



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
FARMACOPEA CHILENA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
AMINOÁCIDOS EN *Athyonidium Chilensis* (PEPINO DE MAR) POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.**

Unidad de Investigación para optar al título de Químico Farmacéutico

FELIPE ARAVENA AGUILA

Directora de Unidad de Investigación: Marcela Escobar Peña
Codirectora de Unidad de Investigación: María Isabel Chávez

2019

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto de estudio, sacrificio y dedicación, culmina esta etapa, que por cierto no ha sido corta, pero que he disfrutado al máximo después de todo. Pensando en mi primer año de universidad, cuando fui a matricularme, unos promotores de un spot televisivo de la UV me preguntaron si quería participar. “Di esta frase: Me la jugué por Química y Farmacia” me dijeron, sin pensar que después iba a aparecer en la televisión y tener mi pseudo momento de fama, lo que fue algo muy divertido la verdad, porque sí, puedo decir que me la jugué por Química y Farmacia, por esta bonita carrera, en la cuál encontré mi vocación y mis ganas de poder ayudar a los demás a través de la atención en salud.

Quiero agradecer en primera instancia a mis padres, ya que sin ellos no podría estar donde estoy ahora, gracias a ellos me convertí en la persona que soy hoy en día, por entregarme valores, cariño y por sobre todo siempre apoyarme en todo este proceso. A mis hermanos menores, que siempre han estado conmigo y con quienes siempre nos reímos y disfrutamos, y aunque estemos lejos la mayoría del tiempo, siempre los llevo conmigo.

Agradecer a mis amigos con los que formé grandes vínculos dentro de la carrera, siempre estudiando, haciendo trabajos, juntas, entre otras cosas, haciendo de la universidad mucho más divertida. Espero que todos y cada uno de ustedes sea un gran profesional en el futuro, porque se que ustedes son excelentes personas ya en el presente y quiero que sigan así.

Agradecer a la profesora Marcela, por darme la oportunidad de trabajar con ella cuando yo me encontraba en una situación un poco complicada en su momento, es una gran persona y profesional y fue un gusto trabajar con usted en todo este proceso.

Agradecer también a María Isabel y Don Dennis, gracias a ustedes mi trabajo dentro de la farmacopea fue muy divertido, me acompañaron en todo el proceso, me ayudaron y me escucharon. Ustedes me enseñaron el verdadero significado de la humildad y la paciencia y nunca olvidaré todos los consejos que me brindaron, siempre compartiendo unas galletitas y un tecito para hacer más ameno todo, siempre les estaré muy agradecido, sobre todo en los momentos donde me bajoneaba y pensaba que todo estaba en contra mío.

Por último, quiero dedicarle estas últimas palabras a mi abuelo José, que, si bien ya no se encuentra con nosotros, a él siempre le gustó la ciencia y habría estado muy orgulloso de que yo siguiera un área científica y relacionada con la salud.

RESUMEN

La especie *Athyonidium chilensis*, llamado comúnmente pepino de mar es conocido como un valioso recurso comercial debido a su alto valor alimenticio, especialmente en países orientales como Japón y China. Su utilización es avalada por diversos estudios de caracterización química y nutricional, que destacan su alto contenido proteico, por ser un organismo que presenta un alto porcentaje de masa muscular. La calidad de una proteína está dada en parte por su composición aminoacídica, por lo que se requiere que los métodos de detección y cuantificación de aminoácidos hayan sido previamente validados. Debido esto es que en el presente trabajo se realizó la validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de trece aminoácidos en manto de *Athyonidium chilensis* (Pepino de mar) por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), con la finalidad de obtener un método que sea repetible y reproducible, que entregue resultados confiables y seguros, acorde a los criterios de calidad. Los resultados para linealidad se encuentran dentro de los criterios de aceptación para cada uno de los aminoácidos. Todos los aminoácidos cumplieron con los criterios de repetibilidad y reproducibilidad, excepto Ácido aspártico e Histidina para este último parámetro. Los límites de detección y cuantificación permiten detectar y cuantificar cada uno de los aminoácidos presentes en *A. chilensis*. Para completar la validación, se requiere realizar estudios de exactitud y selectividad, para determinar que la metodología empleada está validada para cada uno de los aminoácidos evaluados.

ABSTRACT

The *Athyonidium chilensis* species, commonly called sea cucumber, is known as a valuable commercial resource due to its high nutritional value, especially in eastern countries such as Japan and China. Its use is supported by various studies of chemical and nutritional characterization, which highlight its high protein content, being an organism that has a high percentage of muscle mass. The quality of a protein is given in part by its amino acid composition, so it is required that the amino acid detection and quantification methods have been previously validated. Because of this, the validation of an analytical method for the identification and quantification of thirteen amino acids in the mantle of *Athyonidium chilensis* (Sea Cucumber) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed, in order to obtain a method that is repeatable and reproducible, that delivers reliable and safe results, according to the quality criteria. The results for linearity are within the acceptance criteria for each of the amino acids. All amino acids met the criteria of repeatability and reproducibility, except aspartic acid and histidine for this last parameter. The limits of detection and quantification allow to detect and quantify each of the amino acids present in *A. chilensis*. To complete the validation, studies of accuracy and selectivity are required, to determine that the methodology used is validated for each of the amino acids evaluated.

ABREVIATURAS

A.chilensis : *Athyonidium chilensis*

DS : Desviación estándar

CV : Coeficiente de variación

HPLC : Cromatografía líquida de alta resolución

\bar{x} : Promedio

ICH : International Conference of Harmonization

USP : United States Pharmacopeia

T_R : Tiempo de retención

SI : Estándar interno

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
Reactivos.....	7
Materiales y equipos.....	7
METODOLOGÍA.....	8
1. Obtención, almacenamiento y procesamiento de la muestra.....	8
I. Obtención.....	8
II. Almacenamiento y procesamiento.....	8
2. Soluciones de trabajo.....	8
I. Preparación de soluciones buffer.....	8
II. Preparación de solución derivatizante.....	8
III. Preparación de solución estándar y muestra de pepino de mar.....	8
IV. Preparación de fases móviles.....	9
3. Procedimiento de inyección de estándares y muestras en HPLC.....	9
4. Implementación del método para cuantificación de aminoácidos en manto de <i>A. chilensis</i>	10
5. Optimización del método.....	10
Tiempo de retención.....	10
Número de platos teóricos.....	11

Factor de asimetría.....	11
Altura equivalente de platos teóricos.....	11
Resolución cromatográfica.....	12
6. Validación del método.....	12
I. Linealidad.....	12
II. Precisión.....	14
A. Repetibilidad del método.....	14
B. Reproducibilidad del método.....	15
III. Sensibilidad.....	16
A. Límite de detección.....	16
B. Límite de cuantificación.....	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIÓN.....	31
BIBLIOGRAFÍA.....	32
ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1:	Condiciones cromatográficas utilizadas en la identificación y cuantificación de aminoácidos en <i>A. chilensis</i> .	10
TABLA N°2:	Tiempos de retención de estándares de aminoácidos.	17
TABLA N°3:	Parámetros cromatográficos optimizados para metodología analítica utilizada.	18
TABLA N°4:	Factor de asimetría para cada aminoácido estudiado	19
TABLA N°5:	Estimadores estadísticos para linealidad de curvas de calibración de los aminoácidos Ácido aspártico y glutámico, Serina, Histidina, Arginina, Alanina y Glicina.	21
TABLA N°6:	Estimadores estadísticos para linealidad de curvas de calibración de los aminoácidos Valina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina, Tirosina y Lisina.	21
TABLA N°7:	Repetibilidad aminoácidos presentes en <i>Athyonidium chilensis</i> .	26
TABLA N°8:	Reproducibilidad aminoácidos presentes en <i>Athyonidium chilensis</i> .	27
TABLA N°9:	Límites de detección y cuantificación para los trece aminoácidos estudiados.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1:	Reacción de derivatización entre o-ftalaldehído (OPA), ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y un aminoácido.	4
FIGURA N°2:	Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibración de estándares de aminoácidos estudiados.	20
FIGURA N°3:	Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para cada aminoácido estudiado.	22
FIGURA N°4:	Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para cada aminoácido estudiado.	23
FIGURA N°5:	Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para Lisina.	24
FIGURA N°6:	Mecanismo de formación de productos secundarios en la reacción de derivatización de aminoácidos con un exceso de reactivo OPA	25
FIGURA N°7:	Mecanismo de reacción para la formación de derivados de Histidina: OPA/MPA-HIS1 y OPA/MPA-HIS2.	28

INTRODUCCIÓN

La evolución de las especies ha permitido la existencia de una gran biodiversidad terrestre, aérea y acuática. Dentro de esta última encontramos organismos, en su mayoría invertebrados, que pueden poseer barreras físicas (exoesqueletos) con el objetivo de defenderse contra otros depredadores, pero existen otro tipo de especies que pueden secretar distintos tipos de compuestos químicos para sobrevivir (metabolitos secundarios) (Haard & Simpson, 1994). La mayoría de estos organismos se desenvuelven en ambientes extremos de presión, temperatura, rangos de salinidad y fluctuaciones de oxígeno, por lo que la pesca y la exploración marina abre un abanico de grandes oportunidades no solo para el comercio, sino también para el descubrimiento y síntesis de nuevos compuestos con utilidad biológica, siendo además una importante fuente de alimentación, desarrollo de suplementos alimenticios y fármacos (Al-Haj *et al.*, 2010; Datta, 2015).

En los últimos años ha surgido gran interés por un cierto tipo de organismos invertebrados pertenecientes al *Phylum Equinodermata* o equinodermos. Dentro de los equinodermos se encuentra la familia *Holothuriidae*, del género holoturia, conocidos comúnmente como pepinos de mar, están extensamente distribuidos, desde las zonas superficiales (intermareales) hasta las profundidades oceánicas (Connand & Byrne, 1993). Habitan en fondos blandos y se alimentan de sedimentos o materia en suspensión, esto por la acción de succión de la faringe cuando el animal introduce los tentáculos por la boca (Lawrence, 1987; Barnes *et al.*, 1996). Se han descrito más de 1500 variedades diferentes a lo largo del océano (Schillali *et al.*, 2014). Estas especies son de importancia económica, principalmente en países asiáticos, donde se considera un producto de élite, lo que ha causado una gran depleción de este recurso marino en estos países (Purcell *et al.*, 2002; Hamel *et al.*, 2003).

Actualmente, existen más de doscientas especies explotadas de pepino de mar, sin embargo, alrededor de veinte poseen una real importancia comercial (Skewes *et al.*, 2004). En China existen alrededor de cien especies de pepino de mar, de las cuales sólo 5 son comercializadas de forma importante, destacando entre ellas *Apostichopus japonicus* (Yellow Sea Fisheries Research Institute, 1991). La elección de especies para alimento depende principalmente de las características estructurales de la pared del cuerpo, ya que ésta presenta pequeñas placas calcáreas empotradas bajo la piel, que le sirven de sostén y protección. Las holoturias que sirven para la elaboración del trepang (comida a base de pepino de mar de alto valor nutritivo) provienen principalmente de los océanos Pacífico e Índico y del mar Rojo, pertenecientes a los géneros *Holothuria* y *Stichopus* (Caso, 1972). Las especies más utilizadas para la elaboración del trepang son *Holothuria nobilis*, *H. mauritiana*, *H. scabra*, *H. lecanora*, *H. argus*, *H. edulis*, *Stichopus variegatus*, *S. japonicus*.

China y Japón son los principales productores y consumidores de pepino de mar a nivel mundial, debido a que este recurso marino es parte de su dieta, además de poseer un uso tradicional, sobre todo en China, donde se ha utilizado para el tratamiento de la artritis, como purificador de la sangre y los riñones, y poseer un efecto afrodisíaco. Se estima que su cultivo y producción en este país excedió los 150 millones de dólares en el año 2009. (Li *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2018). China, Corea y Japón, entre los años 2009 a 2016, fueron los países con mayor producción de este recurso marino (Yu *et al.*, 2015; Rogers *et al.*, 2018).

La razón principal de su elevado valor comercial se debe a que forma parte de la alimentación base de la mayoría de los países asiáticos, pudiendo comerse tanto crudo, hervido o en conserva. Su alto contenido proteico, es aproximadamente tres veces más que el de pescados y mariscos, siendo este otro de los motivos por lo que el pepino de mar es uno de los alimentos más consumidos en oriente. Entre sus componentes destaca el fucoidano, un polisacárido que se ha encontrado en el manto del *Apostichopus japonicus*, con actividad anticoagulante, antiosteoclastogénica, hipoglicémica y protectora contra los efectos ulcerativos de la mucosa gástrica (Wang *et al.*, 2012). Además, otros estudios han establecido que los pepinos de mar poseen, entre otras propiedades, actividad antiinflamatoria (Xue *et al.*, 2015), anti-cáncer (Janakiram, Mohammed, & Rao, 2015), e incluso propiedades antioxidantes (Mou *et al.*, 2018).

En Chile están descritas 74 especies de holoturias de las cuales dos son explotadas comercialmente en nuestro país, *Pattalus mollis* y *Athyonidium chilensis*, siendo esta última una de las especies de Holothuridos más comunes en nuestro país (Guisado, 2005) y su comercialización empieza en el año 1992. La recolección de *A. chilensis* entre el año 1998 y 2008 fue de 269 toneladas por año, con un máximo de extracción de 1510 toneladas en el año 2000 (SERNAPESCA, 2008; Toral-Granda, 2008). Se caracteriza por ser una de las especies de mayor longitud, perteneciendo al orden Dendrochirotida, morfológicamente posee una marcada simetría bilateral, presentando una zona ventral y dorsal claramente definidas. Externamente, se distinguen 2 coronas de cinco pares de tentáculos dendríticos, dispuestos externamente por grandes tentáculos e internamente formada por tentáculos más pequeños (Pawson, 1968; Fernández, 1998). Al igual que las especies orientales, *A. chilensis* ha mostrado poseer en el manto polisacáridos bioactivos con propiedades anticoagulantes, aislándose principalmente condroitin-sulfato fucosilado y algunos fucanos en menor cantidad (Matsuhira *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2014; Pomin, 2015).

Diferentes estudios reportan que en general estas especies poseen proteínas como su principal componente, siendo los porcentajes de lípidos y carbohidratos algo menores. En el caso de individuos de *A. chilensis* cultivados con dietas artificiales, se determinaron en la pared del cuerpo valores de proteínas superiores al 60%. Por otra parte, estudios reportan que algunos oligopéptidos provenientes de hidrolizados de algunas especies de pepinos de mar pueden tener un efecto antioxidante (Zheng *et al.*, 2012) es por esto que la composición y cuantificación de sus aminoácidos puede ser de utilidad para la evaluación de las propiedades nutricionales y funcionales, lo que puede determinar su factibilidad para ser incorporado en la formulación de alimentos como ingredientes alimentarios, con fines tecnológicos y nutricionales.

Para la caracterización y cuantificación de aminoácidos de proteínas en muestras biológicas, previamente estas deben ser sometidas a procedimientos de hidrólisis. Existen tres tipos de hidrólisis: hidrólisis ácida, alcalina y enzimática; la diferencia de las dos primeras principalmente radica en el tipo de reactivos y de los aminoácidos que puedan ser cuantificados posterior a la hidrólisis. Para la hidrólisis ácida comúnmente se utilizan soluciones de HCl 6N, desafortunadamente, esto provoca la destrucción de aminoácidos azufrados, como cisteína, triptófano, metionina, por lo que este tipo de hidrólisis no permite obtener todos los aminoácidos requeridos para su posterior cuantificación. En cuanto a la hidrólisis alcalina, se utilizan bases fuertes como NaOH y KOH, esto permite poder cuantificar los aminoácidos que se destruyen por acción de los ácidos fuertes en la

hidrólisis ácida (Akhlaghi *et al.*, 2015). La hidrólisis enzimática utiliza enzimas a una determinada temperatura y pH, para desnaturalizar las proteínas en estructuras primarias o secundarias y posteriormente romper los enlaces peptídicos para obtener los distintos aminoácidos que las componen (Aluko, 2018).

Debido a lo anterior, el análisis proteico, y más específicamente aminoacídico del pepino de mar puede ser de gran interés tanto económico como con fines de investigación. Investigaciones anteriores han utilizado métodos de análisis de aminoácidos en algas y otros tipos de organismos marinos (Capetillo, 2000); métodos de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) han sido los más utilizados para dicho fin. La cromatografía líquida es una técnica de separación que se ha utilizado desde 1906 para el aislamiento de diversos tipos de compuestos químicos en diferentes tipos de matrices. Esta técnica consiste en la habilidad de una columna que contiene en su interior una fase estacionaria porosa, que permite la separación de diferentes compuestos cuando se añade una mezcla de compuestos, que están disueltos y son eluidos por una fase móvil. Cuando la muestra y la fase móvil son eluidos a través de la columna, distintos tipos de interacciones producen la separación de los compuestos que están dentro de la mezcla. Los compuestos más afines a la fase estacionaria se retienen con mayor fuerza dentro de la columna, por lo que son los últimos en eluir, mientras que los compuestos menos afines a dicha fase son los primeros en salir de la columna, por lo que su tiempo de retención es menor y son más afines a la fase móvil (Quattrocchi *et al.*, 1992). Los parámetros involucrados en la optimización de una metodología HPLC son:

- Tiempo de retención (T_R): representa el tiempo transcurrido entre la introducción de la muestra en la columna y el momento en el que dicho componente alcanza el máximo de señal en el detector.
- Número de platos teóricos (N): es el cuadrado de la relación entre el tiempo de retención y la desviación estándar. Esto define la eficacia de la columna.
- Altura equivalente de platos teóricos (H): relaciona la eficacia de una columna con su longitud. Es el cociente entre la longitud de la columna (L) y el número de platos teóricos (N).
- Factor de asimetría (A_s): es una relación que determina la distribución gaussiana de un peak cromatográfico.
- Resolución cromatográfica (R_s): medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos. Se define como el cociente de la distancia entre los centros de las dos bandas y el valor medio de la anchura de estas. Mientras mayor sea R_s mejor separados estarán los picos cromatográficos de los componentes.

Se han desarrollado distintos métodos de cuantificación de aminoácidos a través de HPLC en muestras biológicas con diferentes métodos de detección (Song *et al.*, 2018), entre los cuales destaca la detección a través de detectores de fluorescencia. Este tipo de detección permite obtener una mayor sensibilidad, entre unas 20 o 30 veces mayor a la de un detector ultravioleta-visible. Existen distintos reactivos que permiten obtener compuestos fluorescentes que pueden ser detectados por HPLC con detector de

fluorescencia, entre los cuales destacan 9-fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl) y o-ftalaldehído (OPA). En el caso del segundo reactivo este puede reaccionar con los aminoácidos y un agente reductor como el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) para generar un producto insoindólico fluorescente (Figura 1) que puede ser leído a una determinada longitud de onda de excitación y de emisión (Jones & Gilligan, 1983; Capetillo, 2000).

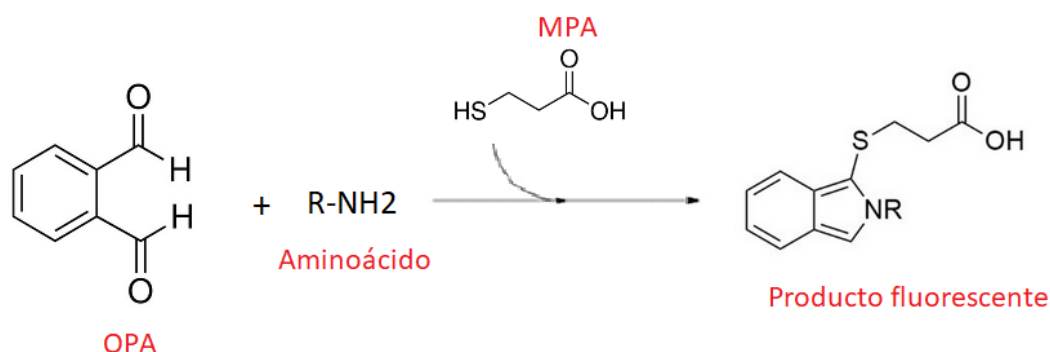


Figura 1. Reacción de derivatización entre o-ftalaldehído (OPA), ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) y un aminoácido (Elaboración propia basada en Capetillo, 2000).

Si bien existen métodos cromatográficos para la cuantificación de distintos tipos de compuestos, estos para entregar resultados confiables y seguros deben estar anteriormente validados. La validación de un método analítico es un proceso documentado por el cual un procedimiento analítico o método demuestra ser adecuado para el uso que está destinado. Validación se define como una acción documentada, efectuada con concordancia con las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y Buenas prácticas de Laboratorio (GLP), que demuestre que los procesos y actividades empleados en el control de calidad están dentro de los límites establecidos (ISP Chile, 2015). Cuando se realiza la validación de un método analítico, se busca poder determinar, junto con el fundamento estadístico, que el método utilizado para esa determinación o proceso analítico, entrega junto a la documentación adecuada, resultados confiables y reproducibles, con un alto grado de exactitud y precisión, y que están dentro de los parámetros establecidos, para entregar calidad y seguridad en los resultados (USP, 2016).

Los parámetros de validación que se deben tener en cuenta difieren según los requisitos que exigen legalmente los distintos organismos (USP, 2016). Los planes de validación deben contemplar y evaluar: linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.

- **Linealidad:** capacidad de un método de análisis, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito a determinar. Su determinación se realiza por el método de los mínimos cuadrados (USP, 2016).
- **Precisión:** es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales, cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una solución homogénea (USP, 2016).

- Exactitud: es el procedimiento analítico, que se refiere a la proximidad entre los resultados obtenidos en el procedimiento y el valor verdadero (USP, 2016).
- Sensibilidad: capacidad de un método para determinar pequeñas diferencias en concentraciones del analito. Esta contempla los límites de detección y de cuantificación.
 - Límite de detección: cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas (USP, 2016).
 - Límite de cuantificación: es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas (USP, 2016).
- Selectividad o especificidad: es el grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes presentes en la muestra de interés, en forma exacta y específica pese a las impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra (USP, 2016).

Basado en los antecedentes presentados, esta unidad de investigación busca establecer una metodología analítica HPLC validada para el análisis de aminoácidos en pepino de mar chileno (*Athyonidium chilensis*) acoplada a detector de fluorescencia. Este método de detección se seleccionó debido a que presenta una mayor sensibilidad, sobre todo en muestras que presentan concentraciones bajas, además por ser un método sencillo de utilizar y que ha sido uno de los más utilizados para la detección y cuantificación de aminoácidos en muestras biológicas (Song *et al.*, 2018). Se buscará la optimización de sus parámetros cromatográficos y la validación del método, con la finalidad de obtener un método que permita detectar y cuantificar los aminoácidos presentes en estos seres vivos, para favorecer posteriores estudios que contemplen este recurso marino para preparación de suplementos alimenticios, medicamentos, entre otros.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia para cuantificación de aminoácidos en manto de *Athyridium chilensis* (Pepino de mar).

Objetivos específicos:

1. Implementación de un método cromatográfico para la cuantificación de aminoácidos en Pepino de Mar.
2. Optimización del método cromatográfico para la cuantificación de aminoácidos en Pepino de Mar
3. Validación del método cromatográfico para la cuantificación de aminoácidos en Pepino de Mar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Ácido bórico p.a., Loba.
- Ácido clorhídrico 37% p.a., Merck.
- Ácido 3 – mercaptopropiónico (MPA) p.a., Merck.
- Agua ultra pura.
- Estándar de L – aminoácidos (21G; L-Ácido aspártico; L-Ácido glutámico; L-Serina; L-Histidina; L-Arginina; L-Alanina; L-Glicina; L-Valina; L-Fenilalanina; L-Isoleucina; L-Leucina; L-Tirosina; L-Lisina) 98-99% de pureza, Sigma-Aldrich.
- O-Ftalaldialdehído para fluorimetría (OPA), Merck.
- Fosfato de potasio dihidrogenado p.a., Merck.
- Hidróxido de potasio p.a., Merck.
- Metanol grado HPLC, $\geq 99,9\%$, Merck.
- Nitrógeno gaseoso.
- Tetrahidrofurano (THF) p.a., Merck.
- Trietanolamina (TEA) p.a., Merck.

Materiales y equipos

- Balanza semi-analítica PS360/C/2, Radwag.
- Balanza analítica AS 220/C/2, Radwag.
- Baño ultrasonido WVC-D10H, Wiseclaen.
- Cámara desecadora
- Centrífuga digital refrigerada 5702-R, Eppendorf.
- Columna Inertsil ODS-3 C18, 15cm x 4,6 mm x 150mm, 5 μm .
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), con autosampler modelo SIL-20AC, horno de columna modelo CTO-20AC, desgasificador modelo DGU-20A5 y detector de fluorescencia RF-10AXL, Shimadzu.
- Estufa de secado ED-8, Binder.
- Material fungible de laboratorio.
- Refrigerador, LG.
- MAXI MIX II Vortex Mixer, Thermo.

METODOLOGÍA

1. Obtención, almacenamiento y procesamiento de la muestra

- I. Obtención: Se utilizaron muestras de *A. chilensis* (Pepino de mar) recolectadas en el sector de El Tabo, cuyo uso fue aprobado previamente por el Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales (CIBICA) y el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso a través de las actas BEA088-2016 y BS022/2016 respectivamente para el proyecto “Valoración del *Athionydium chilensis* (Pepino de mar) a través de su caracterización nutricional y capacidad funcional proteica” (Anexos 1, 2 y 3).
- II. Almacenamiento y procesamiento: Las muestras de *A. chilensis* previamente liofilizadas y tamizadas se almacenaron en cámara desecadora y protegidas de la luz. Además, se almacenó contramuestra en caso de posteriores análisis.

2. Soluciones de trabajo

I. Preparación de soluciones buffer

- Buffer borato 100 mM: Se preparó esta solución diluyendo 1,54 g de ácido bórico en 500 mL de agua HPLC, posteriormente se ajustó a pH 9,9 con una solución 1,5 M de KOH.
- Buffer fosfato 9 mM: Se preparó esta solución diluyendo 2,45 g de fosfato de potasio dihidrogenado en 2 L de agua HPLC, se adicionó 0,5 mL de trietanolamina por litro de solución buffer y se ajustó a pH 6,9 con una solución 1,5 M de KOH.
- Buffer neutralizante: Se preparó esta solución diluyendo 13,61 g de fosfato de potasio dihidrogenado en 250 mL de agua HPLC y se adicionó 10 mL de trietanolamina por litro de solución buffer.

II. Preparación de solución derivatizante

Para la preparación de esta solución, en un tubo de ensayo se pesó 25 mg de reactivo o-ftalaldehido (OPA), se añadió 0,5 mL de metanol HPLC y 25 μ L de MPA, se centrifugó y se sonicó para mejorar la solubilidad. Posteriormente se esta solución se protegió de la luz debido a que el reactivo OPA es altamente foto lábil.

III. Preparación de solución estándar y muestra de pepino de mar

Para la preparación de estándar de aminoácidos, se pesaron 10 mg de cada uno (excepto tirosina se pesaron 5 mg) y se disolvieron por separado en matraces aforados de 5 mL con una mezcla de buffer borato y metanol HPLC en proporción 1:1. Del

estándar interno (SI), Norvalina, se pesaron 11,3 mg y se aforaron con buffer borato/metanol en la misma proporción en un matraz aforado de 5 mL. Posteriormente se tomaron volúmenes de estas soluciones (exceptuando Norvalina) y se mezclaron en una solución única (Solución madre 1) y se aforaron a 10 mL con una mezcla de buffer borato y metanol en proporción 3:1. De esta solución se tomó un volumen de 750 μ L y se depositó en un tubo eppendorf de 2 mL y se añadió 1,25 mL de mezcla de buffer borato/metanol 3:1 (Solución madre 2). De esta última solución se tomó un volumen de 50 μ L y se mezcló con 20 μ L de SI, 200 μ L de agua HPLC y 900 μ L de reactivo OPA/MPA. Se mezcló y se esperó 3 minutos para posteriormente añadir 500 μ L de buffer neutralizante, para luego filtrar a través de filtros de jeringa de 0,45 micras e inyectar en el HPLC.

Para la preparación de la solución de trabajo de *A. chilensis*, se pesaron 50 mg de muestra por sextuplicado y se hidrolizaron con 15 mL de HCl 6N con ambiente de nitrógeno. Estas muestras se sometieron a una temperatura de 110 ± 2 °C durante 24 horas. Posteriormente estas muestras se evaporaron y reconstituyeron con mezcla de buffer borato/metanol 1:1, se centrifugaron a 4000 rpm, a una temperatura de 4°C y durante 4 minutos. Después de la centrifugación se procedió a aforar en matraces de 10 mL.

IV. Preparación de fases móviles

- Fase móvil A: Se mezclaron 250mL de buffer fosfato 9 mM, 250mL de agua HPLC y 1mL de tetrahidrofurano.
- Fase móvil B: Se mezclaron 250 mL de buffer fosfato 9 mM, 175 mL metanol HPLC y 75 mL de acetonitrilo HPLC.

3. Procedimiento de inyección de estándares y muestras en HPLC

Para el análisis de los aminoácidos tirosina y lisina se utilizaron las muestras sin diluir, en cambio para los otros 11 aminoácidos, se procedió a diluir las muestras diez veces con una mezcla de buffer borato/metanol HPLC en proporción 3:1 debido a que presentaron un mayor factor de respuesta, por lo que se les añadió un volumen de 1 mL y 0,1 mL de Norvalina respectivamente.

Para el proceso de derivatización e inyección, se tomaron 50 μ L de muestra a los cuales se le añadieron 200 μ L de agua HPLC y 900 μ L de reactivo OPA/MPA. Se mezcló y esperó durante 3 minutos para posteriormente añadir un volumen de 500 μ L de buffer neutralizante, para luego filtrar a través de filtros de jeringa de 0,45 micras e inyectar en el HPLC (Capetillo, 2000).

4. Implementación del método para cuantificación de aminoácidos en manto de *A. chilensis*

La identificación y cuantificación de aminoácidos en muestras de manto se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se tomaron como base las condiciones cromatográficas del trabajo realizado por Capetillo (2000) (Tabla 1). Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se utilizó como estándar de referencia la mezcla de Sigma LAA21 que contiene 21 aminoácidos, y como estándar interno Norvalina.

Tabla N°1: Condiciones cromatográficas utilizadas en la identificación y cuantificación de aminoácidos en *A. chilensis* (Basado en trabajo de Capetillo, 2000).

Condiciones cromatográficas	Condiciones utilizadas
Equipo	SHIMADZU
Bomba	Model L-7100
Detector	Fluorescencia RF-10AXL
Longitud de onda	Excitación: 230 nm Emisión: 389 nm
Volumen de inyección	20 µl
Flujo	1 mL/min
Columna	ODS-3 C18, 15cm x 4,6 mm x 150mm, 5 µm, Inertsil
Temperatura	30°C
Fase móvil	Fase móvil A: 250mL de buffer fosfato, 250mL de agua ultrapura y 1mL de tetrahidrofurano Fase Móvil B: 250 mL de buffer fosfato, 175 mL metanol HPLC y 75 mL de acetonitrilo HPLC
Gradiente	0-24 minutos isocrático 98% fase móvil A; 25-34 minutos rampa linear 98% fase móvil B; 35-40 minutos isocrático 98% fase móvil A

5. Optimización del método

Los parámetros cromatográficos evaluados y optimizados fueron:

- Tiempo de retención: este parámetro se determinó directamente desde el cromatograma de los aminoácidos estándares de aminoácidos, el cuál entrega el tiempo de retención (variable X) versus la señal cromatográfica o área del analito (variable Y).

- Número de platos teóricos: este parámetro se determinó a través de la siguiente fórmula (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$N = 16 \left(\frac{T_R}{w} \right)$$

Donde:

N= Número de platos teóricos

T_R= Tiempo de retención

w= Ancho de peak del cromatograma

Se utilizaron el tiempo de retención y ancho del peak de Norvalina (SI) para calcular este parámetro. Mientras mayor sea el número de platos teóricos, mayor será la eficiencia de la separación. Como valor de referencia mínimo, N debe ser mayor a 2000.

- Altura equivalente de platos teóricos (H): Este parámetro se calculó a través de la siguiente fórmula (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde:

H= Altura equivalente de platos teóricos

L= Longitud de la columna (mm)

N= Número de platos teóricos

Mientras menor sea la altura de cada plato teórico, mejor será la eficiencia de la separación de los compuestos.

- Factor de asimetría (As): este parámetro se calculó a través de la siguiente fórmula (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$As_{10\%} = \frac{b}{a}$$

Donde:

As_{10%}= Factor de asimetría al 10% de la altura del peak cromatográfico

a= extremo anterior del peak cromatográfico

b= extremo posterior del peak cromatográfico

Si el peak cromatográfico presenta un valor igual a 1, este tendrá una distribución gaussiana normal, mientras que valores mayores o menores a 1 (tailing y fronting respectivamente) no tendrán este tipo de distribución. Como criterio de aceptación se determinó que As debe ser menor a 2 (As<2) (Quattrocchi *et al.*, 1992).

- Resolución cromatográfica: este parámetro se determinó a través de la siguiente fórmula (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(w_2 + w_1)}$$

Donde:

R_s = Resolución cromatográfica

t_1 = tiempo de retención del analito 1

t_2 = tiempo de retención del analito 2

w_1 = ancho del peak del analito 1

w_2 = ancho del peak del analito 2

Este parámetro se determinó para peaks cercanos entre sí. Valores de $R_s \geq 1,5$ representan una separación hasta la línea base de ambos picos y un valor de 1,0 representa una resolución del 90%. Valores de $R_s < 1$ indican solapamiento; valores de $R_s \geq 1$ indican separación (García de María & del Castillo, 1988).

6. Validación del método

Se evaluaron los siguientes parámetros de calidad: linealidad, sensibilidad y precisión. Según lo descrito por la USP (2016), Quattrocchi *et al.*, (1992) e International Conference of Harmonization (2005).

I. Linealidad

Capacidad del sistema para obtener una relación proporcional entre la cantidad de analito y su respuesta. El objetivo será obtener un modelo que describa con precisión esta relación.

Se determinó a través de la construcción de una curva de calibrado de cuatro niveles de concentración a partir de la solución madre 2 de trece aminoácidos estándar Sigma-Aldrich, de acuerdo con las siguientes concentraciones:

- Ácido aspártico: 4,69 – 9,38 – 18,75 – 37,50 mg/L
- Ácido glutámico: 9,38 – 18,75 – 37,50 – 75,00 mg/L
- Serina: 3,75 – 7,5 – 15,00 – 30,00 mg/L
- Histidina: 18,75 – 37,50 – 75,00 – 150,00 mg/L
- Arginina: 4,69 – 9,38 – 18,75 – 37,50 mg/L
- Alanina: 3,75 – 7,5 – 15,00 – 30,00 mg/L
- Glicina: 4,69 – 9,38 – 18,75 – 37,50 mg/L

- Valina: 2,34 – 4,69 – 9,38 – 18,75 mg/L
- Fenilalanina: 2,34 – 4,69 – 9,38 – 18,75 mg/L
- Isoleucina: 2,34 – 4,69 – 9,38 – 18,75 mg/L
- Leucina: 3,75 – 7,5 – 15,00 – 30,00 mg/L
- Tirosina: 12,50 – 25,00 – 50,00 – 100,00 mg/L
- Lisina: 15,00 – 30,00 – 60,00 – 120,00 mg/L
- Norvalina (SI): 22,6 mg/L

La mezcla de aminoácidos se analizó según metodología y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. Con los datos obtenidos, se determinó:

1. La ecuación de la recta (pendiente e intercepto).
2. Coeficiente de correlación r , coeficiente de correlación r^2 .
3. Test de linealidad:
 - Estadístico t de Student para la pendiente (t_{cal})

La curva de regresión lineal se determinó mediante el método de los mínimos cuadrados, según la fórmula:

$$y = mx + b$$

Donde:

b = intercepto en el eje de las ordenadas

m = pendiente de la gráfica

Se evaluó el coeficiente de regresión (r), que determina el ajuste lineal del método, siendo el valor $r = 1$ para una recta perfectamente lineal. Es necesario demostrar estadísticamente que el método es lineal en el rango de concentraciones utilizado para cada analito. Para esto, se determinó el valor estadístico t de Student experimental (t_{cal}) según la siguiente ecuación (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$t_{cal} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde:

n= número de puntos de la curva de calibrado

r= coeficiente de correlación

r²= coeficiente de determinación

Para $t_{cal} > t_{tabla}$ (con 95% de probabilidad para n-1 grados de libertad) se determinó que existe una correlación lineal significativa entre ambas variables, indicando una pendiente distinta de cero. Además, se establecieron los intervalos de confianza para los estimadores de regresión (pendiente e intercepto) con un nivel de significancia de 95% para n-2 grados de libertad, según la ecuación de (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$a * = a \pm t \times Sa$$

$$b * = b \pm t \times Sb$$

Donde:

a (intercepto)= intervalo de confianza de a

b (pendiente)= intervalo de confianza para b

t= Valor estadístico t student

Sa= Varianza de a

Sb= Varianza de b

II. Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de un valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales. La precisión del método analítico se determinó a través de la repetibilidad y reproducibilidad de la lectura analítica de una solución de la muestra de *A. chilensis* y curva de calibración de cada aminoácido respectivamente.

A. Repetibilidad del método

Este parámetro se determinó utilizando una muestra de *A. chilensis*, la cual fue analizada según la metodología por sextuplicado, en condiciones de repetibilidad (por un mismo analista, mismo instrumento, mismo día).

Matemáticamente, la repetibilidad se expresa como el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) permitiendo evaluar la incertidumbre y dispersión de los datos alrededor de un valor medio (Quattrocchi *et al.*, 1992). La desviación estándar relativa se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$RSD = \frac{DS}{X} \times 100$$

Donde:

DS= desviación estándar de las concentraciones obtenidas

X= promedio de las concentraciones obtenidas

Como criterio de aceptación de este parámetro se utilizó el coeficiente de variación de Horwitz (CVh) para cada aminoácido, según la ecuación de Horwitz que relaciona la RSD con la concentración del compuesto, expresado en potencia de 10 (Quattrocchi *et al.*, 1992), como se indica en la siguiente fórmula:

$$CVh = 2^{(1-0,5 \text{ LOG } C)}$$

Para que el método sea repetible se estableció que el coeficiente de variación debe ser menor al CVh (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Se estableció un intervalo de confianza para la medida, que se calculó de acuerdo con la distribución t de Student para n-1 grados de libertad con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ (95% de probabilidad) según la siguiente ecuación (Quattrocchi *et al.*, 1992):

$$x = \frac{t \times s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

x= intervalo de confianza

S= Desviación estándar

n= Número de mediciones

t= Valor de t Student

B. Reproducibilidad del método

Se determinó a partir de la inyección de 6 soluciones de *A. chilensis*, por un analista y día diferente. Como criterio de aceptación de este parámetro se utilizó el coeficiente de variación de Horwitz (CVh) para cada aminoácido, según la ecuación de Horwitz que relaciona la RSD con la concentración del compuesto, expresado en potencia de 10 (Quattrocchi *et al.*, 1992), como se indica en la siguiente fórmula:

$$CVh = 2^{(1-0,5 \text{ LOG } C)}$$

Para que el método sea reproducible se estableció que coeficiente de variación debe ser menor al CVh (Quattrocchi *et al.*, 1992).

III. Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir una señal o resultado significativo.

A. Límite de detección (LD)

El límite de detección corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra. Para calcular el límite de detección, se utilizó el método de ICH (2005) basado la desviación estándar de la respuesta (intercepto) y la pendiente, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3,3 * S}{m}$$

Donde:

LD= Límite de detección

S= desviación estándar de los interceptos

m= pendiente de la curva de calibración

B. Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud según las condiciones establecidas, expresándose en unidades de concentración. Para calcular el límite de detección, se utilizó el método de ICH (2005) basado la desviación estándar de la respuesta (intercepto) y la pendiente, como se muestra en la siguiente fórmula:

$$LQ = \frac{10 * S}{m}$$

Donde:

LQ= Límite de cuantificación

S= desviación estándar de los interceptos

m= pendiente de la curva de calibración

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de parámetros cromatográficos

La tabla N°2 muestra los tiempos de retención obtenidos a partir del cromatograma de los estándares de aminoácidos (Figura 2), incluyendo el tiempo de retención del estándar interno, Norvalina.

Tabla N° 2: Tiempos de retención de estándares de aminoácidos.

Aminoácido	Tiempo de retención (Tr) (min)
Ácido aspártico	7,19
Ácido glutámico	9,15
Serina	12,62
Histidina	14,87
Arginina	17,14
Alanina	17,68
Tirosina	19,70
Glicina	21,47
Valina	23,35
Norvalina (SI)	24,25
Fenilalanina	25,35
Isoleucina	26,26
Leucina	27,28
Lisina	29,54

En la tabla N°3 se muestran los parámetros cromatográficos: Número de platos teóricos (N), Altura equivalente de platos teóricos (H) y Resolución (Rs).

Tabla N° 3: Parámetros cromatográficos optimizados para metodología analítica utilizada.

Aminoácidos	Resolución (Rs)
Asp-Glu	3,04
Glu-Ser	4,24
Ser-Hys	3,18
Hys-Arg	4,23
Arg-Ala	0,94
Ala-Tyr	3,45
Tyr-Gly	2,43
Gly-Val	2,61
Val-Nor	1,35
Nor-Phe	1,71
Phe-Ile	1,71
Ile-Leu	1,34
Leu-Lys	2,94
N	15989,88
H (mm)	0,009381

Asp: Ácido aspártico; Glu: Ácido glutámico; Ser: Serina; Hys: Histidina; Arg: Arginina; Ala: Alanina; Tyr: Tirosina; Gly: Glicina; Val: Valina; Nor: Norvalina (SI); Phe: Fenilalanina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Lys: Lisina; N: número de platos teóricos; H: altura equivalente de platos teóricos.

En la tabla anterior se presentan los parámetros cromatográficos evaluados y optimizados. El número de platos teóricos presentó un valor elevado (valor mínimo >2000) y la altura equivalente de platos teóricos presentó un valor bajo, por lo que la eficiencia de la columna para separar los compuestos para la metodología empleada es la óptima (Food and Drug Administration, 1994). Esto se demuestra a partir de la resolución de los aminoácidos analizados, ya que la mayoría de los compuestos presentan una buena separación (diez compuestos con una resolución $\geq 1,5$ y dos compuestos con una resolución >1), excepto para el caso de Arginina-Alanina, que presentan un leve solapamiento de los peak. Para mejorar la separación de estos compuestos podría emplearse otro tipo de gradiente entre los 17 y 18 minutos de elución, o también, disminuir el flujo de elución para permitir una mayor retención en la columna y mejor separación.

Tabla N°4: Factor de asimetría para cada aminoácido estudiado.

Aminoácido	Factor de Asimetría (As)
Ácido aspártico	1,0
Ácido glutámico	1,0
Serina	1,0
Histidina	0,71
Arginina	1,14
Alanina	0,9
Tirosina	1,0
Glicina	1,0
Valina	1,0
Norvalina (SI)	0,75
Fenilalanina	0,95
Isoleucina	0,95
Leucina	1,0
Lisina	1,0

En la tabla anterior se presentan los factores de asimetría para cada uno de los aminoácidos en el cromatograma (Figura 2). Los aminoácidos que presentan valores iguales a 1 son simétricos, mientras que los que presenten valores menores o mayores son asimétricos (fronting y tailing respectivamente). Todos los aminoácidos se encuentran dentro del criterio de aceptación ($As < 2$), por lo que se puede inferir que el método utilizado permite una correcta cuantificación de los aminoácidos.

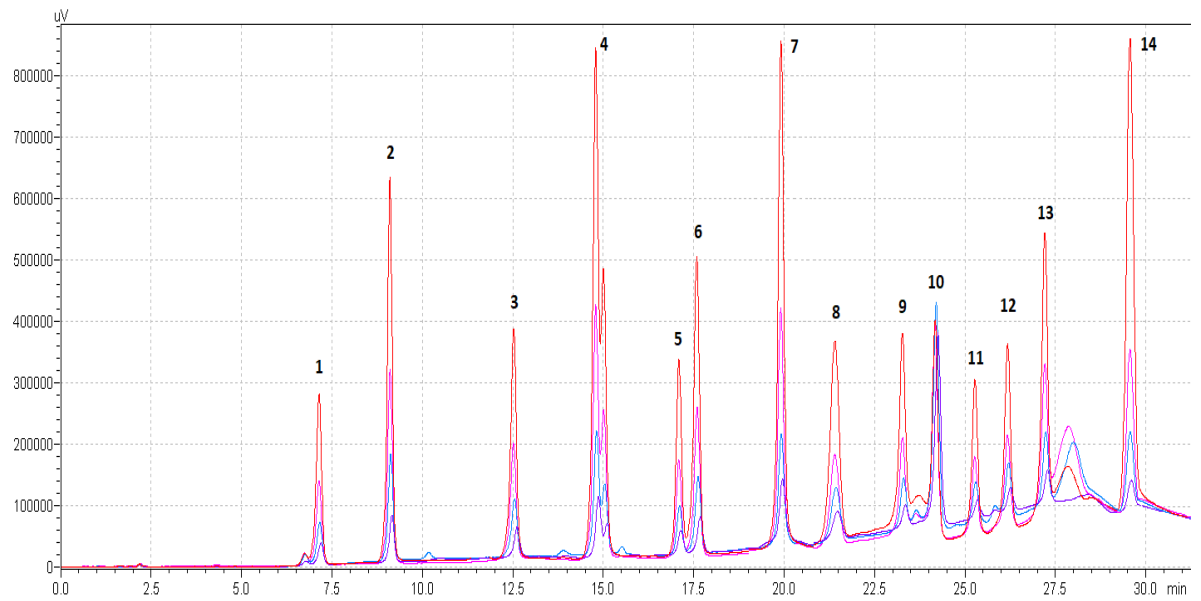


Figura 2. Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibración de estándares de aminoácidos estudiados. 1= Ácido aspártico; 2= Ácido glutámico; 3= Serina; 4= Histidina; 5= Arginina; 6= Alanina; 7= Tirosina; 8= Glicina; 9= Valina; 10= Norvalina (SI); 11= Fenilalanina; 12= Isoleucina; 13= Leucina; 14= Lisina.

Validación

A. Linealidad

Para la evaluación de este parámetro, se analizaron las relaciones de área y concentración de trece curvas de calibrado con estándares de aminoácidos (Anexo 4), correspondientes a cada aminoácido encontrado en el pepino de mar. Los estimadores estadísticos (Tablas N° 5 y 6) y las curvas de calibración (Figuras 3 a 5) se resumen a continuación:

Tabla N°5: Estimadores estadísticos para linealidad de curvas de calibración de los aminoácidos Ácido aspártico y glutámico, serina, histidina, arginina, alanina y glicina.

Parámetros estadísticos	Ácido aspártico	Ácido glutámico	Serina	Histidina	Arginina	Alanina	Glicina
r	0,9982	0,9992	0,9992	0,9991	0,9994	0,9993	0,9981
r ²	0,9964	0,9984	0,9983	0,9982	0,9988	0,9987	0,9962
m	0,5287	0,5513	1,0021	0,4310	0,6363	1,2835	1,0138
b	-0,0474	-0,0621	-0,0408	-0,1206	-0,0401	-0,0645	-0,0678
a*	-0,0474 ± 0,0930	-0,0621 ± 0,1285	-0,0408 ± 0,0956	-0,1206 ± 0,2139	-0,0401 ± 0,0647	-0,0645 ± 0,1086	-0,0678 ± 0,1815
b*	0,5287 ± 0,0972	0,5513 ± 0,0672	1,0021 ± 0,1250	0,4310 ± 0,0559	0,6363 ± 0,0677	1,2835 ± 0,1420	1,0138 ± 0,1899
t _{cal}	23,3962	35,2903	34,5049	33,1632	40,4356	38,8911	22,9738

Tabla N°6: Estimadores estadísticos para linealidad de curvas de calibración de los aminoácidos valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, tirosina y lisina.

Parámetros estadísticos	Valina	Fenilalanina	Isoleucina	Leucina	Tirosina	Lisina
r	0,9989	0,9997	0,9990	0,9959	0,9996	0,9948
r ²	0,9979	0,9994	0,9981	0,9919	0,9992	0,9896
m	1,2040	1,0593	1,3081	1,1372	0,5792	0,4741
b	-0,0439	-0,0355	-0,0582	-0,0780	-0,0420	-0,2717
a*	-0,0439 ± 0,0811	-0,0355 ± 0,0374	-0,0582 ± 0,0831	-0,0780 ± 0,2399	-0,0420 ± 0,0950	-0,2717 ± 0,3352
b*	1,2040 ± 0,1696	1,0593 ± 0,0782	1,3081 ± 0,1739	1,1372 ± 0,3136	0,5792 ± 0,0373	0,4741 ± 0,1095
t _{cal}	30,5454	58,2550	32,3654	15,6037	49,4392	13,7723

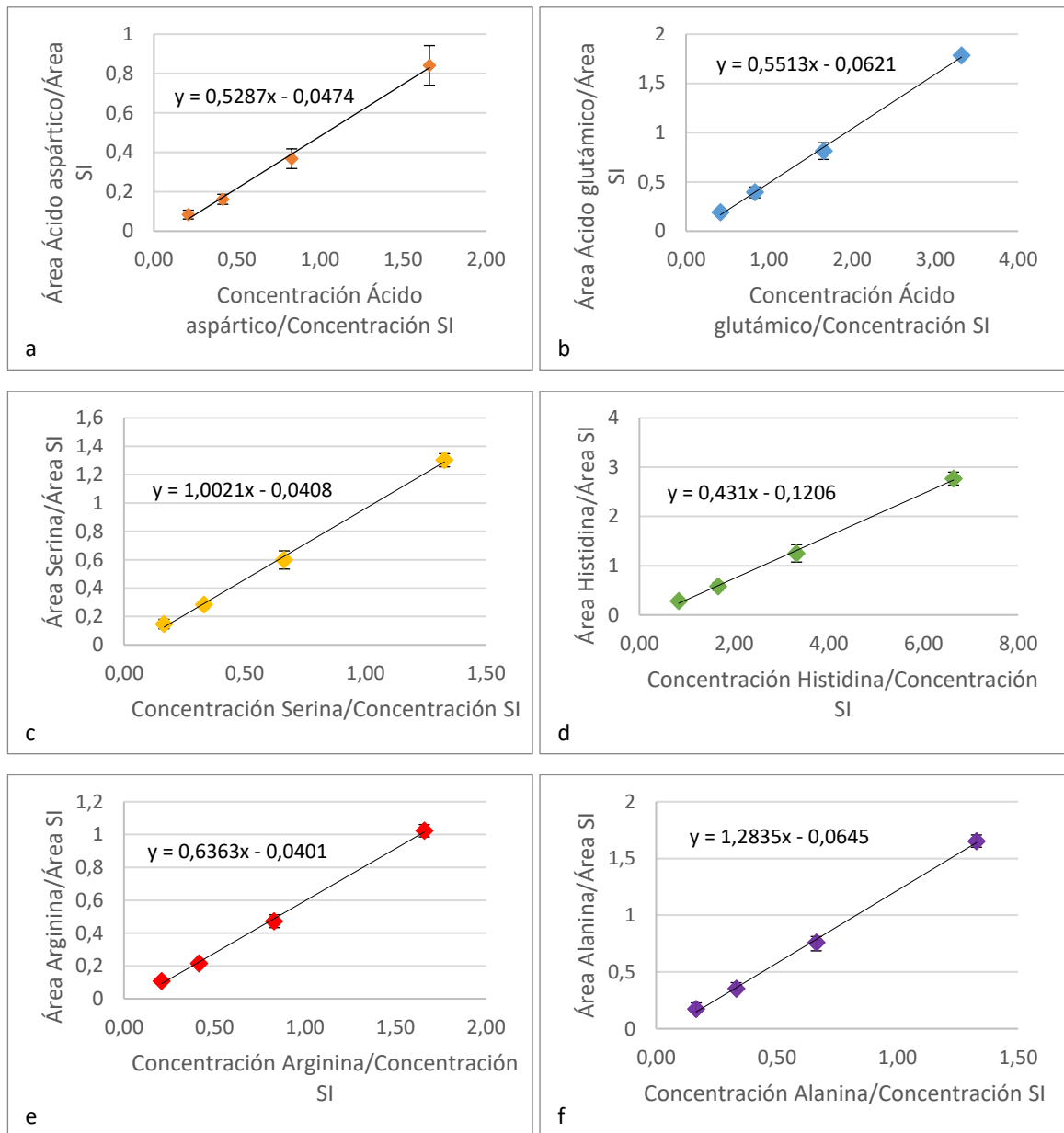


Figura 3. Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para cada aminoácido estudiado. a= Ácido aspártico; b= Ácido glutámico; c= Serina; d= Histidina; e= Arginina; f= Alanina.

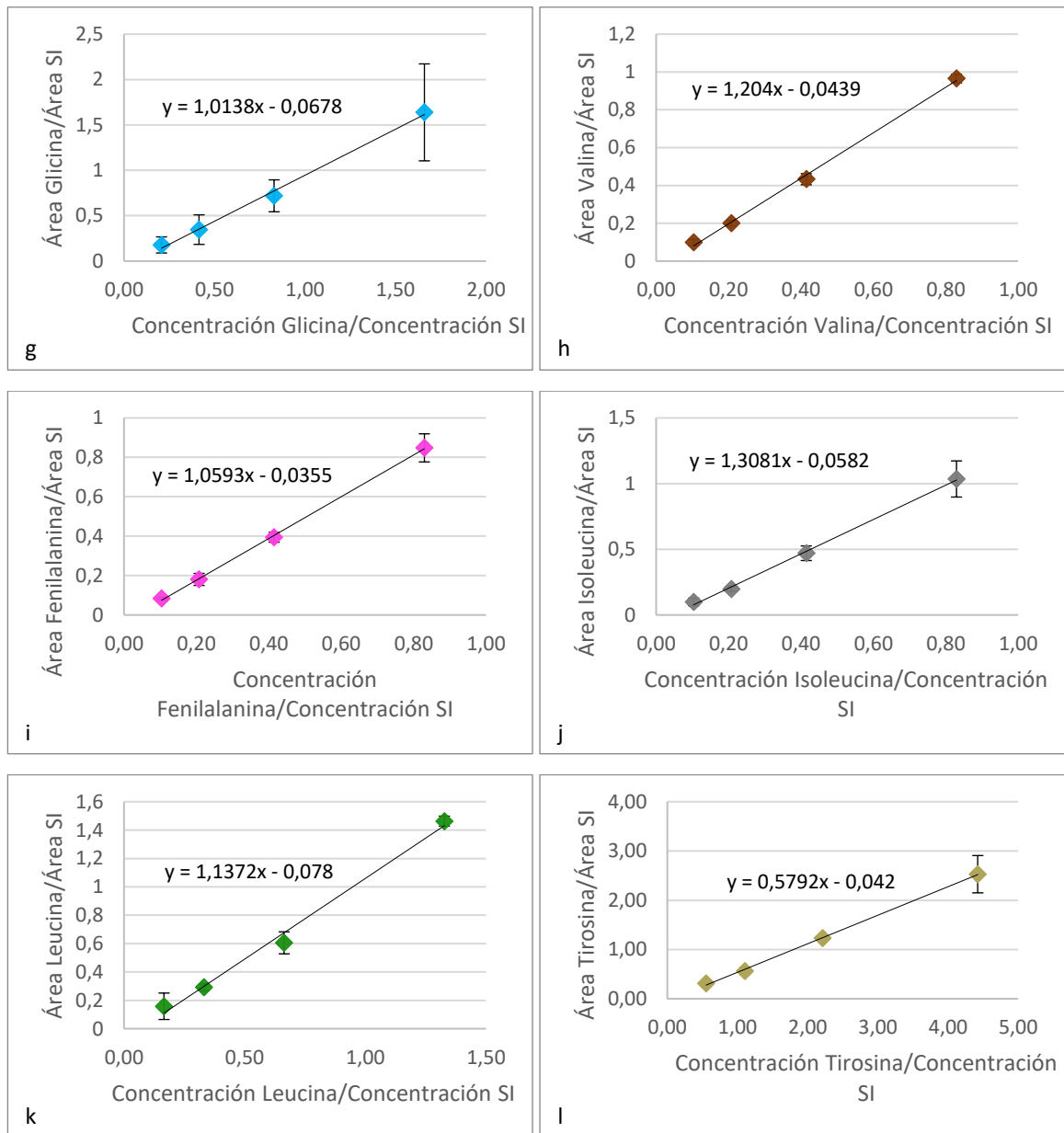


Figura 4. Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para cada aminoácido estudiado. g= Glicina; h= Valina; i= Fenilalanina; j= Isoleucina; k= Leucina; l= Tirosina.

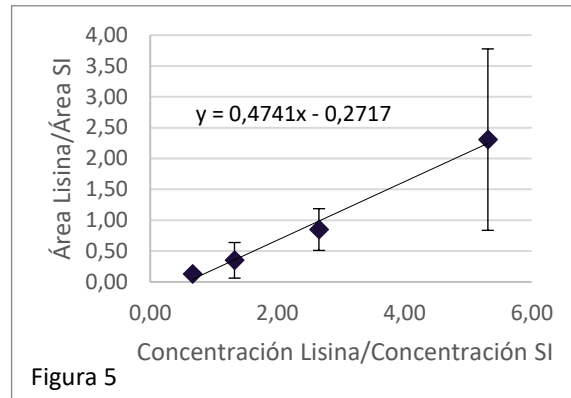


Figura 5. Concentración de aminoácido/Concentración SI versus Área de aminoácido/Área SI para Lisina.

En cuanto al parámetro de linealidad, con los datos presentados anteriormente, se puede establecer que los valores para cada uno de los trece aminoácidos, se encontraron dentro de los criterios de aceptación, tanto para los criterios de ICH (2005) ($r > 0,995$; $r^2 > 0,980$) y para los indicados por Quattrocchi *et al.* (1992) ($t_{cal} > t_{tabla}$), que permite afirmar que el método es lineal para el rango de concentraciones establecido para $n-2$ grados de libertad, con un nivel de confianza de 95% y un nivel de significancia estadística de $\alpha = 0,05$ según Quattrocchi *et al.* (1992), indicando que existe una correlación entre el área cromatográfica (variable Y) y la concentración de analito (variable X). Esto debido que todos los aminoácidos presentaron valores mayores a sus criterios de aceptación ($r = 0,995$; $r^2 = 0,998$) (ICH, 2005). Sin embargo, para ciertos aminoácidos como glicina ($r = 0,9981$; $r^2 = 0,9962$) y lisina ($r = 0,9948$; $r^2 = 0,9896$), que presentaron coeficientes de variación elevados para los puntos de sus curvas de calibración respectivas, se puede explicar a través de su inestabilidad y la aparente formación de otros productos secundarios postderivatización con la mezcla de reactivo OPA/MPA (Hanczkó *et al.*, 2004).

Estudios han demostrado que la formación de productos secundarios más el exceso de moléculas de OPA podría afectar negativamente al área cromatográfica de aminoácidos como glicina y lisina, los cuales poseen una estructura NH_2-CH_2- , que podría reaccionar con otras moléculas de OPA y generar nuevos picos cromatográficos que se sumarían a los picos cromatográficos ya existentes, aumentando las áreas de estos productos secundarios y disminuyendo el área del compuesto primario (Molnár-Perl, 2001; Kutlán *et al.*, 2002; Mengerink *et al.*, 2002). Para el caso de estos aminoácidos se podría optar por utilizar otra proporción de mezcla de aminoácidos/derivatizante con la finalidad de obtener una relación con una cantidad equivalente de ambos. Aunque para estos dos aminoácidos no se cumplan los valores de r y r^2 , se tomó como criterio de aceptación el valor de t calculado (t_{cal}), ya que funciona como un mejor estimador estadístico para la linealidad de una curva de calibración (ISP Chile, 2015), por lo que todos los aminoácidos serían lineales al ser mayores al valor de t de tabla 4,303.

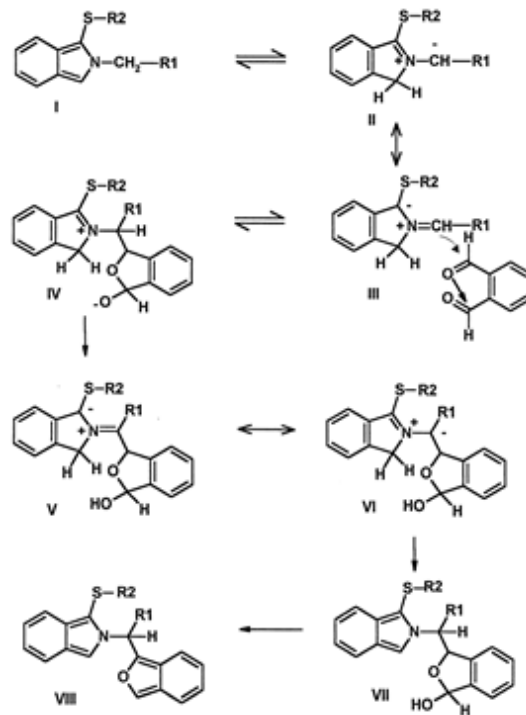


Figura 6. Mecanismo de formación de productos secundarios en la reacción de derivatización de aminoácidos con un exceso de reactivo OPA (Mengerink *et al.*, 2002).

Se determinó, por lo tanto, que la linealidad de los métodos para los trece aminoácidos fue estadísticamente significativa, ya que se obtuvieron valores de coeficiente de correlación mayores de 0,995 (excepto para lisina) y valores superiores al t tabulado (4,303) para $n-2$ grados de libertad y un nivel de confianza del 95%, por lo que existe una correlación lineal entre la variable X (Concentración de aminoácido/Concentración de estándar interno) y la variable Y (Área de aminoácido/Área de estándar interno).

B. Precisión

Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad del método se utilizó una solución de muestra de *A. chilensis* que además contenía Norvalina como estándar interno. Se midió 6 veces en el HPLC, por un mismo analista y en el mismo día. En la tabla N°7 se puede apreciar los resultados obtenidos bajo las condiciones de repetibilidad, donde se indica el área promedio, la desviación estándar, intervalo de confianza del 95% de la media y coeficiente de variación.

Tabla N° 7: Repetibilidad aminoácidos presentes en *Athyonidium chilensis*.

Aminoácido	Promedio Concentración (mg/L)	DS	CV	CV Horwitz	Intervalo de confianza (95%)
Ácido aspártico	34,21	2,69	7,86	9,40	±2,82
Ácido glutámico	49,62	1,46	2,94	8,89	±1,53
Serina	19,91	0,35	1,76	10,20	±0,37
Histidina	145,58	5,89	4,05	7,56	±6,18
Arginina	30,91	0,41	1,34	9,55	±0,43
Alanina	16,76	0,55	3,28	10,47	±0,58
Tirosina	78,98	5,34	6,76	8,29	±5,61
Glicina	29,55	0,44	1,48	9,61	±0,46
Valina	13,22	0,47	3,54	10,85	±0,49
Fenilalanina	8,43	0,28	3,37	11,61	±0,30
Isoleucina	9,05	0,38	4,21	11,49	±0,40
Leucina	17,41	0,65	3,73	10,41	±0,68
Lisina	112,03	6,12	5,47	7,86	±6,43

Los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad se encuentran dentro del criterio de aceptación para todos los aminoácidos estudiados, con coeficientes de variación (Ácido aspártico= 7,86; Ácido glutámico= 2,94; Serina= 1,76; Histidina= 4,05; Arginina= 1,34; Alanina= 3,28; Tirosina= 6,76; Glicina= 1,48; Valina= 3,54; Fenilalanina= 3,37; Isoleucina= 4,21; Leucina= 3,73; Lisina= 5,47) menores a sus respectivos criterios de aceptación (CV<9,40 para Ácido aspártico, CV<8,89 para Ácido glutámico, CV<10,20 para Serina, CV<7,56 para Histidina, CV<9,55 para Arginina, CV<10,47 para Alanina, CV<8,29 para Tirosina, CV<9,61 para Glicina, CV<10,85 para Valina, CV<11,61 para Fenilalanina, CV<11,49 para Isoleucina, CV<10,41 para Leucina, CV<7,86 para Lisina). Debido a lo anterior se puede establecer que, para los anteriores aminoácidos, la metodología no se ve afectada significativamente por la cantidad de análisis realizados en un mismo día y por el mismo analista.

Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del método se utilizó una solución de muestra de *A. chilensis* que además contenía Norvalina como estándar interno. Se midió 6 veces en el HPLC, por el mismo analista, pero en dos días diferentes. En la tabla N°8, se muestra el resumen de reproducibilidad para cada uno de los trece aminoácidos estudiados.

Tabla N° 8: Reproducibilidad aminoácidos presentes en *Athyonidium chilensis*

Aminoácido	Promedio Concentración (mg/L)	DS	CV	CV Horwitz
Ácido aspártico	31,65	3,86	12,19	9,51
Ácido glutámico	47,61	2,63	5,52	8,95
Serina	19,63	0,40	2,06	10,22
Histidina	134,10	12,78	9,53	7,65
Arginina	30,67	0,59	1,93	9,56
Alanina	16,97	0,49	2,91	10,45
Tirosina	78,61	6,17	7,84	8,30
Glicina	29,42	0,58	1,96	9,62
Valina	12,96	0,50	3,85	10,88
Fenilalanina	8,17	0,41	5,03	11,66
Isoleucina	9,51	0,55	5,82	11,40
Leucina	17,56	0,59	3,38	10,39
Lisina	111,79	5,63	5,03	7,87

Los resultados obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad se encuentran dentro del criterio de aceptación para Ácido glutámico, Serina, Arginina, Alanina, Tirosina, Glicina, Valina, Fenilalanina, Isoleucina, Leucina y Lisina, todos con coeficientes de variación (Ácido glutámico= 5,52; Serina= 2,06; Arginina= 1,93; Alanina= 2,91; Tirosina= 7,84; Glicina= 1,96; Valina= 3,85; Fenilalanina= 5,03; Isoleucina= 5,82; Leucina= 3,38; Lisina= 5,03) menores a sus respectivos criterios de aceptación (CV<8,95 para Ácido glutámico, CV<10,22 para Serina, CV<9,56 para Arginina, CV<10,46 para Alanina, CV<8,30 para Tirosina, CV<9,62 para Glicina, CV<10,88 para Valina, CV<11,66 para Fenilalanina, CV<11,40 para Isoleucina, CV<10,39 para Leucina y CV<7,87 para Lisina). Debido a lo anterior se puede establecer que, para los anteriores aminoácidos, la metodología no se ve afectada significativamente por la variación en días al realizar los análisis, por lo que son reproducibles. Para los aminoácidos restantes, Ácido aspártico (CV=12,19) e Histidina (CV=9,53), sus coeficientes de variación son mayores a sus respectivos criterios de aceptación (CV<9,51 para Ácido aspártico, CV<7,65 para Histidina), por lo que se puede establecer que la metodología si se ve afectada por la variación en días al realizar los análisis, por lo que no serían reproducibles en el tiempo.

Para el caso del Ácido aspártico, un estudio demostró que esta variación en los análisis se puede explicar por un aparente problema de elusión del compuesto, y que se requiere un ajuste de la cantidad de tetrahidrofurano en la fase móvil para solucionar este problema (Vasanits *et al.*, 2000). Por otra parte, la hidrólisis ácida de la muestra puede provocar que el contenido de Asparagina (si es que presentara) reaccione y se transforme en Ácido aspártico, modificando el área cromatográfica de este aminoácido (Molnár-Perl, 2001) por lo que se debería optar por otro tipo de hidrólisis para evitar esta variación. Histidina es un aminoácido que puede formar productos secundarios postderivatización, que pueden reaccionar con otras moléculas de OPA (Figura 7) y por ende disminuir su área cromatográfica (Csámpai *et al.*, 2004), lo que puede explicar la variación del compuesto y que este no cumpla con los criterios de reproducibilidad.

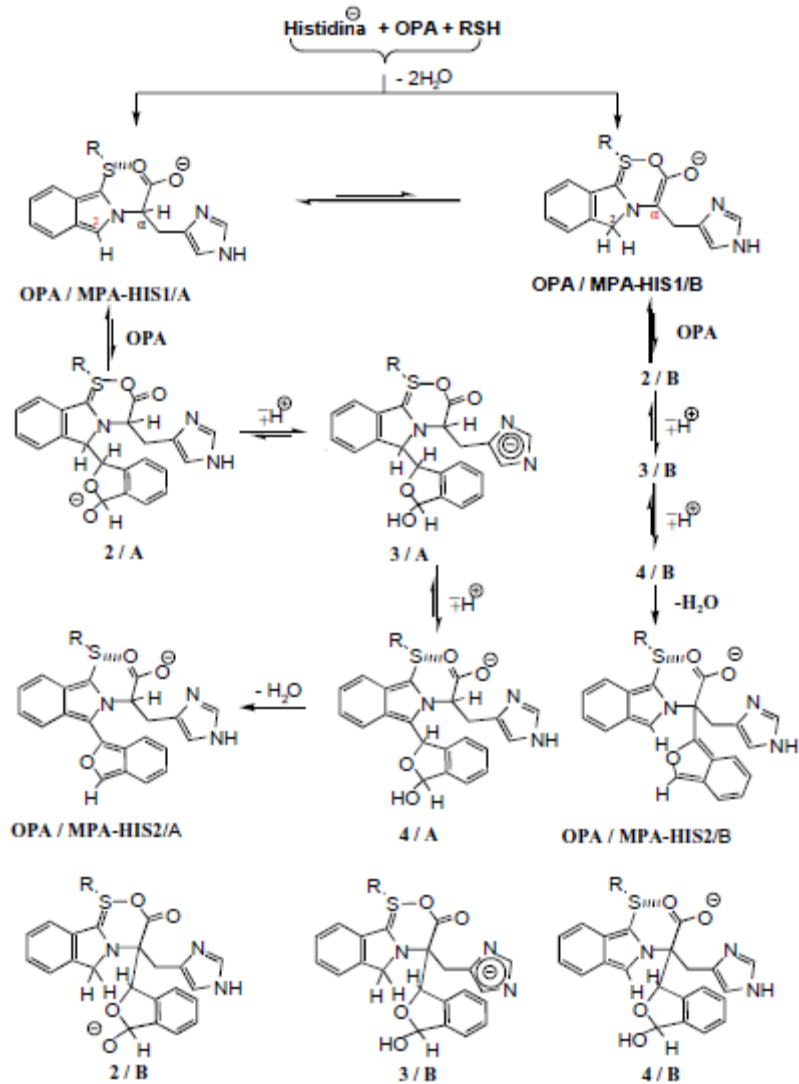


Figura 7. Mecanismo de reacción para la formación de derivados de Histidina: OPA/MPA-HIS1 y OPA/MPA-HIS2 (Csámpai *et al.*, 2004).

C. Sensibilidad

A partir de las curvas de calibración de los trece estándares de aminoácidos se determinó el límite de detección y límite de cuantificación a través del método ICH (2005). En la tabla N° 9, se muestra el resumen de los límites de detección y límite de cuantificación para cada uno de los trece aminoácidos estudiados.

Tabla N°9: Límites de detección y cuantificación para los trece aminoácidos estudiados

Aminoácido	Pendiente 1	Pendiente 2	Pendiente 3	Pendiente Curva de calibrado promedio	DS	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Ácido aspártico	-0,036	-0,006	-0,016	0,53	0,01	2,11	6,41
Ácido glutámico	-0,039	-0,031	-0,007	0,55	0,02	2,26	6,84
Serina	-0,029	-0,019	0,004	1,00	0,02	1,25	3,80
Histidina	-0,111	-0,001	-0,018	0,43	0,06	10,29	31,17
Arginina	-0,035	-0,003	-0,008	0,64	0,02	2,01	6,09
Alanina	-0,047	-0,017	-0,015	1,28	0,02	1,06	3,21
Glicina	-0,047	-0,023	-0,003	1,01	0,02	1,65	4,99
Tirosina	-0,041	0,001	-0,009	0,34	0,03	1,37	17,18
Valina	-0,034	-0,001	-0,005	1,20	0,02	1,28	4,16
Fenilalanina	-0,034	-0,022	-0,018	1,06	0,02	0,47	3,88
Isoleucina	-0,056	-0,007	-0,046	1,31	0,01	1,70	1,43
Leucina	-0,056	-0,007	-0,046	1,14	0,03	5,67	5,15
Lisina	-0,404	0,016	0,101	1,90	0,27	10,63	32,20

Como se puede evidenciar en la tabla N° 9, todos los aminoácidos presentan límites de detección por debajo de las concentraciones de trabajo, por lo que el método puede detectar con certeza las concentraciones para cada uno. Sin embargo, para diez de los aminoácidos (Ácido aspártico, Serina, Histidina, Arginina, Glicina, Valina, Fenilalanina, Leucina, Tirosina, Lisina), el límite de cuantificación sobrepasa al primer punto de sus curvas de calibración, (Ácido aspártico=4,69 mg/L; Serina=3,75 mg/L; Histidina=18,75 mg/L; Arginina=4,69 mg/L; Glicina=4,69 mg/L; Valina=2,34 mg/L; Fenilalanina=2,34 mg/L; Leucina=3,75 mg/L; Tirosina=12.50 mg/L), incluso dos puntos de la curva de calibración (Lisina= 15 y 30 mg/L), por lo que no podrían cuantificarse concentraciones menores a estos valores. Para el caso de Histidina, este aminoácido presenta una estabilidad variable y podría formar otros metabolitos que podrían reaccionar con moléculas excesivas de reactivo OPA (Csámpai *et al.*, 2004), lo que podría afectar sus áreas cromatográficas y por lo tanto el cálculo de estos parámetros. A pesar de esto, la metodología empleada permite detectar y cuantificar cada uno los aminoácidos, ya que las concentraciones presentes en *A. chilensis* se encuentran sobre los límites de cuantificación de cada uno de los aminoácidos evaluados.

Para el cálculo de ambos límites, se utilizó un método matemático, por lo que podría esperarse que los valores para estos podrían ser incluso más bajos de lo que se calculó. Para mejorar este parámetro, se podrían utilizar otros métodos como son la inyección de analito hasta concentraciones bajas o indetectables. No podrían utilizarse métodos como medir el blanco reactivo, ya que para otorgue una señal medible, se necesita realizar una reacción de derivatización junto con un compuesto aminoacídico, por lo que la ausencia de estos en el blanco no podría ser una buena herramienta para el cálculo de ambos límites. A pesar de esto el método matemático proporcionado por ICH (2005) permite detectar y cuantificar cada uno de los aminoácidos en *A. chilensis*.

Exactitud

El cálculo de exactitud no se realizó debido a la falta de un material certificado de referencia para calcular el sesgo, según las concentraciones reales de *A. chilensis*. Estudios posteriores podrían determinar este parámetro evaluando el porcentaje de recuperación de cada uno de los aminoácidos posterior a la hidrólisis ácida o alcalina que se requiera para su determinación.

Selectividad

Para determinar la selectividad del método se requiere realizar análisis de los aminoácidos posterior a someter a la muestra a procedimientos de oxidación, fotólisis, termólisis e hidrólisis alcalina.

CONCLUSIÓN

- Se concluye que se obtuvo un método con parámetros cromatográficos optimizados, los cuales, entregaron resolución de los aminoácidos analizados, elevado número y baja altura de los platos teóricos, por lo que la eficiencia de la columna para separar compuestos es la adecuada para el análisis.
- La metodología analítica por HPLC implementada en este estudio permitió la detección y cuantificación de trece aminoácidos presentes en *Athyonidium chilensis*. Sin embargo, es necesario determinar a través de otros métodos de hidrólisis, si presenta los aminoácidos esenciales (metionina, triptófano, treonina), para definir que esta especie presenta proteínas con alto valor nutritivo para el consumo humano y ser incorporado a futuro en alimentos, suplementos, entre otros.
- La metodología analítica implementada para todos los aminoácidos cumple con los requisitos de linealidad establecidos por la International Conference of Harmonization (2005). Todos los aminoácidos estudiados cumplen con los criterios de repetibilidad, sin embargo, solo Ácido aspártico e Histidina no son reproducibles y no cumplen con el criterio de Horwitz.
- A partir de estos resultados se recomienda continuar en una posterior investigación, para incluir parámetros como exactitud y selectividad, para completar la validación y así obtener resultados concluyentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Akhlaghi, Y., Ghaffari, S., Attar, H. (2015). A rapid hydrolysis method and DABS-Cl derivatization for complete amino acid analysis of octreotide acetate by reversed phase HPLC. *amino acids* 47: 2255
- Al-Haj, N. A., Mashan, N. I., Shamsudin, M. N., Mohamad, H., Vairappan, C. S., & Sekawi, Z. (2010). Antibacterial Activity of Marine Source Extracts Against Multidrug Resistance Organisms. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(2), 95–102
- Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. *Proteins in Food Processing*, 389–412.
- Barnes, R. & Amp, Ruppert, E. (1996). *Zoología de los Invertebrados*. lugar de publicación. Mcgraw-Hill Interamericana, México. 6ta Edición. 1114 pp.
- Capetillo, C. (2000). Caracterización de morfotipos de *Porphyra columbina* Mont. (Rhodophyta bangiales), a través de su composición aminoacídica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 45 pp.
- Caso, M.E. (1972). El aspecto económico de las holoturias o pepinos de mar en la alimentación humana. El trepang. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 33: 85-98.
- Connand C, M. Byrne. (1993). A review of recent development in the world sea cucumber fisheries. *Marine Fisheries Review*. 55(4): 1–13.
- Csámpai, A., Kutlán, D., Tóth, F., & Molnár-Perl, I. (2004). o-Phthaldialdehyde derivatization of histidine: stoichiometry, stability and reaction mechanism. *Journal of Chromatography A*. 1031(1-2): 67–78.
- Dai, Z., Wu, Z., Jia, S., & Wu, G. (2014). Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 964: 116–127.
- Datta, D., Talapatra, S. N., & Swarnakar, S. (2015). Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines- An overview. *ILNS*. 34: 42-61
- Fernández, F. (1998). *Ecología de Athyonidium chilensis* (Samper 1868) (Equinodermata: Holoturidae), en tres habitats de la Región de Coquimbo. Tesis para obtener el título de biólogo marino. Universidad Católica del Norte. Facultad de Ciencias del mar, 73 pp
- Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Validation of Chromatographic Methods*
- García de Marina, A. y del Castillo, B. (1988). *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Ed. Limusa, México.

- Guisado, Chita. (2005). Conicyt Project: Development of the cultivation technology of the sea cucumber *Athyonidium chilensis*, in the Chilean south central region. *SpC Beche-De-Mer Information Bulletin*, 21 pp.
- Haard N.F, Simpson B.K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. *Fisheries Processing*, 132–154.
- Hamel, J. F., Hidalgo, R. Y., & Mercier, A. (2003). Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 3–8.
- Hanczkó, R., Kutlán, D., Tóth, F., & Molnár-perl, I. (2004). Behavior and characteristics of the o-phthaldialdehyde derivatives of n -C 6 – C 8 amines and phenylethylamines with four additive SH-containing reagents, *1031: 51–66*.
- ICH. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (r1). International Conference on Harmonization of Technical Requirements. Recuperado en octubre de 2019, de: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf
- Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). (2015). Guía Técnica de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Recuperado en octubre de 2019, de: http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1_validacion_de_Metodos_y_determinacion_de_la_incertidumbre_de_la_medicion_1.pdf
- Janakiram, N., Mohammed, A., & Rao, C. (2015). Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer agents. *Marine Drugs*, 13(5): 2909–2923.
- Jones, B. N., & Gilligan, J. P. (1983). o-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *Journal of Chromatography A*, 266: 471–482.
- Kutlán, D & Presits, P & Molnár-Perl, Ibolya. (2002). Behavior and characteristics of amine derivatives obtained with o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and with o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents. *Journal of chromatography. A*. 949: 235-48.
- Lawrence, J.M. (1987). A functional biology of echinoderms. John Hopkins, Baltimore. 340 pp
- Li C, Feng W, Qiu L, Xia C, Su X, Jin C, *et al.* (2012). Characterization of skin ulceration syndrome associated microRNAs in sea cucumber *Apostichopus japonicus* by deep sequencing. *Fish & Shell. Immun.*, 33(2): 436–441
- Matsuhiro B, Osorio-Román I, Torres R. (2012). Vibrational spectroscopy characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Carbohydrate Polymers*, 88: 959– 965.

- Mengerink, Y., Kutlán, D., Tóth, F., Csámpai, A., & Molnár-Perl, I. (2002). Advances in the evaluation of the stability and characteristics of the amino acid and amine derivatives obtained with the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents: High-performance liquid chromatograph. *Journal of Chromatography A*, 949(1–2): 99–124.
- Molnár-Perl, I. (2001). Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *Journal of Chromatography A*, 913(1-2): 283–302.
- Mou, J., Li, Q., Qi, X., & Yang, J. (2018). Structural comparison, antioxidant and antiinflammatory properties of fucosylated chondroitin sulfate of three edible sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, 185: 41–47.
- Pang M., Shafiquzzaman S., Al Azad, S. (2014). Fucosylated chondroitin sulfate diversity in sea cucumbers: A review. *Carbohydrate Polymers*, 112: 173–178.
- Pomin, V. H. (2015). NMR structural determination of unique invertebrate glycosaminoglycans endowed with medical properties. *Carbohydrate Research*, 413: 41–50.
- Purcell, S., Gardner, D., & Bell, J. (2002). Developing optimal strategies for restocking sandfish: a collaborative project in New Caledonia. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 13–17.
- Quattrocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., & Laba, R. (1992). Introducción a HPLC aplicación y práctica. En O. Quattrocchi, S. Abelaira de Andrizzi, & R. Laba, *Análisis cuantitativo* (págs. 302-327). Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A.
- Rogers, A., Hamel, J.-F., Baker, S. M., & Mercier, A. (2018). The 2009–2016 Belize sea cucumber fishery: Resource use patterns, management strategies and socioeconomic impacts. *Regional Studies in Marine Science*, 22: 9–20.
- Schillaci, D., Cusimano, M. G., Russo, D., & Arizza, V. (2014). Antimicrobial peptides from echinoderms as antibiofilm agents: a natural strategy to combat bacterial infections. *Ital.J. of Zoo.*, 81(3), 312-321
- SERNAPESCA. (2008). Anuario estadístico de pesca 2007. Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción, Servicio Nacional de Pesca, Valparaíso. , 156pp
- Skewes T., Haywood M., Pitcher R. And Willan R. (2004). Description of key species groups in the northern planning area. Holothurians. In: National Oceans Office. *National Oceans*. 1-10.
- Song, Y., Xu, C., Kuroki, H., Liao, Y., & Tsunoda, M. (2018). Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples. *J. of Pharm. and Biom. Anal.*, 147, 35–49.

Toral-Granda V. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. In: Toral-Granda V, A Lovatelli & M Vasconcellos (eds). Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 516: 213-229.

United States Pharmacopeia Convention (USP) (2006). Validation of compendia methods. Rockville: MagPrinting.

United States Pharmacopeia Convention (USP). (2016). Validation of compendia methods Rockville: MagPrinting.

Vasanits, A., Kutlán, D., Sass, P., & Molnár-Perl, I. (2000). Retention/quantitation properties of the o-phthaldialdehyde–3-mercaptopropionic acid and the o-phthaldialdehyde–N-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 870(1-2), 271–287.

Wang Y, Su W, Zhang C, Xue Ch, Chang Y, Wu X, Tang Q, Wang J. (2012). Protective effect of sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan against ethanol-induced gastric damage. *Food Chem.* 133: 1414–1419.

Xue, Z., Li, H., Wang, X., Li, X., Liu, Y., Sun, J., & Liu, C. (2015). A review of the immune molecules in the sea cucumber. *Fish & Shellfish Immunology*, 44(1), 1–11.

Yellow Sea Fisheries Research Institute. (1991). Training Manual on breeding and culture of scallop and sea cucumber in China. Training Manual Publications and Documents of the Regional Seafarming Development and Demonstration Project.

Yu L, Xue Ch, Chang Y, Hu Y, Xu X, Ge L, Liu G. (2015). Structure and rheological characteristics of fucoidan from sea cucumber *Apostichopus japonicas*. *Food Chemistry* 180: 71–76.

Zheng, J., Wu, H.-T., Zhu, B.-W., Dong, X.-P., Zhang, M.-M., & Li, Y.-L. (2012). Identification of antioxidative oligopeptides derived from autolysis hydrolysates of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts. *European Food Research and Technology*, 234(5), 895–904.

ANEXOS

Anexo N°1: Solicitud de bioética para el uso de animales de experimentación



Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la
Investigación con Animales

SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN

PRIMERO: ANTECEDENTES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

1. **TÍTULO:**

Valorización del *Athyonidium chilensis* (Pepino de Mar) a través de su caracterización nutricional y capacidad funcional proteica

2. **FONDO E INSTITUCIÓN** CONCURSO DE PROYECTOS PARA ESTUDIANTES DE LA UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO, 2016

(Señale nombre del concurso e institución a la que postula. En lo posible, trate de no utilizar siglas o acrónimos).

3. **INVESTIGADOR RESPONSABLE:** Indicar unidad académica y datos de contacto (al menos email).

Marcela Escobar Peña
marcela.escobar@uv.cl

4. **INVESTIGADOR ALTERNO:** Indicar unidad académica y datos de contacto.

Camilo Fuentes Peña
camilo.fuentes.pena@hotmail.cl

5. **COINVESTIGADORES:** Indicar unidad académica y datos de contacto.

(Señale nombre completo, correo electrónico, dirección y unidad académica de los investigadores responsables, alternos y co-investigadores según corresponda).

Este proyecto de investigación utiliza:

	Marque con X
Animales como sujetos de experimentación	
Animales vivos sólo para registros de datos	
Animales muertos para registro de datos	x



Dirección de Investigación

Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Código/numeración de solicitud	
Fecha de recepción solicitud	
Fecha Acta de Evaluación	
Fecha de Seguimiento	

6. MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debe explicar el problema, presentar antecedentes generales y plantear en forma explícita la hipótesis (si es que la hay) y objetivos. (Utilice máximo 1 página y media)

La Clase Holothuroidea está constituida por unas 1100 especies agrupadas en seis órdenes, a los que se conoce vulgarmente como holothurias, "cohombrós" o "pepinos de mar". Corresponden a una de las cinco clases del Phylum Echinodermata, diferenciándose morfológicamente de estas, debido a que presenta el eje polar largo, un cuerpo cilíndricamente alargado con la boca y el ano en el extremo anterior y posterior, respectivamente.

Actualmente, existen más de doscientas especies explotadas de pepino de mar, sin embargo alrededor de veinte especies poseen una real importancia comercial, siendo las más importantes *Holothuria scabra*, *Holothuria nobilis* y *Apostichopus japonicus*

Los países orientales utilizan al pepino de mar como alimento desde hace siglos por su alto contenido de proteínas, casi tres veces mayor que el de los pescados y mariscos más comunes en oriente, y su efecto afrodisíaco. El producto más importante que se extrae de los holotúridos es el beche-de-mer (trepang o hai-som), que corresponde a la pared seca del organismo. Tal es la demanda de este producto que el precio de mercado del beche-de-mer (*Apostichopus japonicus*) ha aumentado drásticamente en las últimas décadas, sobresaliendo China, país que tiene el control casi exclusivo del mercado mundial de este recurso marino, siendo Hong Kong su principal centro de mercadeo.

Nuestro país no está ajeno a seguir esta tendencia mundial, ya que la gran demanda y el alto precio que se paga por este producto en el mercado internacional incentivan la explotación de los holotúridos chilenos, *Athyonidium chilensis* y *Pattalus mollis*, comercializándose congelados y secos.

Diferentes estudios reportan que en general estas especies poseen proteínas como su principal componente, siendo los porcentajes de lípidos y carbohidratos algo menores. En el caso de individuos de *Athyonidium chilensis* cultivados con dietas artificiales, se determinaron en la pared del cuerpo valores de proteínas superiores al 80%, incluyendo los músculos longitudinales y retractores del introverso.

La caracterización nutricional de la pared del cuerpo y los músculos a través de la evaluación química proximal y de la determinación de ácidos grasos y minerales permitirá valorizar este recurso marino para el consumo humano. Además el aislamiento y evaluación de las propiedades funcionales de su componente mayoritario, las proteínas, determinará la factibilidad de incorporar estos aislados proteicos en la formulación de alimentos como ingredientes alimentarios, con fines tecnológicos y nutricionales.

Hipótesis

Los pepinos de mar u holoturias, están extensamente distribuidos en el mundo y se utilizan desde siglos ancestrales para la alimentación humana por su valor nutricional expresado en un alto contenido de proteínas y ausencia de colesterol. En Chile están descritas 74 especies de holoturias de las cuales dos son explotadas comercialmente, siendo una de ellas el *Athyonidium chilensis*, que se comercializa en forma seca y congelada para su exportación a países orientales. Estudios recientes realizados en esta especie muestran que la pared del cuerpo contiene altos valores de



Dirección de Investigación

Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

proteínas, mayores al 80 %, y similares a las especies de importancia comercial. Dado lo anterior, la caracterización nutricional y funcional del cuerpo y músculo de pepino de mar chileno, permitiría la valorización de este recurso y su incorporación en la formulación de alimentos, con fines tecnológicos y nutricionales, en calidad de ingrediente alimentario.

Objetivo general

Caracterizar nutricionalmente el músculo y pared del cuerpo del *Athyonidium chilensis* (Pepino de Mar) y la funcionalidad de las proteínas presentes.

Objetivos Específicos

1. Determinar la composición química proximal, de ácidos grasos y minerales de la pared del cuerpo y músculo del pepino de mar.
2. Aislar las proteínas mayoritariamente presentes en la pared del cuerpo y músculo del pepino de mar.
3. Caracterizar química y aminoacídicamente las proteínas previamente aisladas desde pared del cuerpo y músculo.
4. Determinar propiedades funcionales de las proteínas aisladas desde pared del cuerpo y músculo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Debe explicitar el tipo de estudio y diseño experimental. Indique también instrumentos, encuestas, fármacos o cualquier otro elemento al que pueda estar expuesto el sujeto de experimentación durante el protocolo de investigación.

Se utilizarán 8 individuos adultos (>200g) de la especie *Athyonidium chilensis* (Pepino de mar) recolectados en el sector de El Tabo (lugar de acceso público), que serán transportados al lugar de eutanasia en cajas de aislapol acondicionadas con gel packs y algas tipo huiro, a objeto de evitar el desove y desecación.

Los pepinos de mar adultos serán narcotizados por inmersión en dos litros agua de mar saturada con cristales de mentol, por animal, durante un periodo aproximado de 12 horas, evaluando cada 2 horas su movilidad a través de la respuesta al tacto de los tentáculos. Los pepinos narcotizados (que no presenten reacción) serán diseccionados separando sus órganos internos y seleccionando pared del cuerpo y músculos.

Sobre la pared del cuerpo y músculos se realizará la caracterización nutricional a través de la evaluación química proximal y de la determinación de ácidos grasos y minerales. Asimismo, se aislarán las proteínas constituyentes y se evaluarán las propiedades funcionales de estas.

8. JUSTIFICACIÓN DE LA METODOLOGÍA Y RELEVANCIA DEL PROYECTO

Argumente la pertinencia de la metodología indicando si existen alternativas y valorando la importancia del desarrollo de este proyecto.

Los individuos de la especie *Athyonidium chilensis* (Pepino de mar) serán diseccionados previa narcosis por inmersión en agua de mar saturada con cristales de mentol, proceso que anestesiara a estos organismos.

No se disponen de alternativas a esta metodología.

SEGUNDO: VALORACIÓN DE ASPECTOS ÉTICOS

(NC: No corresponde)

1. Los animales recolectados vivos serán utilizados sólo para registro de datos (peso, sexo, lugar de muestreo, etc).	SI		NO	x
<i>Explique qué sucederá con ellos después de registrar los datos requeridos.</i>				
2. Los animales obtenidos vivos serán mantenidos en cautiverio y/o en condiciones de laboratorio	SI		NO	x
<i>Explique en qué condiciones serán mantenidos, por cuánto tiempo y quien será el responsable de su cuidado.</i>				
<i>Explique qué sucederá con los animales luego de terminado el estudio</i>				
3. Su estudio evalúa una práctica clínica (fármacos, aparatos, radiaciones, procedimientos quirúrgicos, otros).	SI		NO	x
<i>Especifique si su respuesta es SI:</i>				
4. La práctica clínica considerada en este estudio es invasiva y/o puede potencialmente causar algún grado de malestar, daño físico al animal en estudio, estrés físico, conductual u otro.	SI		NO	x
<i>Especifique si su respuesta es SI. Considere medidas de mitigación al malestar, al daño, estrés u otro.</i>				
5. La práctica clínica considerada en este estudio beneficiará directa o indirectamente a los animales del estudio.	SI		NO	x
<i>Especifique si su respuesta es SI.</i>				
6. Señale si los animales obtenidos deben ser sacrificados para la obtención de datos. Indique y justifique el número de animales a utilizar.	SI	x	NO	
<i>Se utilizarán 6 pepinos de mar adultos, número de individuos que permite obtener datos estadísticos (promedio \pm DS), la obtención de material suficiente para obtención de los resultados a los objetivos planteados y similar a los individuos utilizados en estudios destinados al aislamiento de proteasas (Hernández A. Identificación y caracterización de Proteasas del pepino de mar. Tesis para optar al grado de Magister, 2010).</i>				



Dirección de Investigación

Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Los pepinos de mar adultos (>200g) serán narcotizados por inmersión en dos litros agua de mar saturada con cristales de mentol, por animal, durante un periodo aproximado de 12 horas, evaluando cada 2 horas su movilidad a través de la respuesta al tacto de los tentáculos. Los pepinos anestesiados serán diseccionados separando sus órganos y seleccionando cuerpo y músculos.			
7. Señale si en este estudio participará una compañía farmacéutica u otra entidad comercial.	SI	NO	x
<i>Si su respuesta es Si, indique el nombre de la compañía y el grado de participación de la entidad en esta investigación (co-investigadores, colaboradores, apoyo logístico, financiamiento, auspicio u otro).</i>			
8. Tienen los investigadores afiliación o algún compromiso económico o de otra naturaleza con la compañía especificada en el punto 7.	SI	NO	x
<i>Si su respuesta es Si, indique la naturaleza del compromiso.</i>			
9. ¿Tienen los investigadores afiliación o algún compromiso económico o de otra naturaleza con alguna compañía o institución no especificada en el punto 7 pero que pudiera estar interesada o beneficiarse por el desarrollo de esta investigación?	SI	NO	x
<i>Si su respuesta es Si, indique la naturaleza del compromiso.</i>			
10. ¿Esperan los investigadores obtener algún beneficio económico u otro directo o indirecto, con el desarrollo de este estudio?	SI	NO	x
<i>Si su respuesta es Si, indique la naturaleza del beneficio.</i>			
11. Fundamente la consideración de métodos alternativos en su estudio (3 Rs: reemplazo, reducción y refinamiento)**(ver definiciones)			
Reemplazo: no hay métodos alternativos para conseguir y caracterizar el material. Reducción: Se usarán 6 animales, número mínimo para determinar estadísticamente las cantidades de proteínas en los tejidos (Hernández A. Identificación y caracterización de Proteasas del pepino de mar. Tesis para optar al grado de Magister, 2010) Refinamiento: Los animales se extraerán del intermareal somero, a mano para evitar daños y se llevarán inmediatamente a cajas apropiadas para el traslado de los animales con pack de hielo y huira para evitar estrés y desecación.			
12. ¿Existen algunas otras consideraciones éticas que deban ser evaluadas?			
Los pepinos de mar serán recolectados en la localidad de El Tabo (lugar de acceso público) y transportados al lugar de eutanasia en cajas de aislapol acondicionadas con gel packs y algas tipo huira			

**Las alternativas de Reemplazo aluden a métodos que eviten o sustituyan el uso de animales. Esto incluye tanto los reemplazos absolutos (es decir, sustituir animales por modelos informáticos), como los reemplazos relativos (es decir, sustituir vertebrados, por animales con una menor percepción del dolor, como algunos invertebrados).



Dirección de Investigación

Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Las alternativas de **Reducción** aluden a cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales para obtener datos suficientes que respondan a la cuestión investigada, o la maximización de la información obtenida por animal, para así limitar o evitar potencialmente el uso posterior de otros animales, sin comprometer el bienestar animal.

Las alternativas de **Refinamiento** aluden a las condiciones en las cuales se mantienen animales o de los procedimientos para minimizar el dolor, angustia y el estrés, así como para mejorar el bienestar de los animales utilizados en la ciencia desde su nacimiento hasta su muerte.

Fuente: GreenFacts based on the Canadian Council on Animal Care, Three Rs Introduction

TERCERO: ANEXOS

A continuación indique qué documentos han sido anexados a este formulario. Especifique en cada línea los documentos anexados.

Documentos	Marque con X
Permisos de recolección del SAG de animales que estén protegidos (e.g., aves, mamíferos, etc.)	
Carta de consentimiento o permiso de acceso a reservas o lugares privados donde se efectuará la recolección de animales	
Otro. Especificar:	
Extracción: se realizará en la orilla, en área de libre acceso y la especie no tiene regulaciones de captura ni artes de pesca.	

CUARTO: COMPROMISO DEL INVESTIGADOR

El investigador responsable individualizado en la primera página de esta solicitud, declara que toda la información descrita en este formulario corresponde a la verdad y se compromete a un desarrollo bioético de su investigación.

Camilo Fuentes P.
22 julio de 2016

Marcela Escobar P.

- Enviar este formulario impreso con firma en original y documentos anexados en un sobre cerrado dirigido al Presidente del CIBICA, Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales, Certificaciones Bioética, a la Dirección de Investigación.



Versión mayo 2015

CIBICA

Comité Institucional de Bioética para la
Investigación con Animales

CONFLICTOS DE INTERES

Si considera que existen conflictos de interés con algún integrante del CIBICA y que esto lo inhabilite para certificar este proyecto, señálelo a continuación con la justificación correspondiente. Esta información será considerada estrictamente confidencial, por lo mismo, no incluya esta hoja en su formulario sino que envíela en un sobre cerrado, a nombre de la Coordinación de Bioética y Bioseguridad DIUV.

Profesora Chita Guisado, es profesor de apoyo de este proyecto

Anexo N°2: Certificado de Bioética para uso de animales de experimentación



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

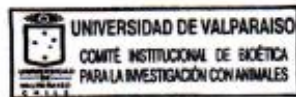
**ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA
BEA088-2016**

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 1 de septiembre de 2016, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA088-2016 titulado " Valorización del *Athyonidium chilensis* (Pepino de Mar) a través de su caracterización nutricional y capacidad funcional proteica" de la investigadora responsable prof. Marcela Escobar P. , tutora del alumno Sr. Camilo Fuentes P. de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Los Estudiantes Primero de la Universidad de Valparaíso.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.



Chita Gulsado Aránguiz
Presidente

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Valparaíso 01 de septiembre de 2016

Blanco 951, Valparaíso | Fono-Fax: +56 (32) 2603184
www.uv.cl

Anexo N°3: Certificado de Bioseguridad para uso de animales de experimentación



Dirección de Investigación
Comité de Bioseguridad

CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD

BS022/2016

I. El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, declara que en su sesión de agosto 18 de 2016, evaluó el protocolo experimental del proyecto "Valorización del *Athyridium chilensis* (Pepino de Mar) a través de su caracterización nutricional y capacidad funcional proteica", presentado por la Profesora Marcela Escobar, tutora del Sr. Camilo Fuentes Peña, alumno de la Facultad de Farmacia de esta Universidad.

II. Para su evaluación el Comité de Bioseguridad revisó los antecedentes presentados por el interesado en relación a los riesgos y medidas preventivas de las actividades planteadas en el proyecto referido, en aquellas actividades que se realizarán en la Facultad de Farmacia.

III. En la valoración de bioseguridad del proyecto, el Comité consideró apropiados el control de riesgos, las medidas preventivas, la gestión de residuos y el resguardo de la comunidad y del medio ambiente.

IV. Por lo anterior, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso certifica que este protocolo experimental contempla las medidas de bioseguridad definidas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la UV y en el Manual de Bioseguridad de CONICYT.

V. Se extiende este certificado para ser presentado al concurso "Los Estudiantes Primero: Hacia una mayor eficacia y eficiencia curricular del pregrado de la Universidad de Valparaíso"

Chilo Gussado
Presidente
Comité de Bioseguridad
Universidad de Valparaíso



Valparaíso, 23 de agosto de 2016.

Anexo N°4: Curvas de calibración para los trece aminoácidos estudiados

Curva de calibrado con estándar de Ácido aspártico y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	C.V. (%)
0,21	0,09	0,08	0,08	0,08	0,01	10,69
0,41	0,16	0,15	0,17	0,16	0,01	6,25
0,83	0,36	0,39	0,35	0,37	0,02	5,45
1,66	0,82	0,81	0,89	0,84	0,04	4,81

Curva de calibrado con estándar de Ácido glutámico y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,41	0,21	0,18	0,18	0,19	0,01	6,96
0,83	0,42	0,37	0,39	0,39	0,02	5,56
1,66	0,84	0,83	0,77	0,81	0,03	4,21
3,32	1,79	1,78	1,79	1,78	0,01	0,40

Curva de calibrado con estándar de Serina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,17	0,16	0,14	0,14	0,15	0,01	9,13
0,33	0,28	0,28	0,29	0,28	0,01	3,55
0,66	0,61	0,62	0,57	0,60	0,03	4,31
1,33	1,30	1,32	1,29	1,30	0,02	1,43

Curva de calibrado con estándar de Histidina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,83	0,30	0,28	0,27	0,28	0,02	6,75
1,66	0,54	0,59	0,60	0,58	0,03	5,40
3,32	1,25	1,32	1,18	1,25	0,07	5,67
6,64	2,72	2,83	2,76	2,77	0,05	1,92

Curva de calibrado con estándar de Arginina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,21	0,11	0,10	0,11	0,11	0,01	4,72
0,41	0,21	0,21	0,22	0,22	0,01	3,33
0,83	0,48	0,48	0,45	0,47	0,02	3,35
1,66	1,01	1,02	1,04	1,02	0,02	1,48

Curva de calibrado con estándar de Alanina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,17	0,18	0,17	0,17	0,17	0,01	5,92
0,33	0,35	0,35	0,36	0,35	0,01	1,68
0,66	0,77	0,78	0,72	0,76	0,03	3,85
1,33	1,63	1,65	1,68	1,65	0,02	1,32

Curva de calibrado con estándar de Glicina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,21	0,22	0,15	0,17	0,18	0,04	19,97
0,41	0,38	0,27	0,39	0,35	0,07	18,89
0,83	0,72	0,65	0,79	0,72	0,07	9,85
1,66	1,70	1,40	1,82	1,64	0,21	13,12

Curva de calibrado con estándar de Valina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,10	0,11	0,10	0,09	0,10	0,01	6,79
0,21	0,19	0,20	0,21	0,20	0,01	2,97
0,41	0,43	0,45	0,42	0,43	0,01	2,71
0,83	0,96	0,96	0,98	0,97	0,01	0,96

Curva de calibrado con estándar de Fenilalanina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,10	0,09	0,08	0,08	0,08	0,00	2,84
0,21	0,19	0,17	0,18	0,18	0,01	6,83
0,41	0,40	0,39	0,38	0,39	0,01	2,57
0,83	0,88	0,82	0,85	0,85	0,03	3,39

Curva de calibrado con estándar de Isoleucina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,10	0,11	0,10	0,09	0,10	0,01	11,67
0,21	0,21	0,19	0,19	0,20	0,01	3,93
0,41	0,45	0,49	0,47	0,47	0,02	4,75
0,83	0,98	1,04	1,09	1,04	0,06	5,35

Curva de calibrado con estándar de Leucina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,17	0,20	0,16	0,12	0,16	0,04	23,70
0,33	0,30	0,30	0,28	0,29	0,01	3,21
0,66	0,61	0,63	0,57	0,61	0,03	5,15
1,33	1,48	1,45	1,46	1,46	0,01	0,97

Curva de calibrado con estándar de Tirosina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,55	0,32	0,31	0,31	0,31	0,01	3,39
1,11	0,59	0,54	0,56	0,56	0,03	4,98
2,21	1,24	1,23	1,23	1,23	0,01	0,48
4,42	2,67	2,36	2,56	2,53	0,15	6,03

Curva de calibrado con estándar de Lisina y estándar interno.

Concentración aminoácido/ Concentración SI	Área 1 aminoácido/ Área SI	Área 2 aminoácido/ Área SI	Área 3 aminoácido/ Área SI	Promedio	DS	CV (%)
0,66	0,14	0,12	0,13	0,13	0,01	6,57
1,33	0,44	0,22	0,39	0,35	0,12	33,12
2,65	0,97	0,70	0,88	0,85	0,14	16,03
5,31	2,98	1,90	2,03	2,31	0,59	25,66