



FACULTAD DE FARMACIA  
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
Centro de Investigación Farmacopea Chilena  
(CIFAR)

**VALORIZACIÓN DEL *Athyonidium chilensis* (PEPINO DE MAR) A  
TRAVÉS DE SU CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL Y  
CAPACIDAD FUNCIONAL.**

Unidad de Investigación para optar al  
Título de Químico Farmacéutico

**CAMILO IGNACIO FUENTES PEÑA**

Directora: Marcela Escobar Peña MSc.

Mayo 2019



*A mi Abuelita María Victoria, mis padres, Hermano, Luna y familia  
"Aquellos que pueden imaginar cualquier cosa,  
pueden crear lo imposible"  
Alan Mathison Turing*

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, agradezco todo a mi mamá Silvia, papá Osvaldo y hermano Osvaldo Andrés, quienes con mucho esfuerzo me apoyaron, ayudaron y guiaron incondicionalmente en este largo y provechoso camino, como también al resto de mis familiares, Tía Edith quién me acompañó largas noches de estudio y me dio grandes consejos junto con mi primo Osvaldo Patricio. También a Keka quién siempre me dio ánimo y fuerza con el tata quien siempre nos cuida desde que sea que esté, a mi Tío José junto a mi Tía Yu quienes siempre incondicionalmente valoran cada paso que doy en la vida y en los estudios, también a todos mis primos, sobre todo a que las que son como hermanas, Francisca y Editha Marina, también a mi Tío Sergio y Tía Carmen y a mis otros primos, Edith (Silmarwen Tasartir) e hijo, Cristian e hijas, Edith Ivonne, José Francisco, Alex y familia. Y también a toda la familia por parte papá, mis tías (Tía Maritza, Tía Paola y Tía Erika), tía Dora, Doris e hijo, Andrea e Ivonne.*

*A mi directora de Tesis, Profe (Tía) Marce Escobar, por darme el voto de confianza y oportunidad de trabajar con ella, por su gran apoyo, paciencia y motivación en este camino de trabajo, no sólo en la investigación, sino también por ser una gran persona, quien me ha dado consejos muy sabios a seguir y por demostrar ser una gran profesional, siendo un ejemplo que seguir.*

*También a todo el TEAM farmacopeico, que apoyaron las grandes tardes y mañanas de trabajo, con el café, con las soluciones y galletas, sobre todo a Don Dennis, Dany en los inicios de este trabajo, a Isa quien me ayudó enormemente en el término de este trabajo que con su ayuda se realizó mucho más rápido y de la mejor manera posible, a mis grandes amigas y compañeras de tesis, Pauli y Yas, por las buenas conversaciones que se tuvieron en el laboratorio.*

*También debo agradecer a Profe Fernanda Cavieres quién me dio un tour y una gran experiencia en la investigación en la estadía en el laboratorio de toxicología de la UV (LADETOX) y a todos los participantes en el Laboratorio de Toxicología desde el año 2013 a 2016, con quienes se formaron lazos muy fuertes.*

*A tod@s mis amig@s de la barrita, Tere, Dennise, Feña, Dany (Pérez), Dany (Rojas), Mauren, Camycami, Diego B, que siempre están para lo que necesité y sin duda siempre apoyándome en mis decisiones y aconsejándome en todo en la vida*

*A mis grandes amigas, Jesu, Diandra y Cata (S.) con quién crecí y conocí nuevas formas de ver la vida durante toda la etapa universitaria, que siempre nos apoyamos en las buenas, nos desquitamos y arreglamos en las malas, y buscamos la solución en las ebrias.*

*A todas mis amistades y grandes amigos formados en la facultad, que siempre estuvieron, están y estarán acompañándome y apoyando, Claudia Sepúlveda, Tamara Canelo, Laura Villanueva, Catita Solis, Janita Vozmediano, Jesu Abello, Diandra Olmos, Valesca Medina, Mali, Cata Torres, Chachi Sobarzo, Dany Rosas (Madrina), Felpecc y al grupo tranza Varela.*

*Agradezco también a QUIFAC, al profe Rodrigo Diaz, por su buena acogida en mi trabajo de seminario, a las CLOX's y Dany, por los buenos ánimos que siempre me dieron en momentos de estrés con el buen café y también a todos los profesores de quien fui ayudante, a la profe Georgina Sánchez, Gabriela Lobos y Soledad Lobos.*

*También doy gracias a Jeremías, quien me ha apoyado, soportado, ayudado en esta última etapa, esperando que lo siga siendo en este largo camino de vida.*

*También y sin olvidar agradezco a todas los compañeros que igualmente se formó un lazo de amistad y que conocí en la facultad, como a las MMAs (Cata Soto, Dany Norambuena, Naty Acevedo, Cony Gonzales, Dany Rosas), Gaby Yori, Jo, Javiersin, Caro R, y Cony Godoy. Cómo también a los académicos y funcionarios de la facultad que siempre estuvieron dispuestos a ayudar, por sobre todo a Don Boris, Juan soto, Juan H, Claudia Bravo y Kathy. Como también a todas las secretarías que llevan un gran trabajo por delante y siempre apoyando y dando ánimos a los alumnos, sobre todo a Susan, Prisci, Cristi y Karina.*

*Agradezco también al todo equipo de trabajo en AstraZeneca Chile, quienes me han apoyado mucho en esta última etapa de trabajo universitario, sobre todo a Dinka, quien me dio la oportunidad de realizar mi práctica y darme el voto de confianza de seguir en aportando a la compañía en el grupo (Regulatory Affairs), además por las grandes enseñanzas que me ha dejado. Por otro lado, a Ale (Dinamarca), quien inolvidablemente ha sido una perfecta compañera y gran amiga Affairs, quien me da dado la oportunidad y paciencia de enseñar y dar el 100% para tener todo a mano, con un flujo de información muy claro y siempre dar en apoyo en lo que uno necesita. A Néstor, quien siempre me da ayudado de hacer el trabajo de la mejor manera posible. Agradezco también a Ana Paula por darme el voto de confianza en seguir trabajando y aportando para AstraZeneca.*

## RESUMEN

El comúnmente llamado pepino de mar es mundialmente conocido como un valioso recurso comercial debido a su alto valor alimenticio, especialmente en países orientales como Japón y China donde es considerado una delicatesen. Perteneciente a la clase *Holoturoidea*, el pepino de mar consta de aproximadamente 1100 especies esparcidas por el mundo, con distintos grados de explotación comercial. En Chile han sido descritas 74 especies de holoturias, de las cuales 2 son comercialmente explotadas, *Pattalus mollis* y *Athyonidium chilensis*. En este estudio se trabajó con la especie *Athyonidium chilensis*, recolectada en el sector de “El Tabo”, que fue diseccionada para separar manto y músculo, siendo luego sometida a liofilización, trituración y tamizaje por 20 mesh.

Con las muestras de manto y músculo procesadas, se procedió a determinar la composición química proximal, contenido proteico por dos tipos de metodologías (Kjeldahl y Lowry), composición de minerales mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma inducido (ICP-OES), composición aminoacídica mediante cromatografía líquida de alta resolución, y además se evaluaron las propiedades funcionales del liofilizado de manto y músculo como solubilidad, capacidad emulsionante, de retención de agua y aceite, y de formación de espuma. Los resultados obtenidos arrojaron diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,05$  entre manto y músculo para los diferentes ensayos realizados, siendo un total de 50 a 70% de proteínas, baja concentración de metales pesados desde 0 a 7,3  $\mu\text{g/g}$ , además en la identificación y cuantificación de aminoácidos obteniéndose diferentes concentraciones (2,3 a 125  $\mu\text{g/g}$ ), como también demostrando tener diferentes propiedades funcionales, como absorber 3 a 5 veces su peso en agua como en aceite, la capacidad de formar emulsión y espuma. Además, este estudio demostró que la especie chilena posee valores de proteínas, minerales y contenido de aminoácidos comparables con otras especies provenientes de China, Japón, Centroamérica, y Pakistán. Tomando en consideración todos los resultados obtenidos el pepino de mar se podría considerar como un alimento con posibilidades innovadoras más allá de la mera recolección y exportación con bajo valor agregado.

## ABSTRACT

The commonly called sea cucumber is worldwide known as a valuable commercial resource due to its high nutritional value, especially in eastern countries such as Japan and China where it is considered a delicacy. Sea cucumber belongs to Holothuroidea class and have around 1100 described extant species all over the world, which have varying degrees of commercial exploitation. In Chile, 74 Holothuroidea species have been described, which two of them are commercially exploited, *Pattalus mollis* and *Athyonidium chilensis*. In this study we worked with the species *Athyonidium chilensis*, collected in the sector of "El Tabo", which was dissected to separate mantle and muscle, being then subjected to lyophilization, crushing and screening by 20 mesh.

With mantle and muscle samples, we proceeded to determinate the proximal chemical composition, protein content using two types of methodologies (Kjeldahl y Lowry), mineral content through Inductively Coupled Plasma-Atomic emission spectroscopy (ICP-AES), amino acid composition through high performance liquid chromatography (HPLC), additionally we evaluated the functional properties of lyophilized mantle and muscle, such as solubility, emulsifying capacity, water and oil retention, and foam formation. The results obtained yielded a statistically significant differences between mantle and muscle ( $p < 0.05$ ) in various tests conducted. Besides, this study showed that the Chilean species has amino acid content, protein and mineral value comparable with species from China, Japan, Central America and Pakistan. Considering all the results obtained, the sea cucumber could be a food with innovative possibilities beyond the mere collection and exports with low added value.

## ABREVIATURAS

<b><i>A. chilensis</i></b>	:	<i>Athyonidium chilensis</i> .
<b>DS</b>	:	Desviación estándar.
<b>HPLC</b>	:	Cromatografía Líquida de alta resolución.
<b>ICP- OES</b>	:	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry.
$\bar{x}$	:	Promedio.
<b>USP</b>	:	United States Pharmacopeia.
<b>RSA</b>	:	: Resolución Sanitaria de Alimentos.
<b>RT</b>	:	Tiempo de Retención.
<b>UV</b>	:	: Radiación Ultravioleta.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
Objetivo general .....	16
Objetivos específicos .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
Reactivos .....	17
Materiales .....	18
3.1 Obtención y acondicionamiento de muestras.....	19
3.2 Composición proximal .....	19
3.3 Cuantificación de nitrógeno total (nitrógeno proteico y no proteico) por método de Kjeldahl.....	19
3.3.2Cuantificación de nitrógeno total.....	19
3.3.1 Cuantificación de nitrógeno proteico y no proteico .....	20
3.4 Cuantificación de grasa total por método colorimétrico... ..	20
3.5 Cenizas.....	22
3.5.1 Cenizas totales .....	22
3.5.2 Cenizas insolubles en HCl .....	22
3.6 Cálculo de carbohidratos.....	23
3.7 Cuantificación de proteínas por método de Lowry.....	23

3.8 Composición de minerales.....	24
3.9 Identificación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos en manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC-RF).....	26
3.9 Propiedades funcionales de aislados proteicos... ..	27
3.11 Análisis estadístico... ..	29
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1:</b>	Curva de calibrado de estándar multielemental para la determinación de metales en ICP-OES	25
<b>TABLA N°2:</b>	Condiciones Instrumentales ICP-OES	25
<b>TABLA N°3:</b>	Longitudes de onda analíticas de emisión atómica utilizadas en la determinación de metales	25
<b>TABLA N°4:</b>	Composición química y aporte calórico de manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> .	30
<b>TABLA N°5:</b>	Porcentaje de proteína en manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> por el método de Lowry.	31
<b>TABLA N°6:</b>	Contenido de minerales totales en manto y músculo en base seca de la especie <i>A. chilensis</i> .	32
<b>TABLA N°7:</b>	Cuantificación de aminoácidos de manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> por estándar externo y estándar interno (Norvalina).	37
<b>TABLA N°8:</b>	Capacidad de absorción de agua y aceite de manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> .	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°1</b>	Gráfico de regresión lineal en unidades de absorbancia versus concentración de albúmina bovina en mg/mL para la cuantificación de proteínas en manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> por método de Lowry.	31
<b>FIGURA N°2</b>	Cromatograma HPLC con mezcla de estándares para la identificación cualitativa.	33
<b>FIGURA N°3</b>	Cromatograma HPLC de manto de la especie <i>A. chilensis</i> .	34
<b>FIGURA N°4</b>	Cromatograma HPLC de músculo de la especie <i>A. chilensis</i> .	34
<b>FIGURA N°5</b>	Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibrado con estándar externo.	35
<b>FIGURA N°6</b>	Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibrado con estándar Interno (Norvalina)	35
<b>FIGURA N°7</b>	Cromatograma HPLC correspondiente a manto de la especie <i>A. chilensis</i> con estándar interno	36
<b>FIGURA N°8</b>	Cromatograma HPLC correspondiente a músculo de la especie <i>A. chilensis</i> con estándar interno	36
<b>FIGURA N°9</b>	Comparación del contenido de aminoácidos entre manto y músculo a través del método de cuantificación con estándar externo de la especie <i>A. chilensis</i> .	38
<b>FIGURA N°10</b>	Comparación del contenido de aminoácidos entre manto y músculo a través del método de cuantificación con estándar interno de la especie <i>A. chilensis</i> .	38
<b>FIGURA N°11</b>	Comparación del contenido de aminoácidos entre manto a través del método de cuantificación con estándar externo y estándar Interno de la especie <i>A. chilensis</i> .	39
<b>FIGURA N°12</b>	Comparación del contenido de aminoácidos entre músculo a través del método de cuantificación con estándar externo y estándar interno de la especie <i>A. chilensis</i> .	39
<b>FIGURA N°13</b>	Porcentaje de formación de espumas de manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> en el tiempo (minutos).	41
<b>FIGURA N°14</b>	Porcentaje de proteína soluble en manto y músculo de la especie <i>A. chilensis</i> versus pH por método de Biuret.	42

## INTRODUCCIÓN

En los océanos existe una abundante biodiversidad de organismos que han evolucionado hasta nuestros días, en su mayoría organismos invertebrados como los organismos sésiles, que al no poseer defensas físicas y con el objetivo de defenderse ante depredadores o de atacar a sus presas producen sustancias con actividad biológica (metabolitos secundarios). Debido a lo anterior, la exploración del mar ofrece grandes oportunidades para el descubrimiento y síntesis de nuevos fármacos (Datta, 2015). Hasta ahora, un gran porcentaje de productos naturales han sido aislados a partir de organismos marinos y reportados en una gran cantidad de publicaciones, los cuales han sido relacionados con actividad biológica.

Los organismos acuáticos ocupan a menudo ambientes extremos para su supervivencia, tales como la profundidad del océano, donde la presión es alta y la luz está prácticamente ausente, temperaturas muy altas o bajas, rangos de salinidad desde muy bajo a saturado y fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno, entre otros (Haard *et al.*, 2000).

En este sentido, ha surgido gran interés por una de las cinco clases del *Phylum Equinodermata* o equinodermos, diferenciándose morfológicamente de estas por la presencia de un eje polar largo, un cuerpo cilíndricamente alargado con la boca y el ano en el extremo anterior y posterior respectivamente (Lawrence J, 1987; Barnes *et al.* 1996; Sun *et al.*, 2004). Dentro de los equinodermos se encuentra la Familia *Holothuriidae*, del género *Holothuria*, conocida vulgarmente como pepino de mar, de la cual se han reportado más de 1.500 variedades diferentes a lo largo de los océanos (Schillaci, 2014; Bahrami, 2016).

Estas especies son de gran importancia económica, debido al gran consumo de este producto, considerado de elite en los países asiáticos. En China existen registros de consumo de este recurso incluso anteriores a la dinastía Ming (1368 – 1644), por lo que en diversos escritos ancestrales se cita este producto como “esencia vital”, siendo utilizado hasta hoy en día en el tratamiento de la artritis, como purificador de la sangre y riñones, por poseer efectos afrodisíacos y por prevenir la debilidad y el envejecimiento y además es usado como “suplemento alimenticio”. 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 las más importante comercialmente y destacando entre estas *Apostichopus japonicus* (Yellow Sea Fisheries

Research Institute, 1991). China y Japón son los principales productores y consumidores a nivel mundial de pepino de mar ya que es parte de su dieta y es considerado como medicina tradicional. Su cultivo en China se estima en más de un millón de acres, y su producción excedió los 150 millones de dólares en el 2009 (Li *et al*, 2012; Rogers *et al*, 2018). En los años 2009 a 2016, la cosecha de esta especie fue en gran proporción entre los países China, Japón y Corea. (Yu *et al*, 2015; Rogers *et al* 2018).

Un ejemplo del incipiente interés en este producto marino es México, donde la pesquería de pepino de mar se inició en Baja California con el *Isostichopus fuscus* en la costa oriental y *Parastichopus parvimensis* en la costa occidental como una actividad de pequeña escala que respondió a la demanda de los países orientales (Castro, 1997; Aguilar *et al.*, 2002). Actualmente, se explotan estas especies de forma legal para exportación, pero en régimen de concesión para su protección.

La razón principal de su gran demanda comercial es el uso alimenticio, pudiendo comerse crudo, hervido o en conserva, aunque la mayor parte del comercio internacional se enfoca a la pared del cuerpo seco, hay cierto comercio vinculado a partes congeladas de las vísceras y los músculos internos, ya sean crudos o en conserva. El pepino de mar es una comida importante en los pueblos asiáticos, por lo que consumen este producto por su gran contenido proteico, casi tres veces mayor que el de los pescados y mariscos más comunes en oriente. Además, las holoturias se utilizan en investigaciones médicas en Australia, donde Ocean Quenst Pty. Ltda. y el Reef Organic Ltda. desarrollaron constrictores y relajantes musculares, como también un suplemento alimenticio con propiedades antiinflamatorias (Kale *et al*, 2013).

Entre sus componentes funcionales, destaca un fucoidano, polisacárido bioactivo que se ha encontrado en la pared o manto del *Apostichopus japonicus*, con actividad anticoagulante, antiosteoclastogénica, hipoglicémica y protectora contra los efectos ulcerativos de la mucosa gástrica inducida por el alcohol (Wang *et al*, 2012; Yu *et al*, 2015).

En Chile están descritas 74 especies nominales 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). Las incursiones comerciales en Chile comienzan en 1992, enfocándose principalmente en el *Athyonidium chilensis*.

Al igual que las especies orientales, *Athyonidium chilensis* ha mostrado poseer en el

manto polisacáridos bioactivos con propiedades anticoagulantes, siendo aislados por Matsuhira *et al.* (2012) un condroitin-sulfato fucosilado y algunos fucanos en menor cantidad (Matsuhira *et al.*, 2012).

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 60%, incluyendo los músculos longitudinales y retractores del introverso. Es por esto, que la caracterización nutricional del manto y los músculos a través de la evaluación química proximal, la determinación de minerales y aminoácidos permitirá valorizar este recurso marino para el consumo humano. Además, la evaluación de las propiedades funcionales del manto y músculo determinará la factibilidad de incorporarlos en la formulación de alimentos como ingredientes alimentarios, con fines tecnológicos y nutricionales.

El término propiedad funcional que se aplica a los ingredientes alimenticios, es definido como toda propiedad no nutricional que influencia la utilidad de un ingrediente en un alimento. La mayor parte de las propiedades funcionales afectan las características sensoriales del producto, pero también pueden tener un papel decisivo en el comportamiento físico de los alimentos durante su preparación, transformación o almacenamiento. Las propiedades funcionales pueden clasificarse en tres grupos principales: 1) propiedades de hidratación, 2) propiedades dependientes de las interacciones proteína- proteína y 3) propiedades superficiales. La determinación de estas propiedades requiere de la evaluación experimental, mediante ensayos que incluyen desde la medida de propiedades fisicoquímicas (viscosidad, tensión superficial, solubilidad) a simples ensayos sobre cocción o pérdida de agua durante la cocción o retención de aceite, entre otros. Entre estos ensayos, se tiene una serie de pruebas que se aplican frecuentemente para la evaluación de la funcionalidad como son las medidas de la capacidad emulsificante y estabilidad de la emulsión, de la formación de espumas y estabilidad de estas, la de absorción y retención de agua y la de gelificación. (Cheftell, 1989; Sikorski, 2001).

## OBJETIVOS

### General:

- Comparar nutricionalmente el manto y músculo del *Athyonidium chilensis* (Pepino de mar) y la funcionalidad de estos.

### Específicos:

- Determinar la composición química proximal y minerales del manto y músculo de pepino de mar.
- Definir las condiciones adecuadas para la caracterización aminoacídica de las proteínas presentes en manto y músculo mediante metodología de HPLC-FL.
- Determinar propiedades funcionales del manto y músculo, tales como capacidad de absorción de agua, capacidad de retención de aceite, capacidad emulsificante, capacidad formación de espumas y solubilidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

- 3.10 1-octanol para síntesis, Merck.
- 3.11 2-propanol p.a., Merck.
- 3.12 Agua destilada.
- 3.13 Ácido bórico p.a., Loba.
- 3.14 Ácido clorhídrico 37% p.a., Merck.
- 3.15 Ácido 3 – mercaptopropiónico (MPA) p.a., Merck.
- 3.16 Ácido nítrico 65% p.a., Merck.
- 3.17 Ácido sulfúrico 95% - 97% p.a., Merck.
- 3.18 Acetato de cobre monohidratado, Merck.
- 3.19 Acetato de sodio trihidratado, Merck.
- 3.20 Agua ultra pura.
- 3.21 Carbonato de sodio p.a., Sigma-Aldrich.
- 3.22 Mentol p.a., Loba.
- 3.23 Estándar de Albúmina fracción V (de suero bovino), Sigma-Aldrich.
- 3.24 Estándar de L – aminoácidos (21G; L-Ácido Aspártico; Glutamato; L-Asparagina; L-Serina; L-Glutamina; L-Histidina; L-glicina; L-treonina; L-Tirosina; L-Lisina; L-Valina; L-Metionina; L-Cisteína; L-Fenilalanina; L-Isoleucina; L-Leucina; L-Triptófano), Sigma-Aldrich.
- 3.25 Estándar multielemental - ICP multi-element standard solution IV, Certipur, Merck.
- 3.26 O-Ftalaldialdehído para fluorometría (OPA), Merck.
- 3.27 Hexano HPLC,  $\geq 99,9\%$  de pureza, Merck
- 3.28 Hidróxido de sodio p.a., Merck.
- 3.29 Hidróxido de potasio p.a., Merck.
- 3.30 Indicador de Tashiro
- 3.31 Metanol grado HPLC,  $\geq 99,9\%$ , Merck.
- 3.32 Nitrógeno gaseoso.
- 3.33 Peróxido de hidrógeno 30 % p.a., Merck.
- 3.34 Reactivo Fenol de Folin Ciocalteau p.a. Merck.
- 3.35 Sulfato de aluminio y potasio dihidratado p.a., Merck.
- 3.36 Sulfato de cobre pentahidratado p.a., Merck.
- 3.37 Sulfato de potasio anhidro p.a., Loba.
- 3.38 Tetrahidrofurano (THF) p.a., Merck.

- 3.39 Trietanolamina (TEA) p.a., Merck.
- 3.40 Tartrato de sodio y potasio p.a., Sigma-Aldrich.

#### Materiales y equipos

- 3.41 Balanza semi – analítica PS360/C/2, Radwag.
- 3.42 Balanza analítica AS 220/C/2, Radwag.
- 3.43 Baño de ultrasonido WVC-D10H, Wiseclaen.
- 3.44 Baño termostático Memmert.
- 3.45 Centrifuga digital refrigerada 5072-R, Eppendorf.
- 3.46 Columna Inertsil ODS -3 C18, 15 cm x 4,6 mm x 150 mm, 5 µm.
- 3.47 Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), con autosampler modelo SIL-20AC, horno de columna modelo CTO-20AC y detector de fluorescencia RF- 10AXL, Shimadzu.
- 3.48 Cámara desecadora.
- 3.49 Destilador Kjeldahl, Velp.
- 3.50 Digestor DK-6, Velp.
- 3.51 Espectroscopio de emisión atómica en plasma inducido (ICP-OES), Optima DV 2000, Perkin Elmer.
- 3.52 Espectrofotómetro UV – Vis UV 1800, Shimadzu.
- 3.53 Estufa de secado modelo ED-8, Binder.
- 3.54 Liofilizador Virtis Benchtop K.
- 3.55 Material fungible de laboratorio
- 3.56 Molinillo eléctrico A11 Basic, IKA.
- 3.57 Refrigerador, LG.
- 3.58 Baño sornicador WVC-D10H, Wiseclaen.
- 3.59 Tamiz #20.
- 3.60 Shaker ASTM.
- 3.61 Vórtex MAXI MIX II, Thermo.

## METODOLOGÍA

### 3.1 Obtención y acondicionamiento de muestras:

Se recolectaron manualmente individuos adultos de *A. chilensis* en el sector de “El Tabo” y fueron transportados al lugar de eutanasia en cajas de aislapol acondicionadas con gel packs y algas tipo huiro, con objeto de evitar el desove y desecación. Los individuos fueron narcotizados por inmersión en agua de mar saturada con cristales de mentol (anexo N°2), durante un período aproximado de 12 horas, evaluando cada 2 horas su movilidad a través de la respuesta al tacto de los tentáculos. Los pepinos narcotizados fueron diseccionados separando sus órganos y seleccionando manto y músculo (anexo N°3), que fueron liofilizados durante 72 horas, triturados y tamizados, que posteriormente fueron tratados por separado para los ensayos descritos a continuación.

### 3.2 Composición proximal

Se determinó la composición química proximal, en base seca, de un homogenizado de pool de muestra (n = 10) representativa de manto y músculo de individuos adultos de *A. chilensis*, previamente liofilizados, triturados y tamizados, que comprendió:

### 3.3 Cuantificación de nitrógeno total, proteína cruda y nitrógeno proteico y no proteico.

#### 3.3.1 Cuantificación de nitrógeno total y proteína cruda.

Para la cuantificación de nitrógeno total, se tomaron 100 miligramos de muestra, por triplicado (manto y músculo), que fueron tratadas directamente por método Kjeldahl.

En primer lugar 100 miligramos de muestra se transfirieron a tubos de digestión de Kjeldahl, añadiendo 0,5 gramos de sulfato de cobre anhidro, 4,5 gramos de sulfato de potasio y 7 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se llevaron al digestor para su digestión a 200°C por 60 min, a 300°C por 60 min y a 400°C por 180 min.

Una vez ya enfriado los tubos con las muestras digeridas, se añadió 50 mL de agua destilada y 90 mL de NaOH 32% p/v que fueron transferidos al destilador de nitrógeno con el programa de destilación ya activado. El destilado se recibió en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de ácido bórico 4% p/v y unas gotas de indicador de Tashiro (anexo N°4). El destilado de color verde esmeralda contenido en el matraz de

Erlenmeyer fue titulado con una solución de ácido clorhídrico estandarizado 0,1 N hasta que la solución viró a color lila (AOAC, 2016).

El porcentaje de nitrógeno total fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno Total} = \left( \frac{V \times N \times \text{PEN}}{M} \right) \times 100$$

En donde:

V: Volumen de ácido clorhídrico 0,1 N gastado en la titulación.

N: Normalidad de ácido clorhídrico.

PEN: Peso equivalente de nitrógeno.

M: masa de muestra en miligramos.

El porcentaje de proteína cruda fue calculado según la siguiente formula:

$$\text{Proteína cruda (\%)} = N_T \times 6,25$$

Donde:

N<sub>T</sub>: Porcentaje de nitrógeno total

### **3.3.2 Cuantificación de nitrógeno proteico y no proteico.**

Por triplicado, 100 miligramos de manto y músculo liofilizados de la especie *A. chilensis* se transfirieron a un matraz Kjeldahl con 50 mL de agua destilada y seis a ocho gotas de antiespumante 1-octanol. Luego se calentó a ebullición durante 30 minutos teniendo la precaución de no llegar a sequedad. Después, sin dejar enfriar, se añadieron 2,5 mL de la solución de sulfato de aluminio y potasio 10 % p/v, mezclando y calentando nuevamente a ebullición por 5 minutos. Posterior a esto, se adicionaron 50 mL de la solución de acetato de cobre 3 % p/v mezclando y dejando enfriar, el precipitado formado es recuperado por filtración a vacío, lavándolo con 60 mL de agua destilada. Tanto la solución como el precipitado fue llevado a los tubos Kjeldahl para el análisis de nitrógeno proteico y no proteico por la metodología descrita en el punto 3.1.1.

Los resultados fueron expresados como porcentaje de nitrógeno proteico y no proteico, siendo calculados utilizando la fórmula presentada en el punto 3.1.1.

El porcentaje de proteína aislada por precipitación fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (\%)} = N_p \times 6,25$$

Donde:

$N_p$ : Porcentaje de nitrógeno proteico

### 3.4 Cuantificación de grasa total por método colorimétrico.

Se pesaron por triplicado 500 miligramos de manto y músculo liofilizados, sometiéndose a una hidrólisis ácida con 20 mL de HCl 3,0 N, a reflujo durante 1 hora, y posteriormente se realizó la extracción de la materia grasa con 10 mL de cloroformo por tres veces. Una vez ya extraída la materia grasa se llevó a evaporación total del cloroformo a  $65 \pm 3$  °C bajo campana y sobre baño maría. Luego de remover el solvente se agregaron 3 mL de una solución de dicromato de potasio (2%) en ácido sulfúrico, prosiguiendo con calentamiento en un baño de agua a 100°C por 15 minutos y posteriormente la solución se enfrió con agua corriente y se añadieron 4,5 mL de agua destilada. La muestra fría se midió a 590 nm en espectrofotómetro (Pande *et al.*, 1963).

Curva de calibrado: Se preparó una solución madre de ácido palmítico de concentración 10 mg/L, de la cual se tomó 0, 107, 214, 321, 428, 535, 642  $\mu$ L respectivamente y se llevaron a un volumen final de 5 mL con cloroformo. Cada punto de la curva se trató utilizando el mismo protocolo de la muestra. Para el blanco se utilizó dicromato de potasio en agua destilada (Pande *et al.*, 1963).

El cálculo del porcentaje de grasa total se realizó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grasa Total} = \frac{[C] * Fd * 100}{M}$$

Donde:

[C]: Concentración obtenida a partir de la absorbancia que se interpoló en la curva de calibrado en mg/L.

Fd: Factor dilución

M: masa de muestra en miligramos.

### 3.5 Cenizas.

#### 3.5.1 Cenizas totales.

Se calentó un crisol de porcelana a 650°C por 30 minutos, se dejó enfriar en un desecador y se pesó para obtener su masa inicial. Posteriormente, se pesó aproximadamente 1 gramo de muestra liofilizada, molida y tamizada (manto y músculo) por triplicado, llevándose a un horno de mufla con temperatura regulable y evacuación segura de gases de combustión. Las muestras se calcinaron a 650°C por 5 horas, hasta peso constante. Luego se enfrió en desecador y se pesó para obtener la masa final (Farmacopea Chilena, 2015).

Los cálculos para el porcentaje de cenizas corresponden a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas Totales} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Donde:

m<sub>2</sub>: Masa en gramos de la cápsula con las cenizas

m<sub>1</sub>: Masa en gramos de la cápsula con la muestra

m<sub>0</sub>: Masa en gramos de cápsula vacía.

#### 3.5.2 Cenizas insolubles.

A los crisoles con las cenizas totales obtenidas en método descrito anteriormente, se agregó 25 mL de ácido clorhídrico 7% p/v, se cubrió con un vidrio reloj y se hirvió suavemente por 5 minutos. Posteriormente, se enjuagó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se adicionó al crisol. La solución resultante en el crisol se filtró por papel filtro libre de cenizas y se lavó el residuo con agua caliente hasta la neutralización del filtrado. Se transfirió el papel filtro con el residuo insoluble al crisol original y fueron calcinados nuevamente en un horno de mufla 650°C por 2 horas, posteriormente se enfrió en un desecador por 30 min y se pesó el residuo (Farmacopea Chilena, 2015).

Los cálculos de porcentaje de cenizas insolubles corresponden a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas insolubles} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_3 - m_0)} \times 100$$

Donde:

m<sub>2</sub>: Masa en gramos de la cápsula con las cenizas

m<sub>3</sub>: Masa en gramos de la cápsula con cenizas totales

m<sub>0</sub>: Masa en gramos de cápsula vacía.

### **3.6 Cálculo de carbohidratos.**

Los carbohidratos fueron calculados matemáticamente realizando la diferencia entre 100 y el contenido de proteína cruda por Kjeldahl, cenizas totales y grasa total. El aporte calórico de la muestra se determinó aplicando factores de Atwater de 4 kcal/g para las proteínas y carbohidratos y 9 kcal/g para grasa (USP, 2010).

### **3.7 Cuantificación de proteínas por método de Lowry.**

Se pesaron por triplicado 300 miligramos acondicionados de manto y músculo de la especie *A. chilensis*, y se le añadió 1 mL de NaOH 2N, posteriormente se llevó a 100°C durante 10 minutos a baño maría. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se tomaron 300 µL del hidrolizado y se les agregó 300 µL de agua destilada y 3 mL del reactivo de formación de complejo, dejando reposar por 10 minutos. El reactivo de formación de complejo consta de una mezcla de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% p/v (solución A), CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 1% p/v (solución B) y Tartrato de sodio y potasio (KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> x4H<sub>2</sub>O) 2% p/v (solución C) en una relación 100:1:1 (A, B, C), el reactivo de formación de complejo se preparó inmediatamente antes de usarse. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se le añadió 300 µL de reactivo de Folin Ciocalteu 21N, se homogenizó en un vórtex y se dejó reposando por 45 a 60 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de reposo, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro UV-VIS 1800 Shimadzu (Pomory, 2008).

Curva de calibrado: Se preparó una solución madre de proteína estándar (fracción V de albumina de suero bovino) de 4 mg/mL de proteína en agua destilada, de la cual se tomó 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1 y 1,25 mL respectivamente y se llevaron a un volumen final de 5 mL con agua destilada, obteniéndose concentraciones entre 0 y 1,0 mg/mL de albúmina de suero bovino, Cada punto de la curva se realizó utilizando el mismo protocolo de la muestra. Para el blanco se utilizó agua destilada (Pomory, 2008).

El resultado fue expresado por el porcentaje de proteína de albúmina bovina, y calculado según la siguiente fórmula:

$$Proteína (\%) = \left( \frac{M_{PC}}{M} \right) \times 100$$

Donde:

$M_{PC}$ : Masa en miligramos de proteína cuantificada

M: Masa en miligramos de muestra pesada de manto y músculo.

### 3.8 Composición de minerales.

La determinación de minerales de manto y músculo de la especie *A. chilensis* se efectuó por espectroscopía de emisión atómica en plasma inducido (ICP-OES), determinándose los metales: Aluminio (Al), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Zinc (Zn), Molibdeno (Mo), Potasio (K) y Sodio (Na).

En primer lugar, se pesaron por triplicado en viales de teflón, alrededor de 0,2500 gramos de manto y músculo acondicionados de la especie *A. chilensis*, se les agregó una mezcla de 9 mL de HNO<sub>3</sub> al 65% y 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, pre-digiriéndose toda una noche.

Después, se realizó la digestión ácida con ácido sulfúrico en un microondas Ethos Easy, a un tiempo de 15 minutos, potencia de 1800 MW (W) y a una temperatura de 180 °C por dos veces. Las muestras se enfriaron durante 25 min y después se aforaron a 25 mL con agua desionizada.

Una vez ya digeridas las muestras, se determinaron metales por ICP-OES. El equipo utilizado fue PERKIN ELMER OPTIMA 2000 DV y las condiciones de análisis se detalla en la tabla N°2.

Se determinaron simultáneamente los metales ya mencionados a las longitudes de onda detalladas en la tabla N°3. A partir del estándar multielemental (ICP multi-element standard solution IV, Certipur. Merck) de 1000 mg/L se preparó una solución de 10 mg/L, tomando de esta 250 µL del estándar y 50 µL de HNO<sub>3</sub> suprapur, aforando a 25 mL. Con esta última solución se construyó la curva de calibrado, como muestra la siguiente tabla:

**Tabla N°1:** Curva de calibrado de estándar multielemental para la determinación de metales por ICP-OES.

Concentración (µg/L)	Volumen patrón 10 (mg/L) (µL)	Volumen HNO <sub>3</sub> (µL)	Aforo (mL)
0	0	100	100
10	50	50	50
20	100	50	50
50	250	50	50
100	500	50	50
200	1000	50	50
400	2000	50	50
800	4000	50	50

**Tabla N°2:** Condiciones instrumentales ICP-OES.

Flujo de Argón L/min		
Plasma	Gas auxiliar	Nebulizador
15	0,2	0,8
Flujo de la muestra 1,5 mL/min		
Poder de radio frecuencia 1300 watts		

**Tabla N°3:** Longitudes de onda de emisión atómica utilizadas en la determinación de metales.

Elemento	Longitud de onda $\lambda$ (nm)
Aluminio	396,153
Cadmio	228,802
Cobre	327,393
Cromo	267,716
Hierro	238,304
Manganeso	257,610
Molibdeno	202,301
Níquel	231,604
Potasio	766,490
Sodio	589,592
Zinc	206,200
Plomo	324,800

### 3.9 Identificación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos.

Para la identificación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos de manto y músculo se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia, según la metodología descrita y modificada por Wu et al. (2016) y Song et al. (2018).

Como material de referencia, se usó un stock de 21 estándares de aminoácidos (LAA-21, Sigma – Aldrich, USA), pesando de cada uno de ellos una cantidad mínima, entre 10 a 20 miligramos, para obtener la identificación de cada uno de ellos y determinar su tiempo de retención como se observa en los cromatogramas descritos en el anexo N°5. Para cada estándar de aminoácido se realizó una solución madre en buffer borato de concentración 200 mM pH 9,9 en 50% de metanol y se almacenó a -20°C hasta su inyección.

Previo a la inyección los estándares de aminoácidos se derivatizaron, adicionando una mezcla de O-Ftalaldialdehído (OPA) y ácido 3 – mercaptopropiónico (MPA), para lo que se pesó 16,9 miligramos de OPA disueltos en 2,4 mL de metanol, se añadió posteriormente 7,6 mL de buffer borato 200 mM pH 9,9 y 24 µL de ácido mercapto propiónico (MPA), teniendo la precaución de ser resguardado por la luz y mantenerlo a temperatura ambiente. Previo al análisis en HPLC, se derivatizó en una relación de estándar y derivatizante de 1:5, 1 µL de estándar o muestra, mezclado con 5 µL de OPA-MPA.

Por triplicado se tomaron 50 miligramos de manto y músculo y fueron hidrolizados con 15 mL HCl 6N por 24 horas a  $110 \pm 2^\circ\text{C}$ , para la identificación cuantitativa se utilizó Norvalina como estándar interno, del cual se añadió 50 miligramos de este a las muestras de manto y músculo antes de su hidrólisis. Las muestras ya hidrolizadas, se llevaron a sequedad a baño maría, y finalmente fueron reconstituidas con 10 mL de buffer borato, pH 9,9; posteriormente se derivatizaron en forma similar a lo realizado con los estándares de aminoácidos y después de 3 minutos se procedió a su inyección y análisis cromatográfico. La fase móvil utilizada en el análisis cromatográfico estaba constituida por fase móvil A, una mezcla de 500 mL buffer acetato (20 mM y pH 7,0), 50 mL de metanol, 1,5 mL de tetrahidrofurano (THF) y 90 µL de trietanolamina (TEA) y fase móvil B, una mezcla de 100 mL de buffer acetato (20 mM y pH 7,0) y 400 mL de metanol (Wu et al., 2016; Song et al., 2018).

La separación cromatográfica se realizó en una columna Inertsil ODS-3 C18, 15 cm x 4,6 mm x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula, a una temperatura de 30°C, con un flujo de 1 mL/min y una presión de 80 bar. Utilizando un sistema de elución por gradiente binario compuesto por fase móvil A y fase móvil B, de forma que: 0-3,5 minutos, isocrático 100% A; 3,5-20 minutos, rampa lineal a 0% A; 22-24 minutos, rampa lineal a 100% B; 25-40 minutos, isocrático 100% A, a un flujo de 0,75 mL/min (Jin *et al.*, 2005). Para la detección se utilizó un detector de fluorescencia RF-10AXL que se ajustó a una longitud de onda de excitación 340 nm y de emisión 450 nm.

Curva de calibrado: Se preparó una curva de calibrado para cada aminoácido cuantificado por estándar externo y estándar interno, en los rangos de concentración que se detalla en el anexo N°6 (L-Ácido Aspártico, Glutamato, L-Serina, L-Histidina, Glicina, L-Arginina, L-Alanina, L-Lisina, L-Valina, L-Fenilalanina, Isoleucina, L-Leucina y Prolina). Para esto se tomó un volumen de 10 a 50 µL de la solución madre de cada aminoácido identificado en manto y músculo, y se llevó a un aforo de 1 mL, realizándose diluciones seriadas 3 veces. Para el caso de estándar interno, se añadió un volumen de 30 µL de una concentración de 234 ppb de Norvalina, que fue equivalente a la utilizada en manto y músculo. Para el blanco se utilizó agua ultra pura más derivatizante

Todas las soluciones utilizadas en este ensayo fueron filtradas por membrana de 0,22 µm previo a su análisis cromatográfico.

### **3.10 Propiedades funcionales del liofilizado de manto y músculo.**

Para la capacidad de absorción de agua, se tomó 1 gramo de manto y músculo acondicionado, se mezcló con 10 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga, agitándose en un vórtex por 10 min, siguiendo con su centrifugación a 1431g por 20 min a temperatura ambiente (Huda *et al.*, 2001).

La cantidad de agua absorbida por 100 gramos de la muestra de manto y músculo fue determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Agua Absorbida} = [M_{\text{post}} - (P_f + M_{\text{pre}})] \times 100$$

Donde:

$M_{\text{post}}$ : Peso de muestra en gramos, después de 10 minutos de tratamiento.

$P_f$ : Peso de contenedor en gramos.

$M_{\text{pre}}$ : Peso en gramos de muestra previo al tratamiento.

Para la capacidad de absorción de grasas, se tomó 1 gramo de manto y músculo acondicionado se mezcló con 10 mL de aceite de maravilla de uso común en un tubo de centrifuga, agitándose en un vórtex por 10 min, siguiendo con su centrifugación a 1431g por 20 min a temperatura ambiente (Huda *et al.*, 2001). La cantidad de aceite absorbido se determinó realizando la diferencia de pesos en gramos, del aceite absorbido por 100 gramos de manto y músculo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Aceite Absorbido} = [M_{\text{post}} - (P_f + M_{\text{pre}})] \times 100$$

Donde:

$M_{\text{post}}$ : Peso de muestra en gramos, después de 10 minutos de tratamiento.

$P_f$ : Peso de tubo contenedor en gramos.

$M_{\text{pre}}$ : Peso de muestra en gramos previo al tratamiento.

Para la capacidad emulsificante, se dispersó 1 gramo de manto y músculo acondicionado en 25 mL de agua destilada, agitando y adicionando gradualmente aceite de maravilla de uso común hasta observar la separación de fases. Los resultados se expresaron como los mL de aceite emulsionados por gramo de manto y músculo acondicionado (Huda *et al.*, 2001).

La capacidad de formación de espumas se valuó tomando 1 gramo de manto y músculo acondicionado que se dispersó en 100 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente y el volumen de espuma generado se midió después de 1, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 min (Huda *et al.*, 2001).

El resultado se expresó como porcentaje de espuma con respecto al volumen medido a los diferentes tiempos, calculado mediante la siguiente fórmula:

$$Espuma (\%) = \frac{h_{EE}}{h_{ES}} \times 100$$

Donde:

$h_{EE}$ : Altura de la espuma formada

$h_{ES}$ : Altura total de la solución

Para estimar la solubilidad de las proteínas contenidas en manto y músculo de la especie *A. chilensis*, se tomó 1 gramo de muestra, se mezcló con 40 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 2, 4, 6, 8, 10 y 12 con HCl o NaOH 0,5 N. Para cada pH se agitó por 30 min y luego se centrifugó a 1431g por 20 min. Se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante por el método de Biuret detallado en el anexo N°7. El porcentaje de proteína soluble se calculó sobre la base del porcentaje de proteína de manto y músculo de la especie *A. chilensis*.

### 3.11 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron con  $\bar{x} \pm DS$ . Para la organización de datos y cálculo de los resultados se empleó el software Microsoft Excel 2016, posteriormente para el tratamiento estadístico de los datos, se utilizó el software Statgraphics Centurion versión XVII, mediante el cual se aplicó análisis t-student de una vía para varianzas desiguales para la comparación de los resultados de una misma condición de tratamiento. Se consideraron resultados estadísticamente significativos a aquellos con  $p < 0,05$ .

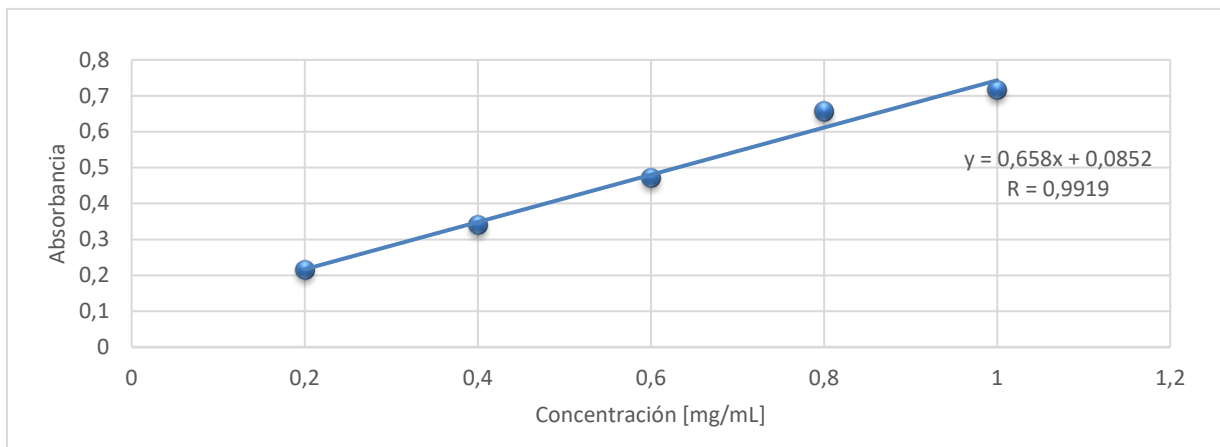
## RESULTADOS

En la tabla N°4, se exhiben los resultados correspondientes a composición química proximal y aporte calórico de manto y músculo liofilizado correspondiente a la especie *A. chilensis* en base seca. Cabe destacar, que la muestra de manto y músculo posee alrededor de un 12% de nitrógeno total, donde el 60 al 76% corresponde a nitrógeno proteico, siendo este último valor diferente estadísticamente significativo a un  $p < 0,05$ , comparando manto y músculo.

**Tabla N°4: Composición química y aporte calórico de manto y músculo de la especie *A. chilensis*.** En las cuadrículas con asterisco (\*) corresponden a valores con diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ . ( $\varphi$ ) corresponde al porcentaje de proteína calculado a partir del nitrógeno proteico.  $n = 3$

Parámetros	Manto	Músculo
Nitrógeno total (%)	11,9 ± 0,05	12,1 ± 0,4
Proteína cruda (%) (Factor: 6,25)	74 ± 0,3	75 ± 2
Nitrógeno proteico (%)	9,1 ± 0,03*	7,3 ± 0,01*
Proteína <sup>φ</sup> (%) (Factor: 6,25)	57 ± 0,3*	46 ± 0,1*
Nitrógeno no proteico (%)	2,8 ± 0,03*	4,6 ± 0,01*
Grasa total (%)	0,09 ± 0,01*	0,29 ± 0,0003*
Cenizas totales (%)	9,02 ± 0,1*	10,2 ± 0,2*
Cenizas insolubles (%)	0,09 ± 0,05	0,15 ± 0,07
Carbohidratos (%)	16,49	14,51
Calorías (Kcal/100g)	364,4	360,7

Para la cuantificación de proteínas de manto y músculo de la especie *A. chilensis* también se realizó por método de Lowry. En la figura N°1 se muestra el gráfico de regresión lineal obtenida para la curva de calibrado de albúmina bovina entre los rangos de concentración 0,2 a 1,0 [mg/mL] para la cuantificación de proteína contenida en manto y músculo en base seca de la especie *A. chilensis*, según el método de Lowry.



**Figura N°1: Gráfico de regresión lineal en unidades de absorbancia versus concentración de albúmina bovina en mg/mL para la cuantificación de proteínas en manto y músculo de la especie *A. chilensis* por método de Lowry.**

En la tabla N°5 se exhibe los resultados para cuantificación proteica de manto y músculo en base seca, mediante detección UV-vis según el método de Lowry. Además, cabe destacar que los resultados obtenidos no se aprecia diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ .

**Tabla N°5: Porcentaje de proteína en manto y músculo de la especie *A. chilensis* por el método de Lowry.** Cada resultado corresponde a  $n = 3$ .

Muestras	% Proteína (b.s.)
Manto	50 ± 5
Músculo	44 ± 5

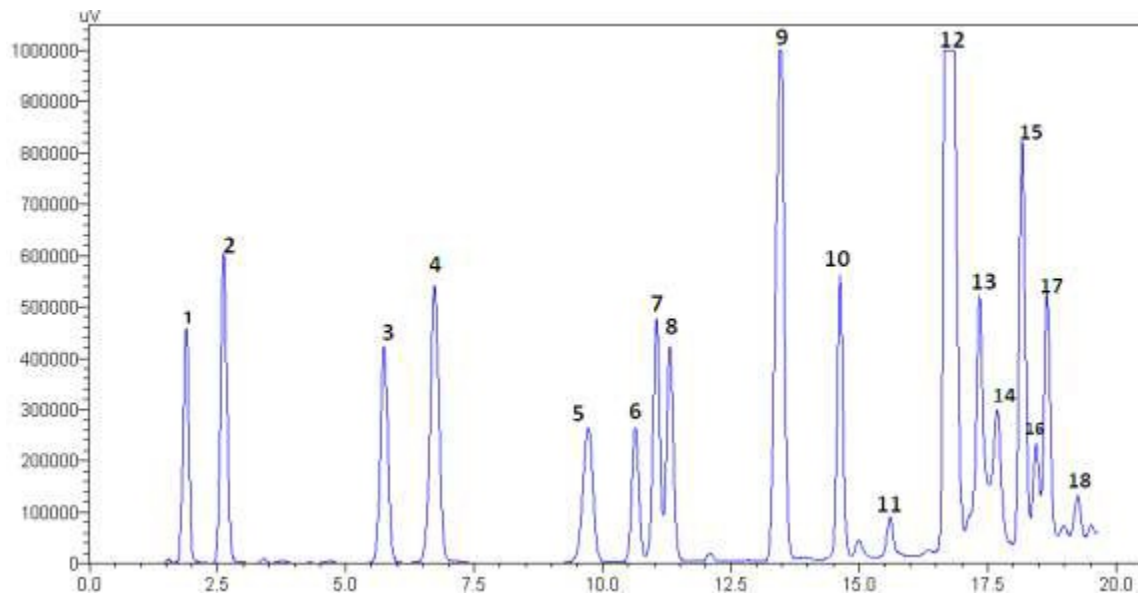
Por otra parte, para la determinación de composición de minerales de manto y músculo de la especie *A. chilensis* en base seca mediante espectroscopía de plasma inducido, tal como se muestra en la tabla N°6, se aprecia los diferentes valores de minerales de manto y músculo. Cabe destacar que el contenido de hierro en manto es seis veces más de lo que está contenido en músculo, de la misma forma como ocurre en potasio, pero en este caso el contenido de músculo es alrededor del doble de lo que contiene el manto. En el caso de níquel, plomo y molibdeno, el contenido se encuentra bajo el límite de detección

del método (LD), por lo que su valor es despreciable en la especie. Para todos los resultados obtenidos se aprecia valores con diferencias estadísticamente significativos entre manto y músculo, con un  $p < 0,05$ .

**Tabla N°6: Contenido de minerales totales en manto y músculo en base seca de la especie *A. chilensis*** Todos los resultados corresponde a  $n = 3$ . Las cuadrículas con asterisco (\*) corresponden a valores con diferencias estadísticamente significativas  $p < 0,05$ . LD: Límite de detección.

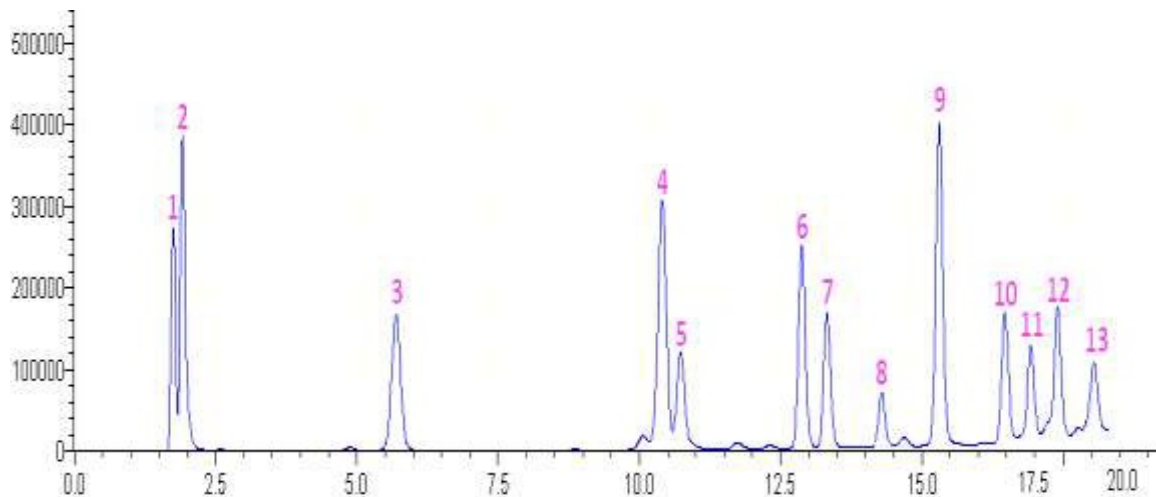
Metal	Manto	Músculo
Aluminio ( $\mu\text{g/g}$ )	$7,3 \pm 0,2^*$	$10,7 \pm 0,3^*$
Cadmio ( $\mu\text{g/g}$ )	$0,19 \pm 0,02^*$	$0,26 \pm 0,02^*$
Cromo ( $\mu\text{g/g}$ )	$0,38 \pm 0,07^*$	$0,38 \pm 0,01^*$
Cobre ( $\mu\text{g/g}$ )	$1,9 \pm 0,2^*$	$1,2 \pm 0,2^*$
Hierro ( $\mu\text{g/g}$ )	$88 \pm 8^*$	$14 \pm 3^*$
Manganeso ( $\mu\text{g/g}$ )	$1,2 \pm 0,1^*$	$1,55 \pm 0,05^*$
Níquel ( $\mu\text{g/g}$ )	<LD	<LD
Plomo ( $\mu\text{g/g}$ )	<LD	<LD
Zinc ( $\mu\text{g/g}$ )	$184 \pm 16^*$	$109 \pm 4^*$
Molibdeno ( $\mu\text{g/g}$ )	<LD	<LD
Potasio (mg/g)	$11,9 \pm 1,74^*$	$20.651 \pm 91^*$
Sodio (mg/g)	$28,1 \pm 1,46^*$	$18.297 \pm 159^*$

Para la identificación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos en manto y músculo de la especie *A. chilensis* por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia (HPLC-RF), en la figura N°2, se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla de estándares de aminoácidos utilizados para la identificación cualitativa en manto y músculo. De los 20 estándares de aminoácidos disponibles sólo se identificaron 18 en el cromatograma, los aminoácidos no identificados fueron tirosina y cisteína.

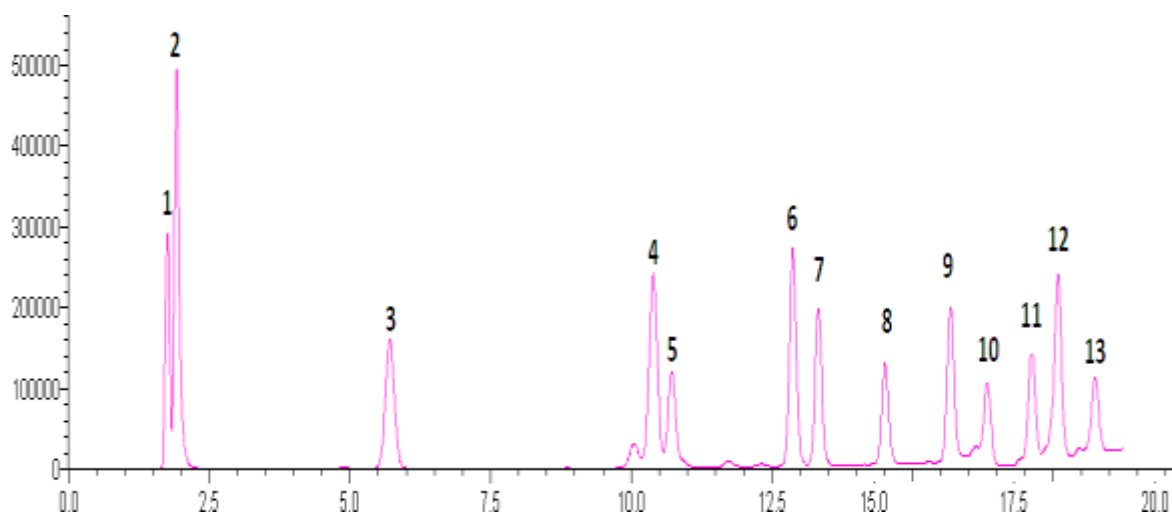


**Figura N°2: Cromatograma HPLC con mezcla estándares para la identificación cualitativa.** 1= Ácido Aspártico; 2= Glutamato; 3= Asparragina; 4= Serina; 5=Glutamina; 6= Prolina;7= Arginina 8= Alanina; 9=Treonina; 10= Glicina;11= No Identificado; 12= Metionina; 13= Valina; 14= Fenilalanina; 15= Isoleucina; 16= Triptófano; 17= Leucina; 18= Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.

A continuación, en la figura N°3 y N°4 se exhiben los cromatogramas correspondientes a la identificación cualitativa de aminoácidos en manto y músculo de la especie *A. chilensis*. Cabe destacar, de los 17 aminoácidos identificados en la figura N°2 (estándar externo), sólo se identificaron 13 aminoácidos tanto en manto y músculo (Ácido Aspártico; Glutamato; Serina; Histidina; Prolina; Arginina; Alanina; Glicina; Valina; Fenilalanina; Isoleucina; Leucina; Lisina).



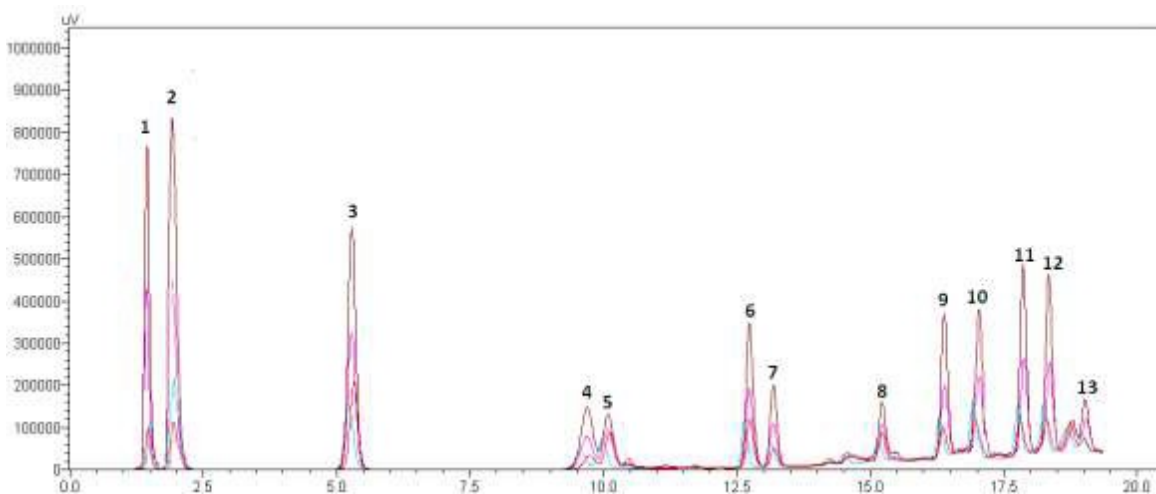
**Figura N°3: Cromatograma HPLC de manto de la especie *A. chilensis* (n=3).** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Glutamato; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Fenilalanina; 11 = Isoleucina; 12 = Leucina; 13 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.



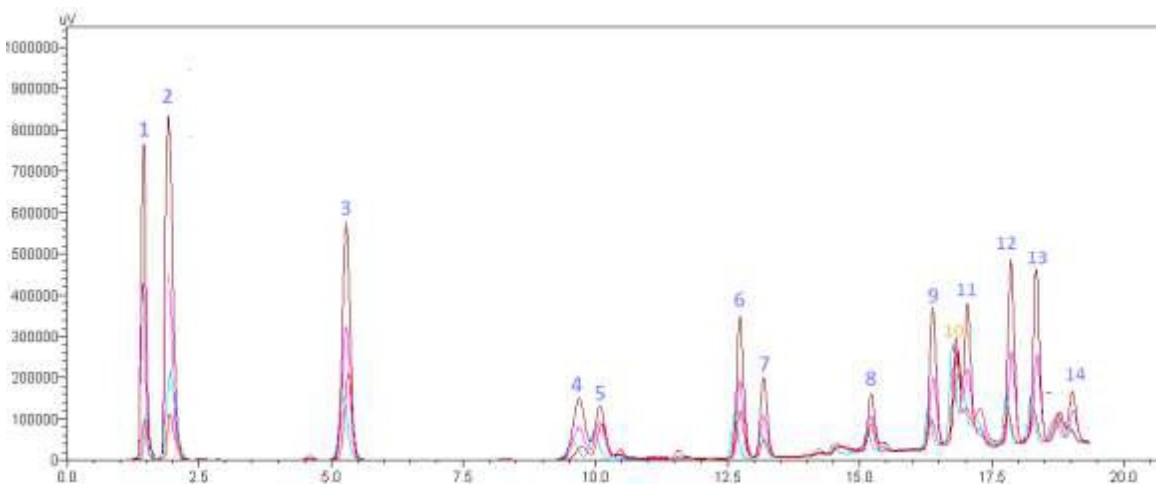
**Figura N°4: Cromatograma HPLC de músculo de la especie *A. chilensis* (n=3).** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Ácido Glutámico; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Fenilalanina; 11 = Isoleucina; 12 = Leucina; 13 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.

Por otro lado, los siguientes resultados corresponden a la identificación cuantitativa de aminoácidos contenidos en manto y músculo de la especie de *A. chilensis*. Los resultados corresponden a dos diferentes formas de cuantificación, una de ellas es utilización de estándar externo (figura N°5) y otra con estándar interno (Norvalina) (Figura N°6). Las

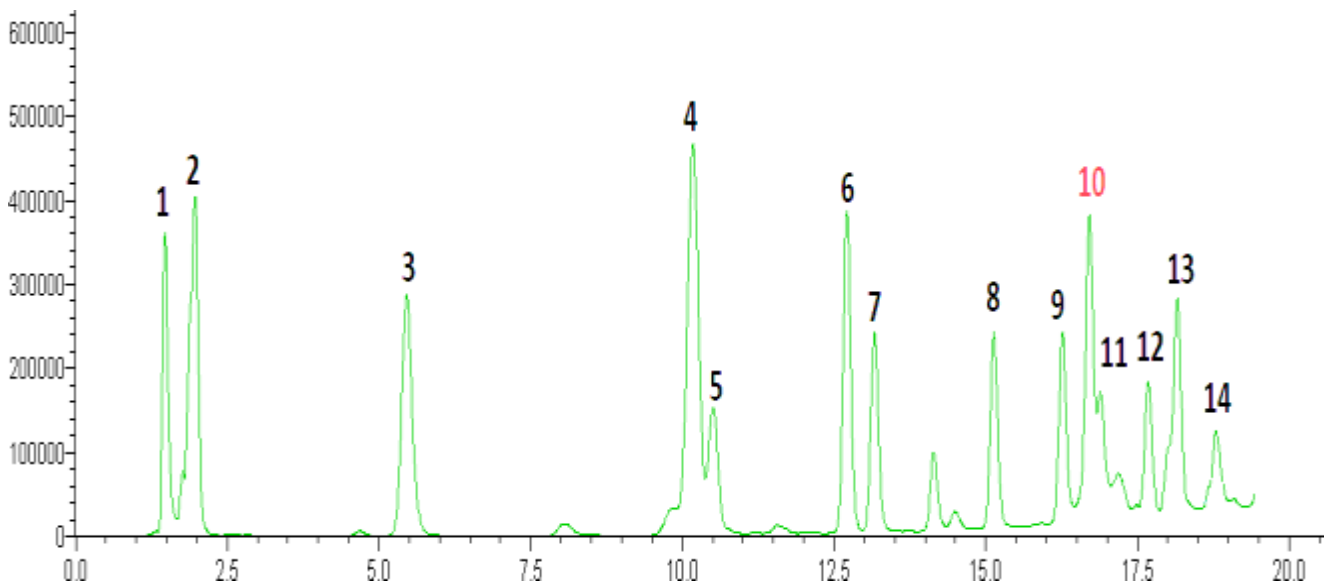
figuras N°7 y 8 corresponden a los cromatogramas de manto y músculo con estándar interno, respectivamente.



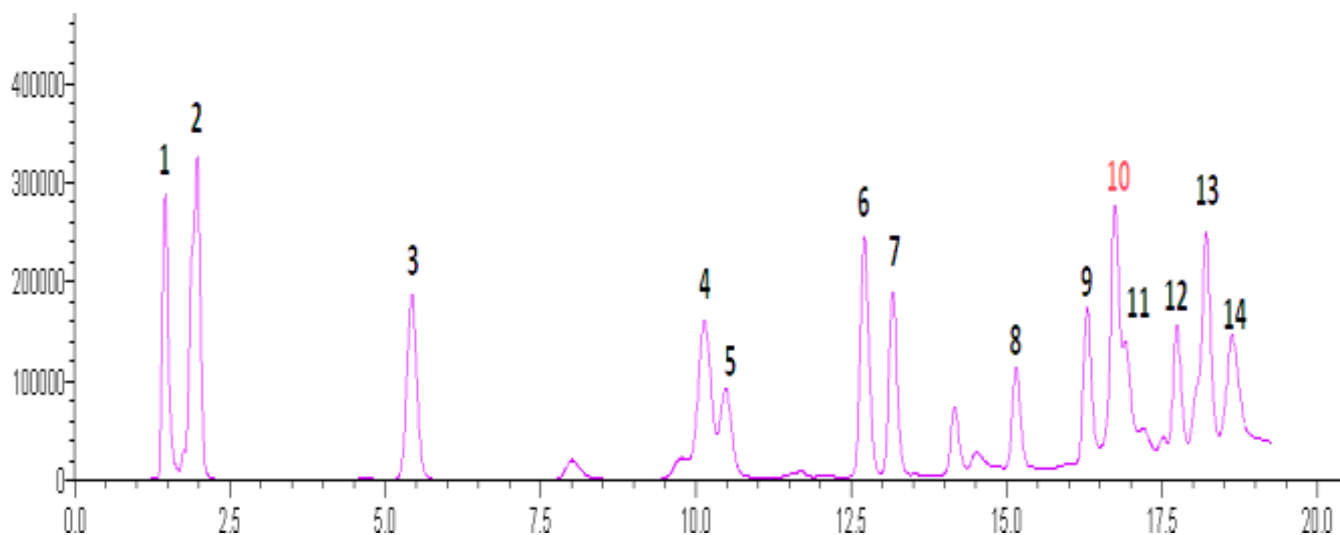
**Figura N°5: Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibrado con estándar externo.** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Glutamato; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Fenilalanina; 11 = Isoleucina; 12 = Leucina; 13 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm



**Figura N°6: Cromatograma HPLC correspondiente a curva de calibrado con estándar interno (Norvalina).** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Glutamato; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Norvalina (estándar interno); 11 = Fenilalanina; 12 = Isoleucina; 13 = Leucina; 14 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.



**Figura N°7: Cromatograma HPLC correspondiente a manto de la especie *A. chilensis* con estándar interno.** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Glutamato; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Norvalina (estándar interno); 11 = Fenilalanina; 12 = Isoleucina; 13 = Leucina; 14 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.



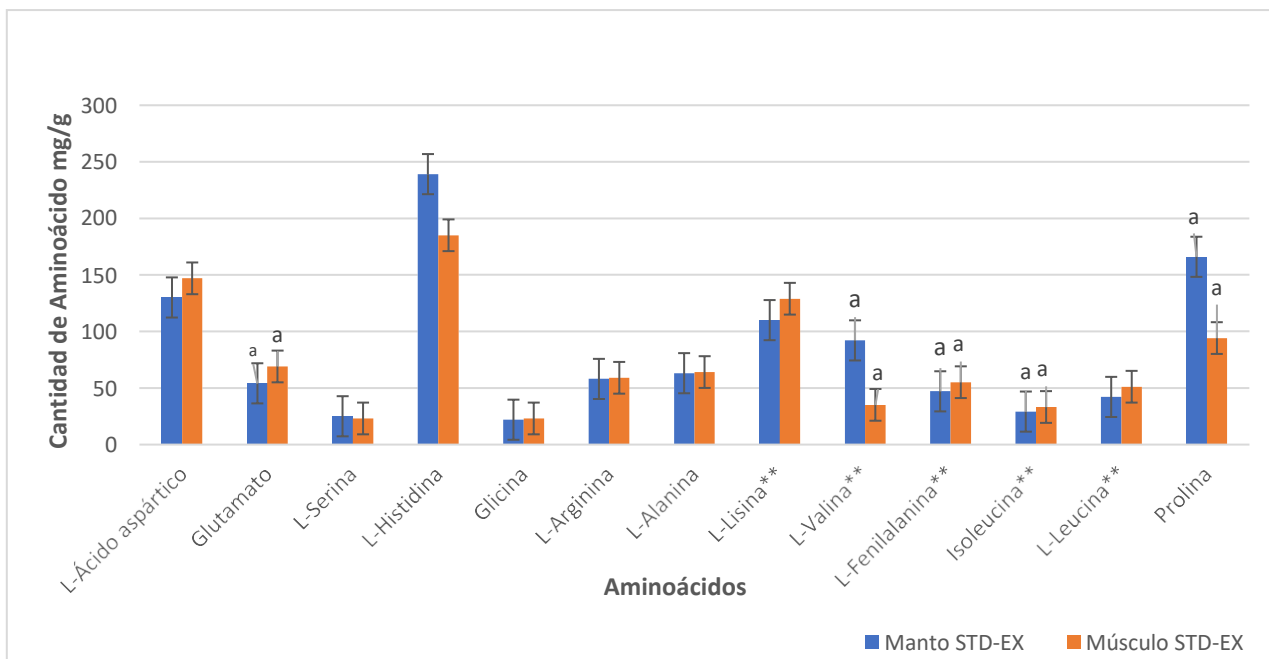
**Figura N°8: Cromatograma HPLC correspondiente a músculo de la especie *A. chilensis* con estándar interno.** 1 = Ácido Aspártico; 2 = Glutamato; 3 = Serina; 4 = Histidina; 5 = Prolina; 6 = Arginina; 7 = Alanina; 8 = Glicina; 9 = Valina; 10 = Norvalina (estándar interno); 11 = Fenilalanina; 12 = Isoleucina; 13 = Leucina; 14 = Lisina. Para la detección de los aminoácidos se ajustó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 450 nm.

Los resultados que se muestran a la tabla N°7 corresponden a la cuantificación de aminoácidos identificados en manto y músculo de la especie *A. chilensis* correspondientes

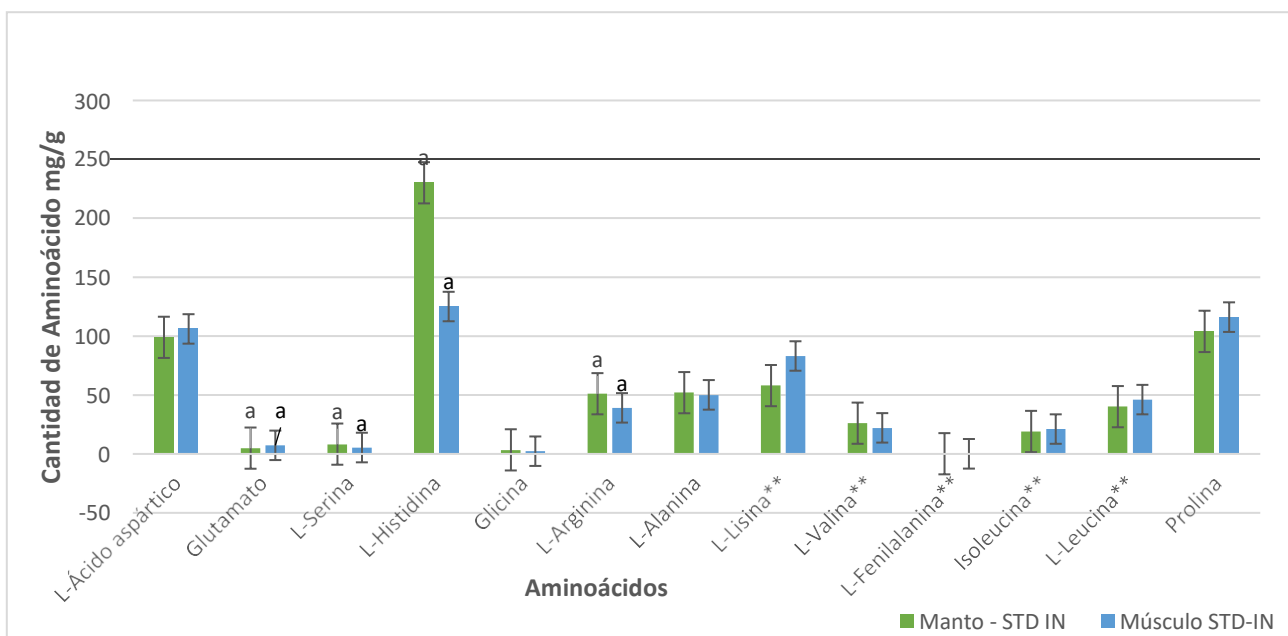
a las figuras N°3 y 4 y, N°5 y 6 de estándar externo e interno, respectivamente. Los resultados se encuentran expresados en  $\bar{x} \pm DS$ , en unidades de mg/g de muestra en base seca y para cada uno de los ensayos se consideró un n=3. Se realizó análisis estadístico entre los grupos de los mismos métodos de cuantificación, manto – músculo (estándar externo), manto - músculo (estándar interno), representado en la tabla N°6 con el símbolo “ $\alpha$ ” si presenta valores con diferencias estadísticamente significativas (figuras N°9 y N°10), como también entre los mismos tipos de muestra, pero de diferente método de cuantificación, manto (estándar externo) – manto (estándar interno), representado en la tabla N°6 con el símbolo “ $\beta$ ” si presenta valores con diferencias estadísticamente significativas (figura N°11) y músculo (estándar interno) - músculo (estándar interno), representado en la tabla N°6 con el símbolo “ $\gamma$ ”, si presenta diferencias estadísticamente significativas (figura N°12).

**Tabla N°7: Cuantificación de aminoácidos de manto y músculo de la especie *A. chilensis* por estándar externo y estándar interno.** Los resultados corresponde a n=3  $\bar{x} \pm DS$  unidades de mg/g de muestra. Las cuadrículas con asterisco (\*) corresponde a aminoácidos esenciales. Las cuadrículas con la simbología “ $\alpha$ ”, “ $\beta$ ” y “ $\gamma$ ”, corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas entre las muestras con un  $p < 0,05$ . NC, corresponde a analito no cuantificado.

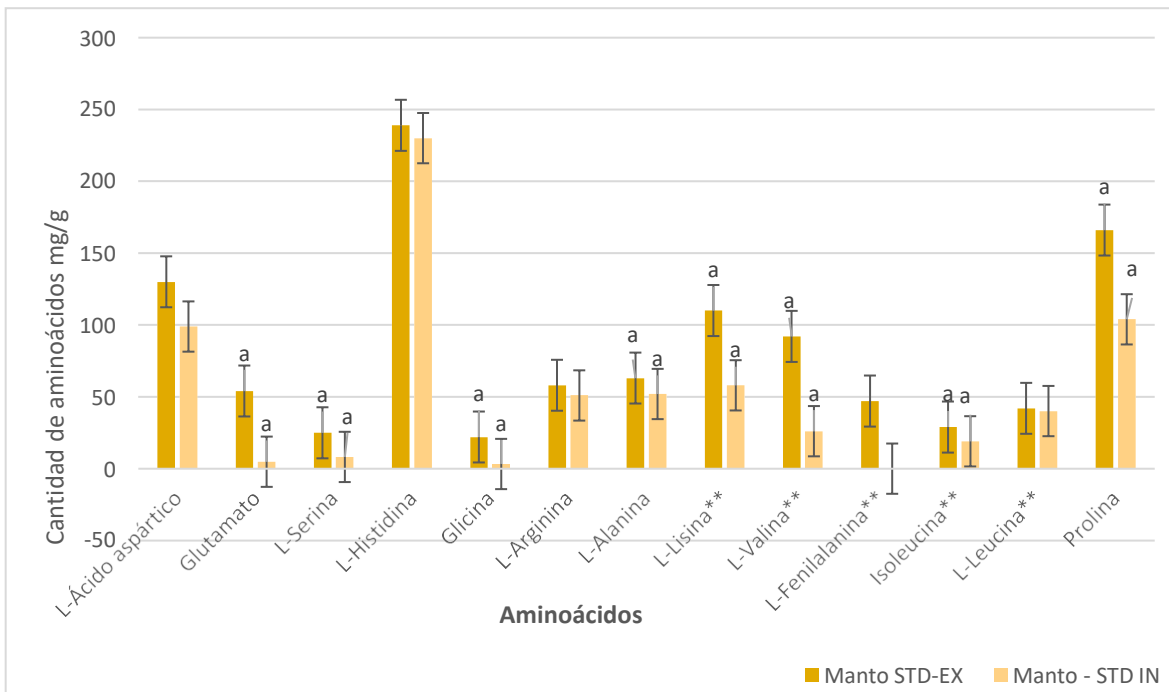
Aminoácido	Estándar externo (mg/g)		Estándar interno (mg/g)	
	Manto	Músculo	Manto	Músculo
<b>L-Ácido aspártico</b>	130 ± 19	147 ± 6 $\gamma$	99 ± 8	106 ± 8 $\gamma$
<b>Glutamato</b>	54 ± 6 $\alpha, \beta$	69 ± 2 $\alpha, \gamma$	4,8 ± 0,3 $\alpha, \beta$	7,3 ± 0,1 $\alpha, \gamma$
<b>L-Serina</b>	25 ± 5 $\beta$	23 ± 4 $\gamma$	8,2 ± 0,4 $\alpha, \beta$	5,3 ± 0,3 $\alpha, \gamma$
<b>L-Histidina</b>	239 ± 21	185 ± 26 $\gamma$	230 ± 8 $\alpha$	125 ± 7 $\alpha, \gamma$
<b>Glicina</b>	22 ± 5 $\beta$	23 ± 4 $\gamma$	3,3 ± 0,8 $\beta$	2,3 ± 0,3 $\gamma$
<b>L-Arginina</b>	58 ± 4	59 ± 4 $\gamma$	51 ± 2 $\alpha$	39 ± 4 $\alpha, \gamma$
<b>L-Alanina</b>	63 ± 5 $\beta$	64 ± 4 $\gamma$	52 ± 3 $\beta$	50 ± 1 $\gamma$
<b>L-Lisina*</b>	110 ± 8 $\beta$	129 ± 23 $\gamma$	58 ± 2 $\beta$	83 ± 9 $\gamma$
<b>L-Valina*</b>	92 ± 2 $\alpha, \beta$	35 ± 6 $\alpha, \gamma$	26 ± 1 $\beta$	22 ± 2 $\gamma$
<b>L-Fenilalanina*</b>	47 ± 3 $\alpha$	55 ± 2 $\alpha$	NC	NC
<b>Isoleucina*</b>	29 ± 1 $\alpha, \beta$	33,1 ± 0,2 $\alpha, \gamma$	19 ± 1 $\beta$	21 ± 1 $\gamma$
<b>L-Leucina*</b>	42 ± 1	51 ± 7	40 ± 6	46 ± 6
<b>Prolina</b>	166 ± 19 $\alpha, \beta$	94 ± 8 $\alpha, \gamma$	104 ± 11 $\beta$	116 ± 9 $\gamma$



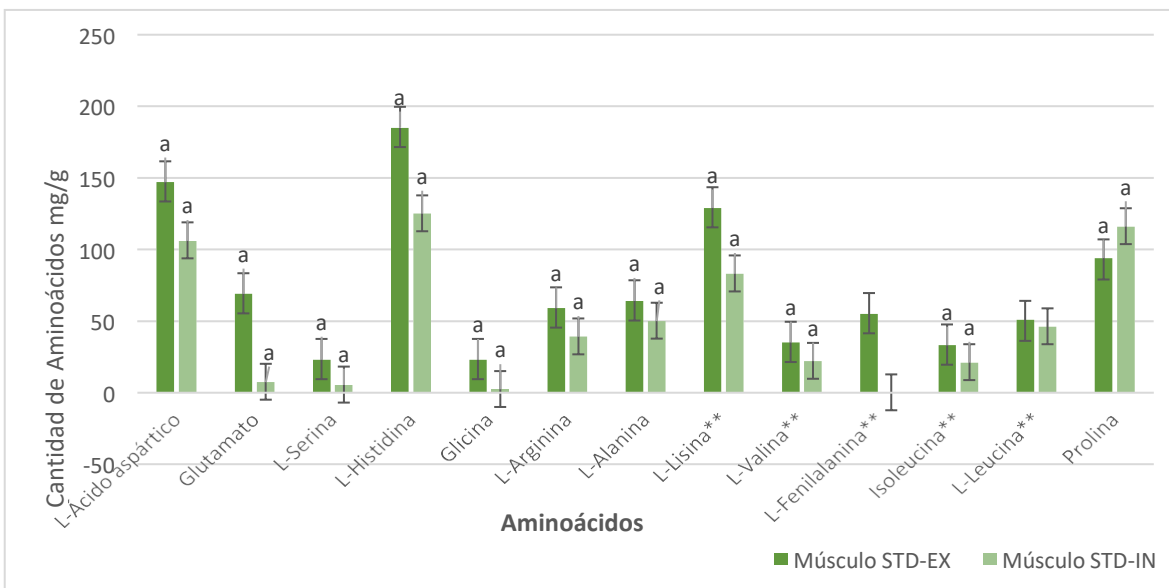
**Figura N°9: Comparación del contenido de aminoácidos entre manto y músculo a través del método de cuantificación con estándar externo de la especie *A. chilensis*.** (\*\*) corresponde a aminoácidos esenciales; (a) corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ .



**Figura N°10: Comparación del contenido de aminoácidos entre manto y músculo a través del método de cuantificación con estándar interno de la especie *A. chilensis*.** (\*\*) corresponde a aminoácidos esenciales; (a) corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,05$ .



**Figura N°11: Comparación del contenido de aminoácidos entre manto a través del método de cuantificación con estándar externo y estándar interno, de la especie *A. chilensis*. (\*\*)** corresponde a aminoácidos esenciales; (a) corresponde a valores estadísticamente significativos con un  $p < 0,05$ .



**Figura N°12: Comparación del contenido de aminoácidos entre músculo a través del método de cuantificación con estándar externo y estándar interno, de la especie *A. chilensis*. (\*\*)** corresponde a aminoácidos esenciales; (a) corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ .

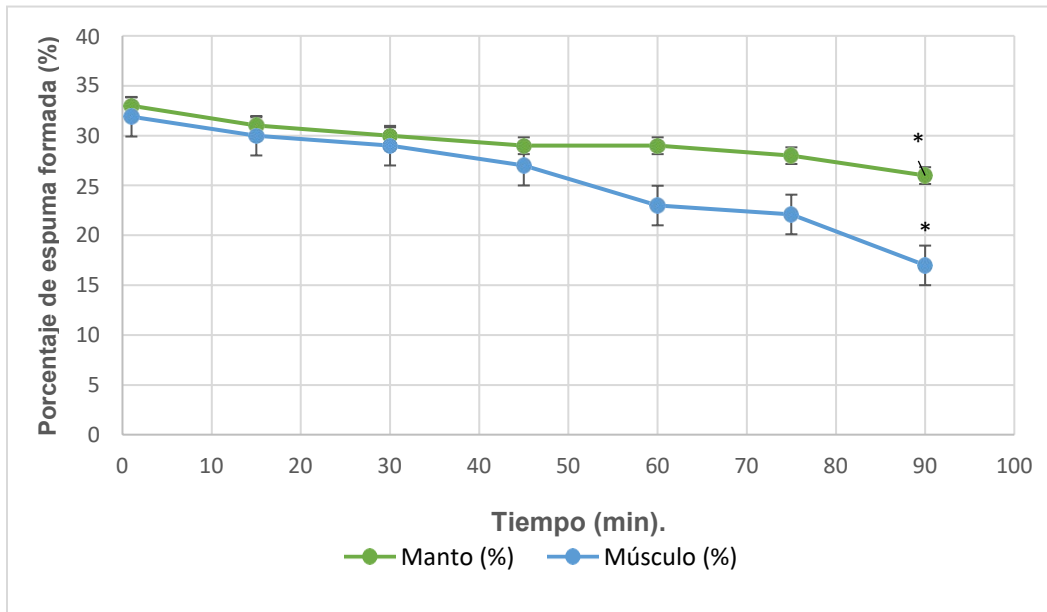
En relación a las propiedades funcionales de manto y músculo, los resultados expresados en la tabla N°8 corresponden a la absorción de agua y aceite en manto y músculo de la especie *A. chilensis*. Cabe destacar que 1 gramo de manto absorbió alrededor de 4 veces su peso inicial de agua (3,9 gramos por cada gramo de manto), de igual forma ocurrió para el músculo, pero para este último caso fue casi 5 veces más su peso inicial (5,5 gramos por cada gramo de músculo). Para el caso de absorción de aceite, el manto absorbió más de tres veces de su peso inicial (3,2 gramos de aceite por gramo de manto), y el músculo alrededor de 5 veces su peso inicial (4,9 gramos de aceite por gramo de músculo).

**Tabla N°8: Capacidad de absorción de agua y aceite de manto y músculo de la especie *A. chilensis*.** los resultados corresponde a n=3 en unidades gramos de agua/aceite absorbido en 1 gramo de muestra. Las cuadrículas con asterisco (\*),  $\alpha$  y  $\beta$  corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ .

Muestras	Agua absorbida/gramo (mL/g)	Aceite absorbido/gramo (mL/g)
Manto	3,9 ± 0,02* $\alpha$	3,2 ± 0,07* $\alpha$
Músculo	5,5 ± 0,1* $\beta$	4,9 ± 0,1* $\beta$

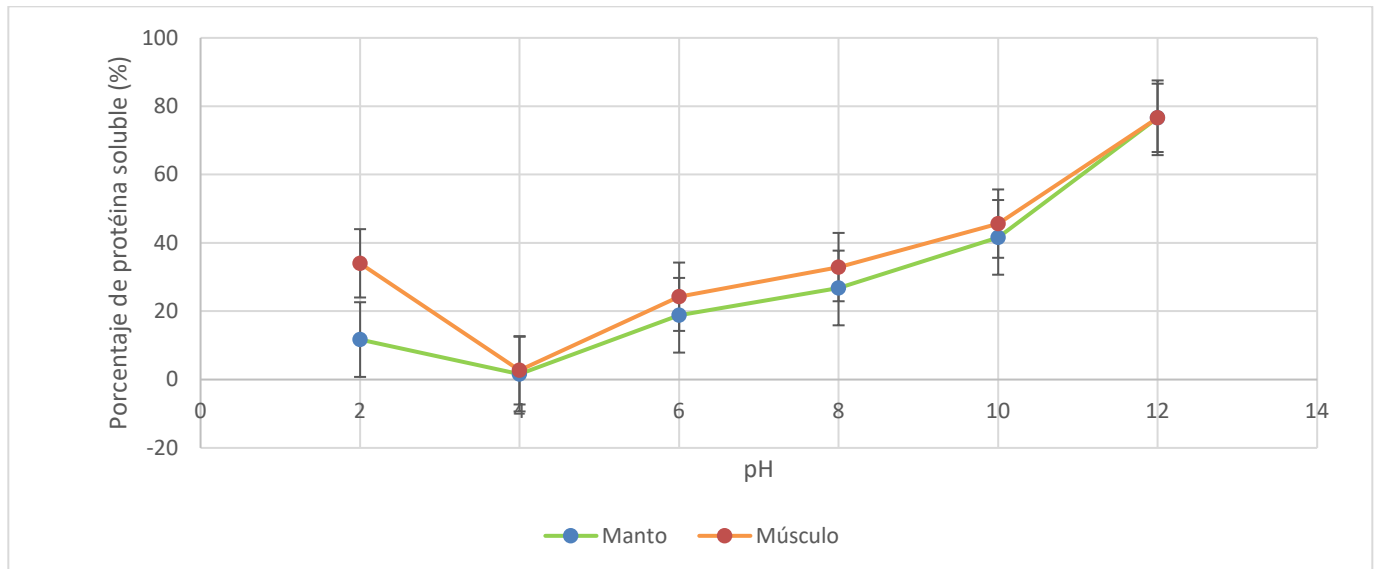
Para el caso de capacidad emulsificante se observó que 1 gramo de manto emulsificó alrededor de 75% del volumen total de aceite añadido (45 mL de aceite de maravilla, siendo volumen total 60 mL de ambas fases acuosa/oleosa) y en caso de músculo, 1 gramo emulsificó alrededor de 80% del volumen total de aceite añadido (40 mL de aceite de maravilla, siendo volumen total 50 mL de ambas fases acuosa/oleosa). Además, cabe destacar que la emulsión final de manto y músculo desarrollaron una textura de gel y se mantuvieron estables por una semana, tiempo de duración del ensayo.

La capacidad de formación de espumas de manto y músculo se exhibe en la figura N°13, destacando que manto posee una mayor capacidad de formación de espuma en comparación con el músculo pero que no es significativa a un  $p < 0,05$ . La estabilidad de la espuma formada por el manto es más estable en el tiempo en comparación a la del músculo, siendo estadísticamente significativa esta diferente estabilidad diferencia ( $p < 0,05$ ) a los 90 minutos.



**Figura N°13: Porcentaje de espuma de manto y músculo de la especie *A. chilensis* en el tiempo (minutos).** Los resultados están expresados en  $\bar{x} \pm DS$  con un  $n=3$  en unidades de porcentaje. (\*) corresponde a valores con diferencias estadísticamente significativas a un  $p < 0,05$ .

La solubilidad de proteínas de manto y músculo en función del pH, se muestra en las figuras N°14 y15. Estas figuras muestran los porcentajes de proteína soluble de la proteína presente en manto y músculo de la especie de *A. chilensis*, a diferentes pH (pH 2 a pH 12), con  $n=2$ . Cabe destacar que, tanto en manto como en músculo, las proteínas provenientes del liofilizado se hacen insoluble a pH 4 alcanzando sólo un 2% de solubilidad aproximadamente, y en el rango de pH 6 a 12, se observa un incremento en la solubilidad de la proteína proveniente del liofilizado, alcanzando la solubilidad máxima de la proteína a pH 12, con un 80% de solubilidad para manto y músculo.



**Figura N°14: Porcentaje de proteína soluble en manto y músculo de la especie *A. chilensis*, versus pH por método de Biuret (n=2).**

## DISCUSIÓN

El análisis proximal de alimentos es un conjunto de ensayos que juega un papel muy importante para evaluar la composición química y características nutricionales de los alimentos y de sus componentes.

Los alimentos de origen marino son una buena alternativa para disponer de una dieta saludable, por su riqueza en proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. Especies como el *Athyonidium chilensis* de la clase *Holothuroidea* o pepino de mar, son de gran importancia económica, debido al gran consumo de este producto, considerado de elite en países asiáticos, cuya composición proximal puede verse afectada por la alimentación, los ciclos de vida de la especie, el hábitat y las características ambientales en las que se encuentra la especie.

Para la cuantificación de proteínas, existen diversas metodologías analíticas diferenciándose entre sí en la exactitud, precisión y sensibilidad del método con que se obtiene el resultado. Uno de los más clásicos corresponde al método de Kjeldahl, que se caracteriza por la destrucción oxidativa de la materia orgánica y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco, donde el amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado *in situ* o por destilación alcalina y titulación (Wang *et al.*, 2016; Dupont *et al.*, 2018).

Un estudio realizado por Breese (1941) recalca que, para el método de Kjeldahl, el multiplicar el valor por el factor proteico de conversión (6,25), el que se basa el valor porcentual de nitrógeno en una proteína es de 16%, puede tomar en cuenta componentes no proteicos, tales como algún polisacárido nitrogenado, u otro componente que contenga nitrógeno, siendo mucho más útil otros métodos con mayor sensibilidad como son los espectrofotométricos.

En las metodologías basadas en la cuantificación de las proteínas por espectrofotometría, donde una de ellas es el método de Biuret, caracterizado por la aparición de una coloración púrpura cuando los iones cúpricos son acomplejados por los enlaces peptídicos a pH alcalino, se ha determinado que el matiz e intensidad de la coloración se ve afectada por el tipo y contenido de proteínas presente en la muestra analizada, (Zheng *et al.*, 2017). Por otro lado, en el método de Lowry, que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, reactivo que se une a la proteína y se reduce a un complejo azul de molibdeno

por la oxidación de los aminoácidos tirosina, triptófano, cisteína, e histidina, el color generado varía de acuerdo al tipo de proteína presente (Pomory, 2008).

El nitrógeno total determinado por método de Kjeldahl para manto y músculo de la especie chilena mostró valores cercanos al 12%, que equivale a un 70% de proteína cruda utilizando el factor de conversión de 6,25, y a un 50% de proteínas cuando estas fueron aisladas por precipitación con sulfato de aluminio y potasio, y separadas de moléculas nitrogenadas de carácter no proteico.

En relación a los valores de proteínas obtenidos por el método de agente precipitante, se correlaciona con los resultados obtenidos aplicando el método de Lowry. Para este último método, se debe tener en consideración ciertas ventajas, como su alta sensibilidad y la simplicidad del método, sin embargo, el color de la reacción generado varía de acuerdo al tipo de proteína y la intensidad de este no es estrictamente proporcional a la concentración de la proteína. Para este método las principales interferencias se deben a la presencia de los iones de potasio, magnesio y calcio, EDTA y polisacáridos (Xie *et al.*, 1994; Ras *et al.*, 2008; Redmile-Gordon, *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017).

Para este estudio, tal como lo muestran los resultados de nitrógeno proteico en manto y músculo, obtenidos por el método de Kjeldahl por precipitación, se observan diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,05$ , comportamiento que se repite en los valores resultantes por el método de Lowry.

El contenido de proteína cruda en manto y músculo de los individuos de la especie *A. chilensis*, se encuentra dentro de los rangos reportados para otras especies, tal como se muestra en el anexo N°8. Cabe destacar que al comparar la especie chilena con las especies *Stichopus japonicas* (Takinawa, 1955), *Actinopyga mauritiana* (Haider *et al.*, 2015), *Paracaudina australis* (Widianingsih *et al.*, 2016), *Holothuria arenicola* (Barzkar *et al.*, 2016), *Holothuria tubulosa* (Öztürk *et al.*, 2018), *Actinopyga mauritiana*, *Bohadschia argus* (Wen *et al.*, 2010), *Parastichopus californicus* (Bechtel *et al.*, 2012), el contenido de proteínas se encuentra en valores inferiores o relativamente más bajos; sin embargo al comparar con las especies *Parastichopus parvimensis* (Chang-Lee *et al.*, 1989), *Parastichopus californicus* (Chang-Lee *et al.*, 1989), *Holothuria arenicola* (Haider *et al.*, 2015), *Stichopus horrens* (Barzkar *et al.*, 2016), *Stichopus herrmanni*, *Thelenota ananas*, *Thelenota anax*, *Holothuria fuscogilva*, *Holothuria fuscopunctata*, *Actinopyga caerulea*, *Holothuria polii*, (Wen *et al.*, 2010), *Holothuria tubulosa*, *Holothuria Mammata* (Aydin *et al.*,

2011) presenta valores similares. Por el contrario, las especies *Isostichopus sp.* (Vergara *et al.*, 2016), *Holothuria scabra* (Sroyraya *et al.*, 2017) se encuentra valores inferiores de proteínas en comparación con la especie chilena.

La importancia de la ingesta de proteínas no solo radica en la cantidad que se consume, sino también en la calidad de ella, la cual está relacionada con la composición aminoacídica, específicamente con el contenido de aminoácidos esenciales y que este sea comparable con los estándares utilizados por la FAO/OMS/UNU (Fennema, 1996).

Considerando lo anterior, en esta investigación, se realizó un estudio exploratorio de la composición de aminoácidos de manto y músculo de la especie *A. chilensis*. Tomando estos resultados y realizando una comparación con otras proteínas de consumo humano, tal como se muestra en el anexo N°9, se puede visualizar en músculo y manto un contenido de 6 y 7 veces más de histidina y 1,3 y 1,6 veces más de lisina, respectivamente; valina se presenta con 1,5 veces más contenido para el caso del manto.

Tanto manto como músculo cubre las recomendaciones de FAO/OMS/ONU para los aminoácidos esenciales identificados y cuantificados en este estudio. En el caso de los aminoácidos esenciales faltantes, como metionina, treonina y triptófano, estos no se detectaron debido a la metodología utilizada, la cual se discutirá más adelante.

En el aspecto técnico, Song *et al.* (2018) resume las diferentes metodologías sobre detección y cuantificación de aminoácidos provenientes de muestras biológicas de acuerdo al sistema de detección empleado. Para este estudio se utilizó la detección por fluorescencia (FL), que como ventaja posee alta sensibilidad, del orden de 20 a 30 veces más frente al detector por ultravioleta (UV); desde el punto de vista de equipamiento, no requiere líneas de gas portador a altas presiones y su mantenimiento es sencillo en comparación a otros sistemas como es el GC/MS y HPLC/MS; como desventaja, para muchos compuestos no fluorescentes se hace necesario una etapa de derivatización que permita la conversión a un producto fluorescente, siendo un obstáculo en la claridad de la lectura en el cromatograma, ya que el agente derivatizante podría sobreponerse frente al compuesto de estudio (García *et al.*, 2012).

Para la cuantificación existen diferentes metodologías, como es la de estándar externo, estándar interno y adición estándar, siendo de elección en nuestro caso los dos primeros,

utilizando como sustancia de referencia los estándares de aminoácidos y Norvalina como estándar interno. La selección de la metodología de cuantificación más adecuada depende principalmente de la muestra, del nivel de precisión, exactitud requerido y de la existencia o no de sustancia de referencia (Quattrocchi, 1992). En relación a los parámetros cromatográficos e instrumentales se siguió lo descrito por Wu *et al.* (2016), como también para la cuantificación por estándar externo y estándar interno descrita por Nielsen (2003), Skoog *et al.*, (1994) y Valcárcel *et al.*, (1994).

En el Anexo N°5 se muestra los diferentes tiempos de retención para cada uno aminoácidos identificados en manto y músculo. En los cromatogramas se puede observar que el tiempo de retención de los aminoácidos es similar en manto y músculo, difiriendo solo en el área bajo la curva de cada pico cromatográfico debido a las diferentes concentraciones que posee cada una de las muestras referente a los aminoácidos, tal como se muestra en las figuras N° 3 y N°4.

Para la cuantificación total de aminoácidos por ambas metodologías, se muestra que existen diferencias estadísticamente significativas con un  $p < 0,05$  en la cantidad de aminoácidos presente tanto para manto y músculo de la especie chilena (anexo N°8 y N°9), observándose que para manto existe un 13% y 44% más cantidad de histidina y valina, respectivamente en comparación con el músculo; sin embargo para los aminoácidos serina (25 mg/g – 23 mg/g), arginina (58 mg/g – 59 mg/g), alanina (63 mg/g – 64 mg/g),leucina (42 mg/g – 51 mg/g), isoleucina (29 mg/g – 31 mg/g), glicina (22 mg/g – 23 mg/g) y fenilalanina (47 mg/g – 55 mg/g) se encuentra en valores similares entre manto y músculo respectivamente. El músculo posee un 15% más de ácido aspártico y lisina y 20% más de ácido glutámico en comparación al manto de la especie chilena.

En las figuras N°11 y N°12, se comparan las metodologías de cuantificación (estándar externo vs estándar interno) y se observa que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores obtenidos a través de ellas, obteniéndose valores inferiores entre el 70% a 140% de diferencias en relación para la cuantificación de estándar externo y estándar interno. Esto se debe principalmente a que el método de estándar interno no es sensible a los errores de inyección, derivatización, dilución, extracción y manipulación de la muestra en general, ya que se compensan al utilizar relaciones de áreas. Además, el uso del estándar interno beneficia a la precisión del

resultado, debido que la manipulación de la muestra consiste en muchos pasos, especialmente cuando la toma de volumen posee una variación constante; sin embargo Norvalina cumple con los requisitos, como por ejemplo, no estar presente en la muestra, posee un área similar al del analito, es estable y químicamente inerte, y responde en forma semejante al analito con el detector seleccionado, pero para esta investigación Norvalina no cumple con la óptima resolución ( $R > 1,5$ ; identificándose totalmente en el cromatograma) (Quattrocchi, 1992).

Por otro lado, las curvas de calibrado de estándares de aminoácidos sin estándar interno disueltos en buffer, resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones correspondiente a cuatro puntos de cada aminoácido, exhibido en el anexo N°6. La linealidad se ve comprobada puesto que los valores de coeficientes de correlación obtenidos ( $r$ ) en la tabla N°12 correspondiente a estándares de aminoácidos sin patrón interno, es superior al criterio de aceptación, donde este debe ser mayor a 0,995 (ICH, 2005), cabe destacar que un  $r$  cercano a 1 significa que existe una correlación con la probabilidad elevada entre la variable X (concentración) y la variable Y (señal cromatográfica), indicando así una recta lineal (Herrera, 2019). Para el caso de la curva de calibrado de los estándares de aminoácidos con estándar interno (Norvalina), se obtuvo valores de coeficiente de correlación ( $r$ ) exhibidos en anexo N°11, cabe destacar que en este caso no presenta linealidad a las concentraciones mostradas en el anexo N°6, debido que para algunos casos como, ácido glutámico, serina, isoleucina, leucina y prolina el coeficiente de relación ( $r$ ) que se presenta no es mayor a 0,995 (ICH 2005; Herrera 2019) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) corresponde a valores inferiores a 0,99, siendo que ambos valores se encuentran fuera del criterio de aceptación (Herrera, 2019). Asimismo, según los requisitos nombrados anteriormente, el estándar interno (Norvalina) debe identificarse y tener una óptima resolución en el cromatograma, en este estudio se solapó con fenilalanina como se muestra en la figura N°6, por lo que la metodología de cuantificación pierde utilidad en este caso.

Por último, en este estudio sólo se identificaron y cuantificaron trece aminoácidos de los 17 identificados mostrados en la figura N°2, sin embargo, según el anexo N°10 y N°12, se han reportado los aminoácidos treonina, tirosina, metionina, cisteína y triptófano que no fueron detectados en la especie chilena no se detectaron (Xu Duan *et al.*, 2010; Haider *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015; Sroyraya *et al.*, 2017; Öztürk *et al.*, 2018).

Lo anterior, puede deberse que existe una destrucción parcial o completa de los aminoácidos al ser sometida la muestra a hidrólisis con ácido clorhídrico, como por ejemplo triptófano, es el aminoácido esencial más inestable durante la hidrólisis ácida, donde el anillo pirrólico es protonado fácilmente por el ácido clorhídrico, o también la unidad del anillo pirrólico puede ser atacado por los radicales libres que estén formados por residuos de oxígeno debido a las altas temperaturas de hidrólisis. Además, los radicales de hidroxilo formados en la hidrólisis, atacan el anillo fenilo del triptófano con la formación de hidrox-triptófano y los radicales de oxígeno atacan el anillo pirrol, que conduce a su apertura y la formación de N-formilquinurenina y otros productos resultantes de la degradación del aminoácido, requiriendo para futuros estudios otras condiciones de hidrólisis (USP, 2010; Lamp *et al.*, 2017).

Para el caso de los, aminoácidos azufrados, metionina y cisteína, estos también son degradados durante la hidrólisis ácida debido a la reacción del azufre con el oxígeno residual, por la formación de metionina sulfóxido y metionina sulfona, y en el caso de cisteína por la formación de ácido sulfínico, ácido sulfénico y ácido sulfónico. Además, ambos aminoácidos azufrados y sus productos de oxidación pueden reaccionar con los residuos de tirosina y triptófano; cisteína y triptófano, formando productos de degradación (Lamp., *et al.*, 2017).

Para el caso de tirosina, al contener un anillo fenilo, este puede halogenarse fácilmente durante la hidrólisis con algún ión cloruro libre o bromuro para formar, cloruro o bromuro de tirosina. Además, al someter a tirosina a altas temperaturas en presencia de ácido clorhídrico e hierro, estos pueden reaccionar con metionina y formar bis-metileno de tirosina. Asimismo, altas concentraciones de sulfato inorgánico en la muestras o liberadas por la hidrólisis ácida pueden formar con tirosina ésteres de sulfato, siendo no identificable en los análisis cromatográficos (Lamp *et al.*, 2017).

En relación a treonina y serina, estos en presencia de hidrólisis ácida, se convierten a  $\alpha$ -ceto ácidos, por la eliminación  $\beta$  de agua y su posible reacción con otros aminoácidos

(Lamp *et al.*, 2017). Por último, se debe considerar que los puntos de unión de las proteínas a las cadenas de oligosacáridos son a través de los aminoácidos serina, treonina y asparagina, que son destruidos por la hidrólisis ácida.

Este estudio reflejó que existe entre un 9 al 10% de cenizas totales, siendo el 0,09 al 0,1% de cenizas insolubles entre manto y músculo en base seca de la especie chilena, siendo esta inferior en comparación con la especie *A. arenicola* que presenta 45% de cenizas en base seca y 30% para la especie *A. mauritana* (Haider *et al.*, 2015); sin embargo, se debe tener presente que los valores de cenizas es un reflejo los contenidos de minerales.

El estudio realizado por Kang *et al.* (2018) resumida en el anexo N°13, el cual comparó cinco tipos de la especie japonesa, *Apostichopus japonicus* (Wehai, Dalian, Yinhkou, Huludao y Jinzhou) y su contenido de minerales, muestra diferencias en los valores con la especie chilena recolectada en la costa de El Tabo, esta última contiene menor cantidad de aluminio, hierro, níquel, plomo y manganeso, mientras que los elementos que se encuentran en mayor cantidad fueron cadmio, cromo, cobre, zinc, potasio y sodio.

Del mismo modo, una revisión realizada por Pangestuti *et al.* (2018), compara el contenido de metales pesados (manganeso, cobre, zinc, cromo, plomo y cadmio) de 5 especies de pepinos de mar, correspondientes a diferentes estudios, mostrados en el anexo N°13 (Wen *et al.*, 2010; Hashmi *et al.*, 2014; Haider *et al.*, 2015). La comparación de estos datos con la especie sujeto de este estudio muestra que las especies descritas por Pangestuti *et al.* contiene mayor cantidad de manganeso y cobre para las especies *S. hermanni*, *H. fuscogilva* y *A. mauritana*, y una mayor cantidad de cromo, plomo y cadmio para las especies *S. hermanni*, *H. fuscogilva* y *H. leucospilota*, *T. ananas*, *T. anax* en comparación con la especie chilena.

Hasta el momento, no existen acuerdos internacionales ni normas locales que establezcan límites de metales pesados específicamente para Echinodermata. Sin embargo, considerando que el límite máximo de plomo (Pb) en otros productos marinos (pescados, moluscos, mariscos y crustáceos) corresponde a 0,3 mg/kg según el Reglamento del Parlamento Europeo (Diario Oficial, 2006) y para Chile corresponde a 2,0 mg/kg según el Reglamento Sanitario de Alimentos (RSA, 1997). La especie *A. chilensis* evaluada en este estudio presenta valores no detectables para Plomo. (RSA, 1997; Diario Oficial, 2006; Pangestuti *et al.*, 2018).

Las propiedades funcionales de las proteínas y sus hidrolizados, juegan un papel importante como agentes aglutinantes, emulsionantes o suplementos nutricionales. Actualmente, la industria alimentaria exige un amplio rango de pH para la solubilidad de los hidrolizados proteicos como una propiedad fisicoquímica funcional para procesos de emulsificación y espumación.

En relación a pepino de mar de la especie *A. chilensis*, el polvo liofilizado de manto y músculo de este, presentan una solubilidad que aumenta considerablemente desde pH 6 a pH 12, siendo similar al pescado como la tilapia reportado por Foh *et al.* (2011), atribuyéndose esta variación a las cargas netas de los péptidos que aumenta a medida que el pH se aleja de los puntos isoeléctricos y de la hidrofobicidad de la superficie, que promueve la agregación mediante interacciones hidrófobas. Además, al poseer una mayor solubilidad a pH alcalino es posible la extracción de las proteínas desde la matriz y recuperarlas por precipitación isoeléctrica al pH de mínima solubilidad (pH 4,0) (Fennema, 1996).

En relación con las propiedades emulsionantes, éstas se encuentran directamente relacionadas con las propiedades de superficie, vale decir, en la medida que el compuesto reduce efectivamente la tensión superficial entre los componentes hidrófobos e hidrofílicos en los productos. La estabilidad de en el tiempo de la emulsión en *A. chilensis* fue alrededor de una semana, explicándose los factores que contribuyen a estas propiedades como la solubilidad, el tamaño molecular y el tipo de proteína que corresponde.

En relación a la capacidad de retención de agua del polvo liofilizado de la especie *A. chilensis* demostró tener una retención de 3,9 g/g y 5,5 g/g para manto y músculo, respectivamente. De acuerdo a Halim *et al.*, (2016) y Taheri *et al.* (2013), esto se debe principalmente a la presencia de ácidos glutámico y aspártico con cadenas laterales polares, permitiendo una gran capacidad de retención de agua. Esto además se corrobora con la gran cantidad de ácido aspártico y glutámico que posee *A. chilensis* que se muestra en la identificación aminoacídica, sin embargo, se debe tener en cuenta los polisacáridos presentes en pepino de mar, donde estos podrían favorecer esta propiedad funcional (Song *et al.*, 2018).

Por otro lado, en relación a la capacidad de absorción de aceite o grasas, *A. chilensis* demostró tener una retención de 3 a 4,4 gramos de aceite para el polvo liofilizado de manto y músculo, respectivamente. Esto se debe principalmente a que existe una mayor

densidad aparente en las proteínas equivalente a una mayor absorción de grasa, además la combinación adecuada de sustancias lipídicas y fragmentos lipofílicos de las proteínas puede crear interfaces entre estos logrando obtener funciones tecnológicas deseadas, siendo además que la capacidad de los péptidos para unirse a la grasa influye en las propiedades organolépticas del alimento, específicamente en el sabor (Lamp *et al.*, 2017).

Por último, el manto y músculo liofilizados y en polvo de *A. chilensis* mostraron capacidad de formación de espuma, estable en el tiempo. Esto puede deberse a la presencia de moléculas en dispersión que disminuyen la tensión en la interfaz del aire, creando espuma. Esta propiedad funcional puede verse influenciada por el pH, por el tamaño molecular de los péptidos, siendo que los péptidos de bajo peso molecular son incapaces de mantener una orientación de la molécula con una interfaz ordenada, siendo que las propiedades espumantes disminuyen con la disminución del tamaño del péptido (Betty *et al.*, 2014; Chi *et al.*, 2014; Halim *et al.*, 2016).

En los futuros trabajos de investigación, se recomienda realizar una caracterización de los polisacáridos presentes en manto de *A. chilensis*, conocimiento que podría contribuir a su caracterización como alimento funcional, su uso como ingrediente alimentario y aplicaciones farmacéuticas.

## CONCLUSIONES

- Se concluye que manto y músculo de *A. chilensis* liofilizado, poseen un alto contenido de sus macroelementos como son las proteínas, siendo comparable con alimentos reconocidos por su calidad proteica, otorgando un gran valor nutricional como alimento, y un bajo contenido de metales pesados como, níquel, plomo, cadmio y cromo, esto último en relación a la legislación local e internacional.
- La metodología analítica HPLC implementada en este estudio permitió una aproximación en la identificación y cuantificación de los aminoácidos presentes en la especie chilena. Sin embargo, se hace necesario determinar los aminoácidos esenciales faltantes (metionina, treonina y triptófano), para definir que *A. chilensis* posee una proteína de alta calidad para el consumo humano, y validar el método cromatográfico implementado y corroborar los datos obtenidos en este estudio.
- En manto y músculo liofilizados de *A. chilensis* poseen propiedades funcionales propias de las proteínas alimentarias como son la capacidad de absorber agua y grasas, así como la capacidad emulsificante y de formación de espumas, además siendo soluble en un rango de pH 6 a 12, comportamiento característico de las proteínas alimentarias y que permite su aislación del resto de los componentes de la matriz.

## REFERENCIAS

Aguilar A., Ramírez G. (2002). Economic reasons, ecological actions and social consequences in the mexican sea cucumber fishery. *Spc Beche-De-Mer Information Bulletin*, 17:33–26.

Alberti C. 2005. Características químicas y organolépticas de especies de *Porphyra* (*Rhodophyta. Bangiales*) sometidas a tratamiento térmico. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso.

Aydin, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y., & Köse, S. (2011). Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International J. of Food Sci. and Tech.*, 46(3), 500–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x>

Bahrami, Y., Franco, C. M. (2016). Acetylated Triterpene Glycosides and Their Biological Activity from Holothuroidea Reported in the Past Six Decades. *Marine Drugs*, 4:14(8), doi:10.3390/md14080147

Barnes, R. & Amp, Ruppert, E. (1996). Zoología de los Invertebrados. lugar de publicación. Mcgraw-Hill Interamericana, México. 6ta Edición. 1114 pp.

Barzkar, N., Attaran Fariman, G., & Taheri, A. (2017). Proximate composition and mineral contents in the body wall of two species of sea cucumber from Oman Sea. *Env. Sci. and Poll. Research*, 24(23), 187–192. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9379-5>

Bechtel, P. J., Oliveira, A. C. M., Demir, N., & Smiley, S. (2012). Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus californicus*, commercially harvested in Alaska. *Food Sci. & Nut.*, 1(1), 63–73. <https://doi.org/10.1002/fsn3.12>

Betty, M., Awuor, O. L., Kirwa, M. E., & Jackim, M. F. (2014). Antioxidative and functional properties of *Rastrineobola argentea* (Dagaa) fish protein hydrolysate. *Discourse J. of Agric. and Food Sci.* 2(6), 180-189.

Breese, J. D. (1941). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. *United States Departament of Agriculture, Whashington DC.*, N°183.

Castro L.R.S. (1997). Review of recent developments in the Baja California, Mexico, *Isostichopus fuscus*, *Holothuria impatiens* and *Parastichopus parvimensis* Fisheries. *Spc Beche-De-Mer Information Bulletin*, 9: 26–27.

Chang-Lee MV, Price RJ, Lampila LE (1989) Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus* spp.) *J Food Sci* 54:567–568

Cheftell JC, Cuq JL, Lorient D. (1989). Proteínas alimentarias. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España.

Chi, C., Cao, Z., Wang, B., Hu, F., Li, Z., & Zhang, B. (2014). Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19, 11211-11230.

Chile - MINSAL. (1996). Reglamento Sanitario de los Alimentos - Decreto 977/1996, 182. Retrieved from [http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO\\_977\\_96 actualizado a Enero 2015\(1\).pdf](http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/DECRETO_977_96_actualizado_a_Enero_2015(1).pdf)

Choi, M. K., Kang, M. H., & Kim, M. H. (2009). The analysis of copper, selenium, and molybdenum contents in frequently consumed foods and an estimation of their daily intake in Korean adults. *Bio. Trace Elem. Research*, 128(2), 104–117. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8260-2>

Cseh, E. K., Veres, G., Szentirmai, M., Nánási, N., Szatmári, I., Fülöp, F., ... Zádori, D. (2019). HPLC method for the assessment of tryptophan metabolism utilizing separate internal standard for each detector. *Anal. Bioch*, 574, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.005>

Datta, D., Talapatra, S. N., & Swarnakar, S. (2015). Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines- An overview. *ILNS (Vol. 34) 42-61*

Diario oficial del consejo Europeo (2006). Reglamento del parlamento europeo y del consejo sobre la cooperación entre las autoridades nacionales encargadas de la aplicación de la legislación de protección de los consumidores. (CE) N° 2006/2004 *Diario Oficial de La Unión Europea, L364/1(95), 364/1-364/11.EC*

Duan, X., Zhang, M., Li, X., & Mujumdar, A. S. (2008). Microwave freeze drying of sea cucumber coated with nanoscale silver. *Dryi. Tech.*, 26(4), 413–419. <https://doi.org/10.1080/07373930801929136>

Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). Guía técnica n°1. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Lugar de publicación. Editorial

Dupont, D., Grappin, R., Pochet, S., & Lefier, D. (2018). *Milk Proteins: Analytical Methods. Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00428-3>

*Farmacopea Chilena (2015)*. (4ta Edición). Chile: Editorial Hunneus. pp 66-67 y 177-181.

Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry - Third Edition*. Marcel Dekker, Inc. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(88\)90055-6](https://doi.org/10.1016/0260-8774(88)90055-6) 471-505 pp.

Foh, M. B. K., Kamara, M. T., Amadou, I., Foh, B. M., & Wenshui, X. (2011). Chemical and physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysate and concentrate. *Internat. J. of Biol. and Chem.*, 1-15.

Gao, Y., Li, Z., Qi, Y., Guo, Z., Lin, Y., Li, W., Zhao, Q. (2016). Proximate composition and nutritional quality of deep sea growth sea cucumbers (*Stichopus japonicus*) from different origins. *J. of the Sci. of Food and Agri.*, 96(7), 2378–2383. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7353>

García, S., & Pérez, R. M. (2012). *Aplicaciones de la Cromatografía Líquida con Detector de Diodos y Fluorescencia al Análisis de Contaminantes Medioambientales*. CIEMAT, Ed. 1247th ed.

Gomes, A. R., Freitas, A. C., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2014). Bioactive compounds derived from echinoderms. *RSC Advances*, 4(56):29365-29382.

Gornall, A.G.; Bardawill, Ch. J. y David, M.M (1949). Determination Of serum proteins by means of the biuret reaction. *The J. of Biol. Chem.* 177, 751-766.

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*, N.21.

Haard N.F, Simpson B.K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. *J. Fish Process: Biotechnological Applications*. A.M. Martin, Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5303-8\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5303-8_6) 132-154

Haider, M. S., Sultana, R., Jamil, K., Tarar, O. M., Shirin, K., & Afzal, W. (2015). A study on proximate composition , amino acid profile , fatty acid profile and some mineral contents in two species of sea cucumber. *The J. of Ani. and Plant Sci.*, 25(1), 168–175. doi

Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Trends in Food Science & Technology Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides : A comprehensive review. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 51, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>

Hanczkó, R. & Molnár-Perl, I. (2003). Derivatization, stability and chromatographic behavior of o-phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: o-Phthaldialdehyde/ 2-mercaptoethanol reagent. *J. Chromatogra.* 57(Suppl 1): S103. <https://doi.org/10.1007/BF02492091>

Hashmi MI, Thilakar R, bin Syed Hussein MA, Hoque Z. Determination of seven heavy metals in eight species of Sea Cucumbers. *Sci Int.* 2014;26(1).

Herrera MJ. 2019. Validación de un método analítico para la determinación de clozapina y norclozapina en muestras de plasma sanguíneo por HPLC/DAD. Tesis para optar al título de Químico Farmceútico. Universidad de Valparaíso.

Huda, Nurul & Abdullah, Aminah & Babji, Abdul. (2001). Functional properties of surimi powder from three Malaysian marine fish. *Internat. J. of Food Sci. & Tech.*, 36. 401 - 406. 10.1046/j.1365-2621.2001.00473.x.

ICH. (2005). *Validation of analytical procedures: text and methodology q2 (r1)*. International conference on harmonization of technical requirements.

Jin, C. L., Yang, L. X., Wu, X. H., Li, Q., Ding, M. P., Fan, Y. Y., Chen, Z. (2005). Effects of carnosine on amygdaloid-kindled seizures in Sprague-Dawley rats. *Neurosci.*, 135(3), 939–947. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.066>

Jin, Y., Huang, Y., Xie, Y., Hu, W., Wang, F., Liu, G., & Zhao, R. (2012). Cyclic interconversion of methionine containing peptide between oxidized and reduced phases monitored by reversed-phase HPLC and ESI-MS/MS. *Talanta*, 89, 531–536. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.070>

Kale V, Freysdottir B, Paulsen B, Friðjonssona O, Hreggviðssona G, Omarsdottir S. (2013). Sulphated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4 (b) Tcells in vitro. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 108–117. 10.1016/j.bcdf.2013.09.009

Kang, X., Zhao, Y., Shang, D., Zhai, Y., Ning, J., & Sheng, X. (2018). Elemental analysis of sea cucumber from five major production sites in China: A chemometric approach. *F. Control*, 94, 361–367. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.019>

Khan, N., Jeong, I. S., Hwang, I. M., Kim, J. S., Choi, S. H., Nho, Kim, K. S. (2013). Method validation for simultaneous determination of chromium, molybdenum and selenium in infant formulas by ICP-OES and ICP-MS. *Food Chem.*, 141(4), 3566–3570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.034>

Knight, M. I., & Chambers, P. J. (2003). Protein Estimation Technique Comparisons. *Molecular Biotechnology*, 23, 20–28. Retrieved from [http://chem.winthrop.edu/faculty/grossoehme/link\\_to\\_webpages/courses/chem525/resources/protein\\_quantitation.pdf](http://chem.winthrop.edu/faculty/grossoehme/link_to_webpages/courses/chem525/resources/protein_quantitation.pdf)

Lamp, A., Kaltschmitt, M., & Lüdtke, O. (2018 a-b). Improved HPLC-method for estimation and correction of amino acid losses during hydrolysis of unknown samples. *Anal. Bioch.*, 543, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.009>

Lawrence, J. M. (1987). *A Functional Biology of Echinoderms*. Johns Hopkins, Baltimore. 340 Pp. University Press.

Lee, M. H., Kim, Y. K., Moon, H. S., Kim, K. D., Kim, G. G., Cho, H. A., ... Han, S. K. (2012). Comparison on proximate composition and nutritional profile of red and black sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) from Ulleungdo(Island) and Dokdo(Island), Korea. *Food Sci. and Biotech.*, 21(5), 1285–1291. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0169-z>

- 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. doi: 10.1016/j.fsi.2012.04.013
- Liu, D., Lu, W., Kelly, A., Zhang, L., Zheng, B., & Miao, S. (2017). Interactions of vegetable proteins with other polymers: Structure-function relationships and applications in the food industry. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 68, 130–144. <https://doi.org/1037//0033-2909.126.1.78>
- Martins, F., Sentanin, M., & Souza, D. De. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chem.*, 272, 732–750. <https://doi.org/1037//0033-2909.126.1.78>
- Matsuhira 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. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.01.052
- Miyamoto, T., & Homma, H. (2018). Detection and quantification of D-amino acid residues in peptides and proteins using acid hydrolysis. *Bioch. et Bioph. Acta - Proteins and Proteomics*, 1866(7), 775–782. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.12.010>
- Navarro, J; García, L;; Sanchez, J. (2012). Aspectos del proceso hidrolítico ácido de proteínas. *Universidad de Murcia*, 122–129. Retrieved from [revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/102701/97671](http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/102701/97671)
- Nielsen, SS (2003). "Food Analysis", ED Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York. pp 437-460.
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chem.*, 270, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.054>
- Official methods of analysis of AOAC International.* (2016)Rockville, MD: AOAC International.
- Öztürk, F.Gündüz, H.(2018).The effect of different drying methods on chemical composition, fatty acid, and amino acid profiles of sea cucumber (*Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791) *J. of Food Proces. and Preserv.*42 (9) - 0145-8892.Doi /10.1111/jfpp.13723
- Pande S, Khan P, Venkitasubramanian T. 1963. Microdetermination of lipid and serum total fatty acids. *Analytical Biochem* 6: 415-423.
- Pangestuti, R., & Arifin, Z. (2018). Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *J.I of Trad. and Compl. Med.*, 8(3), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.06.007>
- Pomory, C. M. (2008). Color development time of the Lowry protein assay. *Anal. Bioch.* 378(2), 216–217. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.04.015>
- Quattrochi O., Abelaira de Andrizzi S., Laba R. (1992). Introducción a hplc aplicación y

práctica. *análisis cuantitativo* (págs. 302-327). Buenos aires: artes gráficas farro S.A.

Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Spérandio, M., & Lefebvre, D. (2008). Protein extraction from activated sludge: An anal. appr.. *Water Research*, 42(8–9), 1867–1878. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.011>

Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., & Goulding, K. W. T. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *S. Bio. and Bioch.*, 67, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.017>

Roura, J. C., Cuervo, I. O. H., Elsa, I. I., Jiménez, A., Zoe, I. I. I., Jiménez, R., & V, E. G. (2008). Validation of a microfluorimetric method for quantitation of L-Histidine in peripheral blood. *J. Cub. Gen. Comm.*, 2(2), 37–45.

Rogers, A., Hamel, J., Baker, S. M., & Mercier, A. (2018). The 2009 – 2016 Belize sea cucumber fishery: Resource use patterns, management strategies and socioeconomic impacts. *Reg. Stud. in Mar. Sci.*, 22, 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2018.05.003>

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. doi:10.1080/11250003.2014.922128

Schrynemackers-Pitance, P., & Schoos-Barbette, S. (1987). Determination of aromatic and neutral aminoacids by HPLC in blood specimens collected on filter paper. *Cli. Chim. Acta*, 166(1), 91–97. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(87\)90200-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(87)90200-2)

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. Boletín N°23:1-10.

Skoog, D. A.;Leary, J.J: "Análisis Instrumental". Ed. McGraw Hill. Interamericana de España, Madrid, 1994, pp 674-703.

Shen, Y. X., Xiao, K., Liang, P., Ma, Y. W., & Huang, X. (2013). Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. *App. Microbiol. and Biotech.*, 97(9), 4167–4178. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4783-3>

Sikorski, Z. (2001). Chemical and Functional Properties of Food Proteins. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9781482279047> pp.113-137

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. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.050>

Sun, H., Liang, M., Yan, J. & Chen, B. (2004). Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. J. Fao Fisheries Tech. Papers Pp. 463 Advances In Sea Cucumber Aquaculture and Management.

Sroyraya, M., Hanna, P. J., Siangcham, T., Tinikul, R., Jattujan, P., Poomtong, T., & Sobhon, P. (2017). Nutritional components of the sea cucumber *Holothuria scabra*. *Funct. Foods in Health and Dis.*, 7(3), 168–181. doi

Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian J. of Fish. Sci.*, 12(1), 154-169.

Tanikawa E (1955) Studies on the protein of the meat of sea cucumber (*Stichopus japonicus*), Hokaido: Memoar of the Facualety of Fisheries of Hokaido University. No3

Tsunoda, M., & Sumida, Y. (2018). *Liquid chromatography | amino Acids. Encycl. of Anal. Sci.* (3rd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00011-x>

USP, C. D. N. (2010). *Farmacopea de los Estados Unidos de América* (33rd ed.). Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Estados Unidos de América. United Book Press, Baltimore, Maryland. 1340-1346 pp

Vergara, W., & Rodríguez, A. (2016). Nutritional Composition of Sea Cucumber (*Isostichopus* sp). *Nat. Res.*, 07(03), 130–137. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73013>

Valcárcel M.; Gómez, A; "Técnicas aniónicas de separación", Ed.Reverté Barcelona, 1994, pp. 655-676.

Vu, D. L., Ranglová, K., Hájek, J., & Hrouzek, P. (2018). Quantification of methionine and selenomethionine in biological samples using multiple reaction monitoring high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (MRM-HPLC-MS/MS). *J. of Chromat. B: Anal. Tech. in the Biom. and Life Sci.*, 1084, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.012>

Wang, H., Pampati, N., McCormick, W. M., & Bhattacharyya, L. (2016). Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. *J. of Pharm. Sci.*, 105(6), 1851–1857. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.039>

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. 10.1016/j.foodchem.2012.02.028

Wen, B., Gao, Q. F., Dong, S. L., Hou, Y. R., Yu, H. B., & Li, W. D. (2016). Effects of different feed ingredients on growth, fatty acid profiles, lipid peroxidation and aminotransferases activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquaculture*, 454, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.12.027>

Wen, J., & Hu, C. (2010). Elemental composition of commercial sea cucumbers (holothurians). *Food Add. and Contam.: Part B Surveillance*, 3(4), 246–252. <https://doi.org/10.1080/19393210.2010.520340>

Wen, J., Hu, C., & Fan, S. (2010). Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 90(14), 2469–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4108>

Widianingsih, Zaenuri, M., Anggoro, S., & Kusumaningrum, H. P. S. (2016). Nutritional Value of Sea Cucumber [Paracaudina Australis (Semper, 1868)]. *Aquatic Procedia*, 7, 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.aqpro.2016.07.038>

Wu, J. L., Yu, S. Y., Wu, S. H., & Bao, A. M. (2016). A sensitive and practical RP-HPLC-FLD for determination of the low neuroactive amino acid levels in body fluids and its application in depression. *Neurosci. Lett.*, 616, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.024>

Xie, Q., & Burnell, G. M. (1994). Interference of Mg<sup>2+</sup> and. *J. of Comp. Bioch. Phys.*, 107(4), 605–608. doi

Xu, C., Zhang, R., & Wen, Z. (2018). Bioactive compounds and biological functions of sea cucumbers as potential functional foods. *J. of Funct. Foods*, 49, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.08.009>

Xu-Duan., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Wang, S. (2010). Microwave freeze drying of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. of Food Eng.*, 96(4), 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.08.031>

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.

Yoshida, H., Kondo, K., Yamamoto, H., Kageyama, N., Ozawa, S. ichi, Shimbo, K., Miyano, H. (2015). Validation of an analytical method for human plasma free amino acids by high-performance liquid chromatography ionization mass spectrometry using automated precolumn derivatization. *J. of Chromat. Anal. Tech. in the Biom. and Life Sci.*, 998–999, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.029>

Yu, J., Chen, Z., Wang, J., Wang, F., Liu, Y., & Li, X. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chem.*, 151, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.089>

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.

You J, Liu L, Zhao W, Zhao X, Suo Y, Wang H, Li Y. (2007) Study of a new derivatizing reagent that improves the analysis of amino acids by HPLC with fluorescence detection: application to hydrolyzed rape bee pollen. *Anal Bioanal Chem.* Apr;387(8) 2705-2718. doi:10.1007/s00216-007-1155-9. PMID: 17333153.

Zeng, L., Wen, J., Fan, S., Chen, Z., Xu, Y., Sun, Y., ... Li, Y. (2018). Identification of sea cucumber species in processed food products by PCR-RFLP method. *Food Control*, 90(9), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.048>

Zhang, X., Zhao, T., Cheng, T., Liu, X., & Zhang, H. (2012). Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. of Chromat. Anal. Tech. in the Biom. and Life Sci.*, 906, 91–95. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.030>

Zheng, K., Wu, L., He, Z., Yang, B., & Yang, Y. (2017). Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation. *Measurement: J. of the Internat. Measur. Confeder.*, 112(15), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2017.08.013>

Ziegler, F., Boucher, J. Le, Lucas, C., & Cynober, L. (1992). Plasma amino-acid determinations by reversed-phase HPLC: Improvement of the orthophthalaldehyde method and comparison with ion exchange chromatography, 14(4), 145–149. Doi: 10.1155/S1463924692000270

# ANEXOS

Anexo N°1: Certificado de Bioética para uso de animales de experimentación.



CIBICA  
Comité Institucional de Bioética para  
la Investigación con Animales

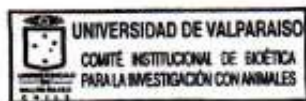
## ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA088-2016

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 Guisado Aránguiz  
Presidente  
Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

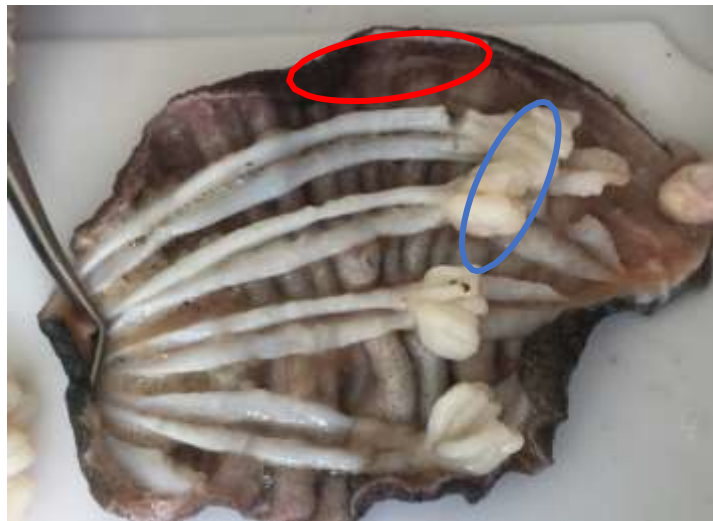
Valparaíso 01 de septiembre de 2016

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

Anexo N°2: Fotografía (elaboración propia) de *A. chilensis* sumergidos en cristales de mentol.



Anexo N°3: Fotografía (elaboración propia) de disección de manto (rojo) y músculo (azul) de la especie *A. chilensis*.



Anexo N°4: Composición de indicador de Tashiro

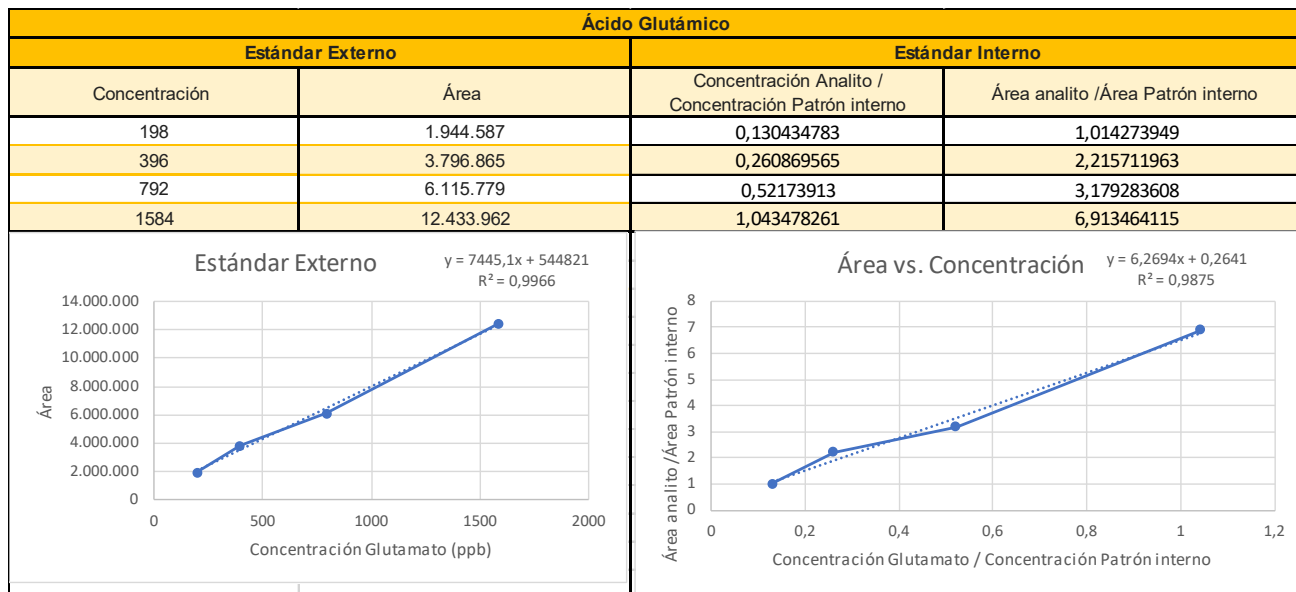
- 100 mg de rojo de metilo
- 50 mg de azul de metileno
- 10,4 mL de agua destilada
- c.s.p. 100 mL alcohol absoluto

Anexo N°5: Concentración y tiempo de retención de cada aminoácido.

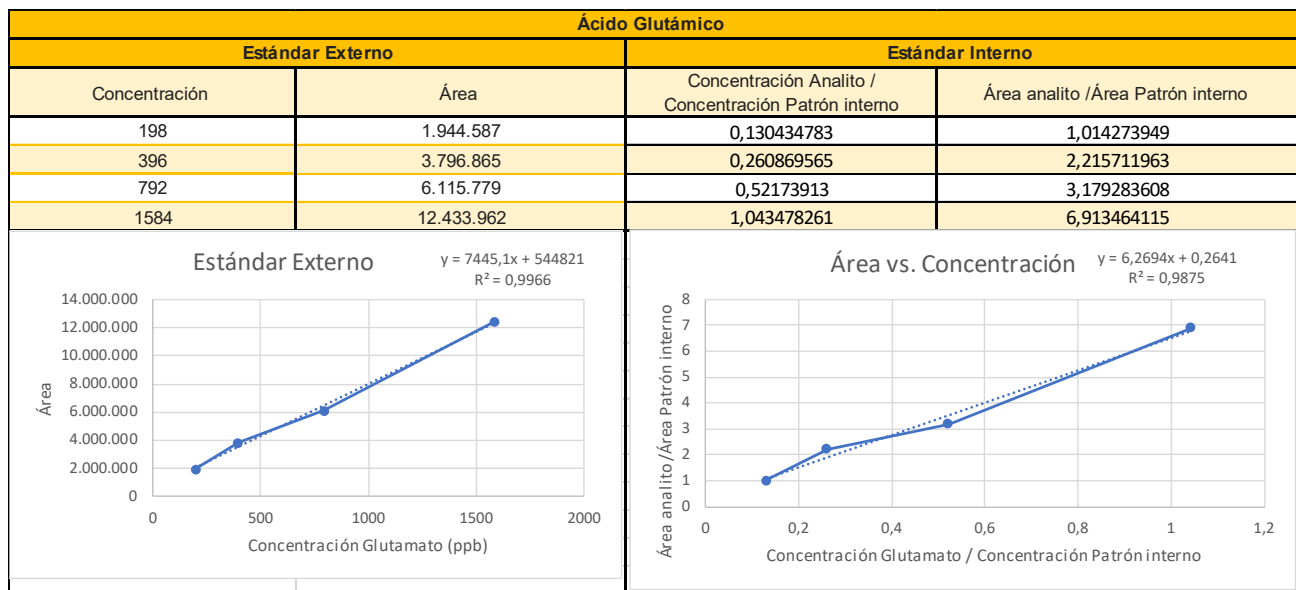
<b>Aminoácido</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
<b>L-Ácido aspártico</b>	13,9	1,792
<b>Glutamato</b>	15,6	2,022
<b>L-Asparragina</b>	15,5	4,952
<b>Prolina</b>	14,9	5,919
<b>L-Serina</b>	10,8	6,889
<b>Glutamina</b>	14,9	9,876
<b>L-Histidina</b>	15,4	11,081
<b>L-Arginina</b>	17,8	13,709
<b>L-Alanina</b>	9,1	13,658
<b>Glicina</b>	7,6	15,829
<b>L-Valina</b>	12,0	16,667
<b>L-Metionina</b>	15,0	16,587
<b>L-Triptófano</b>	20,6	16,763
<b>L-Norvalina</b>	3,44	16,749
<b>L-Treonina</b>	11,7	17,016
<b>L-Fenilalanina</b>	16,8	17,181
<b>Isoleucina</b>	12,8	18,130
<b>L-Leucina</b>	13,2	18,547
<b>L-Lisina</b>	14,8	19,000

Anexo N°6: Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno

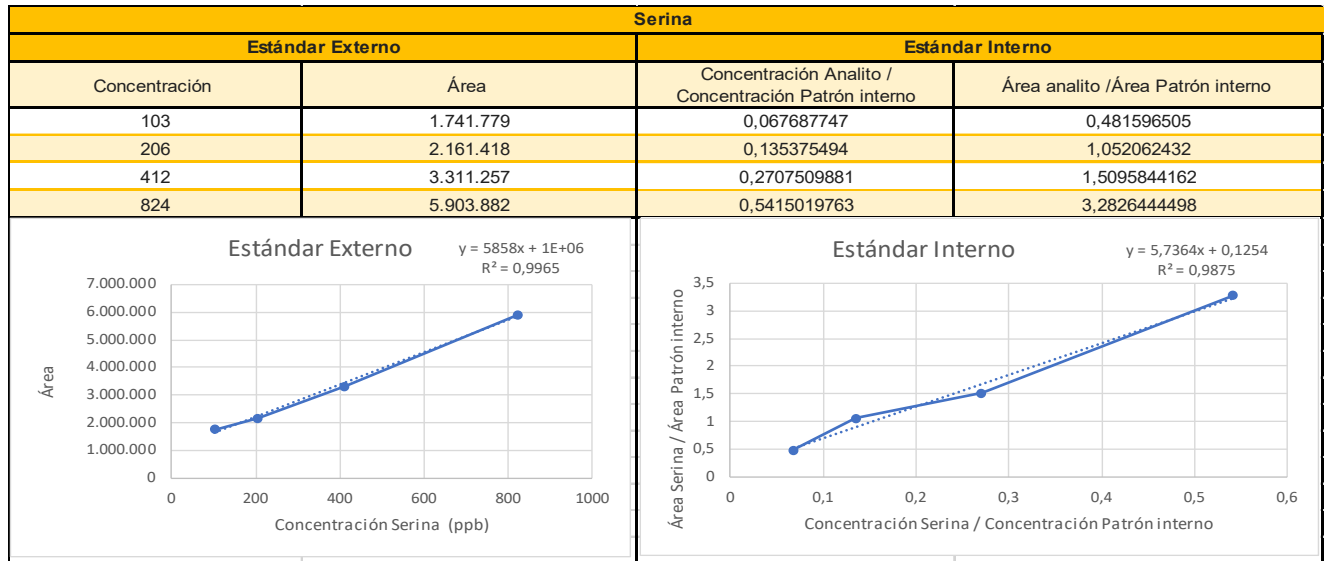
a) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para L-Ácido Aspártico.



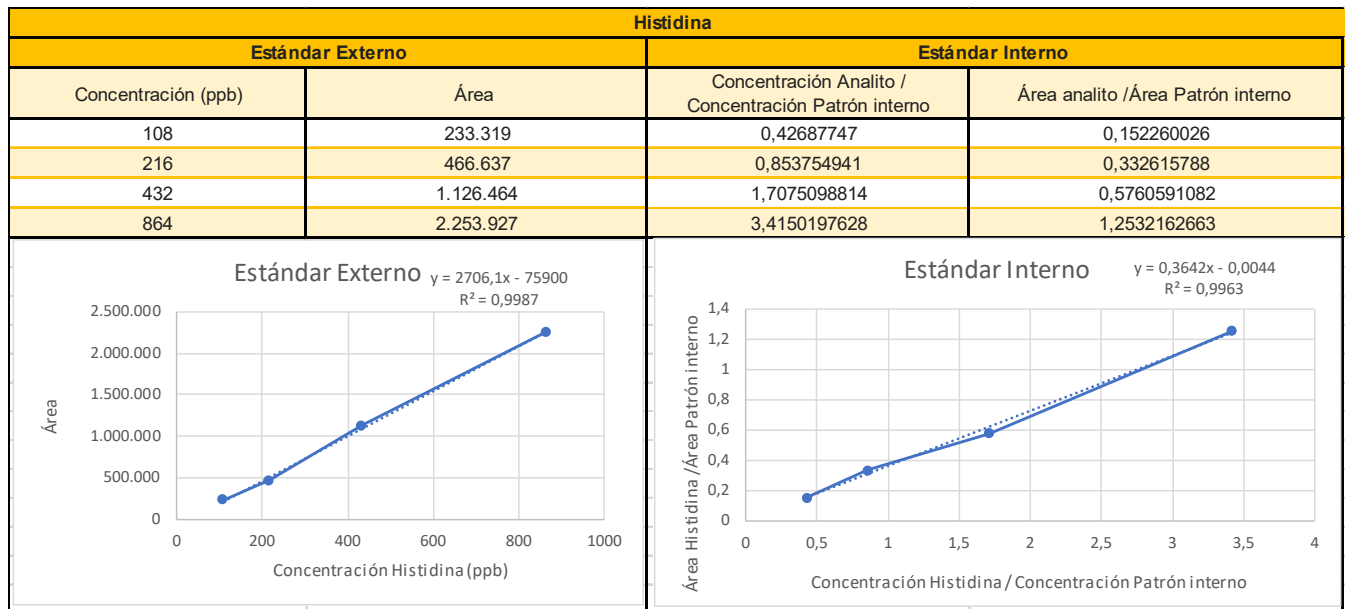
b) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Ácido Glutámico.



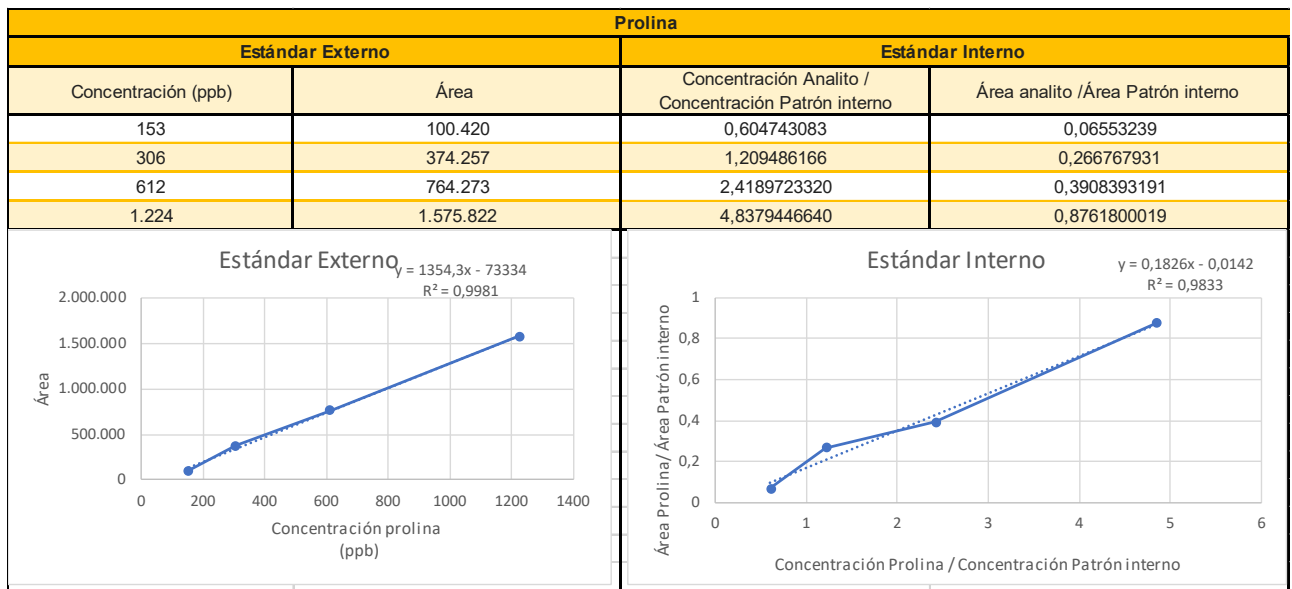
c) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Serina.



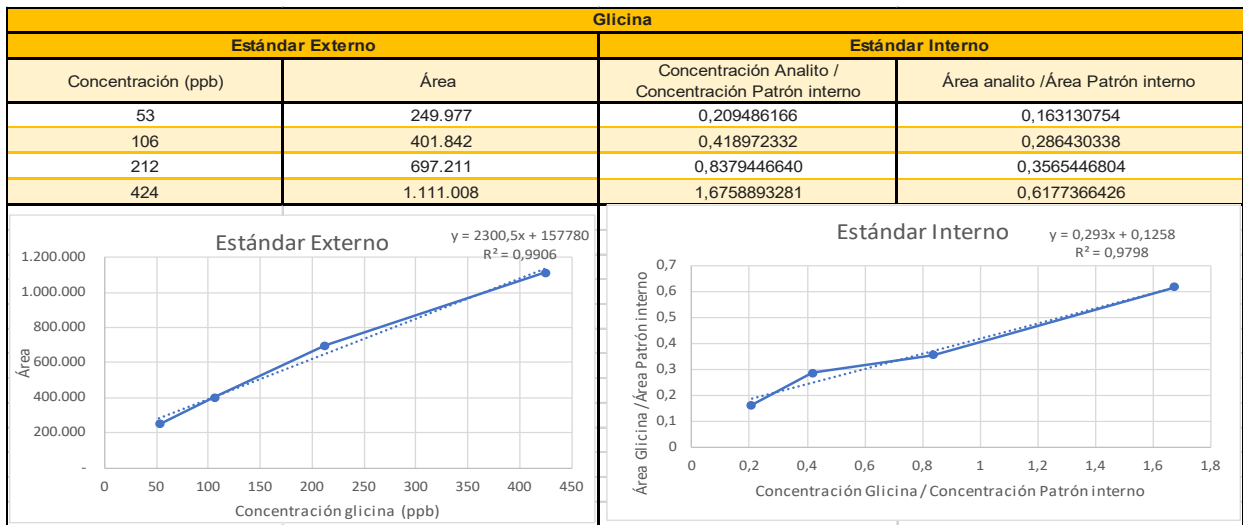
d) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Histidina.



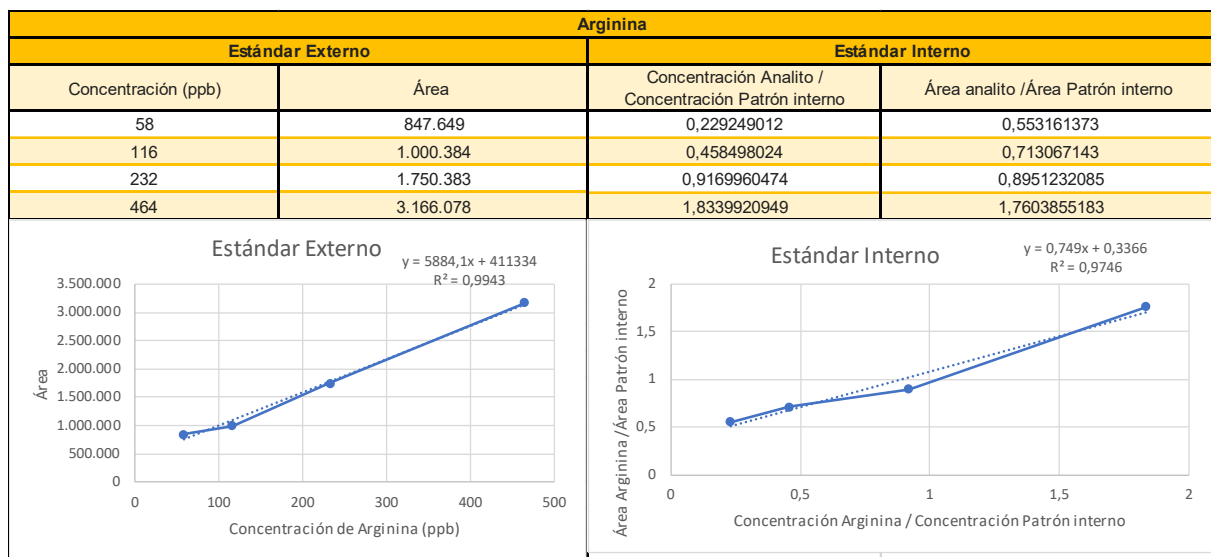
e) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Prolina.



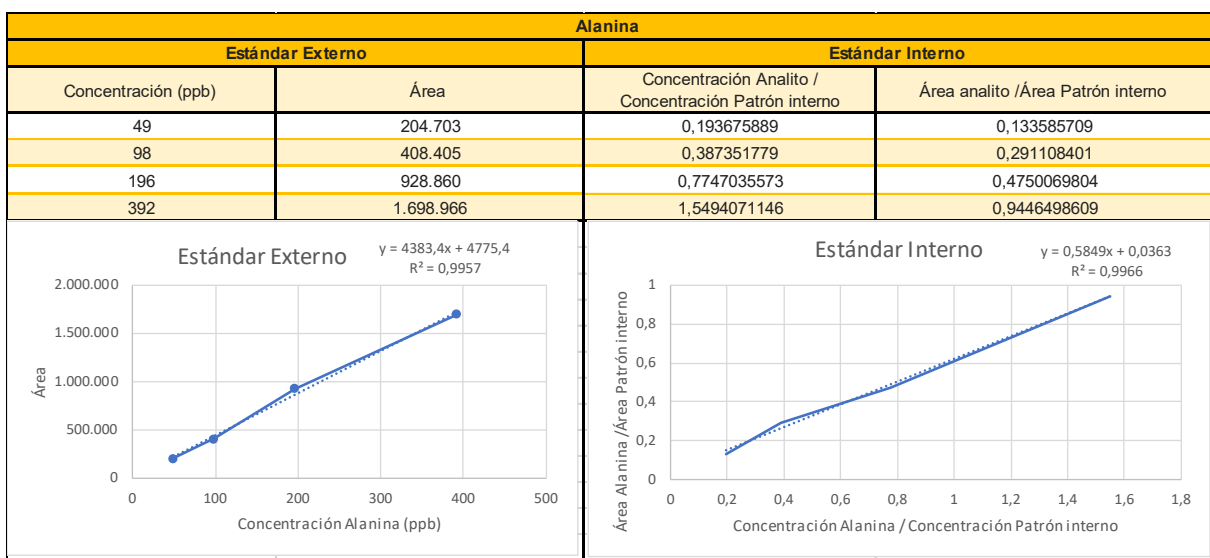
f) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Glicina.



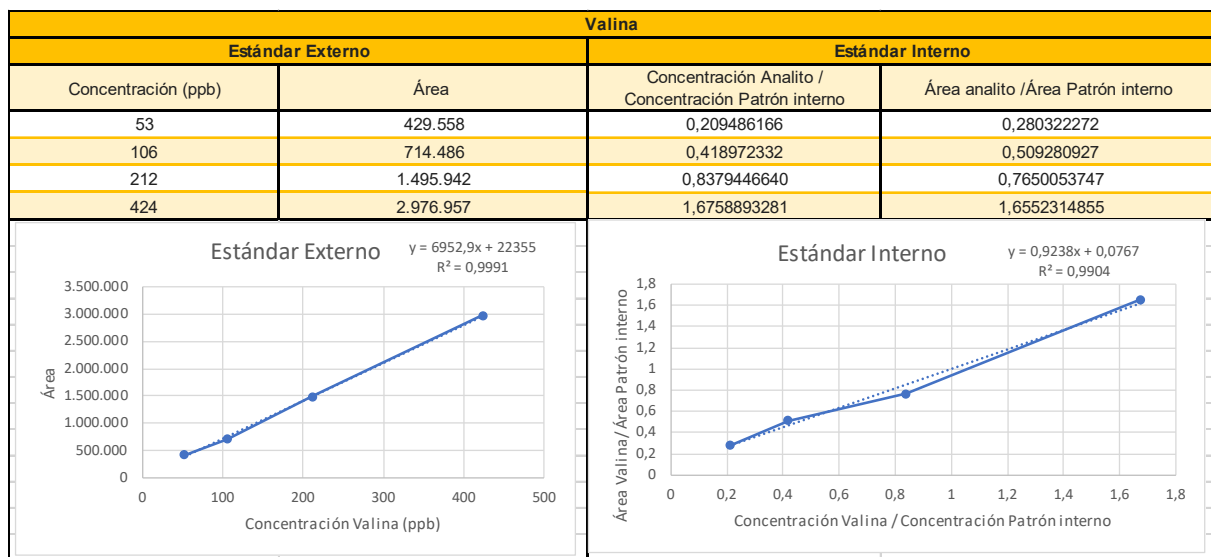
g) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Arginina.



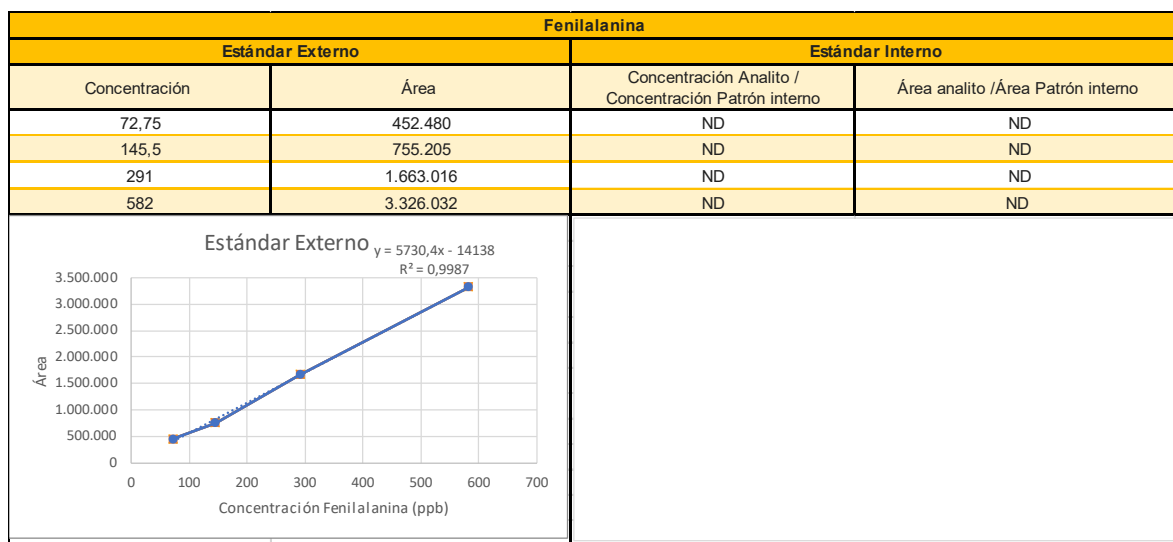
h) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Alanina.



- i) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Valina.

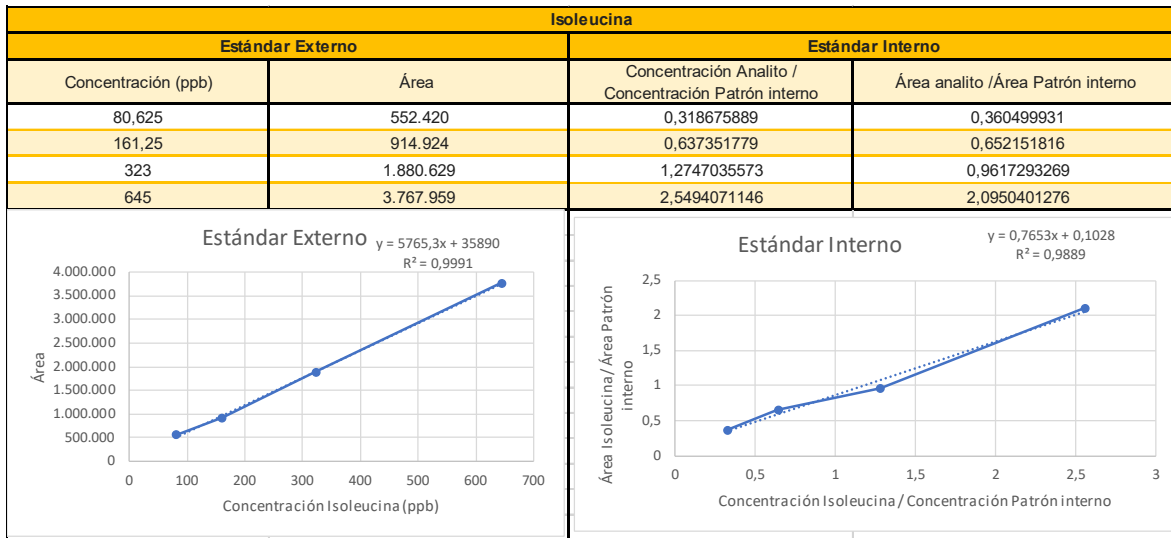


- j) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Fenilalanina.

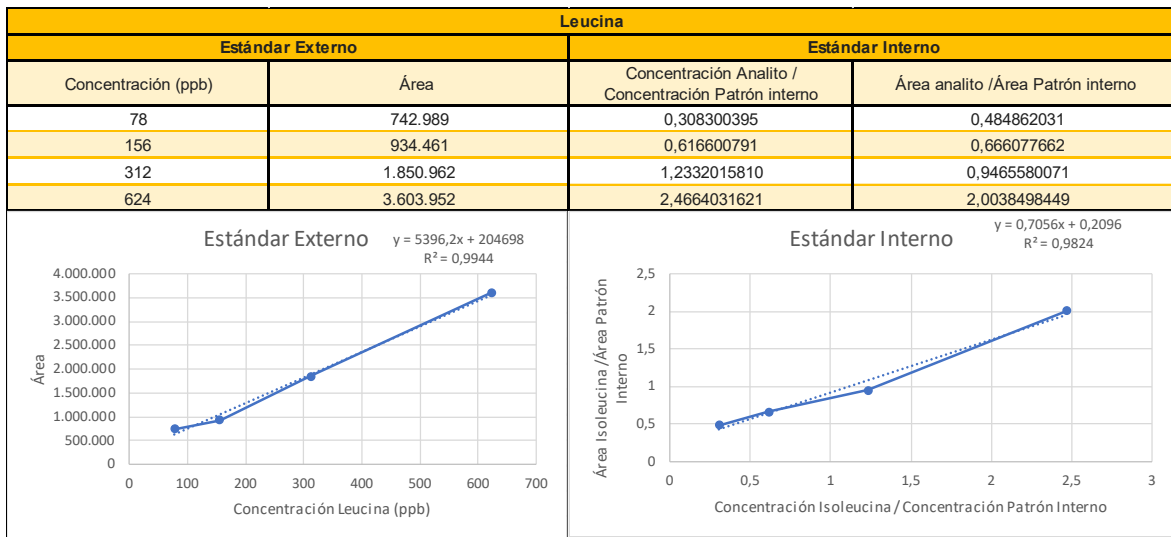


ND: No detectado

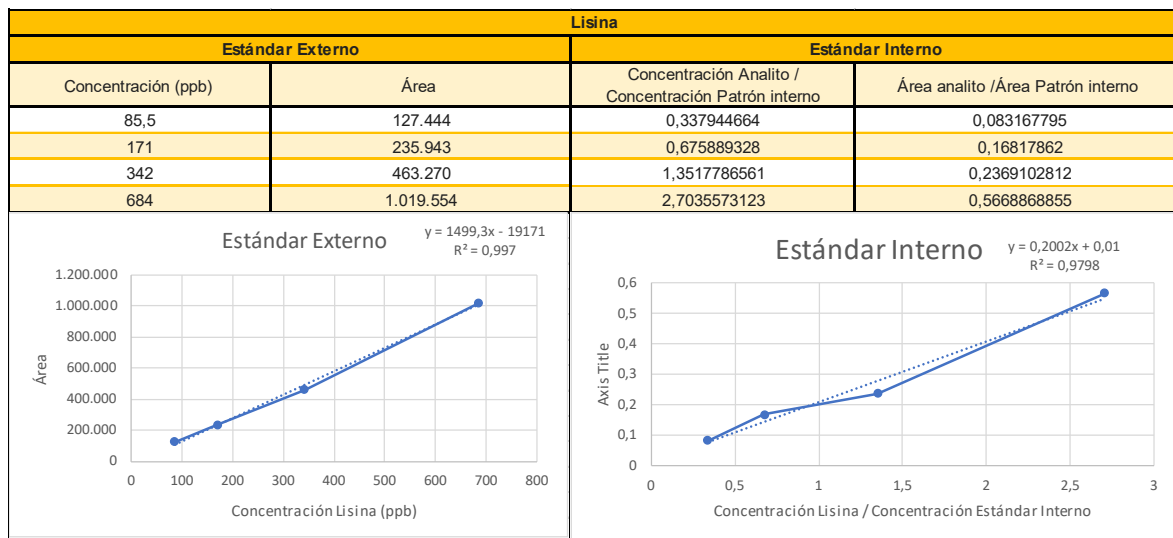
k) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Isoleucina.



l) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Leucina.



m) Curvas de calibrados de cuantificación por estándar externo y estándar interno para Lisina.



## Anexo N°7: **Método de Biuret**

Para llevar a cabo el método de Biuret, fue necesario preparar el reactivo de Biuret que consta de:

- Solución A: 1,5 gramos de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  y 6 gramos de tartrato sódico-potásico en 500 mL de agua destilada.
- Solución B: 300 mL de NaOH al 10% p/v.

Una vez ya preparadas las soluciones, estas se mezclaron y se llevaron a 1 litro con agua destilada.

Posteriormente se tomó por duplicado a pH 2, pH 4, pH 6, pH 8, pH10 y pH 12, 1 mL del sobrenadante y se transfirieron a tubos de ensayo, que se le adicionaron 4 mL del reactivo de Biuret. Posteriormente se mezcló y se dejó en reposo 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Después, se determinó la absorbancia del color violeta producido a 540 nm contra un blanco preparado de la misma manera, pero con 1 mL de agua destilada y 4 mL del reactivo de Biuret.

Para la cuantificación de proteína disuelta en manto y músculo de la especie *A. chilensis*, se preparó una curva de calibrado de albumina bovina entre los rangos de concentración 0,042 a 1,667 [mg/mL] (Gornall *et al.*, 1949).

Anexo N°8: Comparación de porcentajes de proteínas (b.s.) de diferentes estudios y especies de pepinos de mar.

<b>Especie</b>	<b>Método</b>	<b>% Proteína (b.s.)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Stichopus japonicas</i> (cuerpo)	Kjeldahl	96,3	Takinawa, 1955
<i>Stichopus japonicas</i> (cuerpo)	Kjeldahl	45,9	Barzkar <i>et al.</i> , 2016
<i>Parastichopus parvimensis</i> (cuerpo)	Kjeldahl	51,1	Chang-Lee <i>et al.</i> , 1989
<i>Parastichopus californicus</i> (cuerpo)	Kjeldahl	52,6	Chang-Lee <i>et al.</i> , 1989
<i>Stichopus herrmanni</i> (cuerpo)	Kjeldahl	47,0	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Thelenota ananas</i> (cuerpo)	Kjeldahl	55,2	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Thelenota anax</i> (cuerpo)	Kjeldahl	40,7	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Holothuria fuscogilva</i> (cuerpo)	Kjeldahl	57,8	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Holothuria fuscopunctata</i> (cuerpo)	Kjeldahl	50,1	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Actinopyga mauritiana</i> (cuerpo)	Kjeldahl	63,3	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Actinopyga caerulea</i> (cuerpo)	Kjeldahl	56,9	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Bohadschia argus</i> (cuerpo)	Kjeldahl	62,1	Wen <i>et al.</i> , 2010
<i>Holothuria polii</i> (cuerpo)	Kjeldahl	46,2	Aydin <i>et al.</i> , 2011
<i>Holothuria tubulosa</i> (cuerpo)	Kjeldahl	56,2	Aydin <i>et al.</i> , 2011
<i>Holothuria Mammata</i> (cuerpo)	Kjeldahl	53,4	Aydin <i>et al.</i> , 2011
<i>Parastichopus californicus</i> (manto)	Kjeldahl	47,03	Bechtel <i>et al.</i> , 2012
<i>Parastichopus californicus</i> (músculo)	Kjeldahl	68,40	Bechtel <i>et al.</i> , 2012
<i>Holothuria arenicola</i> (cuerpo)	Kjeldahl	44,5	Haider <i>et al.</i> , 2015
<i>Actinopyga mauritiana</i> (cuerpo)	Kjeldahl	66,8	Haider <i>et al.</i> , 2015
<i>Stichopus horrens</i> (cuerpo)	Kjeldahl	48,2	Barzkar <i>et al.</i> , 2016
<i>Holothuria arenicola</i> (cuerpo)	Kjeldahl	62,9	Barzkar <i>et al.</i> , 2016
<i>Isostichopus sp.</i> (Músculo)	Kjeldahl	20,1	Vergara <i>et al.</i> , 2016
<i>Paracaudina australis</i> (cuerpo)	Kjeldahl	80,5	Widianingsih <i>et al.</i> , 2016
<i>Holothuria scabra</i>	Kjeldahl	22,5	Sroyraya <i>et al.</i> , 2017
<i>Holothuria tubulosa</i> (cuerpo)	Kjeldahl	62,7	Öztürk <i>et al.</i> , 2018
<i>Athyonidium chilensis</i> (manto)	Kjeldahl	57	Este estudio (2019)
<i>Athyonidium chilensis</i> (manto)	Lowry	50	Este estudio (2019)
<i>Athyonidium chilensis</i> (músculo)	Kjeldahl	46	Este estudio (2019)
<i>Athyonidium chilensis</i> (manto)	Lowry	44	Este estudio (2019)

Anexo n°9: **Contenido de aminoácidos esenciales de diversos orígenes (mg/g de proteína).** ΣAAE: Sumatoria de aminoácidos esenciales contenido en los productos descritos.

Aminoácidos esenciales	FAO/OMS/ONU Adultos	Fuente de Proteína					
		Huevo	Leche	Carne	Pescado	<i>A. chilensis</i>	
						Manto	Músculo
<b>Histidina</b>	16	22	27	34	35	239	185
<b>Isoleucina</b>	13	54	47	48	34	29	33
<b>Leucina</b>	19	86	95	81	77	42	51
<b>Lisina</b>	16	70	78	89	91	110	129
<b>Metionina + Cisteína</b>	17	57	33	40	40	-	-
<b>Fenilalanina + Tirosina</b>	19	93	102	80	76	47 (Phe)	55 (Phe)
<b>Treonina</b>	9	47	44	56	46	-	-
<b>Valina</b>	5	66	64	50	61	92	35
<b>Triptófano</b>	13	17	14	12	11	-	-
<b>ΣAAE mg/g</b>	<b>111</b>	<b>512</b>	<b>504</b>	<b>480</b>	<b>485</b>	<b>559</b>	<b>488</b>

Anexo n°10: **Perfil de aminoácidos esenciales en diferentes especies de sea cucumber.** (His= histidina; Ile= isoleucina; Lys= lisina; Met= metionina; Phe= fenilalanina; Thr= treonina; Trp= triptófano; Val= valina). ND: No detectado.

Especie	Estudio	Perfil de Aminoácidos Esenciales % (AAE)								
		His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val
<i>A. chilensis</i> (Manto)	Este estudio	14,1	3,9	6,01	3,6	ND	6,0	ND	ND	14,5
<i>A. chilensis</i> (Músculo)	Este estudio	11,4	4,6	7,5	4,4	ND	7,3	ND	ND	5,6
<i>S. hermanni</i>	Wen <i>et al.</i> , 2010	0,29	1,08	1,57	0,79	0,44	0,92	1,87	0,13	1,34
<i>H. fuscogilva</i>	Wen <i>et al.</i> , 2010	0,27	0,94	1,88	0,62	0,57	0,89	2,58	0,10	1,81
<i>H. fuscopunctata</i>	Wen <i>et al.</i> , 2010	0,31	0,88	1,84	0,68	0,44	1,07	2,37	0,11	1,72
<i>A. mauritana</i>	Wen <i>et al.</i> , 2010	0,40	1,47	2,27	1,14	0,62	1,18	2,52	0,13	2,18
<i>A. caerulea</i>	Wen <i>et al.</i> , 2010	0,32	1,31	2,01	0,90	0,65	1,06	2,36	0,20	1,80
<i>P. californicus</i> (músculo)	Bechtel <i>et al.</i> , 2012	2,1	3,6	5,3	4,1	2,2	3,8	5,7	ND	4,8
<i>P. californicus</i> (manto)	Bechtel <i>et al.</i> , 2012	1,7	4,2	7,6	7,6	2,3	4,1	4,6	ND	5,3
<i>H. arenicola</i>	Haider <i>et al.</i> , 2015	1,41	3,37	5,19	2,06	0,43	2,80	4,59	ND	2,94
<i>A. mauritana</i>	Haider <i>et al.</i> , 2015	1,30	2,52	6,40	2,23	0,07	3,83	4,80	ND	2,86
<i>H. scabra</i>	Sroyraya <i>et al.</i> , 2017	1,31	0,75	2,9	0,99	1,15	2,02	3,01	0,7	1,88
<i>H. Tubulosa</i>	Öztürk <i>et al.</i> , 2018	1,22	1,71	6,06	2,33	6,28	1,76	3,84	5,95	1,14

Anexo N°11: Coeficientes de correlación (r) y coeficientes de determinación (r<sup>2</sup>), correspondiente a estándares de aminoácidos con y sin estándar externo.

ND: No detectado. (\*\*) Corresponde a aminoácidos esenciales.

Aminoácido	Estándar Externo		Estándar interno	
	r	r <sup>2</sup>	r	r <sup>2</sup>
L-Ácido aspártico	0,9962	0,9924	0,9993	0,9986
Glutamato	0,9983	0,9966	0,9937	0,9875
L-Serina	0,9982	0,9965	0,9937	0,9785
L-Histidina**	0,9993	0,9987	0,9981	0,9963
Glicina	0,9953	0,9906	0,999	0,998
L-Arginina	0,9971	0,9943	0,9971	0,9943
L-Alanina	0,9978	0,9957	0,9983	0,9966
L-Lisina**	0,9985	0,9970	0,9898	0,9798
L-Valina**	0,9995	0,9991	0,9952	0,9904
L-Fenilalanina**	0,9993	0,9987	ND	ND
Isoleucina**	0,9995	0,9991	0,9944	0,9889
L-Leucina**	0,9972	0,9944	0,9912	0,9824
Prolina	0,9990	0,9980	0,9916	0,9833

Anexo N°12: Aminoácidos reportados en diferentes especies correspondiente a sea cucumber

(Asp= Aspartato; Glu= Glutamato; Asn= Asparagina; Ser= Serina; Gln= Glutamina; His= Histidina; Gly= Glicina; Thr= Treonina; Arg= Arginina; Ala= Alanina; Tyr= Tirosina; Lys= Lisina; Val= Valina; Met= Metionina; Cys= Cisteína; Phe= Fenilalanina; Ile= Isoleucina; Leu= Leucina; Pro= Prolina; Trp= Triptófano). X: Presencia; - : Ausencia

Especie	Referencia	Aminoácidos Identificados																			
		Asp	Glu	Asn	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala	Tyr	Lys	Val	Met	Cys	Phe	Ile	Leu	Pro	Trp
<i>A. Chilensis</i> (Manto)	Este Estudio	X	X	-	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X	X	X	X	-
<i>A. Chilensis</i> (Músculo)	Este Estudio	X	X	-	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X	-	X	X	X	X	X	-
<i>S. japonicus</i>	Xu Duan et al., 2010	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
<i>H. arenicola</i>	Haider et al., 2015	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S. japonicus</i>	Gao et al., 2015	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>A. Mauritana</i>	Haider et al., 2015	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>H. scabra</i>	Sroyraya et al., 2017	X	X	-	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>P. australis</i>	Widianingsih, 2016	X	-	-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	-	X	X	X	X	X	-
<i>H. tubulosa</i>	Öztürk et al., 2018	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Anexo N°13: Contenidos de minerales de *A. chilensis* y de otras especies de sea cucumber.  
 <LD: Bajo límite de detección.

Especie	Referencia	Contenido de metales (µg/g)											
		Al	Fe	Mn	Cu	Zn	Cr	Ni	Pb	Mb	Cd	Na	K
<i>A. chilensis</i> (Manto)	Este Estudio	7,3	88,0	1,2	1,9	184	0,4	<LD	<LD	<LD	0,2	29.123	11.769
<i>A. chilensis</i> (Músculo)	Este Estudio	10,7	14,0	1,6	1,2	109	0,4	<LD	<LD	<LD	0,3	18.297	20.651
<i>A. japonicus</i> (Weihai)	Kang et al., 2018	36,3	50,9	4,6	0,2	2,6	0,0001	0,072	0,03	-	0,02	10.181	934
<i>A. japonicus</i> (Dalian)	Kang et al., 2018	17,8	19,5	3,6	0,3	3,5	0,0001	0,100	-	-	-	6.261	996
<i>A. japonicus</i> (Yingkou)	Kang et al., 2018	15,7	20,5	1,9	0,2	3,0	0,0009	0,100	0,03	-	0,08	7.824	687
<i>A. japonicus</i> (Huluodao)	Kang et al., 2018	62,0	70,0	4,5	0,4	3,7	0,0001	0,101	0,05	-	0,06	8.651	810
<i>A. japonicus</i> (Jinzhou)	Kang et al., 2018	85,4	110,1	9,7	0,4	3,4	0,0002	0,200	0,1	-	0,1	11.591	995
<i>S. hermanni</i>	Wen et al., 2010	-	-	9,1	3,0	33,0	1,6	-	0,5	-	0,03	-	-
<i>T. ananas</i>	Hashmi et al., 2014	-	-	5,7	1,3	15,2	3,3	-	0,2	-	2,4	-	-
<i>T. anax</i>	Hashmi et al., 2014	-	-	4,0	1,0	9,9	1,5	-	0,2	-	0,04	-	-
<i>fuscogilva</i>	2010	-	-	9,4	57,0	11,0	1,3	-	0,7	-	1,2	-	-
<i>H. leucospilota</i>	Hashmi et al., 2014	-	-	2,2	0,9	16,3	1,6	-	0,3	-	0,05	-	-
<i>A. mauritana</i>	Haider et al., 2015	-	-	58,5	51,1	52,3	<LD	-	<LD	-	<LD	-	-