

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



Desarrollo de un sistema para la determinación
y cuantificación de sucralosa por HPTLC

Trabajo especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el Br Luis
Zacarias para optar al título
de Licenciado en Química

Caracas, 20 de Mayo, 2015.

Los abajo firmantes asignado por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado:” Desarrollo de un sistema para la determinación y cuantificación de sucralosa por HPTLC”. Presentado por el Br Luis Zacarias, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Jimmy Castillo

Tutor

Dr. Vincet Piscitelli

Jurado

Dr. Hector Gutierrez

Jurado

Yo Profesor Jimmy Castillo, Investigador del Laboratorio o Centro de Investigación de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

” Desarrollo de un sistema para la determinación y
cuantificación de sucralosa por HPTLC”.

Que presenta el Br. Luis Zacarias, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio o Centro de Investigación de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2011 y 2012, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 20 de Mayo de 2015

Dr Jimmy Castillo

Tutor

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo desarrollar una metodología rápida y económica para la cuantificación de *Sucralosa* en muestras por cromatografía plana de alta eficiencia usando una cámara fotográfica y un software de computador. Se describe la metodología utilizada para separar, identificar y cuantificar *Sucralosa*, en un edulcorante comercial conocido como *Sucaryl*, por CPAE, optimización del sistema de revelado y relación entre los solventes de la fase móvil, distribución de luminaria y mejora del montaje para captura de imágenes, edición de imágenes capturadas y obtención de perfiles cromatograficos con el uso de un ImageJ para realizar la cuantificación del analito en muestras reales.

La metodología se fundamenta en la preparación de placas cromatograficas con soluciones patrón y muestras sembradas sobre ella, su posterior revelado, digitalización y posterior análisis para su cuantificación utilizando un programa de computador conocido como *ImageJ*.

El procedimiento de cromatografía en plano se comparó con el método tradicional de cromatografía vertical, presentado buena linealidad en cuantificación de la *Sucralosa* contenida en productos comerciales.

La precisión y exactitud se evaluaron con el *Coefficiente de Variación* y *Error relativo* respectivamente, generando para el nuevo método comparable a cromatografías tradicionales y nuevos métodos acoplamientos para detección.

AGRADECIMIENTOS

La vida con toda su sabiduría y en sus misteriosos caminos me colocó frente a un reto, el cual luego de ser superado me permitió darme cuenta de toda la información concedida a mi formación como persona y químico de esta universidad. A lo largo de este camino, por el cual muchas personas han pasado y muchas otras pasaran, me conseguí con muchos problemas y muchas soluciones.

Los problemas son inevitables, siempre están presentes en cada una de las situaciones que se nos presentan; pero las soluciones no están a simple vista y siempre debes buscarlas arduamente. En mi caso las soluciones a los muchos problemas presentados en mi Trabajo Especial de Grado se vieron acompañados de personas, personas las cuales mágicamente contribuyeron positivamente a este reto e hicieron posible la culminación satisfactoria de esta etapa en mi vida.

Dedicare las siguientes líneas a nombrar a todas aquellas personas que fueron parte de la solución y no del problema, Catherina Zacarias, Alessandro Rita, Hector Garcia, Tony La Rosa, Andreina Ron, Madelein Diaz, Vicmary Vargas, Luis de Freitas, Dayana Cabrera, Ariannais Chitty, Anais Ramirez, Alejandro Febres, Andrés Sequea a todos ellos muchas gracias.

INDICE GENERAL

	Página
1. Introducción	1
1.1 Edulcorantes.....	1
1.2 Sucralosa, Síntesis, hidrolisis y propiedades.....	2
1.3 Cromatografía, historia, características.....	5
1.4 Cromatografía en capa fina.....	6
1.5 Cromatografía en capa fina de alta eficiencia.....	8
1.6 Cromatografía en plano.....	9
1.7 Chip CCD.....	10
1.8 ImageJ.....	10
2. Antecedentes	11
3. Objetivos	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. Parte experimental	16
4.1 Materiales y reactivos.....	16
4.2 Metodología experimental.....	17
5. Resultados y discusión	33

5.1 Sistema de solventes.....	33
5.2 Solución reveladora.....	35
5.3 Evaporación de Metanol.....	37
5.4 Preparación de solución madre, patrones y muestras.....	40
5.5 Preparación de placas de silica.....	40
5.6 Optimización del montaje para captura de imágenes.....	43
5.7 Linealidad de CCFAE Horizontal y Vertical.....	48
5.8 Reproducibilidad y Exactitud.....	59
6. Conclusiones.....	64
7. Recomendaciones.....	65
8. Bibliografía.....	66
9. Apéndice.....	69

INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1. Proporciones de sistema de solventes.....	33
Tabla 2. Evaporación del Metanol - Masa de viales.....	38
Tabla 3. Preparación de solución madre de Sucralosa.....	48
Tabla 4. Preparación de patrones.....	48
Tabla 5. Preparación de muestras.....	49
Tabla 6. Linealidad de CPAE-Horizontal.....	49
Tabla 7. Linealidad de CCPAE-Vertical.....	56
Tabla 8. Comparativa de método cromatográfico.....	58
Tabla 9. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 1.....	59
Tabla 10. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 2.....	59
Tabla 11. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 3.....	60
Tabla 12. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 4.....	60
Tabla 13. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 5.....	60
Tabla 14. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 6.....	60
Tabla 15. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 1.....	61
Tabla 16. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 2.....	62
Tabla 17. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 1.....	70
Tabla 18. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 1.....	70

Tabla 19. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 2.....	70
Tabla 20. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 2.....	70
Tabla 21. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 3.....	71
Tabla 22. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 3.....	71
Tabla 23. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 1.....	71
Tabla 24. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 1.....	71
Tabla 25. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 2.....	72
Tabla 26. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 2.....	72
Tabla 27. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 3.....	72
Tabla 28. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 3.....	72
Tabla 29. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 1.....	73
Tabla 30. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 1.....	73
Tabla 31. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 2.....	73
Tabla 32. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 2.....	73
Tabla 33. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 3.....	74
Tabla 34. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 3.....	74
Tabla 35. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 1.....	74
Tabla 36. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 1.....	74
Tabla 37. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 2.....	75
Tabla 38. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 2.....	75
Tabla 39. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 3.....	75

Tabla 40. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 3.....	75
Tabla 41. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 1.....	76
Tabla 42. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 1.....	76
Tabla 43. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 2.....	76
Tabla 44. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 2.....	76
Tabla 45. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 3.....	77
Tabla 46. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 3.....	77
Tabla 47. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 1.....	77
Tabla 48. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 1.....	77
Tabla 49. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 2.....	78
Tabla 50. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 2.....	78
Tabla 51. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 3.....	78
Tabla 52. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 3.....	78
Tabla 53. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 1.....	79
Tabla 54. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 2.....	79
Tabla 55. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 3.....	79
Tabla 56. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 4.....	79
Tabla 57. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 5.....	80
Tabla 58. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 6.....	80

INDICE DE GRAFICOS

	Pagina
Grafico 1. Evaporación de metanol en vial 1.....	37
Grafico 2. Evaporación de metanol en vial 2.....	38
Grafico 3. Evaporación de metanol en vial 3.....	38
Gráfico 4. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 1	50
Gráfico 5. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 2.....	50
Gráfico 6. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 3.....	50
Gráfico 7. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 1	51
Gráfico 8. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 2.....	51
Gráfico 9. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 3.....	51
Gráfico 10. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 1.....	52
Gráfico 11. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 2.....	52
Gráfico 12. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 3.....	52
Gráfico 13. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 1.....	53
Gráfico 14. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 2.....	53
Gráfico 15. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 3.....	53
Gráfico 16. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 1.....	54
Gráfico 17. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 2.....	54
Gráfico 18. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 3.....	54

Gráfico 19. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 1.....	55
Gráfico 20. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 2.....	55
Gráfico 21. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 3.....	55
Gráfico 22. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 1.....	56
Gráfico 23. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 2.....	56
Gráfico 24. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 3.....	57
Gráfico 25. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 1.....	57
Gráfico 26. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 2.....	57
Gráfico 27. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 3.....	58

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Síntesis de sucralosa a partir de sacarosa.....	2
Figura 2. Acetato-6-sacarosa a partir de sacarosa, acilación.....	2
Figura 3. Cloración del acetato-6-sacarosa.....	3
Figura 4. Obtención de la Sucralosa, desacilación.....	3
Figura 5. Productos de hidrolisis de la Sucralosa.....	3
Figura 6. Separación de una mezcla por cromatografía.....	6
Figura 7. Calculo de R_f en placa de cromatografía capa fina.....	8
Figura 8. Viales con tapa para solución madre y patrones.....	18
Figura 9. Viales con tapa para muestras.....	19
Figura 10. Montaje experimental - Captura de imágenes de las placas de silica.....	21
Figura 11. Software, ImageJ.....	22
Figura 12. Abrir imágenes en ImageJ.....	22
Figura 13. Selección del área de interés de la imagen.....	23
Figura 14.a Selección de “Crop” en el menú.....	23
Figura 14b. Imagen con la herramienta “Crop”.....	24
Figura 15a. Selección de tamaño en el menu.....	24
Figura 15b. Ajuste de valores de tamaño.....	25
Figura 15c. Herramienta “Flatten” en el menu.....	25

Figura 16a. Selección “Brillo/Contraste” en el menu.....	26
Figura 16b. Ajuste de brillo y contraste.....	26
Figura 17a. Selección “Color Threshold” en el menu.....	27
Figura 17b. Sombreado inicial.....	27
Figura 17c. Ajuste del sombreado.....	28
Figura 17d. Selección del área sombreada.....	28
Figura 17e. Nuevo portafolio.....	28
Figura 18. Imagen limpia.....	29
Figura 19a. Selección de imagen en 32bit.....	29
Figura 19b. Imagen en 32bit e inversión de colores.....	30
Figura 20. Obtención de áreas.....	30
Figura 21. Separación del analito y otros compuestos en la muestra.....	33
Figura 22. Placa de CP rotulada.....	40
Figura 23. Placa de CCFAE rotulada.....	40
Figura 24. Montaje inicial.....	42
Figura 25. Adaptación de luces blancas.....	43
Figura 26. Paredes blancas.....	44
Figura 27. Montaje final.....	45
Figura 28. Posición de la placa.....	45
Figura 29. CCFAE-Horizontal – Placa 1. Sembrado triple de M1.....	81
Figura 30. CCFAE-Horizontal – Placa 2. Sembrado triple de M1.....	81

Figura 31. CCFAE-Horizontal – Placa 3. Sembrado triple de M1.....	81
Figura 32. CCFAE-Horizontal – Placa 4. Sembrado triple de M2.....	82
Figura 33. CCFAE-Horizontal – Placa 5. Sembrado triple de M2.....	82
Figura 34. CCFAE-Horizontal – Placa 6. Sembrado triple de M2.....	82

LISTA DE ABREVIACIONES

HPLC = High-performance liquid chromatography

HPTLC = High-performance thin layer chromatography

CLAE = Cromatografía líquida de alta eficiencia

CCF = Cromatografía en capa fina

CCFAE = Cromatografía en capa fina de alta eficiencia

CCD = Dispositivo de carga acoplada

CPAE-CCD = Cromatografía plana de alta eficiencia con detector CCD

DCC = N,N-diciclohexilcarbodiimida

DMF = N,N-dimetilformamida

4-CG = 4-cloro-4-desoxi-D-galactosa

1,6-DCF = 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-D-Fructosa

HAc = Ácido acético

p-TsOH = Ácido para-toluensulfónico

ADU = Unidades de datos Analógicos

s = Desviación estándar

CV = Coeficiente de variación

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la sociedad y los individuos que la conforman enfrentan muchos problemas de salud, problemas generados por el stress, herencia familiar, accidentes, sin embargo la mayoría de estos son debidos a la ingesta diaria de productos artificiales los cuales afectan sus rutinas, entorno social y calidad de vida. Existen muchas organizaciones dedicadas a realizar análisis en los diferentes productos que consumimos continuamente, en estos análisis se logra determinar la cantidad o concentración de cierta especie, la cual debe estar dentro de un margen o rango de concentración permitido por organizaciones gubernamentales en diferentes países para evitar la intoxicación o amenazas para la salud de un individuo.

Este proceso para la determinación de la concentración de una sustancia de interés se le conoce como *cuantificación*, y requiere un análisis químico. Este análisis químico se da en diferentes etapas, una de las etapas se relaciona al equipo que un analista debe utilizar el cual debe estar en óptimas condiciones y cumplir con una metodología apropiada y normada.

Actualmente los edulcorantes son una pequeña porción de los varios compuestos sintetizados por la ciencia, estos son compuestos que permiten disfrutar del sabor dulce en comidas, bebidas y otros productos sin la necesidad de consumir las calorías asociadas a los azúcares de origen natural ⁽¹⁾. El Aspartame, Sacarina, Acesulfamo-K, Neotamo y Sucralosa son los cinco edulcorantes más utilizados y aprobados por la FDA ^(1,2).

La *Sucralosa* es un edulcorante no nutritivo utilizado en una amplia cantidad de alimentos, bebidas, y otros productos ^(1,3). Fue descubierto en 1976 por Shashikant Phadnis, un estudiante de Queen Elizabeth College ⁽⁴⁾. Es obtenida por cloración selectiva de la *Sacarosa*, los principales grupos hidroxilo son sustituidos por átomos de cloro en una reacción de tres etapas ^(1, 2, 6, 7, 8), lo cual genera es un compuesto órgano-clorado, esta clase de compuestos son conocidos por sus efectos dañinos en la salud aún en pequeñas concentraciones ⁽³⁾.

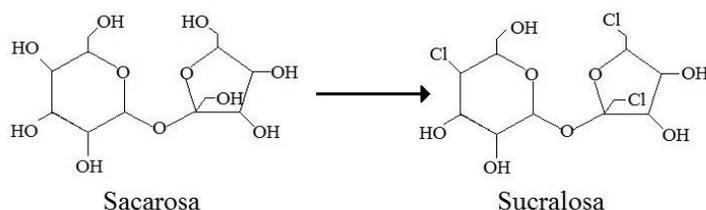


Figura 1. Síntesis de sucralosa a partir de sacarosa ⁽⁸⁾.

La síntesis de la *Sucralosa* a partir de la *sacarosa* se lleva a cabo en tres etapas ⁽⁸⁾, la primera etapa es la acilación de la *sacarosa* para obtener el acetato-6-*sacarosa* con la presencia de un intermediario de reacción,

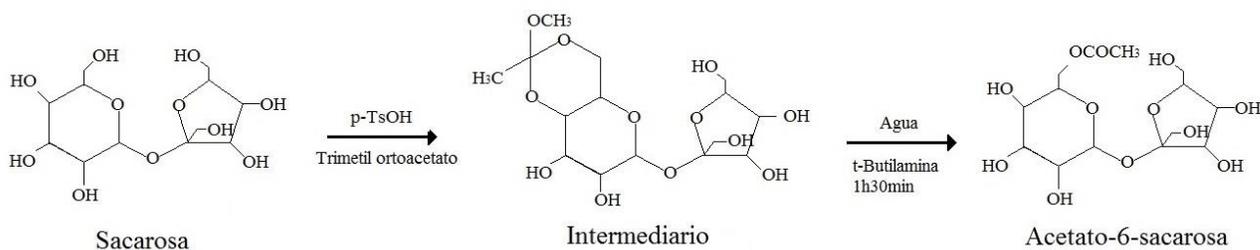


Figura 2. Acetato-6-sacarosa a partir de sacarosa, acilación

El acetato-6-*sacarosa* obtenido es recristalizado con una mezcla acetato de etilo:metanol luego de dejarlo enfriar. La segunda etapa consiste en la cloración del nuevo sustrato,

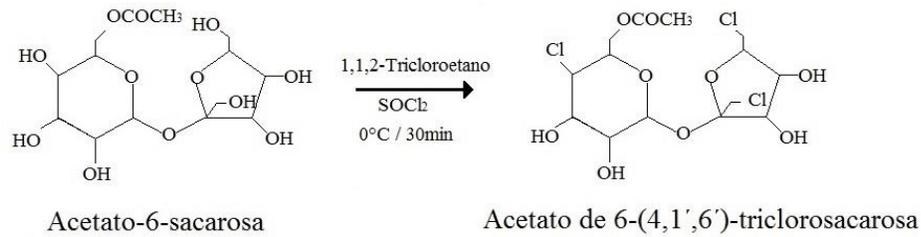


Figura 3. Cloración del acetato-6-sacarosa

Y finaliza con una desacilación en medio prótico.

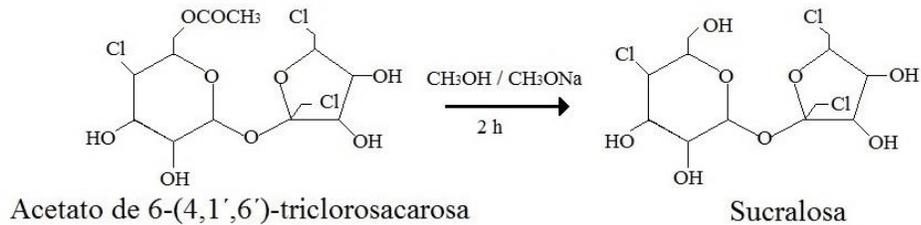


Figura 4. Obtención de la Sucralosa, desacilación

Aunque la *Sucralosa* no es metabolizada por el cuerpo, puede sufrir una hidrólisis generando los siguientes compuestos ⁽⁴⁾:

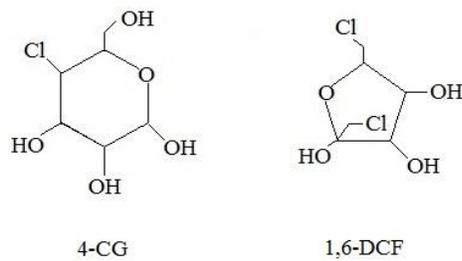


Figura 5. Productos de hidrólisis de la sucralosa

Ambos productos de hidrólisis son excretados por el cuerpo, la 4-CG por el intestino delgado y la 1,6-DCF sufre una reducción a 1,6-dicloroaminnitol y es excretado por la

orina o aglutinado con el tripéptido glutatión. La *Sucralosa* posee varias propiedades físico-químicas, algunas de ellas facilita el almacenamiento de los productos comerciales que la contienen generando un aumentado considerablemente en su uso dentro de la industria alimenticia ^(1,4), estas propiedades se mencionan a continuación:

- Estable en altas temperaturas, en medio ácido y con cambios de pH
- No contiene calorías
- Es insípido, no genera sabor luego de su ingesta
- Es seiscientas veces más dulce que la *Sacarosa* y mantiene el sabor por más de un año
- No interactúa químicamente con otras comidas o ingredientes
- No metaboliza, no interfiere en la asimilación de la glucosa, carbohidratos, secreción de insulina
- El 85% de la *Sucralosa* no es absorbida

Hay estudios realizados en personas que sugieren una mayor respuesta cerebral y corporal al estímulo del sabor dulce generado por la *sacarosa* que la *Sucralosa* al observar directamente el cerebro con un equipo de resonancia magnética nuclear ⁽⁵⁾.

Desde 1999 la *Sucralosa* se comercializa abiertamente como aditivo de diferentes productos de consumo masivo por haber aprobado los análisis realizados por entes gubernamentales como la FDA ⁽⁴⁾, al no conseguir evidencia de daños a la salud. Se comercializa en bebidas carbonatadas y no carbonatadas, refrescos, pastillas de azúcar, vitaminas, medicina, saborizantes, preservantes, mermeladas, salsas preparadas, sirope, postres, vegetales enlatados, productos pasteurizados; y su consumo recomendado por la ADI es de 15mg/Kg peso/día.

Los análisis realizados a la *Sucralosa* suelen variar dependiendo del estudio a realizar. Aquellos enfocados en la cuantificación requieren equipos que implican una gran inversión al adquirirlos y posteriormente implican un gasto continuo en mantenimiento. Por esta razón en este trabajo de grado se buscó unificar diferentes técnicas que existen hoy día para lograr la cuantificación de la *Sucralosa* en muestras reales a bajos costos.

La cromatografía fue la técnica que se implementó en este trabajo especial de grado e involucra los más modernos y sofisticados métodos de separación de mezclas en química, esta técnica se define como la separación de dos o más compuestos diferentes o distribución iónica entre dos fases ⁽⁹⁾. La técnica fue desarrollada por el botánico Mikhail Semenovich Tsvett (1872–1919) en el año 1906 al separar pigmentos presentes en muestras de plantas, eligió el término *cromatografía* procedente de las palabras griegas *khromatos* (color) y *graphos* (escrito) ya que utilizó el término para describir la separación de pigmentos vegetales en distintas zonas coloreadas⁽¹⁰⁾.

Estas dos fases se clasifican en fase estacionaria y fase móvil. La fase móvil, por lo general líquido o un flujo de gas continuo, fluye sobre la fase estacionaria la cual puede ser sólida o líquida. Los componentes establecen un equilibrio dinámico en el cual son removidos de la fase móvil y capturados por la fase estacionaria temporalmente, dependiendo de la afinidad de los componentes con la fase estacionaria y móvil, se reparten en diferentes proporciones según el equilibrio que alcanza cada uno de los compuestos generando bandas de migración.

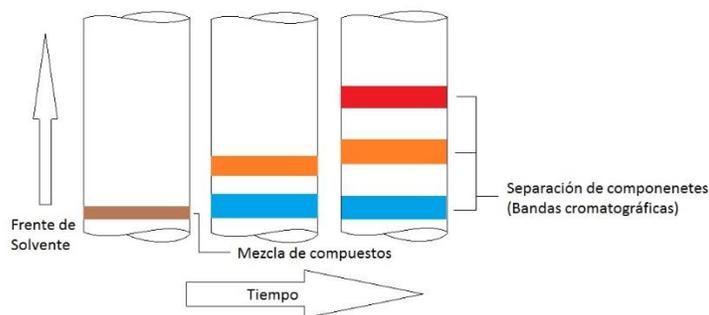


Figura 6. Separación de una mezcla por cromatografía

La afinidad de un compuesto a la fase estacionaria o móvil depende de las interacciones presentes entre ellos las cual pueden ser fuertes o débiles. Estas interacciones, ordenadas de mayor a menor fuerza, son las siguientes ⁽¹¹⁾.

Formación de sales > Compuestos de coordinación > Puentes de hidrogeno > Dipolo-dipolo > Van der Waals ⁽⁹⁾

Los métodos cromatográficos utilizados para la purificación e identificación de mezclas de compuestos son clasificados según la naturaleza de la fase móvil y la fase estacionaria. La cromatografía de columna, de capa fina (cromatografía en capa fina-CCF) y de líquidos (cromatografía líquida de alta eficiencia-CLAE) involucran interacciones en la fase móvil líquida y la fase estacionaria sólida, mientras que la cromatografía de gases (CG) involucra interacciones en la fase móvil gas y la fase estacionaria líquida ^(9, 11).

La cromatografía en capa fina (CCF) surge como una fusión entre la cromatografía de papel y la cromatografía en columna adoptando sus principios y fundamentos debido a las limitaciones de la cromatografía en papel, por el empleo de celulosa como fase estacionaria. Esta es una técnica que permite el análisis simultáneo de muestras y

patrones ⁽¹²⁾, rápida separación, análisis cualitativo de cantidades pequeñas de material y el análisis de mezclas y productos de reacción en macro y micro escala; esta técnica cromatográfica tiene importantes aplicaciones en química, algunas se mencionan a continuación ⁽⁹⁾:

- Determinación de similitud entre dos componentes
- Determinación del número de componentes de una muestra
- Determinación del solvente para la cromatografía en columna
- Monitoreo de la separación en cromatografía en columna
- Comprobar la efectividad de una separación cromatográfica en columna
- Monitoreo de una reacción

La fase estacionaria es una capa de partículas de unos milímetros de espesor fijadas sobre un soporte sólido (generalmente aluminio, plástico o vidrio) ⁽¹²⁾.

La CCF puede ser empleada como criterio de pureza e identificación según el valor negativo del R_f , es decir, si la sustancia incógnita y un patrón con el que se la compara en la misma corrida cromatográfica dan valores de R_f distintos no se trata del mismo compuesto siempre y cuando se controlen diferentes parámetros, como: adsorbente, estructura del soluto, solvente de elución, temperatura y saturación de la cuba ⁽¹³⁾. El término R_f se refiere a relación entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia del frente del solvente, en el cual la distancia recorrida por la sustancia desconocida será la misma, siempre y cuando, estén bajo las mismas condiciones experimentales ⁽⁹⁾.

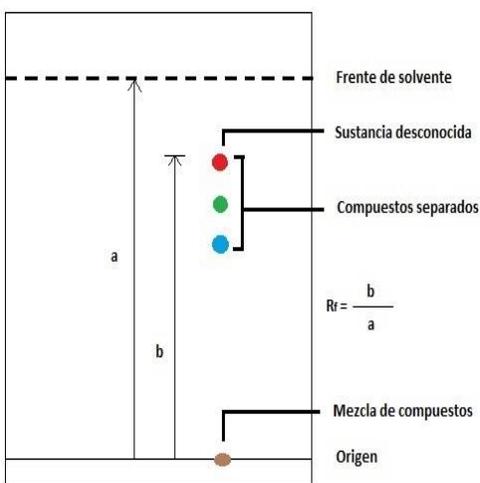


Figura 7. Calculo de R_f en placa de cromatografía capa fina

Para la cromatografía en capa fina los adsorbentes más utilizados son los siguientes ⁽¹⁴⁾:

- Silica gel
- Óxido de aluminio
- Celulosa
- Poliamida
- Kieselgur

La cromatografía en capa fina fue evolucionando en el tiempo, Halpaap (1973) fue el primero en reconocer las ventajas de utilizar partículas de sílice de menor tamaño (5-6 μm) en la preparación de placas de TLC ⁽¹⁵⁾; hoy en día se conoce la cromatografía en capa fina de alta eficiencia (CCFAE) la cual ofrece una mejor separación, nuevos procedimientos para desarrollo de placa y sembrado de muestra ⁽¹⁶⁾. Incorpora varias mejoras respecto a la CCF ^(12,16):

- Menor distancia de migración
- Menor cantidad de fase móvil
- Menor tiempo de análisis
- Adsorbentes similares a la cromatografía en capa fina

- Optimo procesamiento y adquisición de data
- Menor preparación de muestra
- Automatización
- Sistema autónomo
- Optimización completa
- Detección selectiva

Las cuales la convierten en una herramienta analítica poderosa para obtener información de muestras complejas de tipo inorgánico, orgánico e inclusive biomoléculas.

En años recientes ha surgido la cromatografía plana (CP) la cual es un variante de la CCFAE, en esta la fase estacionaria o placa de desarrollo es colocada sobre una superficie plana. La CP conserva las ventajas de la CCF y agrega una mejor relación costo-eficiencia, permite un análisis paralelo de muestras y detección de secuencia, y la fase estacionaria es desechable ⁽¹⁶⁾.

El método más reciente y dominante para la separación y cuantificación de compuestos por CCF es la densitometría de barrido (slit-scanning densitometry), estando limitada por su sistema de detección por absorción o fluorescencia en el UV-Visible. Los videos densitométricos usan barridos electrónicos con digitalizadores de video, fuentes de luz, monocromadores para iluminar la placa y enfocar la imagen a una videocámara CCD. Un montaje simple sin partes móviles aumenta la sensibilidad, prolonga los tiempos de adquisición de data y aumenta la compatibilidad con ella ⁽¹⁶⁾.

Desde hace muchos años los equipos de análisis químico buscan mejorar el sistema de detección, es esta época con la revolución digital no es de extrañarse el

desarrollo de sistemas de detección de esta índole. Surgieron entonces los detectores CCD, estos fueron inventados en 1969 por W.S. Boyle & G.E. Smith, inicialmente utilizados en la astronomía y hoy en día son utilizados ampliamente cámaras digitales, cámaras de videos, scanner, etc. Se describen como chips semiconductores, una de sus caras es rectangular dividida en áreas rectangulares (pixeles) sensibles a la luz. Es posible estimar la cantidad de luz incidente en cada pixel al conocer la cantidad de carga almacenada en él, por lo tanto, la carga acumulada en cada pixel es convertida a un número, en unidades arbitrarias llamadas ADU ⁽¹⁷⁾.

ImageJ es un procesador de imágenes en Java inspirado por NIH Image. Es soportado en cualquier sistema operativo permitiendo mostrar, editar, analizar, procesar, guardar e imprimir imágenes en 8, 16, 32 Bit. Posee una arquitectura abierta para facilitar el uso de “plug-in” creados por el autor u creado por el usuario. El programa permite al usuario su uso para cualquier propósito, estudiar y cambiar el programa como desee, difundir el uso del programa, mejorar y compartir mejoras conseguidas con el programa ⁽¹⁸⁾.

2. ANTECEDENTES

En el año 2004 Maleki y col. ⁽¹⁹⁾ utilizaron una cámara digital con chip CCD como sistema de detección en la determinación simultánea de Al(III) y Fe(III) en aleaciones, utilizaron Cromo Azurol S (CAS) como reactivo cromogénico para generar coloración en soluciones de los metales. Ajustando diferentes condiciones experimentales disminuyeron las interferencias, aumentaron la sensibilidad y selectividad en el análisis y lograron valores de precisión y exactitud satisfactorias. El uso de imágenes digitales abre la posibilidad del aumento del procesamiento vía software de computador y disminuir el consumo de tiempo en análisis espectrofotométricos convencionales.

Para el año 2007 Irish, A. ⁽²⁰⁾ analizó cualitativa y cuantitativamente Nicotinamida y Vanilina por cromatografía en capa fina con digitalmente. Acoplaron a la cromatografía en capa fina una cámara digital CCD y un software de computador como sistema de detección del montaje experimental. Utilizaron una lámpara UV (254nm) para obtener una coloración de cada analito al momento de capturar la imagen. Cada imagen fue separada en los colores base, RGB, y fueron trabajadas por separado. El autor menciona varios parámetros importantes relacionados al montaje, cámara digital e imágenes digitales:

- Apertura del lente
- Velocidad de captura
- Tiempo de exposición
- Zoom
- Ajustes de exposición manual
- Distancia constante entre la fuente de luz y la placa cromatográfica
- Las imágenes en formato JPEG no deben ser re-guardadas.

Para la siembra de la muestra utilizaron micro-pipetas con un volumen máximo, se llenaron a tope y seguidamente se vaciaron sobre la placa en su totalidad. La densidad óptica de los puntos sembrados tiene una relación lineal con la cantidad de muestra en el punto. El método logra disminuir los costos en el análisis y reportar buena linealidad y reproducibilidad.

En 2007 Morlock y col ⁽²¹⁾, cuantificaron por CCFAE la *Sucralosa* presente en bebidas energéticas y deportivas, postres, biscochos y otras matrices. Cada una con placas de silca utilizando dos nuevos reactivos susceptibles a la luz UV (405nm y 500nm) debido a la derivatización. La metodología fue comparada con otros trabajos que utilizaron placas de amino compuestos. El sistema de detección fue densitometría óptica

En 2007 Morlock y col ⁽²²⁾, señala que la CP es una técnica que permite solucionar fácilmente problemas difíciles al analizar una matriz compleja, permite una facilidad en la preparación de la muestra, se puede fusionar con varios sistemas de detección lo cual la convierte en una herramienta muy flexible para aplicarla en el estudio de drogas, pesticidas, micotoxinas, contaminantes, preservativos, lípidos, aminoácidos, carbohidratos, aditivos y pigmentos entre otros. El autor menciona que con los equipos adecuados la CP permite buena sensibilidad en la cuantificación de compuestos y debe considerarse como una herramienta que cumple los estándares nacionales e internacionales manteniéndose como una herramienta económica.

En 2010 Idris y col. ⁽²³⁾ determinaron *Sucralosa* en refrescos, jugos, dulces sin azúcar, edulcorantes por cromatografía en capa fina de alta eficiencia. Utilizaron dos mezclas de solvente como fase móvil para la cromatografía y una mezcla ácida de Rodamina/Ácido Sulfúrico como agente revelador para obtener una coloración particular

de la *Sucralosa* bajo luz UV. La extracción de la *Sucralosa* presente en los productos comerciales se realizó con metanol en un baño ultrasónico para luego ser filtradas y posteriormente sembrarlas en la placa de silica. El método se reportó como simple, rápido, específico, seguro y selectivo al compararlo con otros métodos.

Para el año 2010 Welke, J y col. ⁽²⁴⁾, desarrollaron y validaron un método eficiente, sensible y con buena precisión para la determinación de Ocratoxina A (OTA) en vino utilizando un chip CCD para la captura de imágenes fluorescente de micotoxinas obtenidas en placas de cromatografía de alta eficiencia bajo luz UV a 366nm. Las imágenes capturadas fueron procesadas con el programa ImageJ obteniendo un patrón de intensidades relacionado con las concentraciones respectivas de cada patrón utilizado.

Un año antes, Yang, D y col. ⁽²⁾ separaron y cuantificaron simultáneamente, Aspartame, Sacarina, Acesulfamo-K, Neotamo, Sucralosa, Ciclamato, Alitama y Estevióside, en comidas por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas. Se reportaron coeficientes de correlación (r^2) mejores a 0,998 (n=6), posee alta sensibilidad, especificidad y simplicidad. El autor señala que las diferencias en las propiedades físicoquímicas y electroquímicas de los edulcorantes permitió la determinación simultánea

Existen varios métodos para la cuantificación de *Sucralosa*, en 2011 Gray, K y col. ⁽²⁵⁾, trabajó con otras dos instituciones para cuantificar la *Sucralosa* presente en bebidas no carbonatadas, bebidas carbonatadas, mermelada, yogurt y chocolates confitados por cromatografía líquida en fase reversa con detección por índice de refracción. El autor señala que los valores de HorRat ⁽²⁶⁾ empeoraban mientras la matriz sea más compleja,

los peores resultados reportados en la cuantificación de *Sucralosa* los obtuvo con chocolates confitados.

En 2013 Scoffoni, Ch y col. ⁽²⁷⁾, utilizaron el software ImageJ para cuantificar la estructura y relacionarla a las funciones del arreglo de venas en las hojas. Lograron de medir el área, perímetro, longitud, ancho de hojas con la relación largo:ancho y otros parámetros. También midieron la longitud de venas primarias, secundarias, terciarias y venas menores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Desarrollo de una metodología experimental para la determinación y cuantificación de *Sucralosa* por HPTLC

3.2 Objetivos Específicos

- Optimización del sistema para la separación de sucralosa en muestras reales.
- Digitalización de placas cromatográficas en imágenes y transformación en matriz de intensidades
- Cuantificación de *Sucralosa* en muestras reales.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Metanol
- Cloroformo
- Tolueno
- Ácido Sulfúrico
- Sucralosa
- Edulcorante comercial

Los materiales utilizados fueron los siguientes:

- Placas de silica gel 60F254, 20 x 20 cm de 25mm de espesor soportadas sobre aluminio (Merck)
- Micropipeta 2 μ l
- Papel de filtro "Whatman" 9,0cm
- Cámara de cromatografía plana de capa fina plano y vertical
- Cámara fotográfica Lumix
- Compresor de aire
- Rociador de vidrio
- Luces fluorescentes blancas
- Centrifugador
- Estufa RAYPA
- Balanza analítica
- Bloque de aluminio

4.2 Metodología Experimental

- **Preparación de la cámara de cromatografía de capa fina vertical:** Un bloque de aluminio (de 5x5x15cm) fue perforado por una de las caras de 5cm para crear un hueco de 12cm de largo por 4,5cm de profundidad. Un vidrio fue cortado para obtener láminas y se dispusieron en forma de paralelepípedo sin tapa y usarlo como tapa aislante o capsula de vidrio, fue hecho a la medida del bloque de aluminio pero con una altura de 20cm, y se utilizó en el proceso de cromatografía de capa fina vertical.
- **Preparación de la cámara de cromatografía de capa fina en plano:** Una lámina de vidrio de 0,5mm de espesor fue cortada con las siguientes dimensiones, 25 x 25 cm, posteriormente fue rotulada con una escala en centímetros en el centro del vidrio, creando así un eje de coordenadas. Seguidamente se le colocaron cuatro patas de vidrio de 2mm de espesor y se perforó un hueco en el centro de la lámina de vidrio para colocar una manguera (no susceptible a solventes orgánicos) de 1,0 centímetros de largo.
- **Preparación de la fase móvil:** Con ayuda de un cilindro graduado se midieron volúmenes (ml) de Cloroformo, Metanol, Tolueno en las siguientes proporciones, 5:2:3 respectivamente. Luego se vertieron en un vial debidamente lavado, tapado e identificado.
- **Preparación de solución reveladora:** con ayuda de un cilindro graduado se preparó una solución de ácido sulfúrico/metanol 10%. Se guardó la solución reveladora en un vial con tapa. La solución reveladora fue guardada en el laboratorio de espectroscopia laser lejos de la interacción con el sol.

- **Preparación de solución madre de sucralosa y patrones:** Para lograr la preparación de la solución madre se pesaron dentro de un vial limpio y seco 0,03 gramos de sucralosa (100 +/- 2 %) y luego se disolvieron en 9,00 gramos de metanol, a partir de esta solución madre se pesaron 0,7; 1,1; 1,5; 1,9; 2,3 gramos en diferentes viales para la preparación de los patrones con las siguientes concentraciones aproximadas 900, 1400, 1800, 2400 y 2800ppm respectivamente. Estos patrones se llevaron a un peso final de 3,0 gramos en metanol. Cada uno de estos patrones y la solución madre fueron debidamente tapados y rotulados. Todos los patrones y solución madre fueron guardados en el laboratorio de espectroscopia laser a una temperatura de $T=22^{\circ}\text{C}$ y pesados una balanza analítica.

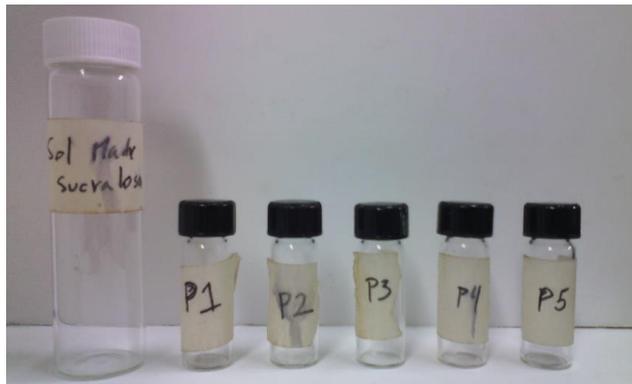


Figura 8. Viales con tapa para solución madre y patrones

- **Preparación de muestras reales:** se pesaron dentro de dos tubos de centrifuga 0,6 gramos de un edulcorante comercial que contiene 1,55% p/p de sucralosa y se realizaron extracciones con un volumen arbitrario de metanol. Se agitó el sólido dentro del tubo centrifuga con el alcohol y fue colocado en la centrifugadora por 1min aproximadamente. Para la primera muestra (M1) el líquido del primer tubo centrifuga fue decantado a un vial luego de cada extracción, procedimiento que fue repetido cuatro veces sucesivas; para la segunda muestra (M2) el líquido del

segundo tubo centrifuga fue filtrado conforme se realizaron las extracciones y recolectado en su respectivo vial con ayuda de un embudo sin tallo, igualmente este procedimiento fue repetido cuatro veces. Culminadas las extracciones se utilizó un volumen de metanol para completar una masa final de cinco gramos en ambas muestras. Los viales fueron debidamente tapados y rotulados. Las muestras fueron guardadas en el laboratorio de espectroscopia laser a una temperatura de $T=22^{\circ}\text{C}$ y pesados con una balanza analítica.



Figura 9. Viales con tapa para muestras

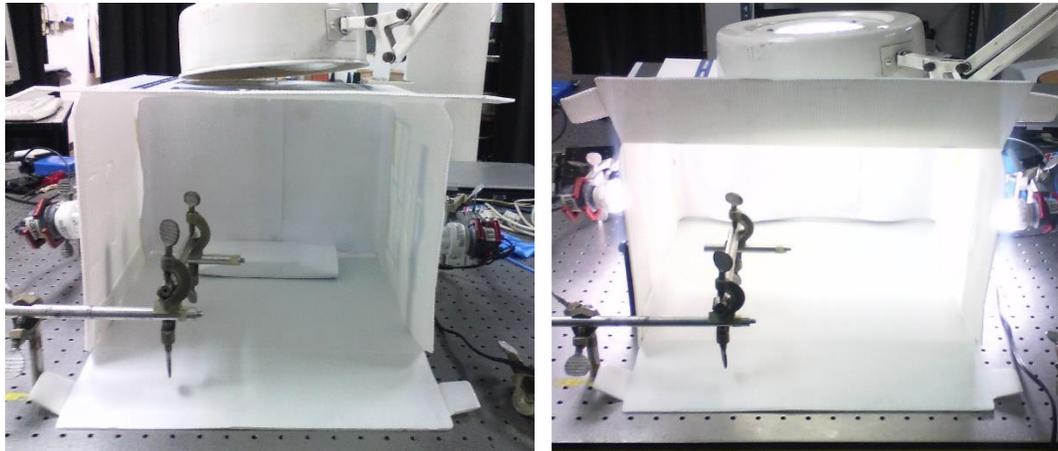
- **Desarrollo cromatográfico en vertical:** las muestras y patrones fueron sembrados, con ayuda de una micropipeta, en diferentes puntos previamente identificados con un lápiz de grafito sobre la placa de silica previamente ajustada a unas dimensiones de 6x5cm. Los puntos se colocaron a una distancia de 0,5cm de los bordes laterales y a 1,0cm del borde inferior y entre ellos, la placa ya preparada se colocó verticalmente en el bloque de aluminio con fase móvil preparado previamente y seguidamente se volvió a tapar con la capsula de vidrio. La fase móvil ascendió por capilaridad sobre la placa de silica hasta alcanzar la distancia de separación para la sucralosa del resto de la muestra, seguidamente se retiró la capsula de vidrio y la placa de silica para evaporar los solventes dentro de la campana de extracción. Una vez la placa de silica estuvo seca fue rociada

con la solución reveladora $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 10% v/v , colocada dentro del rociador de vidrio, ayudados por un compresor de aire. Posteriormente se calentó en la estufa a 115°C por 10 min. Culminado el tiempo se obtuvieron zonas de color marrón oscuro relacionadas a los patrones y las muestras utilizadas.

- **Desarrollo cromatográfico horizontal:** las muestras y patrones fueron sembrados, con ayuda de una micropipeta, en diferentes puntos previamente identificados con un lápiz de grafito sobre la placa de silica previamente ajustada a unas dimensiones de 5x5cm. Los puntos se colocaron a una distancia de 0,8cm del centro de la placa y 45° entre cada punto de siembra, la placa ya preparada se fijó a la base de la cámara de cromatografía con tirro. El vidrio rotulado fue colocado sobre la placa de silica con el eje de coordenadas en el centro de la misma. La fase móvil se cargó en una jeringa y fue liberada a través de la manguera poco a poco, así se evitó la formación de charcos sobre la silica. La fase móvil al tocar la placa de silica se desplazó radialmente desde el centro de la placa hacia los extremos de la misma. Una vez alcanzada la distancia de separación para la sucralosa del resto de la muestra se retiró el material de vidrio y se dejaron evaporar los solventes dentro de la campana de extracción. Una vez seca la placa de silica se despegó de la base y fue rociada con la solución reveladora $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 10% v/v , preparada y colocada previamente dentro del rociador de vidrio, ayudados por el compresor de aire. Posteriormente se calentó en la estufa a 115°C por 10 min. Culminado el tiempo se obtuvieron zonas de color marrón oscuro relacionadas a los patrones y las muestras utilizadas.
- **Montaje para la captura de imágenes:** Haciendo uso del material presente dentro del laboratorio de espectroscopia laser se fijó en sus extremos una caja blanca semitransparente a un mesón del laboratorio, fue iluminada por tres bombillos de luz blanca, uno en la cara superior y otros dos en las caras laterales. Dentro de la

caja fue colocada una hoja blanca de papel bond y se acomodó una base para mantener una cámara fija a una altura constante.

- **Captura de imágenes:** La cámara digital se fijó dentro del montaje y fueron tomadas tres fotos sucesivas de cada placa de silica revelada, las fotos fueron tomadas utilizando el temporizador ajustado a dos segundos. A continuación se ilustra el montaje utilizado para la captura de imágenes,



a) Sin iluminación

b) Con iluminación

Figura 10. Montaje experimental - Captura de imágenes de las placas de silica

- **Procesamiento de imágenes:** Las imágenes obtenidas en cromatografía vertical y horizontal fueron cargadas en un programa de computador de libre acceso conocido como "ImageJ". Las imágenes de cada cromatografía fueron procesadas análogamente, de las excepciones hechas se hará mención.

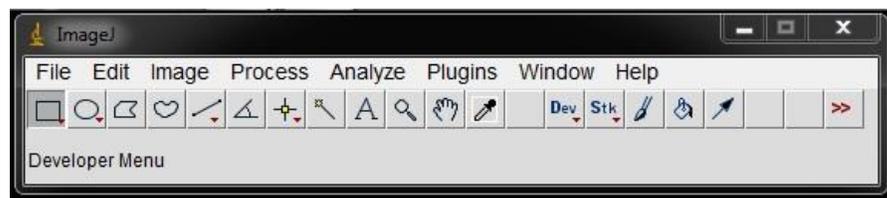


Figura 11. Software, ImageJ

ImageJ permitió obtener patrones de intensidad relacionados a los patrones y muestras la imagen capturada la placa de silica revelada. El procedimiento se realizó varios pasos contenidos en dos etapas, a continuación cada uno de los pasos de cada etapa es ilustrado gráficamente:

- **Primera Etapa - Edición de imagen**

- Cada imagen a ser analizada se abrió con ImageJ para seleccionar el área de interés que contiene los patrones y muestras en esta imagen.

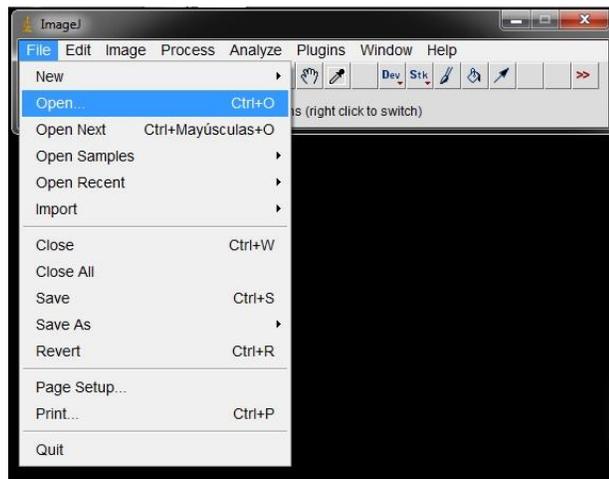


Figura 12. Abrir imágenes en ImageJ

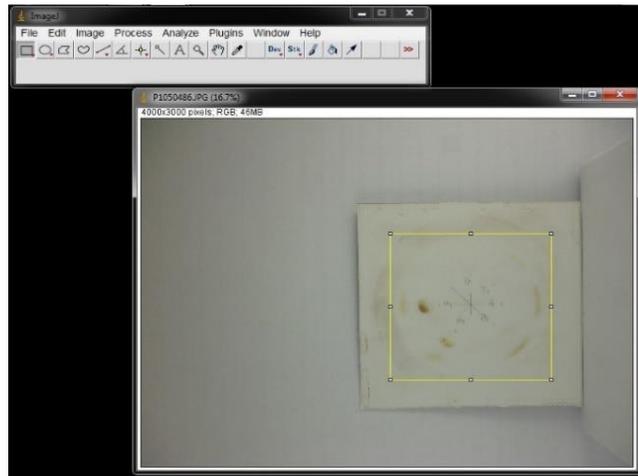


Figura 13. Selección del área de interés de la imagen

- La selección de la imagen fue cortada con una herramienta llamada “Crop” (ruta: Image - Crop) la cual coloca la selección de la imagen ampliada en un nuevo archivo automáticamente ⁽⁹⁾.

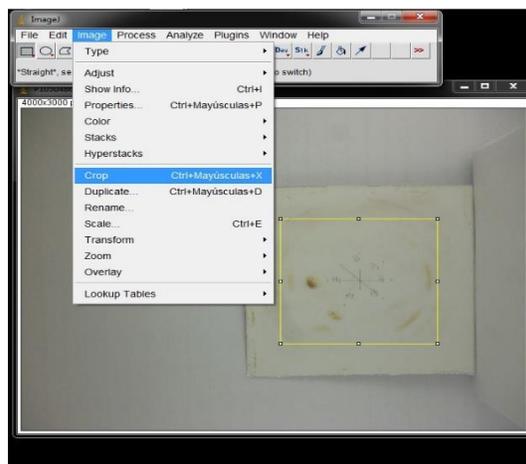


Figura 14.a Selección de “Crop” en el menú

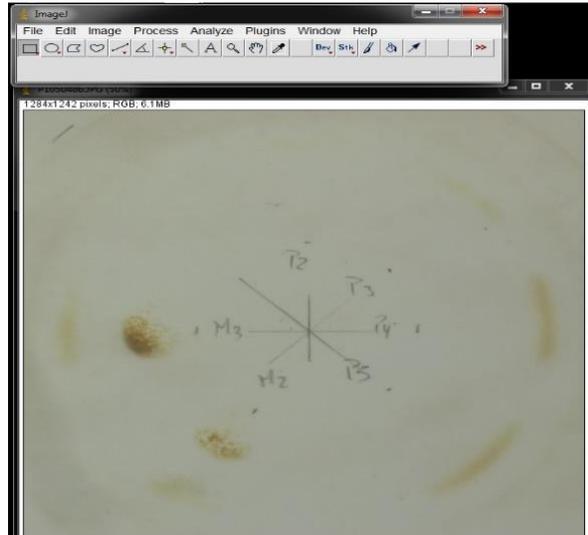


Figura 14b. Imagen con la herramienta “Crop”

- Seguidamente se ajustó el tamaño de la selección y se le aplicó la herramienta “Flatten” (ruta: Image - Overlay - Flatten) la cual genera una nueva imagen.

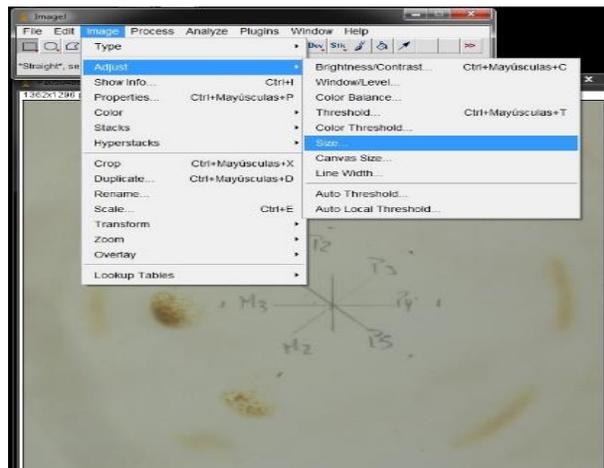


Figura 15a. Selección de tamaño en el menú

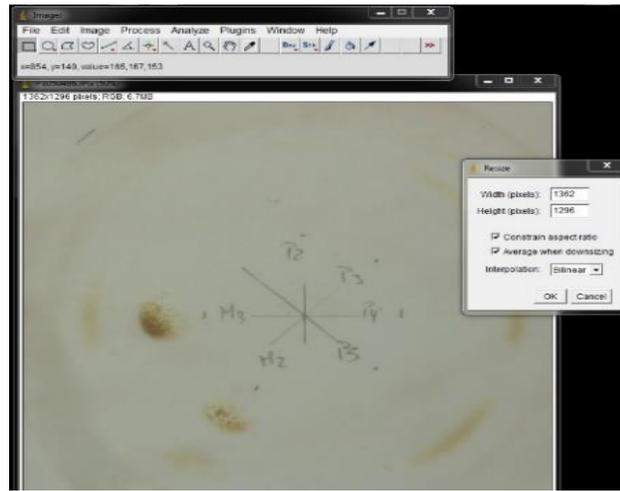


Figura15b. Ajuste de valores de tamaño

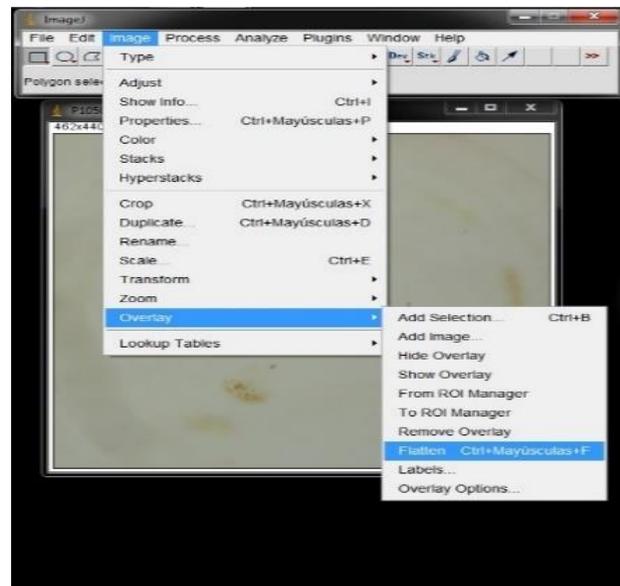


Figura 15c. Herramienta “Flatten” en el menú

- A esta nueva imagen se le ajustó el brillo y contraste (ruta: Imagen – Adjust - Brightness/Contrast) para realzar la intensidad de las zonas relacionadas a los patrones y muestras.

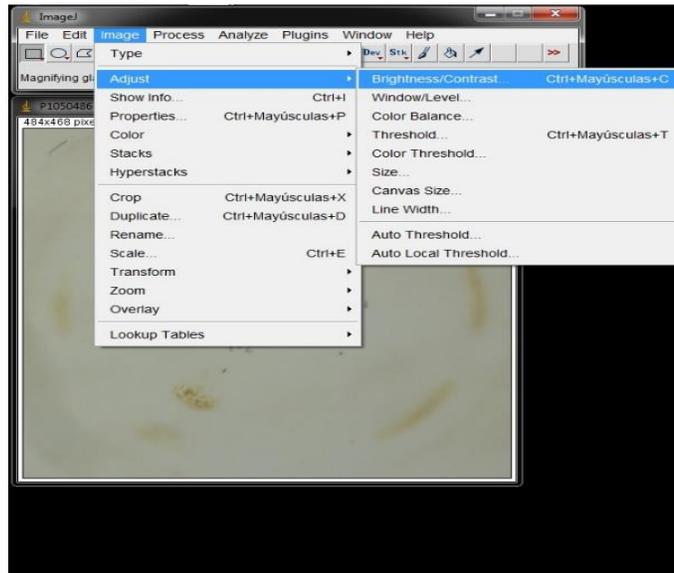


Figura 16a. Selección “Brillo/Contraste” en el menú

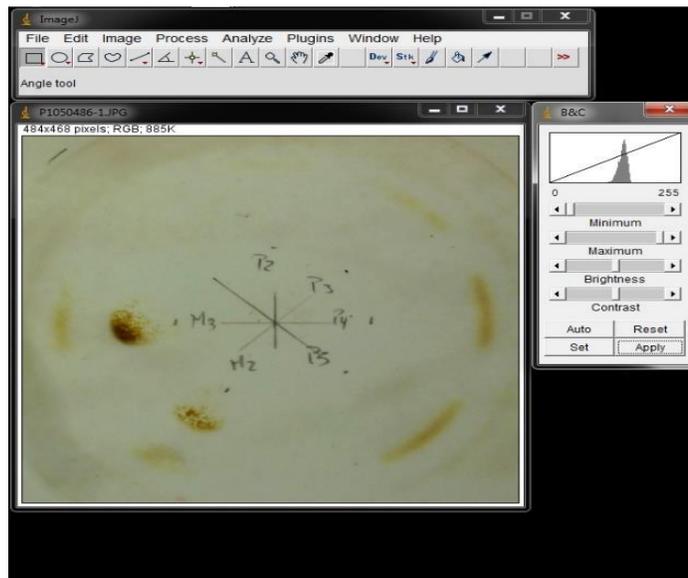


Figura 16b. Ajuste de brillo y contraste

- Este ajuste en brillo/contraste permitió aumentar la intensidad de las zonas de interés en las imágenes de ambas técnicas cromatográficas empleadas. Para ambas técnicas cromatográficas se realizó la extracción de estas

zonas referidas al analito con la herramienta “Color Threshold”, la cual al aplicarla sombrea parcialmente la imagen, ajustando los parámetros de la herramienta se pudo lograr seleccionar las zona relacionadas a patrones y muestras y descartar el resto de la imagen. A continuación la selección deseada se cortó y pego en una nuevo proyecto con la ayuda de la herramienta “Internal Clipboard”.

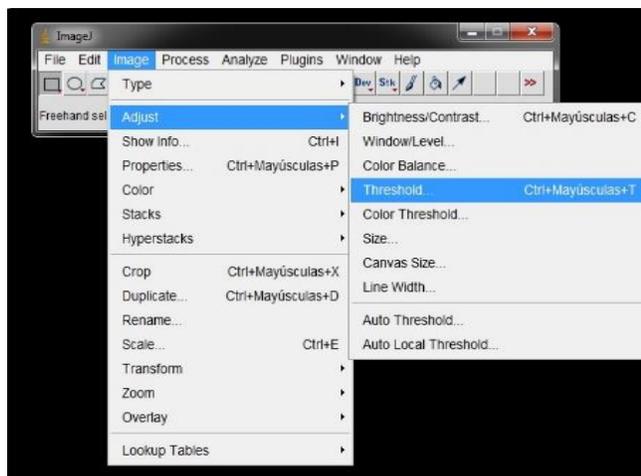


Figura 17a. Menú del programa

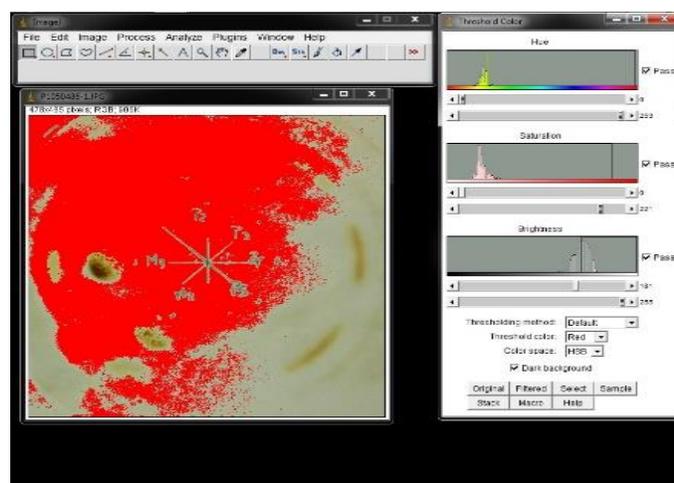


Figura 17b. Sombreado inicial

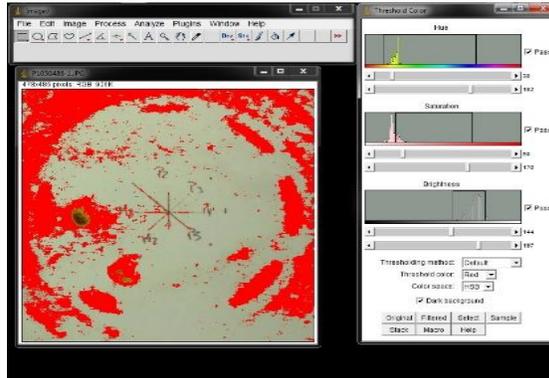


Figura 17c. Ajuste del sombreado

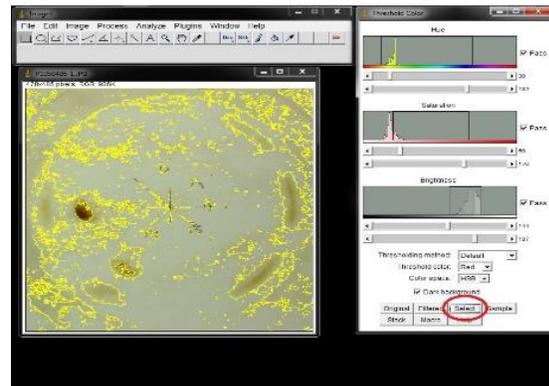


Figura 17d. Selección del área sombreada

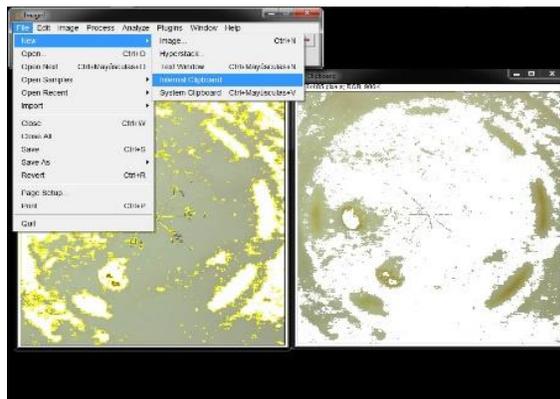


Figura 17e. Nuevo portafolio

Figuras. Etapas de la herramienta “Color Threshold” & “Internal Clipboard”

- A esta nueva imagen se le removieron los retazos remanentes de la imagen anterior y se continuó con la edición.

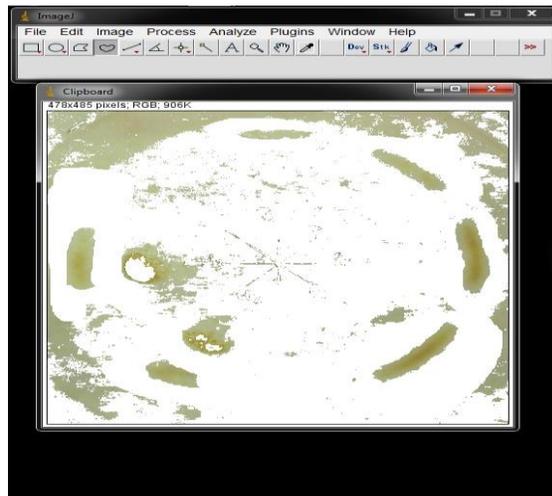


Figura 18. Imagen limpia

- A esta imagen limpia se le eliminaron los colores llevándola a 32bits (ruta: Image - Type - 32Bit) y seguidamente se invirtieron los colores (blancos a negros y los negros a blanco) (ruta: Edit - Invert).

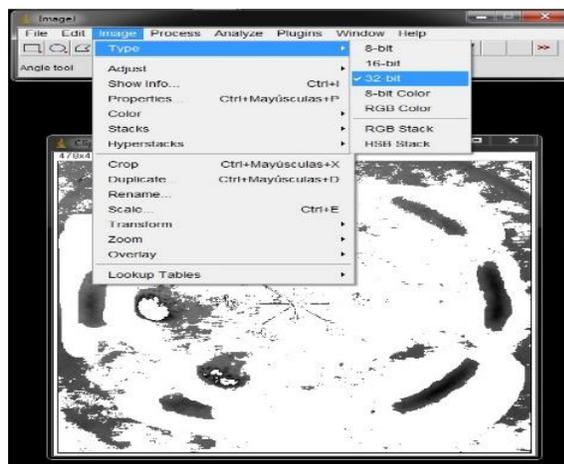


Figura 19a. Selección de imagen en 32bit



Figura 19b. Imagen en 32bit e inversión de colores

Para la segunda etapa las imágenes cromatográficas desarrolladas horizontal y verticalmente se trabajaron de diferente manera con el software. El procedimiento para cada caso se describe a continuación.

- **Segunda Etapa - Obtención de áreas**

- Para la cromatografía horizontal fueron sombreadas cada una de las zonas asociadas al analito con la selección lineal del programa, esta línea se utilizó en su versión ancha.
- Una vez ubicada la zona de interés se generó su gráfico para visualizar la banda cromatográfica (Analyze - Plot profile) y generar los datos relacionados a ella los cuales fueron copiados en una hoja de Excel.
- Este procedimiento se repitió para cada patrón y muestra presente en la placa horizontal. Toda la data fue almacenada y analizada posteriormente.

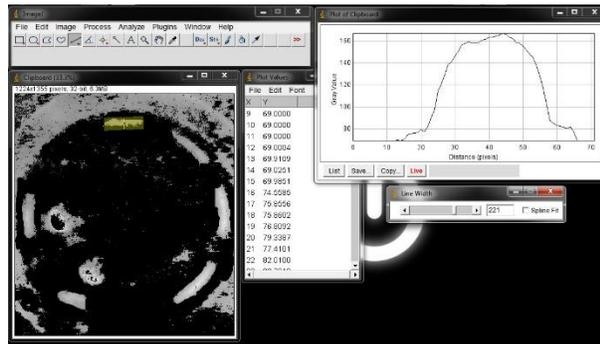


Figura 20. Obtención de áreas

- Para la cromatografía en vertical, se ubicaron las zonas de interés de la imagen obtenida en la primera etapa y se aplicó la herramienta “Gel” sobre el primer punto para obtener un perfil inicial, los demás perfiles se obtuvieron sucesivamente como perfiles secundarios. Al tener la selección completa de todas las zonas se aplicó la herramienta “Plot Lines” y De esta manera se obtuvo una banda característica de cada zona marcada sobre la placa.
- Una vez obtenido este conjunto de bandas se fijó el “piso” de cada gráfico y se utilizó la herramienta “Magic wound” para obtener los valores del área bajo la curva relacionado a cada banda.

Luego de recibir el tratamiento descrito anteriormente y haber generado las bandas cromatográficas, los valores del área bajo la curva asociados a cada patrón y analito presente en la placa fueron sumados. Con estos valores se obtuvieron curvas de calibración para cada una de las placas de silica trabajadas y se realizó la cuantificación de la *Sucralosa* presente en las muestras reales.

En líneas generales el procedimiento experimental inició con la preparación de las soluciones patrón a partir de la solución madre y muestras (M1 y M2), estas muestras fueron sembradas sobre las placas de CCFAE con ayuda de una micropipeta para su elución vertical y horizontal. Seguidamente se dejaron secar los solventes de la fase móvil para continuar con el rociado de la placa con la solución reveladora y luego del calentamiento en la estufa obtener las zonas oscuras relacionadas a la *Sucralosa*.

De cada placa revelada se tomaron tres fotografías, cada una de ellas fue trabajada con el programa ImageJ para lograr obtener una relación de intensidades respecto a la concentración de cada solución. Con esta información se realizaron curvas de calibración para determinar la concentración de *Sucralosa* presente en cada muestra.

En cada placa fueron sembrados tres puntos de cada muestra, fueron utilizadas tres placas para la primera muestra y tres placas para la segunda muestra. Con este sembrado se pudo realizar el tratamiento estadístico para conocer la precisión del método desarrollado.

Antes de comenzar con el estudio cromatográfico se hizo un estudio sobre la evaporación de metanol en el tiempo bajo las condiciones del laboratorio de espectroscopia laser.

Se utilizaron tres patrones a los cuales se les tomó el peso por un período de tres meses. Los patrones estaban contenidos en viales debidamente tapados. Al culminar el estudio todos los patrones fueron preparados nuevamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo del Trabajo Especial de Grado, abordando los siguientes aspectos: composición de la fase móvil, concentración de la solución reveladora, evaporación del metanol en el tiempo, preparación de patrones, muestras y su desarrollo sobre la placa de sílica en CCFAE en vertical y horizontal, montaje experimental e iluminación, captura de imágenes de las placas, edición de imágenes con el software ImageJ, banda cromatográficas generadas por el software, cuantificación.

5.1 Sistema de solventes.

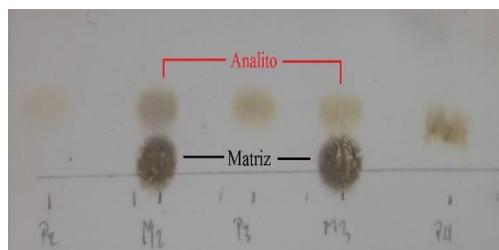
El sistema de solventes constaba de Cloroformo:Metanol:Tolueno los cuales se mezclaron inicialmente con proporciones de referencia y luego se ajustaron las proporciones según los resultados obtenidos en CCFAE:

Tabla 1. Proporciones de sistema de solventes

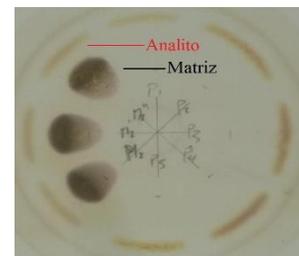
Proporciones Cloroformo:Metanol:Tolueno	Observaciones
5:3,5:1,5 ⁽²³⁾	El compuesto es arrastrado con el frente de solvente. No hay separación.
4,5:3,5:2	El compuesto no se desplaza considerablemente del punto de siembra
5:2:3	La distancia de recorrido fue la necesaria para obtener una separación óptima.

Con la proporción 5:3,5:1,5⁽²³⁾ el analito recorrió entre siete y ocho centímetros sobre la plata separándose debidamente de los otros compuestos del edulcorante. Las proporciones 4,5:3,5:2 no nos permitieron separar el analito de otros compuestos presentes debido a que la distancia recorrida fue mínima, por lo cual se decidió ajustar las proporciones de los solventes.

Por último se buscó disminuir el recorrido del analito procurando garantizar la separación y con esto disminuir los costos, tiempo de análisis, etc; las proporciones de cada solvente fueron ajustadas a 5:2:3 y se logró disminuir la distancia recorrida por el analito a 1,1-1,2cm y garantizar su separación de los demás compuestos presentes en la muestra que se desplazaron hasta los 0,7-0,9cm. Una vez obtenida la composición de la fase móvil más adecuada se realizaron ensayos con las placas de silica en plano; una placa representativa sembrada, desarrollada y revelada con los patrones y muestras se muestra en la siguiente imagen.



a) Cromatografía vertical



b) Cromatografía horizontal

Figura 21. Separación del analito de otros compuestos en la muestra.

5.2 Solución reveladora

Inicialmente la solución reveladora era una mezcla alcohólica de Rodamina B/Etanol 0,25% v/v que permitiría ver el analito con luz UV ⁽¹⁰⁾, sin embargo esta solución coloreaba excesivamente la placa impidiendo distinguir los puntos de los patrones y muestras del color obtenido. La mezcla se preparó a diferentes concentraciones sin poder disminuir la saturación de color sobre las placas, por esta razón se decidió cambiar por otro agente revelador, una mezcla Metanol/Ácido Sulfúrico ⁽²⁸⁾ que permitió obtener puntos visibles al colorear sutilmente la *Sucralosa* presente de color marrón.

La solución reveladora fue necesaria debido a que el analito no genera coloración sobre la placa luego de desarrollarla. El estudio cualitativo se realizó para ajustar las proporciones de la mezcla de solventes de nuestro sistema y los parámetros relacionados al revelado de la placa, estos parámetros son:

- Concentración de la solución reveladora
- Temperatura de estufa para revelado
- Tiempo de calentamiento
- Distancia de separación del analito respecto a la matriz
- Distancia de elución mínima necesaria para la separación

Se prepararon placas de silica con los patrones y muestras de referencia para la elución vertical, seguidamente fueron rociadas por la solución reveladora. La solución reveladora se preparó a una concentración de 20%v/v, se calentó la placa a 120°C por un tiempo de diez minutos. Esta combinación generó un revelado excesivo sobre las zonas de interés ocasionando manchas en lugar de puntos oscuros.

Se procedió a disminuir la temperatura y tiempo de calentamiento, se trabajó a 110°C por cinco minutos con la misma concentración de la solución reveladora. Las placas de sílica obtenidas presentaron una ligera mejora, la solución reveló bien las zonas de interés pero generaba manchas aleatorias no deseadas sobre toda la placa. Por esta razón se decidió disminuir la concentración de la solución reveladora a 15%^{v/v} y mantener la misma temperatura y tiempo de calentamiento.

Esta nueva configuración generó zonas oscuras muy débiles sobre la placa de sílica dificultando la visualización de todos los patrones sembrados. A continuación se decidió aumentar la temperatura de calentamiento a 115°C y sin variar el tiempo de calentamiento ni la concentración de la solución reveladora, con esta nueva configuración se obtuvieron zonas oscuras con la intensidad moderada. Sin embargo se probó con una concentración de 10%^{v/v}. La placa se dejó por un mayor período de tiempo, luego de diez minutos la placa se reveló de manera deseada, con las zonas oscuras relacionadas a los patrones y muestras sembradas bien definidas, y ausencia de manchas aleatorias.

Se encontró que la concentración de la solución reveladora tiene dependencia con la temperatura y tiempo de calentamiento de la placa. La combinación óptima de estas variables fue una concentración Metanol/ Ácido sulfúrico de 10%^{v/v}, una temperatura fija en 115°C y diez minutos de calentamiento de la placa en la estufa.

Inicialmente la solución reveladora era rociada utilizando un sistema mecánico plástico para la succión y expulsión de la misma, este dispositivo permitía un rociado tosco y ocasionaba la caída de gotas sobre la placa de sílica. Las zonas del analito sobre la placa no eran reveladas homogéneamente, ya que el agente revelador no se convertía

en nube o rocío. Estas situaciones nos llevaron a cambiar de dispositivo para el rociado de la muestra.

Se utilizó un rociador de vidrio, fabricado en el Taller de Vidrio de la facultad de ciencias, cuyas características que permitieron la formación de una nube del agente revelador gracias a un flujo de aire constante que expulsaba la solución.

En flujo de aire debido a un compresor de aire resulto muy intenso y dificultaba inmensamente el procedimiento de rociado, ocasionaba que la placa se moviera al momento de rociarla inclusive estando sobre una base.

Debido a esto se utilizó un compresor de aire pequeño, este generaba un flujo de aire de muy baja presión sin disminuir la calidad del rociado al generar la nube de la solución reveladora. El vidrio brindó la ventaja de evitar cualquier tipo de reacción entre los solventes que componen la solución reveladora y el contenedor.

5.3 Evaporación de Metanol

El grado de evaporación del metanol se determinó pesando, por triplicado, en una balanza analítica ($\pm 0,0001g$) los viales de cada patrón en rangos de tiempo variables pero tomando las medidas de cada día en horas similares entre ellas. La temperatura del entorno fue constante e igual a $22^{\circ}C$. Los valores de la masa de cada uno de los tres viales se resumen en la siguiente tabla, el valor reflejado es el promedio de tres pesadas realizadas con cada uno de los viales,

Tabla 2. Evaporación de metanol - Masa de viales

T=22°C	Fecha	Vial 1 (g)	Vial 2 (g)	Vial 3 (g)
1	19-nov	28,1575	7,5634	9,1576
2	20-nov	28,1562	7,6026	9,1576
3	21-nov	28,1559	7,5540	9,1544
4	23-nov	28,1560	7,5495	9,1524
5	25-nov	28,1543	7,5405	9,1522
6	26-nov	28,1539	7,5373	9,1493
7	04-dic	28,1503	7,5318	9,1477
8	14-dic	28,1404	7,5164	9,1304
9	12-ene	28,1300	7,4893	9,1132

Al ver la masa de cada vial en una escala temporal se puede observar la tendencia a la pérdida de peso,

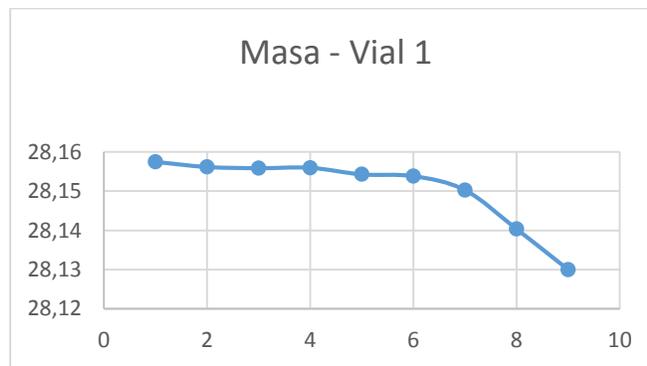


Gráfico 1. Evaporación de metanol en vial 1

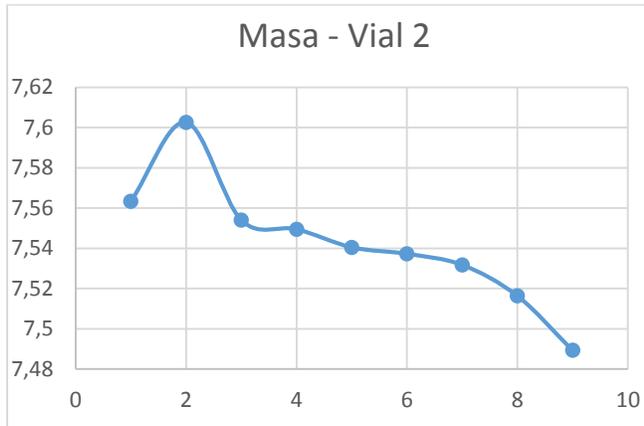


Gráfico 2. Evaporación de metanol en vial 2

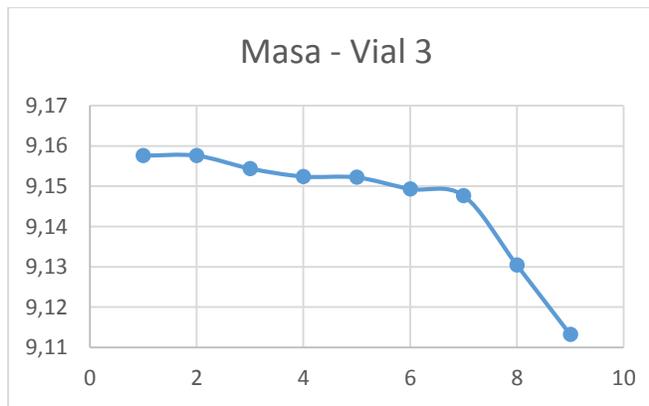


Gráfico 3. Evaporación de metanol en vial 3

Esta tendencia se traduce en un aumento irremediable en la concentración de cada patrón utilizado. Con esta información se puso como plazo máximo 10 días como tiempo de trabajo con cada solución, luego las soluciones preparadas eran descartadas. En este estudio el valor de las concentraciones de cada patrón fueron de referencia.

5.4 Preparación de solución madre, patrones y muestras

La solución madre fue preparada a partir de *Sucralosa*, polvo de color blanco, según la metodología descrita previamente. La solución madre, los patrones y las muestras fueron preparados por pesada en una balanza analítica (+/- 0,0001) debido a que el metanol utilizado como solvente es volátil.

De la solución madre se pesaron diferentes alícuotas para preparar cada uno de los patrones utilizados, luego de tomada cada alícuota los patrones se llevaron a una masa final. Las muestras fueron pesadas y recolectadas según el procedimiento descrito en la parte experimental, la cantidad teórica de *Sucralosa* presente en el edulcorante comercial es de 1.55% P/p. Cada patrón, muestra y solución madre fueron pesados en la balanza analítica antes y después de su uso, de esta manera se controlaba la variación en la concentración por evaporación del solvente.

Inicialmente las soluciones preparadas en material de vidrio fueron contaminadas con agua condensada por las temperaturas del entorno, todo esto por no disponer de tapas con rosca que son las más adecuadas. El agua presente generaba un exceso de color al revelar las placas de silica, estropeando todo el análisis. Por esta razón no se utilizó material de vidrio.

5.5 Preparación de placas de silica

Para la cuantificación por CCFAE-Horizontal se cortaron placas de silica en dimensiones de 5x5cm, haciendo uso de una regla se ubicó el centro de cada placa de silica y con un lápiz de grafito se marcaron los puntos de siembra a una distancia de

0,8cm del centro de la placa. En general, las placas de silica utilizadas en CCFAE-Horizontal se veían de la siguiente manera,

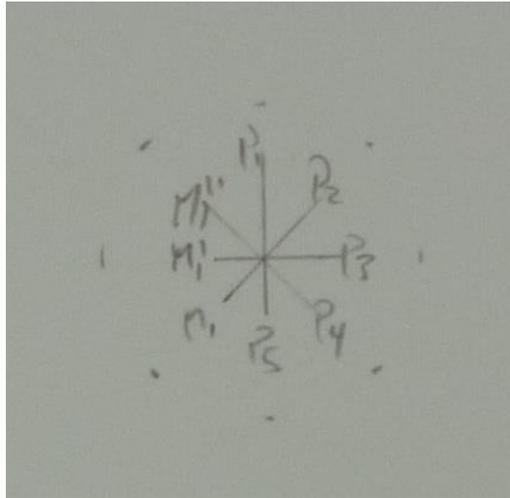


Figura 22. Placa de CCFAE-Horizontal rotulada

Para la CCFAE-Vertical se cortaron placas de silica con unas dimensiones de 6x5cm, igualmente los puntos de siembra para los patrones y muestras fueron marcados con un lápiz de grafito a una distancia de 0,5cm de los bordes laterales, 1,0cm del borde inferior y entre cada analito. En general, las placas de silica utilizadas en CCFAE-Vertical se veían de la siguiente manera,

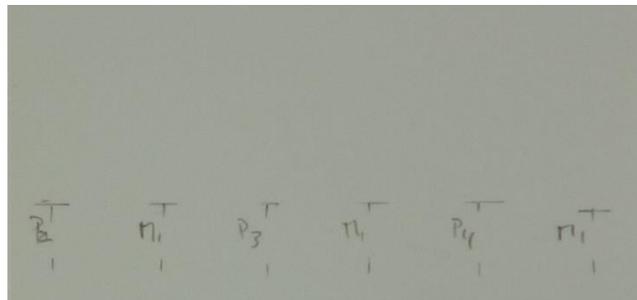


Figura 23. Placa de CCFAE-Vertical rotulada

Cada vial de cada solución fue destapado uno por uno para tomar una pequeña alícuota con una micropipeta de 2µl y sembrar todos los puntos requeridos en las placas, una gota de cada solución sobre su respectivo punto fue más que suficiente para llevar a cabo ambos desarrollos cromatográficos, luego de sembrada cada punto de las soluciones fue tapado cada vial. A continuación cada placa preparada se colocó en su respectiva cámara de desarrollo (vertical u horizontal) y se procedió con el procedimiento de elución descrito en la parte experimental.

La CCFAE-Horizontal se comenzó con mayor facilidad, una vez las soluciones respectivas estuvieron sembradas la placa fue colocada dentro de la cámara de desarrollo y se procedió al desarrollo cromatográfico.

En el caso de la CCFAE-Vertical fue necesario esperar a que la fase móvil generase la atmósfera del sistema de solventes dentro de la cámara de desarrollo, lo cual implica mayor tiempo en la cromatografía. Ambas técnicas permiten una elución en tiempos cortos y similares, pero la CCFAE-Vertical requiere una preparación previa lo cual se traduce en tiempo de espera.

Todas las placas de silica fueron cortadas manualmente, algunas de ellas perdían pequeños fragmentos de los bordes durante este procedimiento. Esta situación afectaba directamente a la CCFAE-Vertical debido a que la interacción con la fase móvil ocurre a través de los bordes de la placa, cualquier anomalía implica una elución indebida. Para el caso de la CCFAE-Horizontal la elución ocurre desde el centro de la placa hacia los bordes, gracias a la distancia del recorrido la pérdida de silica en los extremos no perjudica a la CCFAE-Horizontal.

Por otro lado, la cantidad de soluciones sembradas sobre las placas fue diferente. La CCFAE-Horizontal permitió sembrar cinco patrones y el respectivo triplicado de la muestra, mientras que la CCFAE-Vertical permitió sembrar tres patrones y el triplicado de la muestra. Es decir, la CCFAE-Horizontal permitió el desarrollo de un mayor número de soluciones, en este caso ocho soluciones simultáneas mientras que la CCFAE-Vertical solo permitió trabajar con seis soluciones simultáneamente.

Una vez la placa de silica fue desarrollada se dejó secar y se procedió a su revelado. A continuación la placa se llevó a la estufa, la cual fue previamente ajustada a la temperatura deseada para generar las zonas oscuras debidas al analito y así culminar la preparación de la placa de silica para la captura de imágenes.

5.6 Optimización del montaje para captura de imágenes

Inicialmente el montaje experimental para la captura de imágenes constaba de una cámara fotográfica ajustada a una altura constante la cual era iluminada por la luz del laboratorio según se describe en la siguiente figura,



Figura 24. Montaje inicial

Este montaje inicial generaba muchas sombras en las imágenes tomadas de las placas, incluida la sombra generada por la misma cámara. Estas sombras entorpecían los valores obtenidos vía software del analito perjudicando todo el análisis, se decidió adjuntar al montaje dos bombillos de luz blanca los cuales se fijaron a una altura con ayuda del material del Laboratorio de Espectroscopia Laser.

Las luces blancas se fijaron al mismo nivel de la cámara fotográfica, estas permitieron eliminar las sombras debidas a la luz del techo y reforzar la luz del ambiente según se describe en la siguiente imagen,



Figura 25. Adaptación de luces blancas

Un nuevo problema surgió por la saturación de la luz blanca sobre la placa, solo perceptible al momento de editar las imágenes. El software no nos permitió solucionar esta situación digitalmente,

Esta complicación conocida como “imagen sobre-expuesta” nos llevó a buscar una manera de difundir equitativamente sobre toda la placa la luz generada por los bombillos. Se ajustaron al montaje tres cuadrados de color blanco sólido perpendiculares entre ellos según se describe en la siguiente imagen.



Figura 26. Paredes blancas

De esta manera se logró que la luz rebotara e iluminara toda el área de trabajo. Al momento de la captura de las fotos se alternaron un fondo blanco y un fondo negro bajo la placa de silica para estudiar el efecto de la luz reflejada al obturador de la cámara.

Aunque se logró homogenizar la iluminación de las paredes blancas los bombillos aun generaban mucha intensidad directa sobre la placa, lo cual se capturaba en las imágenes. Esta situación se conoce como “luz dura” la cual nos llevó al montaje final. El fondo blanco y negro no generaba mejoras perceptibles al momento de la edición y cuantificación de las soluciones, por lo cual se decidió mantener el fondo blanco para tener mayor reflexión de la luz dentro del montaje.

En este montaje se fijó una caja blanca plástica de textura corrugada semitransparente que permitió el paso de la luz a través de sus paredes con menor intensidad, todo este nuevo sistema se colocó sobre la mesa de trabajo del laboratorio según se describe en la parte experimental y se ilustra en la siguiente imagen,

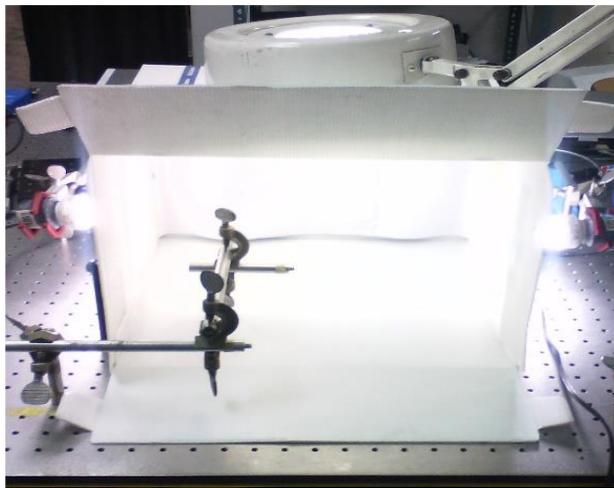


Figura 27. Montaje final

La placa fue colocada verticalmente sobre el fondo de la caja para obtener una luminosidad homogénea y la cámara fotográfica en frente de la placa de sílica según se describe en la siguiente figura,



Figura 28. Posición de la placa

Con este montaje se realizaron tres capturas de cada placa de sílica preparada, estas imágenes fueron cargadas en el programa de computador para su edición y posterior cuantificación.

El procedimiento para la edición de las imágenes tuvo sus respectivas mejoras con la evolución del trabajo. Se estudiaron los efectos de varias herramientas del programa sobre las placas, diferentes vías para seleccionar las regiones sobre la imagen que se deseaban analizar y las maneras que ofrece para generar patrones de intensidad en función de las regiones deseadas.

De toda esta experiencia, el procedimiento descrito en la parte experimental fue el que permitió obtener los mejores resultados al relacionar los valores del área bajo la curva de los patrones usados para las curva de calibración y muestras de cada placa, con la intensidad de las zonas oscuras sobre la placa.

5.7 Linealidad de CCFAE Horizontal y Vertical

Se prepararon las respectivas soluciones y se desarrollaron seis placas de silica por CCFAE-Horizontal. Junto a todas las soluciones patrón fueron sembradas las muestras, la primera muestra por triplicado en cada una de las primeras tres placas y la segunda muestra por triplicado en las últimas tres placas, así se pudo evaluar la reproducibilidad de la captura de imágenes y procesamiento de las mismas dentro del método, conjuntamente con el estudio de linealidad.

La CCFAE-Horizontal fue comparada con la CCFAE-Vertical, fueron sembrados los patrones dos, tres y cuatro junto con las muestras por triplicado en cada placa. La primera placa contenía los patrones mencionados y el triplicado de la muestra 1, y la segunda placa contenía los patrones y el triplicado de la muestra 2.

Tabla 3. Preparación de solución madre de *Sucralosa*

Solución Madre	Masa (g)	Concentración (ppm)
Sucralosa	0,0336	3726,6254 +/- 11,0912
Metanol	9,0162	

Tabla 4. Preparación de patrones

Patrones	Alícuota (g)	Metanol (g)	Concentración (ppm)	Variación (ppm)
1	0,7410	3,0464	906,4566 +/- 2,7007	906,7395
2	1,1658	2,9428	1476,3150 +/- 4,3959	1476,8820
3	1,5028	3,006	1863,0648 +/- 5,5466	1863,7142
4	1,9476	2,9594	2452,5159 +/- 7,3007	2453,1281
5	2,3227	3,0093	2876,3609 +/- 8,5621	2877,6342

Según la masa tomada del edulcorante comercial, la concentración teórica de *Sucralosa* presente en cada muestra es la siguiente:

Tabla 5. Preparación de muestras

Muestra/Sucaryl	Masa (g)	g Metanol	Concentración Sucralosa(ppm)	Variación (ppm)
M1	0,6205	5,091	1889,1672 +/- 12,1920	1889,7732
M2	0,6110	5,4146	1749,0673 +/- 11,2880	1749,2185

A cada una de las placas les fueron tomadas tres fotografías, al analizar las imágenes por triplicado se está evaluando la reproducibilidad de la edición y reproducibilidad de la cuantificación del analito. Los valores de linealidad para las placas desarrolladas en plano y vertical se presentan a continuación:

Tabla 6. Linealidad de CCFAE-Horizontal

Placa 1		Placa 2		Placa 3	
Imagen	r ²	Imagen	r ²	Imagen	r ²
1	0,9603	1	0,9916	1	0,9813
2	0,9319	2	0,9733	2	0,9897
3	0,9621	3	0,9733	3	0,9697

Placa 4		Placa 5		Placa 6	
Imagen	r ²	Imagen	r ²	Imagen	r ²
1	0,9849	1	0,9896	1	0,9843
2	0,9764	2	0,9880	2	0,9886
3	0,9867	3	0,9892	3	0,9949

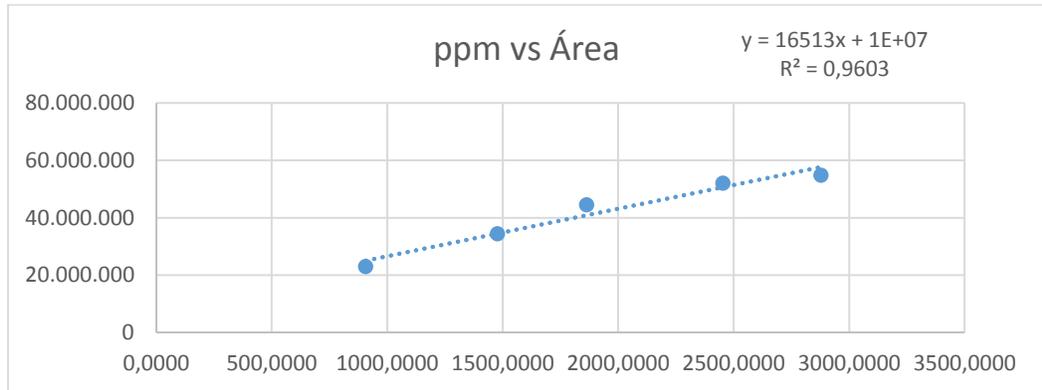


Gráfico 4. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 1

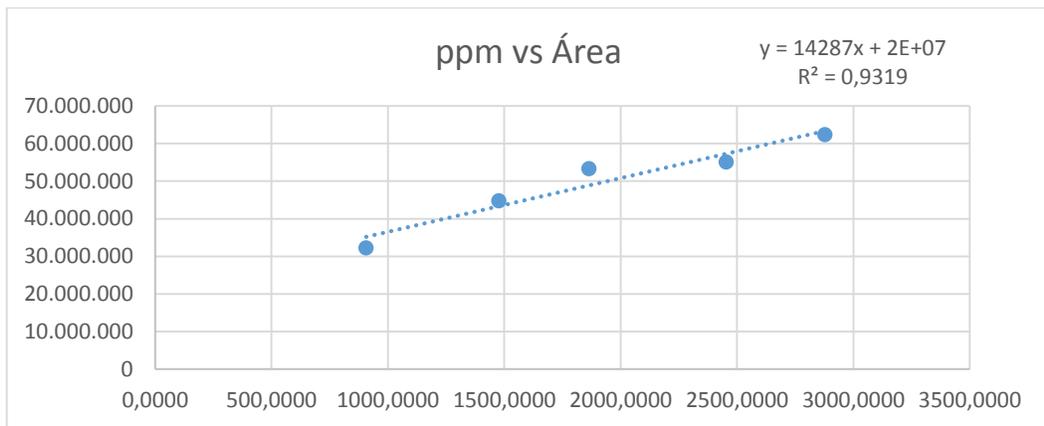


Gráfico 5. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 2

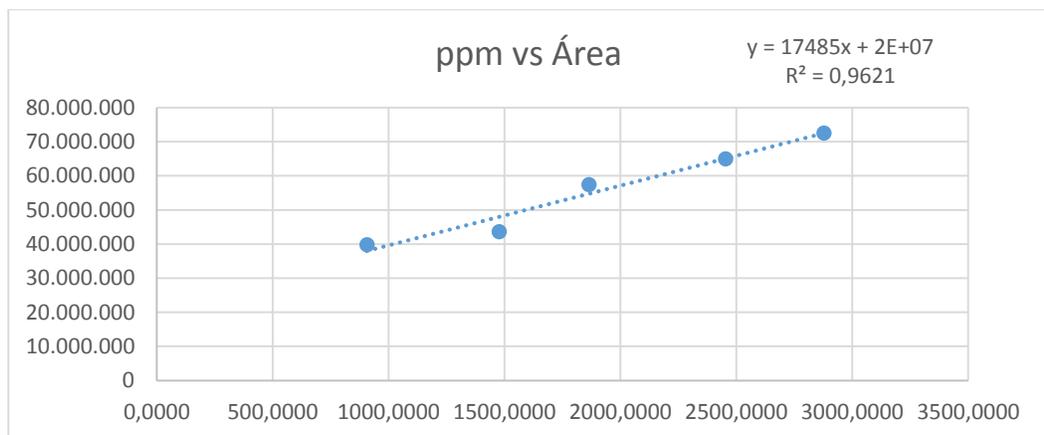


Gráfico 6. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 3

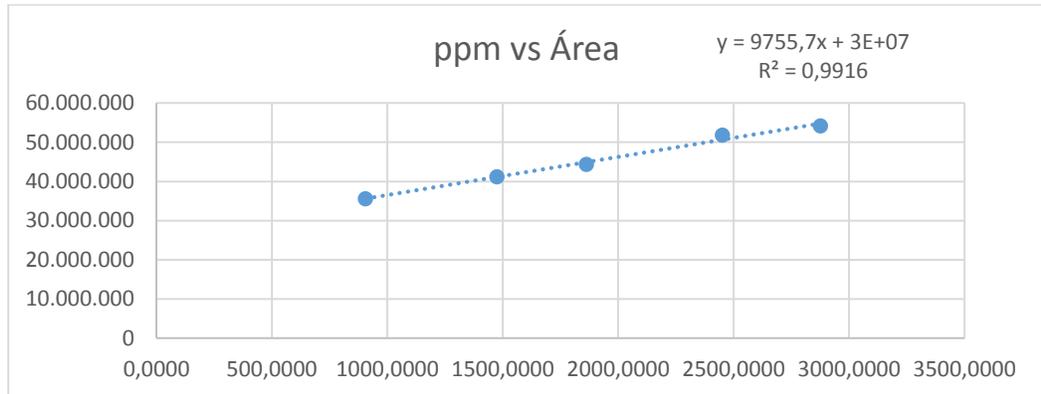


Gráfico 7. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 1

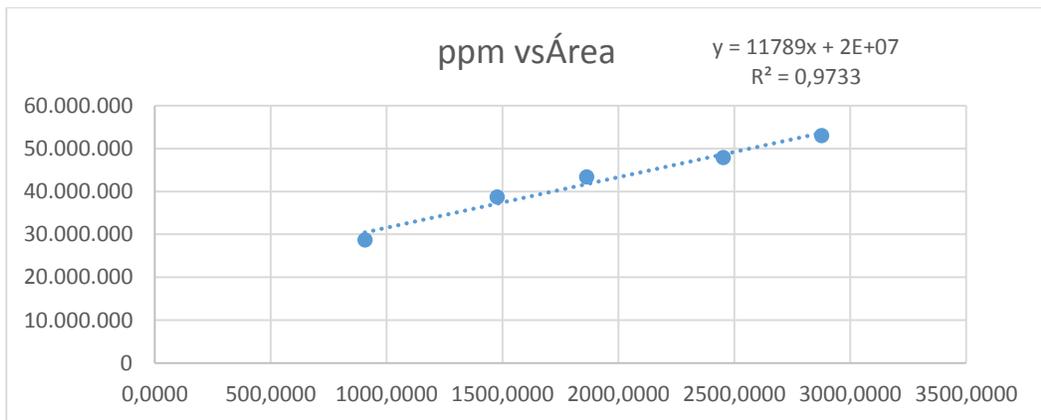


Gráfico 8. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 2

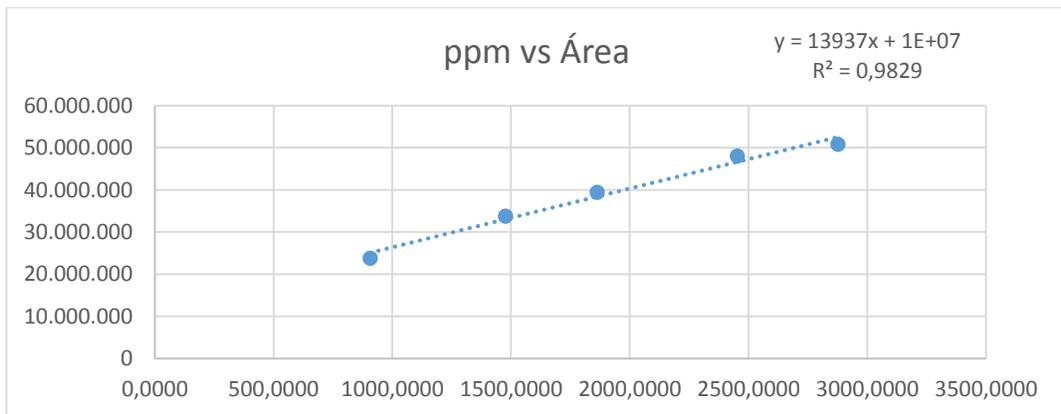


Gráfico 9. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 3

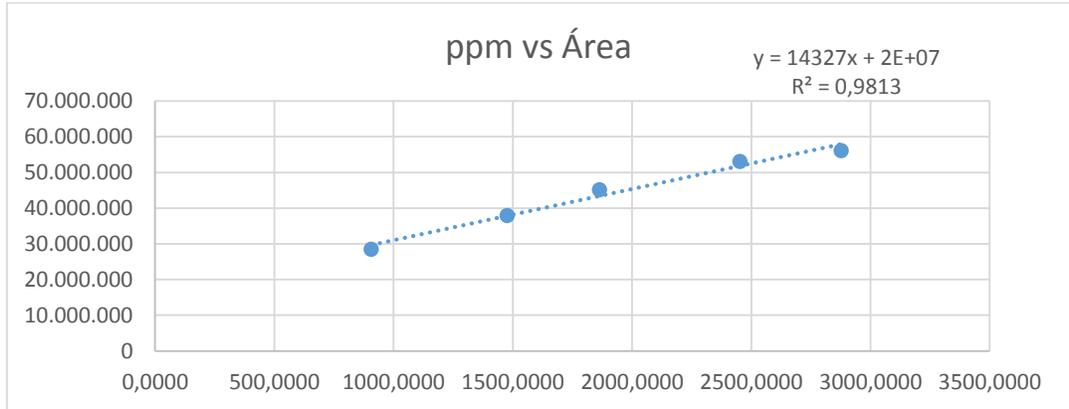


Gráfico 10. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 1

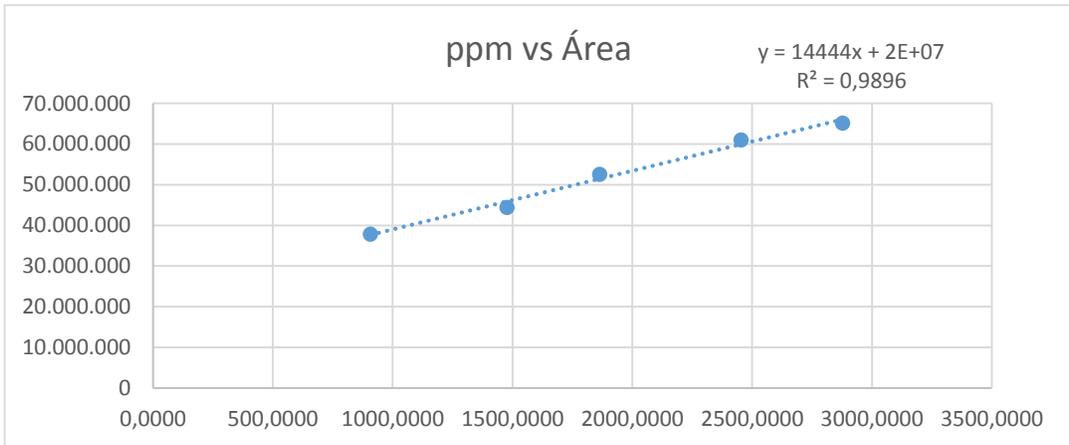


Gráfico 11. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 2

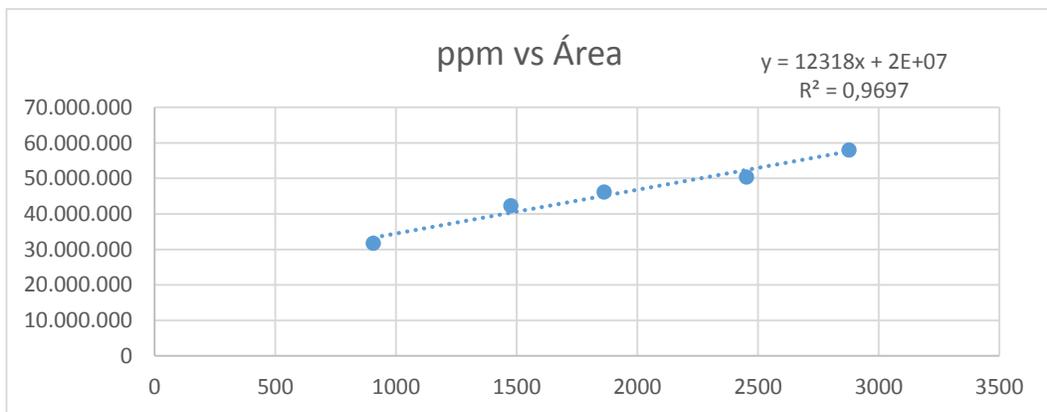


Gráfico 12. Curva de calibración. Placa 3 - Imagen 3

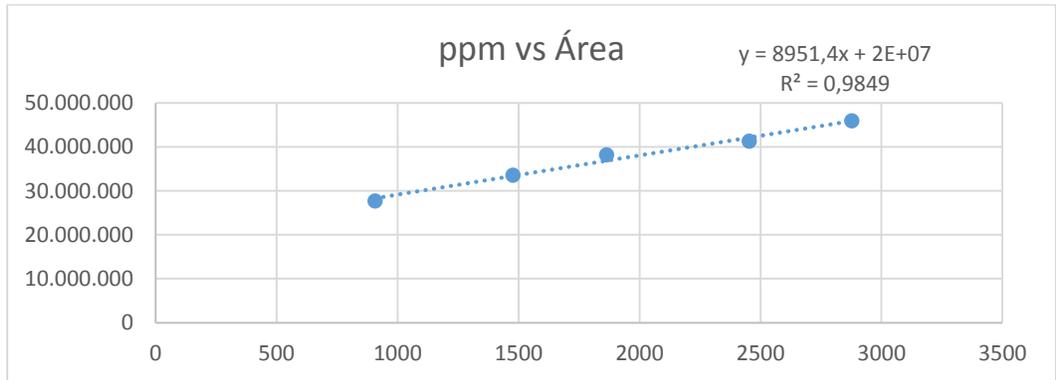


Gráfico 13. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 1

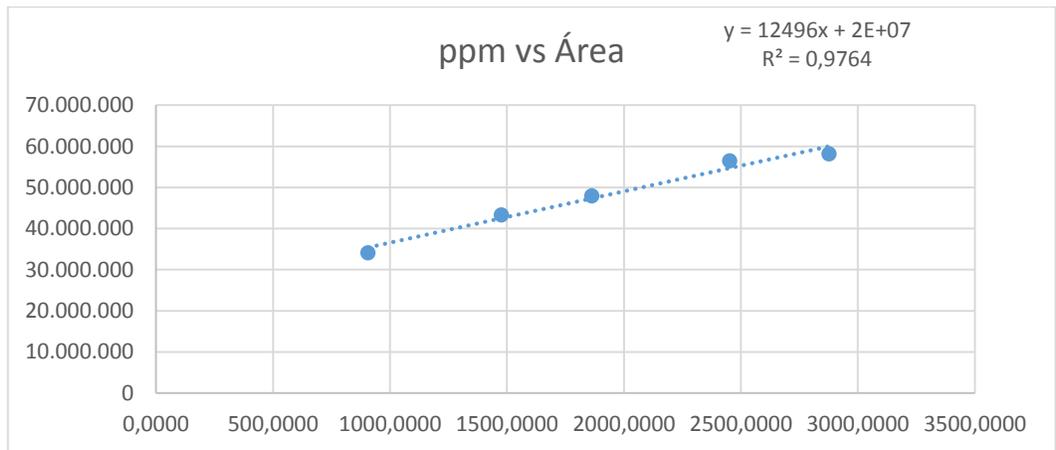


Gráfico 14. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 2

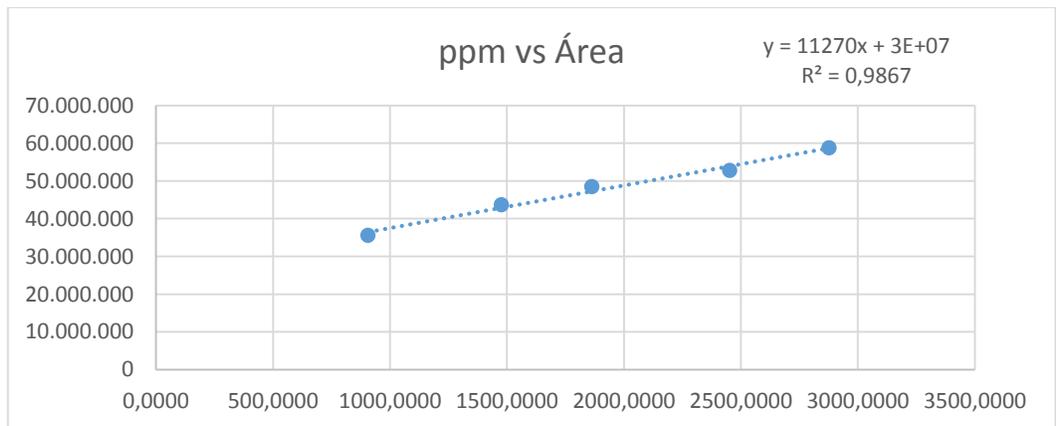


Gráfico 15. Curva de calibración. Placa 4 - Imagen 3

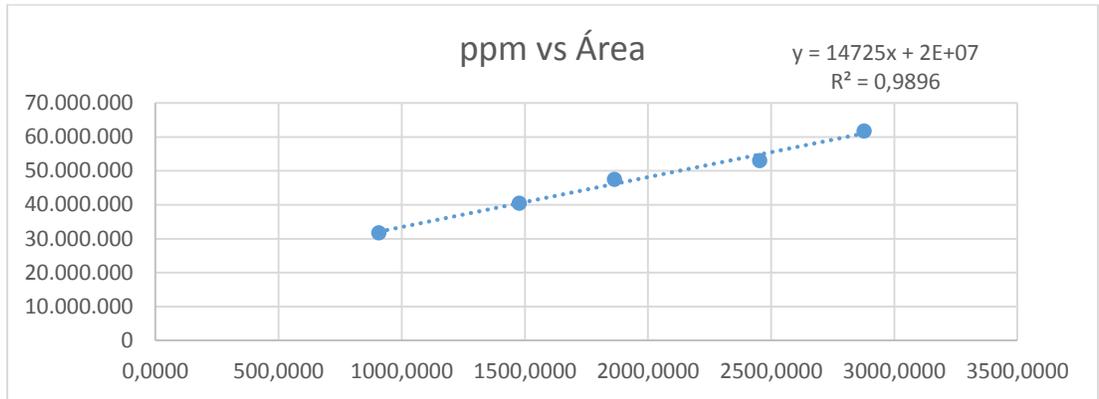


Gráfico 16. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 1

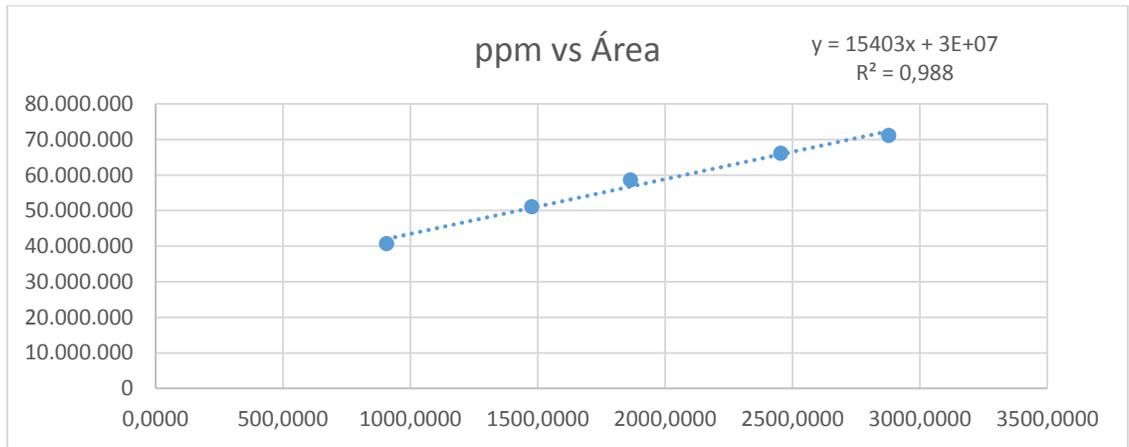


Gráfico 17. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 2

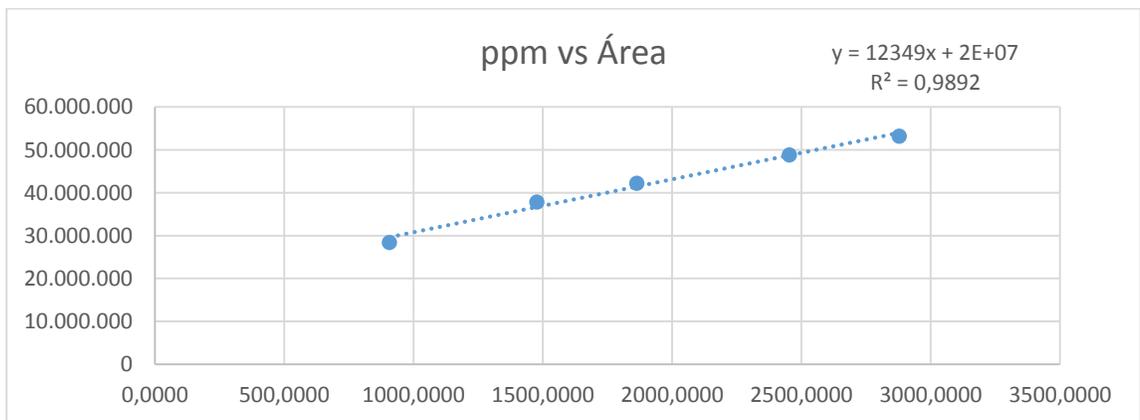


Gráfico 18. Curva de calibración. Placa 5 - Imagen 3

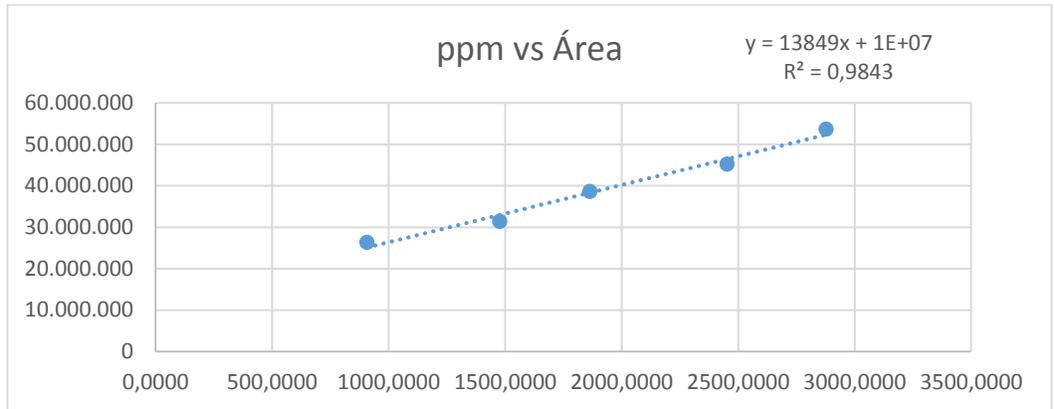


Gráfico 19. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 1

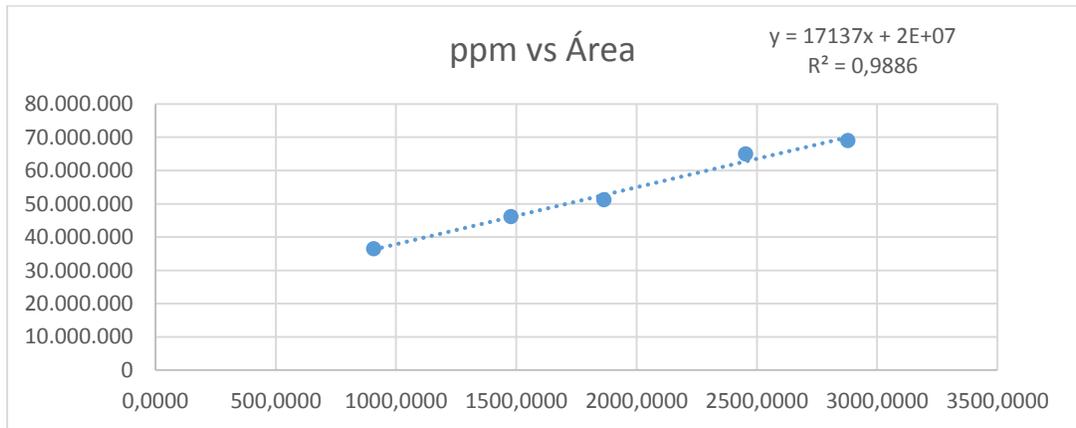


Gráfico 20. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 2

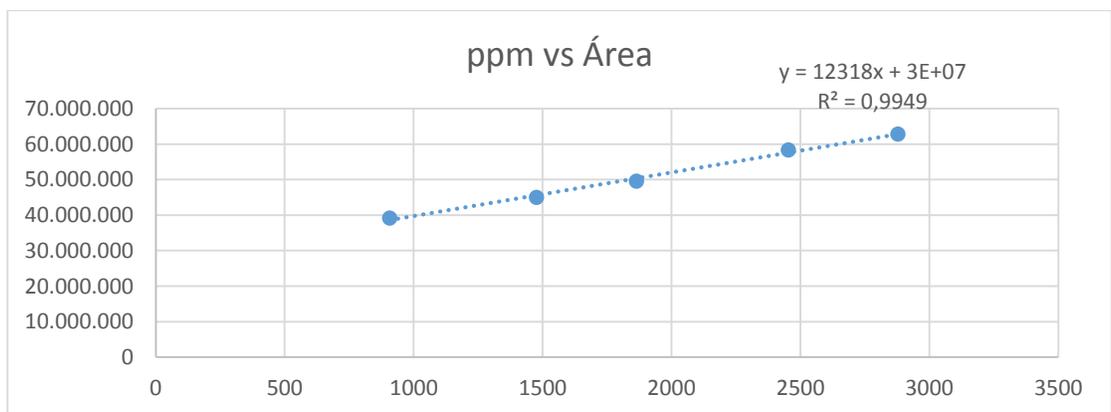


Gráfico 21. Curva de calibración. Placa 6 - Imagen 3

Tabla 7. Linealidad de CCPAE-Vertical

Placa 1		Placa 2	
Imagen	r ²	Imagen	r ²
1	0,9873	1	0,9925
2	0,9997	2	0,9984
3	0,9892	3	0,9988

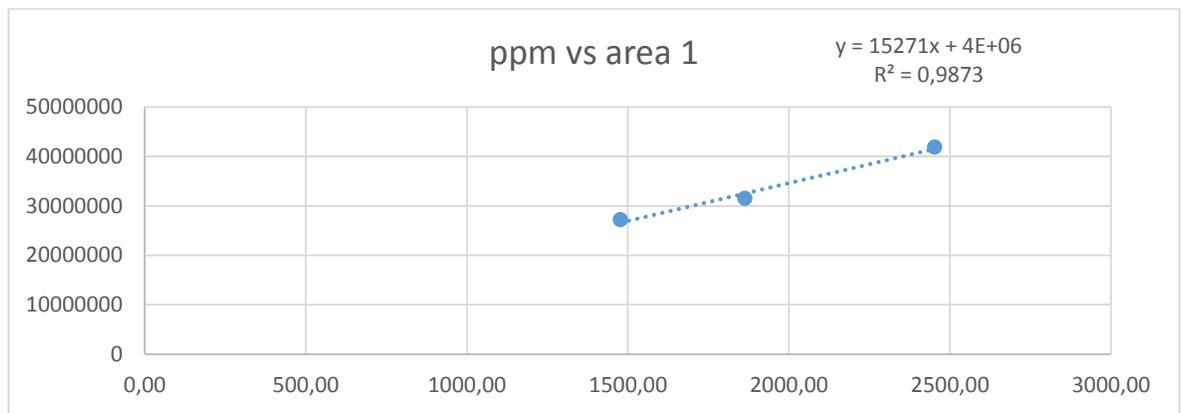


Gráfico 22. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 1

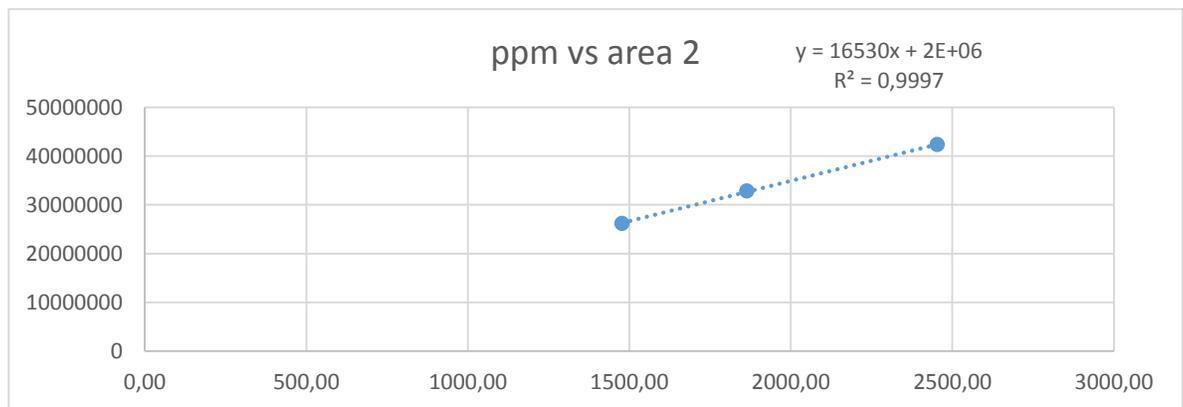


Gráfico 23. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 2

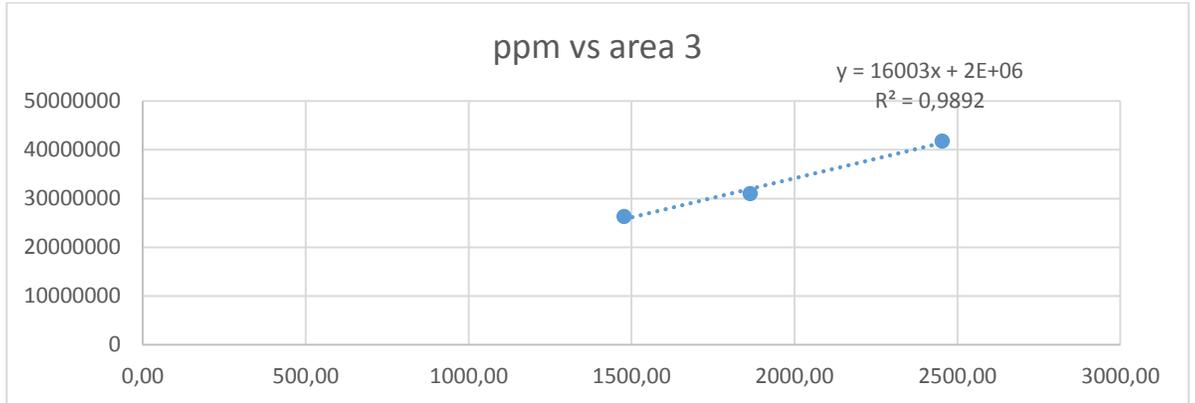


Gráfico 24. Curva de calibración. Placa 1 - Imagen 3

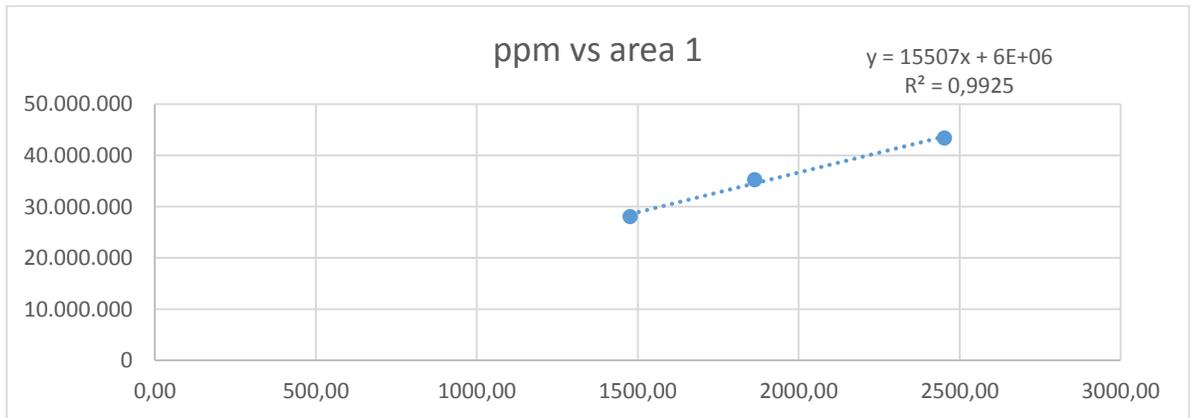


Gráfico 25. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 1

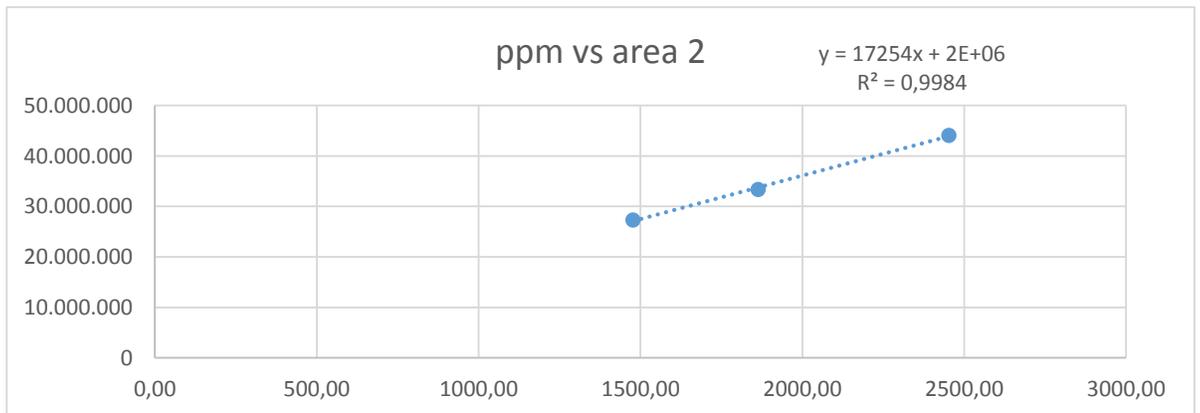


Gráfico 26. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 2

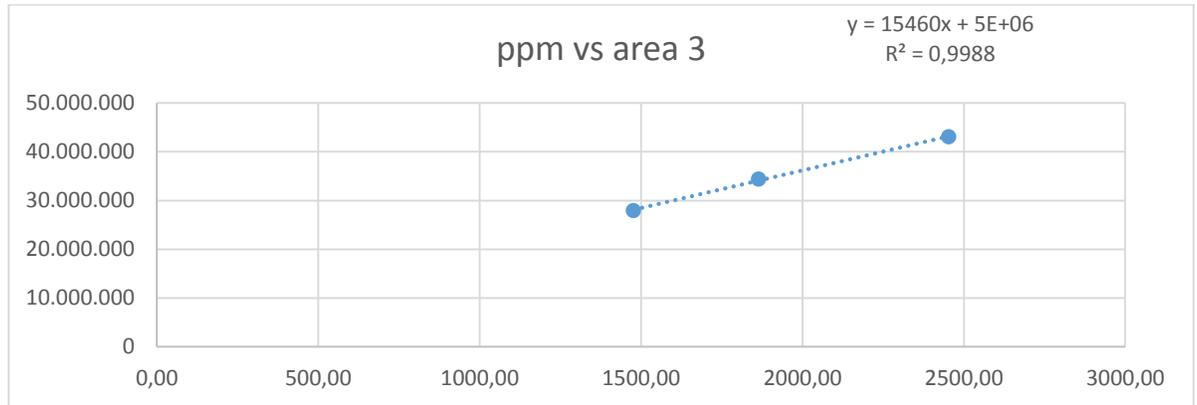


Gráfico 27. Curva de calibración. Placa 2 - Imagen 3

La CCFAE-Horizontal presento valores comparables a los obtenidos por CCPAE-Vertical que es una técnica más tradicional, las imágenes digitales permitieron obtener buena linealidad al acoplar una cámara fotográfica como detector para la CCFAE-Horizontal. El coeficiente de determinación (r^2) para la primera imagen de la primera placa de CCFAE-Horizontal posee un rango de variación estrecho, para las otras placas este rango disminuyó al evolucionar el análisis. Otros autores reportan mayor linealidad en sus métodos de cuantificación utilizando equipos de detección más sofisticados,

Tabla 8. Comparativa de método cromatográfico con otros estudios

Autor	Método	r^2
Idris ⁽²³⁾	HPLC	0,9947
Morlock ⁽²¹⁾	HPTLC	0,9945
Morlock ⁽³⁾	HPTLC	0,9997

Siempre que se tenga una buena preparación y elución de las placas cromatográficas, partiendo desde el sembrado de la muestra hasta el revelado, se podrá

obtener valores similares en linealidad del nuevo método desarrollado y conforme la destreza del analista incrementa, así lo hará la linealidad del método desarrollado.

5.8 Reproducibilidad y Exactitud

Con la edición y procesamiento de las imágenes obtuvimos el área bajo la curva de cada muestra sembrada por triplicado en las placas, fueron tres placas para la muestra 1, tres placas para la muestra 2. Con estos valores y los de la curva de calibración se realizó la regresión lineal, el cálculo de las concentraciones experimentales de cada una de las muestras en cada placa y el respectivo cálculo estadístico.

Tabla 9. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 1

Placa 1

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1918,1955	1,50	2,24	42,95
2	1926,3682	1,94	1,29	24,87
3	2008,0391	6,26	2,04	41,05

Tabla 10. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 2

Placa 2

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1768,8853	6,38	2,92	51,74
2	2035,7355	7,75	1,73	35,19
3	1933,5538	2,34	1,34	25,87

Tabla 11. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 3

Placa 3

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1977,2690	4,63	1,86	36,68
2	1910,9118	1,12	2,03	38,86
3	1936,4622	2,47	2,62	50,73

Tabla 12. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 4

Placa 4

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1845,2231	5,49	2,78	51,26
2	1801,9576	3,02	1,70	30,69
3	1708,9788	2,30	1,64	28,04

Tabla 13. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 5

Placa 5

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1769,7930	1,18	1,51	26,71
2	1763,4222	0,81	1,39	24,48
3	1710,4624	2,22	0,77	13,21

Tabla 14. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 6

Placa 6

Imagen	Concentración (ppm)	Er (%)	CV	s
1	1803,0421	3,08	1,92	34,62
2	1767,3428	1,04	0,98	17,34
3	1809,5346	3,45	1,30	23,51

Cada uno los valores obtenidos de cada placa cromatográfica son comparables entre ellos, no podemos comparar placas cromatográficas diferentes debido a que los componentes estudiados durante la elución se desplazan de diferente manera sobre cada una de ellas. Cada placa de silica es empacada de manera única por lo cual el recorrido

sobre ella será único e irreproducible. Razón por la cual se tomaron tres fotografías de cada placa y conocer la precisión del análisis.

Las placas 1, 3, 4 mostraron valores de CV cercanos entre las imágenes, el CV relaciona la desviación estándar (s) con la media (X_{prom}) de las medidas experimentales por imagen capturada, esto se traduce en concentraciones experimentales cercanas al valor promedio de ellas.

Las placas 5 y 6 poseen los valores de CV más bajos y cercanos entre ellos, implica una disminución en los términos de “s” para cada imagen. Esta mejora para las últimas placas señala la importancia del analista en cada una de las etapas, las etapas clave de la metodología, en donde el analista tiene más peso, son el sembrado de las soluciones sobre las placas y la edición de las imágenes para obtener el patrón de intensidades.

Las placas desarrolladas por CCFAE-Vertical mostraron valores CV análogos a la CCFAE-Horizontal,

Tabla 15. Concentraciones experimentales de la Muestra 1 en la placa 1

Placa 1

Imagen	Concentración (ppm)	Er(%)	CV	s
1	1894,3490	0,24	1,51	28,51
2	1921,1097	1,66	2,90	55,72
3	1953,1451	3,35	1,97	38,50

Tabla 16. Concentraciones experimentales de la Muestra 2 en la placa 2

Placa 2

Imagen	Concentración (ppm)	Er(%)	CV	s
1	1744,5139	0,27	1,44	25,08
2	1766,1831	0,97	0,37	6,45
3	1760,9598	0,67	0,56	9,88

Desde el punto de vista de la precisión ambos métodos, CCFAE-Horizontal y CCFAE-Vertical, son equivalentes. La captura de imágenes permite reproducibilidad en la data obtenida vía software de computador, siempre que se controle la siembra y edición de imágenes.

Para estudio de la exactitud del método de CCFAE-Horizontal se evaluó el error relativo de cada una de las imágenes (Er), este permitió calcular en que porcentaje la concentración real de cada muestra está lejos o cerca del valor experimental obtenido.

Las placas 1, 3, 5 y 6 mostraron una mayor cercanía al valor verdadero en la mayoría de las tres imágenes procesadas. Las placas 2 y 4 se ven más lejos que cerca del valor teórico de *Sucralosa* contenida en el edulcorante comercial.

En situación remarca la importancia del rociado de la placa cromatográfica, una vez eluida la fase móvil es necesario garantizar el rociado homogéneo sobre toda la placa de silica para que cada región donde descansa el analito sea coloreada por completo. Al no garantizar esta homogeneidad puede revelarse las zonas sobre la placa de forma incompleta y no garantizar la debida cuantificación.

Los valores de error relativo para las imágenes de las placas desarrolladas por CCFAE refleja más cercanía al valor real, es decir, fue más exacta que la CPAE

Por otro lado la edición de las imágenes permitió eliminar regiones que carecían de interés, al hacer uso excesivo de esta herramienta se pudo causar la pérdida de información. Situación que no ocurre en el procesamiento de las imágenes desarrolladas por CCFAE, aquí la disposición vertical de las soluciones en la imagen permite usar otra herramienta del programa ImageJ para generar los patrones de intensidad debidas a los patrones y muestras.

6. CONCLUSIONES

La cromatografía en plano permitió la cuantificación de *Sucralosa* en muestras reales con la metodología desarrollada en el Laboratorio de Espectroscopia Laser. Esta metodología logro mantener la linealidad, exactitud y precisión de otros métodos tradicionales y más novedosos. La metodología descrita requiere menos preparación previa para el desarrollo cromatográfico, permitió el análisis simultáneo de una mayor cantidad de soluciones que técnicas cromatográficas tradicionales y logro la cuantificación digital de muestras reales.

Hay un compromiso método-analista que permite mejorar o desmejorar la cuantificación del procedimiento descrito. Se debe tratar de disminuir la presencia del analista en las etapas importantes del método, como lo son la siembra de las muestras sobre las placas, el rociado y edición de las imágenes via software de computador.

Fue necesario adaptar y mejorar la luminaria para la captura de las imágenes desarrolladas, el software es bastante susceptible a la presencia de sombras sobre las placas de silica.

El programa ImageJ fue una herramienta muy versátil, fácil de adaptar a los cambios requeridos experimentalmente para el análisis de las imágenes y generando patrones de intensidad. Es necesario explorar más sus funciones para mejorar la cuantificación

7. RECOMENDACIONES

- Desarrollar un sistema para la siembra de soluciones en placas de silica, autónomo y que garantice un volumen constante.
- Las soluciones preparadas en solventes volátiles deben ser resguardadas a una temperatura adecuada constante respecto al solvente utilizado.
- La cámara digital casera permitió la captura de buenas imágenes, sin embargo el uso de una cámara profesional permite ajustar y mejorar parámetros asociados a la captura de fotografías.
- Uso de bombillos LED en el montaje experimental, son menos incandescentes y más fáciles de apartar a diferentes superficies.
- Desarrollo de “plug-in” para la adquisición de información automáticamente, a partir de las imágenes digitales buscando disminuir el tiempo de análisis y el rol del analista.
- Profundizar en el uso y bondades del programa ImageJ

8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Grotz, V. Munro, I. **An overview of the safety of sucralose.** *Elsevier*, 2009, 1-5.
- 2) Yang, D. Chen, B. **Simultaneous determination of nonnutritive sweeteners in food by HPLC/ESI-MS.** *J.of Agricultural and food Chemistry*. 2009, 57, 3022-3027.
- 3) Morlock, G. Prabha, S. **Analysis and stability of Sucralose in a milk-based confection by a simple planar chromatographic method.** *J.of Agricultural and Chemistry*. 2007, 55, 7217-7223.
- 4) Rodero, A. Rodero, L. Azoubel, Reinaldo. **Toxicity of Sucralose in humans: A review.** *Int. J. Morphol*, 2009. 27 (1) 239-244.
- 5) Frank, G. Oberndorfer, T. Simmons, A. Paulus, M. Fudge, J. Yang, T. Kaye, W. **Sucrose activates human taste pathways differently from artificial sweetener.** *Elsevier, Neuroimage* 39, 2008, 1559-1569.
- 6) Hao, X. United States Patent **US7.932.380 B2**
- 7) Wang, F. He, H. Yang, Xin. Yu, Yongzhu. Zhisong, F. United States Patent **US7.884.203 B2**
- 8) Luo, Y. Xu, L. Sun, X. **Synthesis of strong sweetener Sucralose.** CCSE, Modern Applied Science, Mayo 2008. Vol. 2, No. 3.
- 9) Pavia, D. Lampman, G. Kriz, G. Engel, R. **Microscale and macroscale Techniques in the Organic Laboratory.** Thomson Brooks/Cole. USA. 2002
- 10) Chromatography. Medical Discoveries. Discoveries in medicine, <http://www.discoveriesinmedicine.com/Bar-Cod/Chromatography.html> (11 Junio 2011)

- 11) Gilbert, J. Martin, S. **Experimental Organic Chemistry. A miniscale and microscale approach.** 5ta Edición. Brooks/Cole Laboratory Series for Organic Chemistry.
- 12) Pérez, C. Pinedo, B. Román B. Fernández, M. Jiménez, D. de Juanes, S. **Cromatografía, Principios y aplicaciones.**
- 13) Galagovsky K, L. Química Orgánica. **Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio.** Editorial universitaria de Buenos Aires.
- 14) Domínguez, X. **Cromatografía en papel y en capa delgada.** Departamento de Asuntos Científico. Whashington, D.C. septiembre 1975
- 15) Halpaap, H. J. **CHromatogr.**, 1973, 78, 77-78.
- 16) Srivastava, M. **High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC).** Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.
- 17) Council for the Central Laboratory of the Research Councils. **Overview of CCD detectors.** www.rl.ac.uk, <http://star-www.rl.ac.uk/star/docs/sc5.htx/node7.html>. 8 Julio 2011
- 18) Ferreira, T. Rasband, W. **ImageJ User Guide.** IJ1.46r Edición Revisada. Octubre 2012
- 19) Maleki, N. Safavi, A. Sedaghatpour, F. **Single Step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera.** Talanta 64, 2004, 830-835.
- 20) Irish, A. **Digitally enhanced thin-layer chromatography: an inexpensive, new technique for quañotative and quantitative analysis.** Journal of Chemical Education, Mayo 2007. Vol 84, No 5.

- 21) Morlock, G. Vega-Herrera, M. **Two new derivatization reagents for planar chromatographic quantification of sucralose in dietetic products.** Journal of Planar Chromatography, 20, 2007, 6, 411-417
- 22) Morlock, G. Schwack, W. **The Contribution of Planar Chromatography to food analysis.** Journal of Planar Chromatography, 20, (2007), 6, 399-406.
- 23) Idris, M. Srivastava, S. Baggi, T. Shukla, S. & Ganjoo, A. **Rhodamine-Sulphuric Acid- A new visualization Reagent for the determination of sucralose by HPTLC.** *J.of Chemistry.* 2010, 7(S1), S559-S565.
- 24) Welke, J. Hoeltz, M. Dottori, H. Noll, Isa. **Determination of Ochratoxin A in Wine by High-Performance Thin-Layer Chromatography using Charged Coupled Device.** Journal of the Brazilian Chemical Society. Vol 21, no 3, 441-446. 2010
- 25) Gray, K. Stuart, B. Ellison, S. Elahi, S. Colwell, P. Wood, R. Damant, A. **Collaborative trial of a method for the determination of sucralose in foods.** Journal of the Association of Public Analysts, 2011. 39, 13-37
- 26) Horwitz, W. Albert, R. **The Horwitz Ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to the precision.** Journal of AOAC International. 2006, Julio-Agosto; 89 (4), 1095-109
- 27) Scoffoni, Ch. Sack, L. **Quantifying leaf vein traits.** CSIRO, Prometheuswiki, Agosto 2013
- 28) JECFA, published in FNP 52 Add 2. 1993
- 29) Skoog, D. West, D. Holler, J. Crouch, S. **Fundamentos de química analítica.** Editorial Thomson. 8va Edición. México. 2005.

8. ANEXOS

- *Error relativo*, indica la cercanía de la medida al valor aceptado

$$E_r = ((X_i - X_r) / X_i) \times 100$$

X_i = Valor aceptado

X_r = Valor experimental

- *Presición*, indica la cercanía entre los resultados obtenidos de la misma manera. Se determina con la desviación estándar, varianza y coeficiente de variación.
- *Coficiente de varianza*, medida de la reproducibilidad

$$CV = (s / X_i) \times 100$$

s = desviación estandar

Tabla 17. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 1

Placa 1 / Imagen1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	23.039.827	r ²	0,9603
P2	1476,8820	34.372.803	a	10132513,1043
P3	1863,7142	44.545.950	bx	16512,9959
P4	2453,1281	52.028.978		
P5	2877,6342	54.838.102		

Tabla 18. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 1

Imagen 1	Concentración	Er	CV
M1	1870,9045	1,01	2,24
M1´	1928,9082	2,07	
M1´´	1954,7737	3,44	

Tabla 19. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 2

Placa 1 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395302	32.290.228	r ²	0,9319
P2	1476,882043	44.803.126	a	22230755,9954
P3	1863,714215	53.350.598	bx	14287,0243
P4	2453,128096	55.131.415		
P5	2877,634187	62.420.933		

Tabla 20. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 2

Imagen 2	Concentración	Er	CV
M1	1947,9326	3,08	1,29
M1´	1899,1601	0,50	
M1´´	1932,0119	2,24	

Tabla 21. Datos de la curva de calibración Placa 1 – Imagen 3

Placa 1 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395302	39.765.508	r ²	0,9621
P2	1476,882043	43.626.336	a	22165329,9394
P3	1863,714215	57.426.700	bx	17484,7157
P4	2453,128096	64.954.915		
P5	2877,634187	72.523.512		

Tabla 22. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 1 – Imagen 3

Imagen 3	Concentración	Er	CV
M1	1967,0853	4,09	2,04
M1´	2007,8553	6,25	
M1´´	2049,1767	8,44	

Tabla 23. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 1

Placa 2 / Imagen 1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566	35.587.699	r ²	0,9916
P2	1476,3098	41.215.356	a	26741505,1569
P3	1863,0783	44.346.456	bx	9755,6773
P4	2452,4978	51.780.432		
P5	2876,7903	54.189.487		

Tabla 24. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 1

Imagen 1	Exp	Er	CV
M1	1751,5155	7,30	2,92
M1´	1728,0697	8,54	
M1´´	1827,0709	3,30	

Tabla 25. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 2

Placa 2 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566	28.665.699	r ²	0,9733
P2	1476,3098	38.693.406	a	19759252,2600
P3	1863,0783	43.382.899	bx	11789,1172
P4	2452,4978	47.923.000		
P5	2876,7903	53.013.619		

Tabla 26. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 2

Imagen 2	Exp	Er	CV
M1	1997,8605	5,74	1,73
M1´	2041,9284	8,08	
M1´´	2067,4177	9,42	

Tabla 27. Datos de la curva de calibración Placa 2 – Imagen 3

Placa 2 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566	23716089	r ²	0,9829
P2	1476,3098	33743908	a	12409889,5074
P3	1863,0783	39338683	bx	13937,2306
P4	2452,4978	47951582		
P5	2876,7903	50750018		

Tabla 28. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 2 – Imagen 3

Imagen 2	Exp	Er	CV
M1	1960,9194	3,79	1,34
M1´	1909,4893	1,07	
M1´´	1930,2528	2,16	

Tabla 29. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 1

Placa 3 / Imagen 1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566134	28447323	r ²	0,9813
P2	1476,309762	37941561	a	16690686,9700
P3	1863,078257	45140404	bx	14330,2849
P4	2452,497766	53064703		
P5	2876,79027	56073823		

Tabla 30. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 1

Imagen 1	Exp	Er	CV
M1	1937,4394	2,52	1,86
M1´	2009,6588	6,34	
M1´´	1984,7089	5,02	

Tabla 31. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 2

Placa 3 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566134	37.838.886	r ²	0,9897
P2	1476,309762	44.433.474	a	24528599,1195
P3	1863,078257	52.562.159	bx	14447,5597
P4	2452,497766	60.999.590		
P5	2876,79027	65.146.187		

Tabla 32. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 2

Imagen 2	Exp	Er	CV
M1	1924,5921	1,84	2,03
M1´	1941,0848	2,72	
M1´´	1867,0586	1,20	

Tabla 33. Datos de la curva de calibración Placa 3 – Imagen 3

Placa 3 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,4566134	31.760.649	r ²	0,9697
P2	1476,309762	42.362.649	a	22155011,9705
P3	1863,078257	46.150.126	bx	12318,1809
P4	2452,497766	50.438.553		
P5	2876,79027	58.011.299		

Tabla 34. Concentración experimental Muestra 1 – Placa 3 – Imagen 3

Imagen 3	Exp	Er	CV
M1	1920,3236	1,62	2,62
M1'	1895,7664	0,32	
M1''	1993,2966	5,48	

Tabla 35. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 1

Placa 4 / Imagen 1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395302	27.692.242	r ²	0,9849
P2	1476,882043	33.540.419	a	20187933,65
P3	1863,714215	38.235.461	bx	8951,413852
P4	2453,128096	41.293.658		
P5	2877,634187	45.915.408		

Tabla 36. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 1

Imagen 1	Concentración	Er%	CV
M2	1786,9944	2,16	2,78
M2'	1883,5262	7,68	
M2''	1865,1489	6,63	

Tabla 37. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 2

Placa 4 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	34.134.110	r ²	0,9764
P2	1476,8820	43.362.912	a	24072625,75
P3	1863,7142	47.954.235	bx	12495,84608
P4	2453,1281	56.445.460		
P5	2877,6342	58.152.851		

Tabla 38. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 2

Imagen 2	Concentración	Er%	CV
M2	1819,1884	4,00	1,70
M2'	1820,1617	4,06	
M2''	1766,5227	0,99	

Tabla 39. Datos de la curva de calibración Placa 4 – Imagen 3

Placa 4 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	35.559.761	r ²	0,9867
P2	1476,8820	43.695.479	a	26257601,03
P3	1863,7142	48.431.042	bx	11270,30169
P4	2453,1281	52.754.577		
P5	2877,6342	58.795.201		

Tabla 40. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 4 – Imagen 3

Imagen 3	Concentración	Er%	CV
M2	1684,8736	3,68	1,64
M2'	1702,3068	2,68	
M2''	1739,7560	0,54	

Tabla 41. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 1

Placa 5 / Imagen 1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	31.705.120	r ²	0,9896
P2	1476,8820	40.468.079	a	18691590,38
P3	1863,7142	47.488.091	bx	14725,1279
P4	2453,1281	53.056.835		
P5	2877,6342	61.778.546		

Tabla 42. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 1

Imagen 1	Exp	Er	CV
M2	1799,1571	2,85	1,51
M2'	1763,2843	0,80	
M2''	1746,9375	0,13	

Tabla 43. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 2

Placa 5 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	40.773.934	r ²	0,9880
P2	1476,8820	51.133.364	a	28072466,78
P3	1863,7142	58.668.394	bx	15402,60791
P4	2453,1281	66.181.805		
P5	2877,6342	71.132.526		

Tabla 44. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 2

Imagen 2	Exp	Er	CV
M2	1776,0657	1,53	1,39
M2'	1778,9950	1,70	
M2''	1735,2060	0,80	

Tabla 45. Datos de la curva de calibración Placa 5 – Imagen 3

Placa 5 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	28.403.265	r ²	0,9892
P2	1476,8820	37.854.092	a	18440311,1
P3	1863,7142	42.191.188	bx	12348,92853
P4	2453,1281	48.826.486		
P5	2877,6342	53.205.773		

Tabla 46. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 5 – Imagen 3

Imagen 3	Exp	Er%	CV
M2	1702,4733	2,67	0,77
M2'	1703,2020	2,63	
M2''	1725,7118	1,34	

Tabla 47. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 1

Placa 6 / Imagen 1	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	26.359.502	r ²	0,9843
P2	1476,8820	31.412.268	a	12544146,94
P3	1863,7142	38.621.071	bx	13849,29318
P4	2453,1281	45.276.565		
P5	2877,6342	53.701.217		

Tabla 48. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 1

Imagen 1	Concentración	Er%	CV
M2	1841,1512	5,26	1,92
M2'	1794,4266	2,58	
M2''	1773,5484	1,39	

Tabla 49. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 2

Placa 6 / Imagen 2	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395	36.428.212	r ²	0,9886
P2	1476,8820	46.087.458	a	20690528,65
P3	1863,7142	51.193.443	bx	17137,4809
P4	2453,1281	64.953.798		
P5	2877,6342	68.934.205		

Tabla 50. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 2

Imagen 2	Concentración	Er%	CV
M2	1785,8071	2,09	0,98
M2´	1751,4059	0,13	
M2´´	1764,8152	0,89	

Tabla 51. Datos de la curva de calibración Placa 6 – Imagen 3

Placa 6 / Imagen 3	ppm	Area	y = a + bx	
P1	906,7395302	39.223.606	r ²	0,9949
P2	1476,882043	45.012.070	a	27395963,06
P3	1863,714215	49.569.554	bx	12317,94964
P4	2453,128096	58.328.614		
P5	2877,634187	62.828.501		

Tabla 52. Concentración experimental Muestra 2 – Placa 6 – Imagen 3

Imagen 3	Concentración	Er%	CV
M2	1817,9508	3,93	1,30
M2´	1827,6813	4,49	
M2´´	1782,9718	1,93	

Tabla 53. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 1

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	41.807.667	49.752.826	57.275.323
Er%			
M1	1,90	0,62	1,27
M1´	0,42	0,79	0,01
M1´´	1,42	0,16	1,24

Tabla 54. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 2

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	43.998.180	43.758.777	39.358.275
Er%			
M1	0,39	1,03	0,96
M1´	0,91	0,17	0,86
M1´´	1,27	0,85	0,12

Tabla 55. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 3

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	45.025.515	52.136.612	46.008.704
Er%			
M1	1,28	0,38	0,43
M1´	1,02	0,83	1,10
M1´´	0,24	1,23	1,50

Tabla 56. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 4

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	36.705.290	46.589.610	45.518.308
Er%			
M1	1,44	0,46	0,60
M1´	0,93	0,49	0,17
M1´´	0,48	0,96	0,76

Tabla 57. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 5

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	44.752.018	55.233.768	39.562.689
Er%			
M1	0,97	0,35	0,25
M1´	0,21	0,43	0,23
M1´´	0,75	0,79	0,48

Tabla 58. Área de muestras y error relativo porcentual – Placa 6

Xprom	Imagen 1	Imagen 2	Imagen 3
M1	37.515.005	50.978.331	49.685.720
Er%			
M1	1,41	0,62	0,21
M1´	0,32	0,54	0,45
M1´´	1,09	0,08	0,66

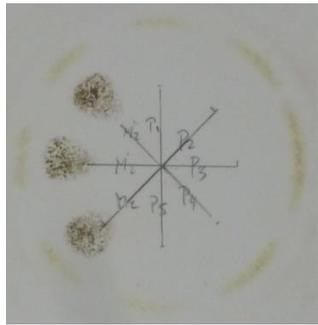


Imagen 1

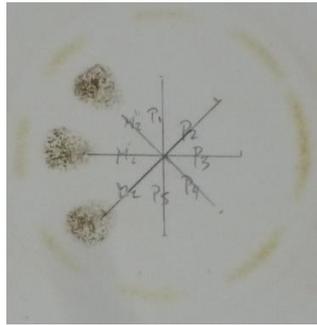


Imagen 2

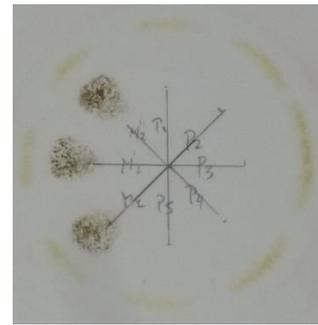


Imagen 3

Figura 29. CCFAE-Horizontal – Placa 1. Sembrado triple de M1

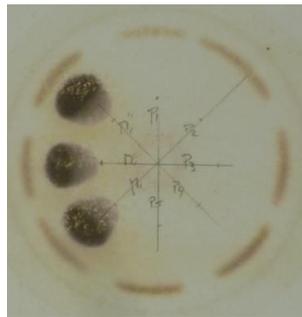


Imagen 1

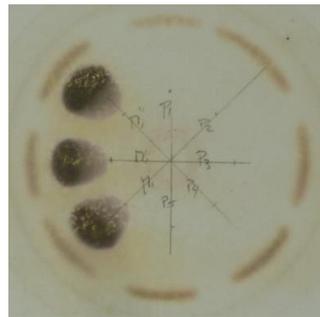


Imagen 2

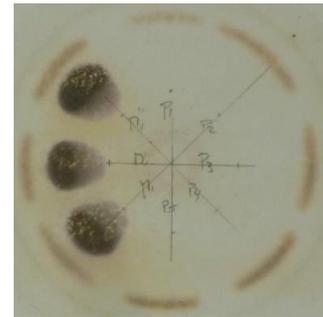


Imagen 3

Figura 30. CCFAE-Horizontal – Placa 2. Sembrado triple de M1

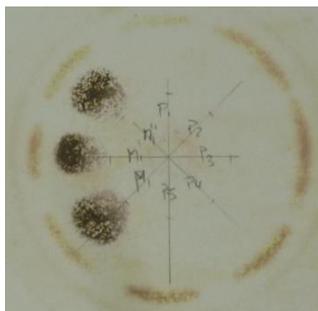


Imagen 1

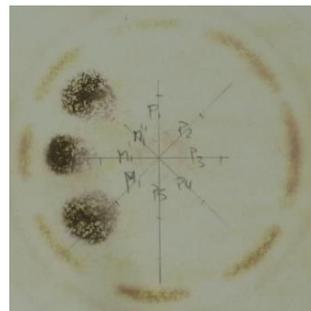


Imagen 2

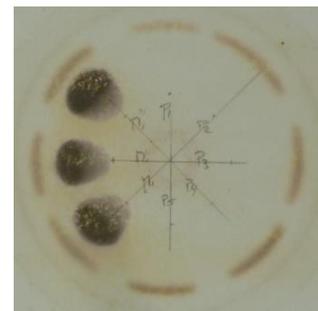


Imagen 3

Figura 31. CCFAE-Horizontal – Placa 3. Sembrado triple de M1

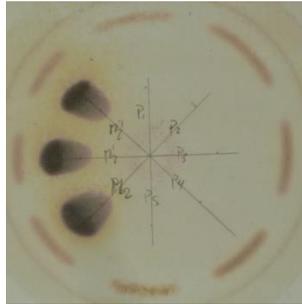


Imagen 1

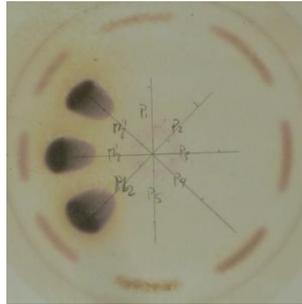


Imagen 2

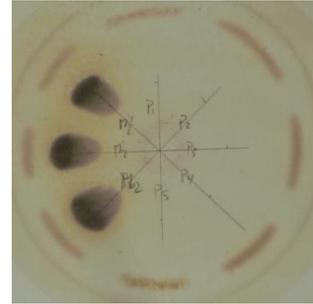


Imagen 3

Figura 32. CCFAE-Horizontal – Placa 4. Sembrado triple de M2

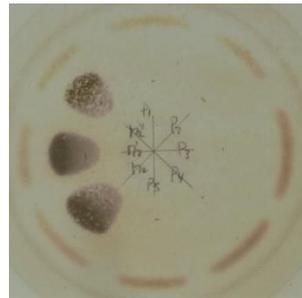


Imagen 1

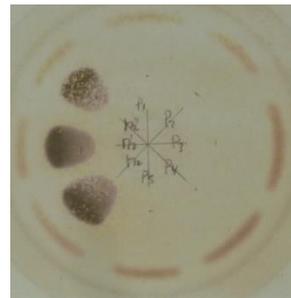


Imagen 2



Imagen 3

Figura 33. CCFAE-Horizontal – Placa 5. Sembrado triple de M2

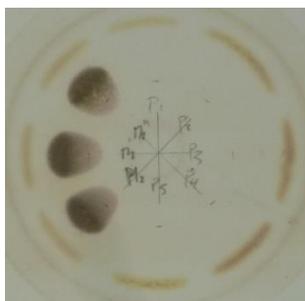


Imagen 1

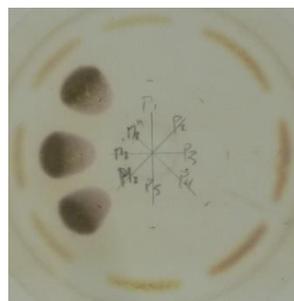


Imagen 2

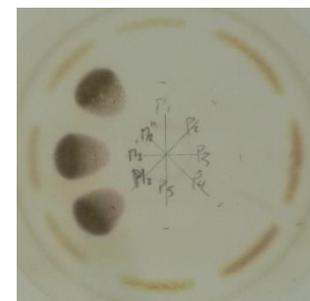


Imagen 3

Figura 34. CCFAE-Horizontal – Placa 6. Sembrado triple de M2