



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA**  
**Y BIOQUÍMICA**

**TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN ALIMENTOS**  
**PARA ANIMALES MAYORES**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br.: Maycol Arturo Antón Sandoval

Asesor:

Mg. Luis Miguel Félix Veliz

Lima – Perú

2017

## **DEDICATORIA**

A mi madre, por el esfuerzo y apoyo brindado que sin duda alguna a forjado el trayecto de mi vida, me ha demostrado amor y disciplina corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi Esposa e Hija, que son mi fuente de apoyo constante y amor incondicional, gracias por soportar largas horas sin mi compañía.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme sabiduría y fuerza para culminar esta valiosa etapa de mi vida.

A mi familia por su apoyo incondicional.

A mi asesor Mg. Miguel Félix Veliz por el apoyo brindado y por contribuir en nuestra formación profesional, guiándonos y motivándonos permanentemente para la culminación del presente estudio.

## INDICE

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
SUMMARY	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación del Problema	1
1.2. Planteamiento del problema	3
1.3. Justificación	3
1.3.1. Social	4
1.3.2. Teórica	4
1.3.3. Práctica	4
1.3.4. Personal	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo General	5
1.4.2. Objetivos Específicos	5
1.5. Variables	5
1.5.1. Dependientes.	5
1.5.2. Independientes.	5
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes	6
2.1.1. Antecedentes Internaciones	6
2.1.2. Antecedentes Nacionales	9
2.2. Técnicas Analíticas	11
2.2.1. Cromatografía de Gases (GC)	11
2.2.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC/MS)	16
2.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	19

	Pág.
2.2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC/MS)	24
2.2.5. Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC)	27
2.2.6. Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)	32
2.2.7. Electroforesis Capilar (CE) acoplada a Espectrometría de Masas (MS)	34
2.2.8. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) acoplada a Espectrometría de Masas (MS)	37
2.2.9. Otras Técnicas	43
2.3. Fabricación de alimentos para animales mayores (piensos)	45
2.3.1. Ingredientes de piensos	46
2.3.2. Producción, elaboración, almacenamiento, transporte y distribución 41 de alimentos para animales (piensos) y sus ingredientes	46
2.3.3. Métodos de muestreo y análisis	47
III. METODOLOGÍA	49
3.1 Tipo de Investigación	49
3.2 Muestra	49
3.3 Procedimiento de recolección de datos	49
3.4 Métodos y Técnicas analíticas de referencia	50
3.5 Otros Estudios	53
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	60
V. CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases	13
FIGURA 2. Sección transversal de las columnas capilares	15
FIGURA 3. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masa.	17
FIGURA 4. Modos de separación más importantes en HPLC	21
FIGURA 5. Componentes de un HPLC	22
FIGURA 6. Componentes de un HPLC acoplado a Masas	25
FIGURA 7. Gráfico Van Deemter ilustra la evolución del tamaño de las partículas en las últimas tres décadas	29
FIGURA 8. Diagrama de un sistema Waters ACQUITY UPLC System	30
FIGURA 9: Sistema capilar con detección instrumental	35
FIGURA 10. Características de qNMR en comparación con métodos cromatográficos.	38
FIGURA 11. Variedades de muestras y panel de aplicaciones de qNMR	39
FIGURA 12. Cromatograma del Hidrolizado de DDGS por HPLC MS/MS	61
FIGURA 13. Comparación de las separaciones cromatográficas del estándar de aminoácidos hidrolizado con BSA.	62
FIGURA 14. Análisis GC-MS de Derivados de Aminoácidos en la SLB-5ms (28564-U).	67
FIGURA 15. Espectro de Masas del Derivado TBDMS de Valina (PM del derivado= 345).	68
FIGURA 16. Espectros de qHNMR de los ejemplos de productos naturales Ginkgolida B y Ginkgo terpenetrilactona (TTL).	69
FIGURA 17. Diagrama de dispersión de los valores de los modelos de regresión lineal de proteínas frente a los de los mejores modelos de calibración NIR.	71
FIGURA 18. Espectro de masas de ESI-MS interpretado típicamente de polipéptido de pescado de carpa con M de 16 751	73

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Descripción general de los principales detectores de GC.	16
TABLA 2. Parámetros de Procesamiento (PP) fueron evaluados en un ensayo de robustez de Youden y Steiner.	57
TABLA 3. Especificaciones de los espectrómetros NIR utilizados en el experimento.	59
TABLA 4. Perfil de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de Plukenetia.	63
TABLA 5. Perfil de aminoácidos de los concentrados proteicos de Tarwi.	64
TABLA 6. Contenido de triptófano por HPLC en muestras de maíz colombiano provenientes del NCRPIS	65
TABLA 7. Estadística de la validación NIRS de maíz.	66
TABLA 8. Resumen de resultados y discusiones.	76

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es determinar las diferentes técnicas analíticas más recomendadas para la identificación y cuantificación de aminoácidos en alimentos (piensos) para animales mayores. Basándonos en las recomendaciones de entidades que regulan la fabricación y control de calidad de los alimentos para animales mayores se investigó sobre el uso de técnicas analíticas modernas con alto rendimiento y calidad. Revisando los métodos oficiales para el análisis de aminoácidos en alimentos para animales. La mayoría de las técnicas analíticas encontradas son: Cromatografía de Gases (GC) acoplada a Masas (GC/MS) Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), acoplada a Masas (HPLC/MS), Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC), Electroforesis Capilar (CE) acoplado a Masas (MS), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) acoplada a (MS). Otras técnicas: Espectroscopia Infrarroja Cercana (NIR). Se concluye que la técnica analítica más recomendable es la Cromatografía Líquida de Alta Performance - HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) como una técnica con buena Repetibilidad y Reproducibilidad, aun costo/beneficio que es accesible para los diferentes laboratorios que realizan estos análisis, sin embargo; acoplar a esta técnica de identificación, la detección por Espectrometría de Masas o Masas/Masas potenciaría estas características y beneficios.

**Palabras clave:** Pienso, FAO, RMN, HPLC, NIR, GC.

## SUMMARY

The objective of the present work is to determine the different analytical techniques most recommended for the identification and quantification of amino acids in foods (feedstuffs) for older animals. Based on the recommendations of entities regulating the manufacture and quality control of feed for older animals, we investigated the use of modern analytical techniques with high yield and quality. Reviewing the official methods for the analysis of amino acids in animal feed. Most of the analytical techniques found are: Gas Chromatography (GC) Mass-coupled (GC / MS) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to Masses (HPLC / MS), Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Capillary Electrophoresis (CE) coupled to Masses (MS), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) coupled to (MS). Other techniques: Near Infrared Spectroscopy (NIR). It is concluded that the most recommended analytical technique is High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as a technique with good repeatability and reproducibility, yet cost / benefit that is accessible to the different laboratories performing these analyzes, the option to coupling to this identification, technique detection by Mass Spectrometry or Masses / Masses would enhance these characteristics and benefits.

**Keywords:** Feedstuffs, FAO, NMR, HPLC, NIR, GC.

# I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día los laboratorios de control de calidad están en la constante búsqueda de mejorar sus diferentes métodos de análisis, sobre todo aquellos que usan instrumentos cada vez son más precisos.

## 1.1. Situación del Problema

Sabemos que las proteínas son biomoléculas poliméricas lineales constituidas por  $\alpha$ -L-aminoácidos. Se encuentran tanto en células animales como vegetales y se pliegan en una estructura tridimensional característica que les brinda una enorme variedad de funciones. Actúan como componentes estructurales y como receptores moleculares; algunas tienen participación en procesos de replicación, transcripción y transducción de la información genética; otras forman parte de la primera línea de defensa de nuestro sistema o se encargan de transportar el oxígeno a todas nuestras células.<sup>1</sup>

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ). Los aminoácidos proteicos se denominan  $\alpha$ -aminoácidos ya que están formados por un carbono alfa unido a un grupo amino, a un grupo carboxilo, a un hidrógeno y a una cadena lateral R con la que forman un cuarto enlace covalente. En las proteínas naturales todos los

aminoácidos, (excepto la glicina) son quirales y se presentan como isómeros L, lo que no indica que deban ser dextrógiros o levógiros.<sup>1</sup>

Mediante el análisis de un vasto número de proteínas de casi cualquier origen se ha demostrado que todas las proteínas están compuestas por 20 aminoácidos.<sup>2</sup>

A diferencia de las plantas que pueden sintetizar todos los aminoácidos a partir de sustancias básicas, el hombre y los animales necesitan del aporte de algunos aminoácidos llamados “esenciales” que provienen de la alimentación. Algunos de estos aminoácidos son sintetizados por el organismo a partir de sustancias endógenas. Junto a las grasas y los carbohidratos, los aminoácidos en forma de proteínas forman también parte de las principales sustancias alimenticias presentes en el alimento para animales.<sup>2</sup>

Los alimentos para animales desempeñan un papel líder en la industria global de alimentos, al permitir la producción de productos de origen animal en todo el mundo (facturación anual calculada US\$85 Billones – 620 Millones de TM).

Los piensos inocuos permiten que las granjas garanticen la inocuidad alimentaria, reduzcan los costos de producción, mantengan o aumenten la calidad y la consistencia del alimento, mejoren la salud animal y bienestar al brindar una nutrición adecuada en cada fase de crecimiento y producción.<sup>3</sup>

Para ayudar a cubrir la demanda de alimentos inocuos y asequibles, los fabricantes de piensos en todo el mundo necesitan:

- Aplicar una amplia gama de tecnología de procesamiento y de ingeniería.
- Usar coproductos, subproductos y otras materias primas.
- Patrocinar investigación en universidades sobre nutrición animal.

La FAO en el Manual para la Buenas Prácticas para la Industria de los Piensos da pautas para realizar los diversos controles de calidad (muestreo,

análisis de sustancias indeseadas, análisis microbiológico, análisis fisicoquímico) para garantizar la calidad del alimento animal. Todos estos controles dependen del uso de métodos analíticos de vanguardia que describiremos en la presente investigación.<sup>3</sup>

Teniendo una perspectiva fisiológica-alimentaria para el hombre y los animales, es importante conocer si estos aminoácidos son esenciales ya que estos no se sintetizan en cantidades suficientes para suplir los requerimientos metabólicos, por lo que deben ser adicionados en el alimento.<sup>4</sup>

La determinación cuantitativa de los aminoácidos ha sido uno de los objetivos más importantes de la bioquímica moderna, ya que nos permite conocer el porcentaje de aminoácidos presentes en las proteínas, y determinar cuáles son sus características alimenticias.<sup>5</sup>

En este sentido es de suma importancia para los laboratorios encontrar una técnica analítica que les permita identificar los aminoácidos de una manera precisa y con un costo/beneficio sustentable en el tiempo.

## **1.2. Planteamiento del problema**

Las diferentes técnicas para la identificación y cuantificación de aminoácidos en piensos son complejas y requieren de un nivel de experiencia alto para los investigadores, por lo que formulamos la siguiente pregunta:

**¿Cuál es la técnica analítica más recomendable para la identificación de aminoácidos en piensos?**

## **1.3. Justificación**

El propósito fundamental por el cual se eligió este tema para el trabajo de investigación se basa en la necesidad de dar a conocer a la comunidad universitaria y social cuales son las variables teóricas, prácticas y económicas

que se deben de tener en cuenta al momento de elegir una técnica para la identificación de aminoácidos en piensos. Obteniendo como beneficio resultados repetitivos, reproducibles y al mejor costo/beneficio. A continuación se detallan algunos puntos de vista que justifican el presente trabajo:

#### **1.3.1. Social**

Por el aporte a la comunidad universitaria de información actualizada sobre nuevos avances en investigación y mejoras a las clásicas técnicas analíticas para la identificación de aminoácidos en piensos.

#### **1.3.2. Teórica**

Por qué se revisarán investigaciones y nuevos desarrollos que fundamentarán los aspectos teóricos que se conocen sobre las clásicas técnicas para la identificación de aminoácidos en piensos.

#### **1.3.3. Práctica**

Porque esta investigación aportará información para el desarrollo e implementación de técnicas analíticas en los laboratorios de control de calidad.

#### **1.3.4. Personal**

Porque esta investigación ayudará a desarrollar mis conocimientos sobre nuevos avances en instrumentación y técnicas analíticas que serán un aporte importante al desarrollo de mi trabajo diario ya que mi línea de carrera se desarrolla en la comercialización de instrumentación analítica y control de calidad.

## **1.4. Objetivos**

### **1.4.1. Objetivo General**

Determinar cuál es la técnica analítica más recomendada para la identificación de aminoácidos en piensos.

### **1.4.2. Objetivos Específicos**

1.4.2.1. Buscar información sobre las técnicas analíticas de identificación de aminoácidos en piensos.

1.4.2.2. Determinar las características más importantes sobre las diversas técnicas analíticas de identificación de aminoácidos.

1.4.2.3. Determinar cuáles son los requisitos de la FAO sobre el control de calidad en la fabricación de piensos.

1.4.2.4. Recomendar según las variables técnica, económica y de cuidado al medio ambiente cuál es la técnica recomendada para la identificación de aminoácidos en piensos.

## **1.5. Variables**

### **1.5.1. Dependientes.**

Repetibilidad y reproducibilidad, menor tiempo de análisis, menor costo por análisis, disponibilidad de equipos en los laboratorios.

### **1.5.2. Independientes.**

Elección de una técnica analítica para la identificación y cuantificación de aminoácidos en alimentos para animales mayores (piensos).

## II. MARCO TEÓRICO

Muchos avances y desarrollos en la Medicina y la Biología no hubieran sido posibles sin la ayuda de los químicos analíticos quienes desarrollan las llamadas “Técnicas Analíticas”. Algunas de las herramientas más importantes de la química analítica las propusieron biólogos que estudiaban problemas bioquímicos. Por ejemplo la cromatografía fue descubierta por el botánico M. S. Tswett en 1903 quien quería estudiar pigmentos vegetales. El electrodo para medir oxígeno fue inventado por el médico L. C. Clarke, hijo, en 1954 y el término “pH” fue acuñado por el enzimólogo S. P. L. Sorensen en 1909.<sup>6</sup>

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Antecedentes Internaciones

En España realizaron el **“Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios”**. En este país los complementos alimenticios están regulados por el Real Decreto 1487/2009 que traspuso a la legislación española la Directiva 2002/46/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia

de complementos alimenticios. Sin embargo, actualmente sólo está regulado el uso de vitaminas y minerales por lo que el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) abordó en el informe aprobado en su sesión plenaria de 28 de noviembre de 2012 las condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios de cara a su inclusión en un nuevo anexo III del Real Decreto 1487/2009. A la vista de algunas observaciones realizadas a las propuestas que evaluó el Comité en su anterior informe, se elaboró una nueva propuesta de la AESAN en la que se incrementan algunas cantidades máximas diarias o se incluyen sustancias relacionadas con las evaluadas anteriormente. Las ocho sustancias o grupos de sustancias propuestas por la AESAN son: aminoácidos ramificados, L-histidina, L-glutamina, ubiquinol, ácido linoleico y ácido alfa-linolénico, mioinositol, quercetina y rutina. El Comité Científico valoró cada propuesta y concluyó, en cada caso, que la propuesta presentada por la AESAN era aceptable desde el punto de vista de seguridad en su uso como complemento alimenticio. En ningún caso, la evaluación realizada supone un aval de la eficacia de las sustancias y dosis valoradas.<sup>7</sup>

En Canadá publicaron el “**Journal of Chromatography A, 893 (2000) 1–21 applications of mass spectrometry to food proteins and peptides**”. Sobre como la aplicación de la espectrometría de masas (MS) a grandes biomoléculas se ha revolucionado en la última década con el desarrollo de técnicas de ionización por electrospray (ESI) y de desorción / ionización láser asistida por matriz (MALDI). ESI y MALDI permiten la evaporación del disolvente y la sublimación de grandes biomoléculas en la fase gaseosa, respectivamente. El acoplamiento de ESI o MALDI con un Espectrómetro de Masas apropiado permitió la determinación precisa de la masa molecular y la detección de

modificación química a alta sensibilidad. La interfaz de hardware de Espectrometría de Masas con computadoras y nuevos métodos de Espectrometría de Masas extendida dio como resultado el uso de MS para la secuenciación de proteínas, modificaciones post-traduccionales, conformaciones de proteínas (nativas, desnaturalizadas, plegables intermedios), plegado / O proteína-ligando.<sup>8</sup>

En Colombia publicaron el artículo técnico **“Uso de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIR S) para la cuantificación rápida y precisa de Triptófano en maíces colombianos”**. En este estudio se utilizó la técnica Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (Near Infrared Reflectance Spectroscopy, NIRS) para desarrollar una ecuación de calibración para predecir el contenido del aminoácido triptófano en maíces colombianos. El método de cuantificación directa de la concentración de triptófano en el grano de maíz fue por HPLC con detección UV a 280 nm. Se escanearon 60 muestras de maíz colombiano mediante NIRS, de los cuales 40 espectros se destinaron para calibración y 20 para validación, generándose una ecuación de predicción con un Error Estándar de Calibración (SEC) de 0,001 y un Coeficiente de Correlación (RSQ) de 0,979. Los datos de concentración de triptófano en las matrices de maíz obtenidos por el método directo (HPLC) usados para la calibración se encontraron en el rango de 0,033 a 0,083% y las muestras de validación en el rango de 0,044 a 0,062%. El RSQval (fracción de la varianza explicada de muestras independientes de validación o coeficiente de correlación al r cuadrado) obtenido, fue bajo debido a la poca variabilidad de las muestras y al número de muestras. Sin embargo, de acuerdo con la prueba del Ji-cuadrado, los valores de predicción por NIRS se ajustaron a los valores obtenidos por HPLC con un nivel de confianza del 95%.<sup>9</sup>

## 2.1.2. Antecedentes Nacionales

En Trujillo realizaron el estudio **“Técnicas analíticas empleadas en metabólomica de alimentos”**. Este estudio revisó las poblaciones de metabolitos de bajo peso molecular en lípidos, aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, ácidos orgánicos, vitaminas, tioles, carbohidratos, etc. que se encuentran presente en los alimentos y son la representación de productos finales de procesos regulatorios a nivel celular que indican cual es la respuesta de los sistemas biológicos a diversas influencias genéticas y ambientales. Su análisis, identificación y cuantificación son un gran y difícil reto que implica el uso de modernas y avanzadas técnicas analíticas, utilizando técnicas de alto rendimiento y alta calidad. No siendo posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola técnica analítica. La mayoría de las técnicas analíticas recomendadas para el análisis de alimentos, seguridad y calidad alimentaria son: Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC), Electroforesis Capilar (CE) acoplada a Espectrometría de Masas (MS) y Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).<sup>10</sup>

En Lima realizaron el estudio **“Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de Sacha Inchi (Plukenetia volubilis y Plukenetia huayllabambana)”**. Donde se determinó la composición proximal, el perfil de aminoácidos, el perfil de ácidos grasos y el contenido de antinutrientes (como saponinas y taninos) en las semillas y tortas (residuo después de la extracción del aceite) de dos especies de Sacha Inchi, el estudio demostró que de las especies Plukenetia huayllabambana y Plukenetia volubilis. Las semillas de P. huayllabambana, proveniente de la provincia Rodríguez de Mendoza,

poseen mayor contenido de aceite (54,3 versus 49,0%), mientras que las procedentes de la provincia de San Martín P. volubilis mostraron mayor contenido de proteínas (29,6 versus 24,5 %). Asimismo, el contenido proteico de la torta de P. volubilis es mayor que el de P. huayllabambana (59 y 46%, respectivamente). El contenido de aminoácidos se determinó por HPLC usando un Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (HPLC), Elite LaChrom: bomba L-2130, detector DAD L-2455, Software EZChrom Elite Client/Server versión 3.2. La columna analítica utilizada fue Superspher® STAR RP-18e (250 mm x 4,6 mm, 4 µm de tamaño de partícula). El resultado nos indica que el contenido de aminoácidos esenciales de las semillas de ambas especies de Plukenetia es el adecuado de acuerdo a lo recomendado por la FAO/OMS, a excepción de los aminoácidos lisina y leucina. Tanto en semillas como en tortas, la concentración de ácido linoleico (omega-6) es mayor en P. volubilis, mientras que el linolénico (omega-3) se encuentra en mayor proporción en P. huayllabambana.<sup>11</sup>

En Puno realizaron la tesis **“Obtención del concentrado proteico y determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet)”**. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo la extracción del concentrado proteico y su posterior determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (Lupinus mutabilis Sweet): Yunguyo I y Negra de Sacacatani. La extracción del concentrado proteico se realizó por el método de punto isoeléctrico a pH de 4.5 y temperaturas de 30°C y 40°C con 3 repeticiones por tratamiento, dando mejores resultados de extracción los tratamientos realizados a la temperatura de 40°C en ambas variedades. La determinación del perfil de aminoácidos se realizó mediante el método HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Performance), los resultados se sometieron a una prueba de hipótesis utilizando la distribución de t-student (nivel de significancia del 5%), el

cual demostró que no existe diferencia significativa en cuanto a la composición del perfil de aminoácidos entre las dos variedades.<sup>12</sup>

## **2.2. Técnicas Analíticas**

Las técnicas analíticas adecuadas para el análisis de aminoácidos deben ser repetibles y reproducibles, además de robustas. Es sabido que en los últimos años se han obtenido avances importantes en el desarrollo e implementación de diferentes técnicas analíticas, para identificar y cuantificar aminoácidos. Sin embargo, dada las características especiales de estos aminoácidos no es posible analizar todos los aminoácidos con una sola técnica analítica por lo que se recomienda usar combinadamente diferentes técnicas e instrumentos que nos brinden resultados confiables de estos análisis.<sup>10</sup>

Las técnicas analíticas de elección en los estudios de aminoácidos son: Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC), Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC), Electroforesis Capilar (CE), Resonancia Magnética Nuclear (NMR). Estas técnicas pueden ser acopladas a Masas (MS) para permitir una mejor separación, detección, caracterización y cuantificación de metabolitos y sus aminoácidos. Otras técnicas: Espectroscopia Infrarroja Cercana (NIR).<sup>10</sup>

### **2.2.1. Cromatografía de Gases (GC)**

Técnica analítica que nos permite separar compuestos usando una columna cromatográfica. Los principios generales de la Cromatografía y las relaciones matemáticas son aplicables a la Cromatografía de Gases (GC). Aplicando la ecuación de Van Deemter de la siguiente manera:

$$H = A + \frac{B}{v} + C_v$$

*Donde  $v$  es velocidad lineal y  $A$ ,  $B$  y  $C$  son constantes.  $A$  es independiente de la velocidad y representa la "Difusión de Eddy", cuando las partículas de la columna son uniformemente pequeñas, el valor de  $A$  es el más bajo  $B$  es la difusión axial o la tendencia a la difusión natural de las moléculas y este efecto se disminuye a altas tasas de flujo, por lo que este término se divide por  $C_v$ , que se debe a la resistencia cinética del equilibrio en el proceso de separación.<sup>13</sup>*

Como las velocidades de difusión son mucho mayores en los gases, cerca de  $10^4$  más que en los líquidos, el término  $B/v$  es más importante en GC que en Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC).<sup>13</sup>

En GC, la muestra es volatilizada e inyectada en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra deba ser volátil y estable en temperatura. La elución es producida por el flujo de un gas inerte como Helio, Nitrógeno, Hidrógeno; aun que de acuerdo con el tipo de detector es necesario usar gases específicos.<sup>13</sup>

Existen dos tipos de GC:

### **A. Cromatografía de Gas Sólido (GCS)**

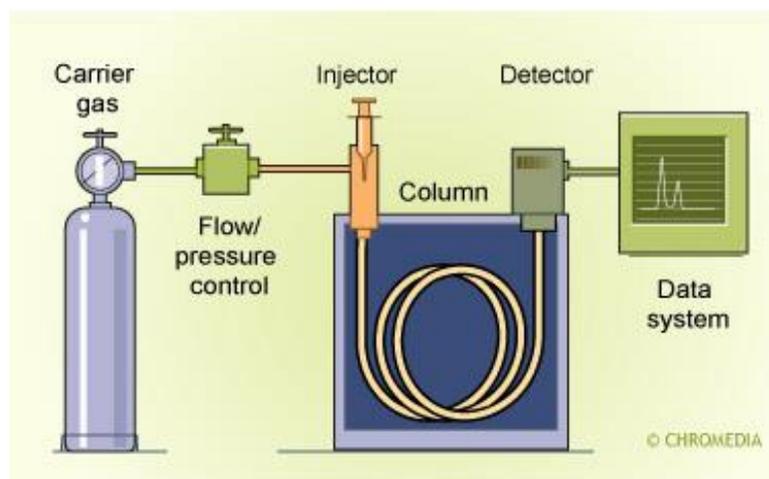
La aplicación de este tipo de GC es limitada a moléculas polares, la fase estacionaria es un sólido sobre el que se retienen los analitos por adsorción física. Como la retención de las moléculas activas o polares no es permanente suelen presentarse colas.<sup>13</sup>

### **B. Cromatografía de Gas Líquido (GCL)**

Es la forma más usada en gases, se utiliza como fase estacionaria un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte, esta fase debe ser estable y no volátil a las temperaturas empleadas en el análisis, y de naturaleza similar a las muestras que se desea separar en ella.<sup>13</sup>

## Componentes Principales de un Cromatógrafo de Gases

- Gas portador (contiene la fase móvil).
- Reguladores de presión.
- Inyector que incluya un sistema para el control de la temperatura.
- Columna Cromatográfica.
- Detector que incluya un sistema para el control de la temperatura.
- Sistema receptor, procesador y de almacenamiento de la información.<sup>14</sup>



**FIGURA 1. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases**

Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

## Columnas

La columna es el corazón del sistema cromatográfico, la muestra se separa en la columna y las diferentes propiedades y características de la columna determinan la potencia de separación y la velocidad de análisis.<sup>13</sup>

En general podemos distinguir dos tipos importantes de columnas:

**Columnas empaquetadas**, consisten en un tubo (de vidrio) con un diámetro interior de aproximadamente 2 - 4 mm, que está empaquetado con partículas porosas pequeñas. Estas partículas

pueden ser la fase estacionaria real o servir como soporte para una fase estacionaria líquida. A pesar de su declinante popularidad a favor de las columnas capilares, las columnas empacadas siguen siendo ampliamente utilizadas, especialmente en el análisis de rutina para fines petroquímicos.<sup>13</sup>

**Columnas capilares**, consisten en un tubo con un diámetro interior de 0,10 a 0,53 mm. En contraste con las columnas empaquetadas, la fase estacionaria se aplica sobre la pared interior de la columna.<sup>13</sup>

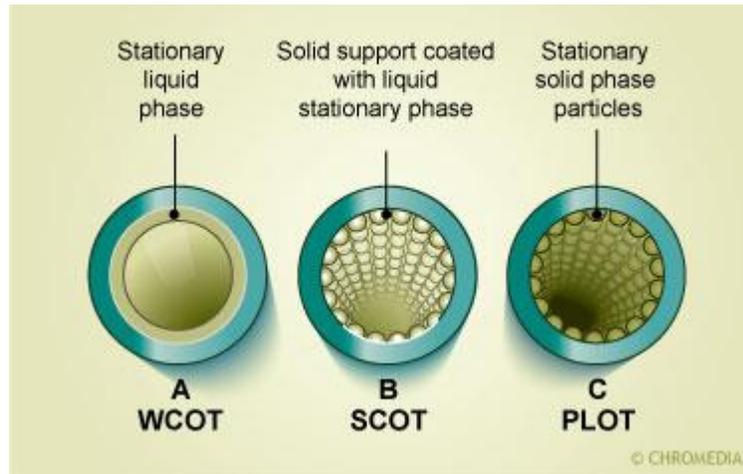
Se distingue entre:

- Columnas de orificio estrecho (0,25 mm).
- Columnas de orificio medio (0,32 mm).
- Columnas de orificio ancho o mega-orificio (0,53 mm).

Hay varios tipos de columnas capilares:

- WCOT (columnas tubulares abiertas revestidas de pared).
- PLOT (capa porosa abierta tubular).
- SCOT (soporte recubierto abierto tubular).

Las columnas micro-empacadas o los capilares empaquetados son columnas empotradas de muy estrecho diámetro (<1 mm). Sólo columnas WCOT y PLOT son relevantes para GC capilar.<sup>13</sup>



**FIGURA 2. Sección transversal de las columnas capilares**

Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

## Detectores

El detector es el "ojo" del sistema cromatográfico. El detector visualiza el resultado de la separación cromatográfica registrando si "algo" o "nada" se eluye de la columna. En la cromatografía de gases capilar, 'algo' es una mezcla del o de los analitos y del gas portador; 'Nada' es puro gas portador.<sup>13</sup>

Los detectores deben ser precisos, reproducibles, lineales, etc., porque las cantidades de muestra introducidas en el sistema GC son muy pequeñas. La sensibilidad, la estabilidad y la robustez totales son también factores importantes para la selección de un detector adecuado.<sup>13</sup>

Características esenciales de un detector, debe ser: Universal / Selectivo, Sensibilidad, Bajo nivel de ruido, Linealidad, Precisión (reproducibilidad), Mantenimiento, Velocidad, Confiabilidad, Facilidad de uso, Bajo costo (compra y operación).<sup>13</sup>

Detector	Principio de Operación	Aplicación	LOD	Linearidad	Tipo	Gas Portador
<b>Conductividad Térmica (TCD)</b>	Conductividad térmica del compuesto frente a la referencia	Universal	$5 \times 10^{-9}$ g/mL	$10^4$	C	H <sub>2</sub> , He, N <sub>2</sub>
<b>Ionización por Llama (FID)</b>	Disociación térmica e ionización	U para C-H orgánicos	$3 \times 10^{-12}$ c/s	$10^6$	Flujo de masa	H <sub>2</sub> , He, N <sub>2</sub>
<b>Captura de Electrones (ECD)</b>	Corriente reducida de electrones de fondo por ionización del compuesto	Selectivo para compuestos electro-negativos	$5 \times 10^{-15}$ g/s	$10^4$	C	N <sub>2</sub> , Ar, H <sub>4</sub> , He + gas de maquillaje
<b>Nitrógeno-Fósforo (NPD)</b>	Ionización por fuente de termo-ionización	S para P y N, halógenos	P: $10^{-14}$ g/s N: $10^{-13}$ g/s	$10^5$	Flujo de masa	H <sub>2</sub> , He, N <sub>2</sub>
<b>Detector Fotométrico de Llama (FPD)</b>	Quimioluminiscencia	S para S y P, halógenos	P: $4 \times 10^{-12}$ g/s S: $4 \times 10^{-11}$ g/s	P: $10^4$ S: $10^3$	Flujo de masa	H <sub>2</sub> , He, N <sub>2</sub>
<b>Espectrómetro de masas (MS)</b>	Separación en masa de fragmentos de moléculas ionizadas	Todo tipo de compuestos	< 10 pg absoluto		Flujo de masa	He

**TABLA 1. Descripción general de los principales detectores de GC.**  
Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

### 2.2.2. Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

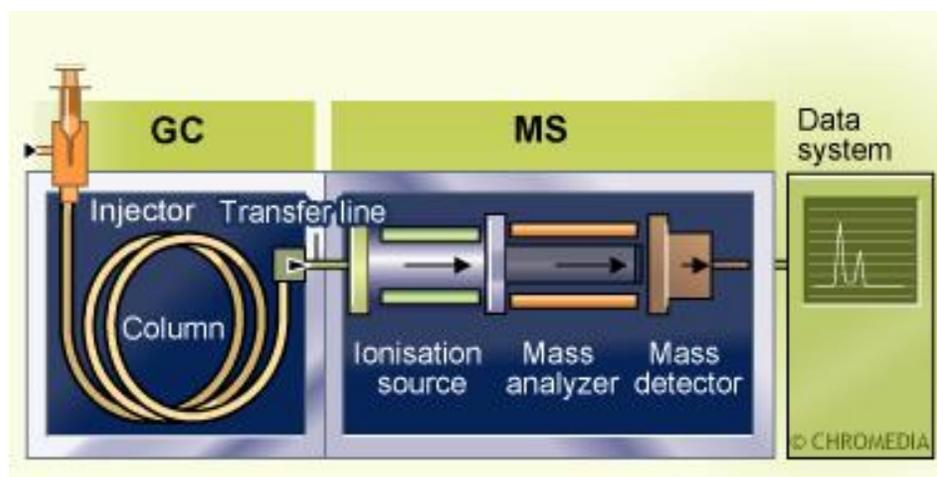
La combinación del poder de separación de la Cromatografía de Gases con las capacidades de identificación de la Espectrometría de Masa (MS) nos proporciona probablemente la técnica más poderosa de identificación de separación disponible hoy en día.<sup>13</sup>

La GC por sí misma puede ofrecer una fuerte evidencia de identidad a partir de las características de retención, particularmente si se conoce la matriz de la muestra, pero esta evidencia nunca es concluyente y nunca será aceptada como prueba legal de identificación.<sup>13</sup>

Tales situaciones se dan comúnmente en el monitoreo ambiental donde las muestras son frecuentemente complejas. Es esencial que los niveles de compuestos tóxicos en las emisiones atmosféricas, descargas acuosas, etc., se mantengan por debajo de los límites especificados, pero éstos a menudo se co-eluyen con otros compuestos cuando se someten a GC.<sup>13</sup>

También puede acoplarse GC-FTIR (Espectrometría Infrarroja Transformada por Fourier). También RMN (Resonancia Magnética Nuclear) que es una poderosa técnica para obtener información espectroscópica adicional en química analítica.<sup>13</sup>

Ambas técnicas proporcionan excelente, información adicional en la elucidación de estructura de compuestos desconocidos. El uso de detectores selectivos o específicos que sólo responden a los compuestos de interés a veces puede ayudar pero la opción más aceptable es aplicar GC-MS.<sup>13</sup>



**FIGURA 3. Diagrama de un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrometría de Masa.**

Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

La GC-MS no sólo es muy sensible y selectiva, sino que también proporciona espectros de masas, que son muy útiles para la confirmación e identificación de la estructura química de los picos de elución de la columna. Existen grandes bibliotecas digitales de datos espectrales soportan esta técnica tan potente.<sup>13</sup>

## **Aplicaciones**

En Farmacéutica, las plantas medicinales son de gran interés para el investigador en el campo de la biotecnología, ya que la mayoría de las industrias farmacéuticas dependen de las plantas medicinales para la producción de compuestos farmacéuticos. Las plantas son las fuentes tradicionales de muchos productos químicos utilizados como productos bioquímicos farmacéuticos, fragancias, colores de alimentos y sabores en diferentes países, especialmente en la India. La mayoría de los medicamentos a base de hierbas y sus productos derivados se prepararon a menudo a partir de extractos de plantas crudas, que comprenden una mezcla compleja de diferentes componentes fitoquímicos (metabolitos secundarios de plantas).<sup>15</sup>

Las características químicas de estos constituyentes difieren considerablemente entre las diferentes especies. El método GC-MS utilizado para el análisis de los extractos obtenidos es una herramienta interesante para probar la cantidad de algunos principios activos en las hierbas utilizadas en la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria.<sup>15</sup>

Por ejemplo en el estudio de identificación de compuestos bioactivos del extracto etanólico de la planta de *Evolvulus alsinoides* por cromatografía de gases y espectroscopia de masas (GC-MS). Se realizó el análisis de GC-MS del extracto etanólico mediante protocolo estándar utilizando el equipo Thermo GC-Trace Ultra Versión: 5.0,

Thermo MS DSQ II. El análisis de GC-MS reveló la presencia de diversos compuestos como piperina, ácidos octodecanoicos, ácido hexadecanoico y escualeno en el extracto etanólico de *Evolvulus alsinoides*.<sup>15</sup>

En Clínica / Biotecnológica, la detección de metabolitos anormales en orina es importante para el diagnóstico de un elevado número de errores congénitos del metabolismo (ECM), por lo que son necesarios métodos de cribado que simultáneamente permitan la detección y la cuantificación de forma fiable de un elevado número de moléculas. Por ejemplo en el estudio Aplicación de la Espectrometría de Masas en Tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel, se desarrolló un método de MS/MS con ionización por electrospray (ESI) en modo de ionización positiva y negativa, para detectar aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos como marcadores en muestras de orina impregnadas en papel de filtro. La sensibilidad de la MS/MS permite el análisis de los metabolitos seleccionados en una muestra biológica de reducido tamaño y baja concentración, como es la orina impregnada en papel de filtro.<sup>16</sup>

### **2.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Sabemos que la Cromatografía Líquida en columna (LC) es una de las técnicas analíticas de crecimiento más acelerado, esto se debe a sus excelentes resultados y capacidades. Este método puede ser aplicado a una mayor variedad de matrices en comparación a otras técnicas de separación y se puede aplicar también a mezclas extremadamente complejas.<sup>17</sup>

Como resultado de los avances tecnológicos de las últimas décadas que han aportado mejoras significativas a la instrumentación y el

empacado de las columnas, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) ha surgido como la técnica preferida para la separación y el análisis cuantitativo de una amplia gama de aminoácidos. Los análisis de HPLC modernos son rápidos y eficientes, y pueden llegar a detectar porciones tan pequeñas como picogramos de algunos materiales. Las oportunidades para la aplicación de HPLC son casi ilimitadas, con el resultado de que los equipos HPLC se han convertido en herramientas indispensables para una variedad de científicos e industrias.<sup>17</sup>

La Cromatografía Líquida se basa en el fenómeno de que, en las mismas condiciones, cada componente de una mezcla normalmente interactúa con su entorno de manera diferente. Cuando se utiliza como una herramienta analítica, LC puede determinar la cantidad de componentes en una mezcla, cuánto de cada uno está presente y el grado de pureza de cada componente. La técnica HPLC es una técnica para hacer separaciones de precisión de mezclas complejas y ofrece una capacidad de separación de alta resolución para resolver problemas más rápido y mejor.<sup>17</sup>

Sin embargo, el sistema HPLC no describe a un instrumento analítico típico en el que se introduce la muestra en el instrumento, y luego el equipo da una señal (analógica o digital) que representa la cantidad presente. El sistema debe ser configurado y ajustado antes de que la muestra se coloque en el dispositivo. Por lo tanto, para tener éxito con HPLC, se necesita tiempo suficiente para "configurar" el instrumento antes de cada análisis.<sup>17</sup>

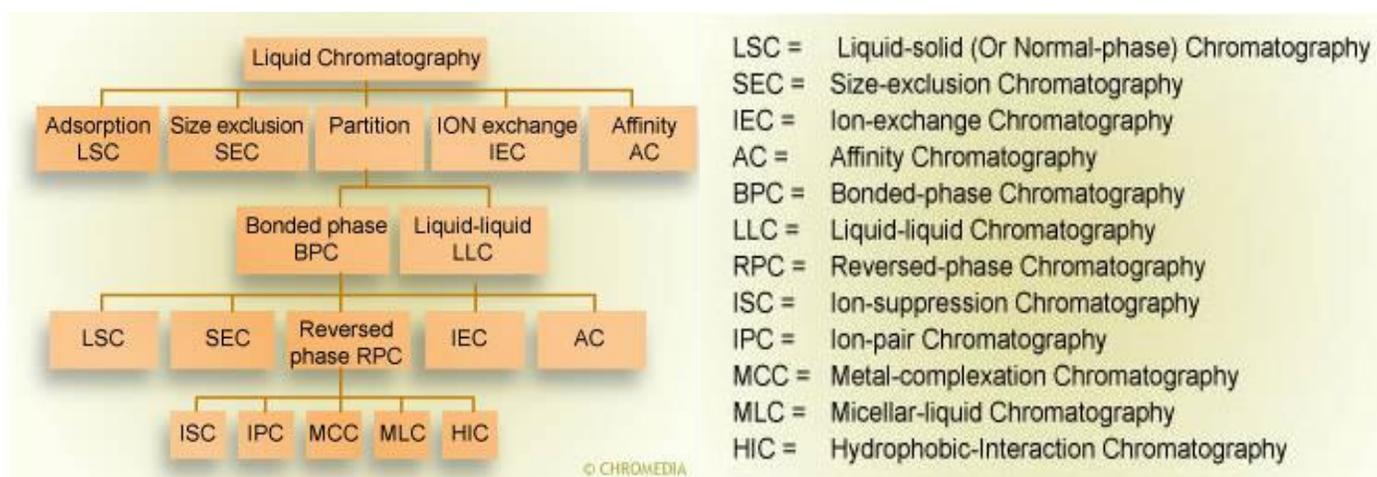
Esto puede ocurrir en horas o días dependiendo del problema (aplicación), el conocimiento del operador, y el tipo de experimentación que se hace. Con experiencia y un conocimiento práctico de la

literatura, los métodos de HPLC se pueden desarrollar de manera efectiva en un tiempo razonable.<sup>17</sup>

En los primeros días de HPLC, la cromatografía de fase directa o normal (LSC) y también la cromatografía líquido - líquido (LLC) eran los métodos de separación más importantes disponibles. Estas técnicas requirieron tiempos de equilibrado relativamente largos, lo que dificultó seriamente el desarrollo eficiente del método y el rendimiento de la muestra en el laboratorio.<sup>17</sup>

Dada esta dificultad, el descubrimiento de fases unidas químicamente (CBP) hace aproximadamente cuatro décadas fue un avance histórico para la cromatografía.<sup>17</sup>

Con el advenimiento de los CBP, diferentes funcionalidades se han incluido. Esto, a su vez, permitió el desarrollo de nuevos modos de separación, incluyendo el intercambio de iones, la afinidad y la cromatografía de exclusión de tamaño.<sup>17</sup>



**FIGURA 4. Modos de separación más importantes en HPLC**  
Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

Si la fase estacionaria es una fase sólida hablamos de Cromatografía Sólida Líquida (LSC) o cromatografía de adsorción. Esto se llama cromatografía de "fase normal" si la fase estacionaria es polar. La fase estacionaria también puede ser una fina película líquida, adsorbida a la partícula sólida. Estas fases líquidas están unidas (por interacciones físicas o químicas) a la superficie.<sup>13</sup>

La cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) es una sub-técnica extremadamente importante de HPLC que emplea un subconjunto importante de la CPB. La técnica es fácilmente reconocible ya que, en comparación con las técnicas de fase normal o recta, invierte la polaridad del adsorbente original así como la polaridad de la fase móvil.<sup>13</sup>

En la cromatografía de fase normal, la fase sólida es polar. Por el contrario, en la cromatografía líquida de fase inversa (RPLC), la fase estacionaria se ha tratado con un revestimiento para que se vuelva no polar mientras que la fase móvil es polar.<sup>13</sup>

### Componentes Principales en HPLC

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bombas).
- Dispositivo de Inyección.
- Columna.
- Detector.
- Registrador/Procesamiento de datos.



**Figura 5. Componentes de un HPLC**

Fuente: Agilent Technologies.<sup>18</sup>

## **Columnas**

El desarrollo de columnas en HPLC se ha caracterizado por la disminución de las dimensiones de las columnas y el diámetro de partícula en fase estacionaria.<sup>13</sup>

Estas dimensiones afectan el rendimiento y los requisitos del sistema, así como la calidad cromatográfica final del sistema. Aunque las técnicas modernas de envasado producen columnas robustas y reproducibles, su vida útil sigue dependiendo del manejo y almacenamiento adecuados por parte del usuario final.

La longevidad de la columna puede prolongarse mediante la selección correcta de la química de fase estacionaria y también mediante el uso de columnas de protección para proteger contra las partículas y la contaminación de las columnas.<sup>13</sup>

## **Detectores**

Los detectores de HPLC se pueden dividir en dos categorías:

- Universales, que miden las propiedades a granel de la mezcla líquida (por ejemplo, índice de refracción o constante dieléctrica). Un detector UV es considerado casi universal.<sup>13</sup>
- Específicos, en este caso se mide una propiedad física o química de uno o más componentes de la muestra en condiciones ideales. Por ejemplo los detectores de fluorescencia se consideran específicos.<sup>13</sup>

Los detectores universales detectan cualquier compuesto a través de las propiedades masivas de su solución, mientras que los detectores específicos responden a las propiedades físicas o químicas del compuesto de la muestra. Los límites del detector (límite de detección,

límite de identificación y límite de cuantificación) están en función de la sensibilidad del detector y del ruido del detector y se definen como las cantidades de analito que generan una señal que es un factor dado más alto que la desviación estándar de La señal en blanco (es decir, el ruido). Otras figuras de mérito, incluyendo el volumen muerto del detector y el rango dinámico lineal deben considerarse al elegir un detector.<sup>13</sup>

#### **2.2.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas (MS)**

La cromatografía líquida puede separar con seguridad una gama muy amplia de compuestos orgánicos, desde metabolitos de fármacos de moléculas pequeñas hasta péptidos y proteínas.<sup>19</sup>

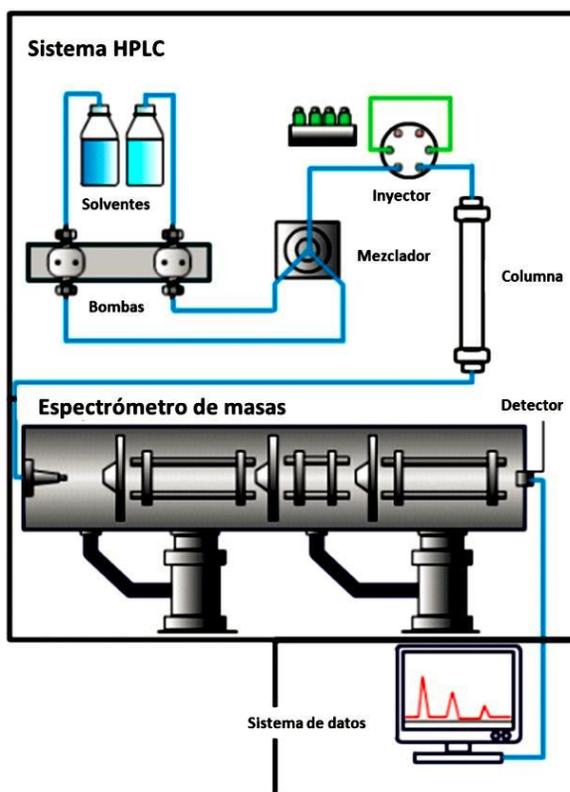
Los detectores tradicionales para cromatografía líquida incluyen detectores de índice de refracción, electroquímicos, fluorescencia y visibles ultravioleta (UV-Vis). Algunos de éstos generan datos bidimensionales; Es decir, datos que representan la señal fuerza en función del tiempo. Otros, incluyendo la fluorescencia y arreglo de diodos. Los detectores UV-Vis, generan datos tridimensionales. Los datos tridimensionales incluyen no sólo la intensidad de la señal sino también los datos espectrales para cada punto en el tiempo.<sup>19</sup>

Los Espectrómetros de Masas generan datos tridimensionales, además de la intensidad de la señal, generan datos espectrales de masa que pueden proporcionar información valiosa sobre el peso molecular, la estructura, la identidad, la cantidad y la pureza de una muestra.<sup>19</sup>

Estos datos espectrales de masas agregan especificidad que aumenta la confianza en los resultados de los análisis tanto cualitativos como cuantitativos.

Para la mayoría de los compuestos, un Espectrómetro de Masas es más sensible y mucho más específico que todos los otros detectores en LC. Pueden analizar compuestos que carecen de un cromóforo adecuado. También pueden identificar componentes en los picos cromatográficos no resueltos, reduciendo la necesidad de una cromatografía perfecta.<sup>19</sup>

Los datos espectrales de masas complementan los datos de otros detectores en LC. Aunque dos compuestos pueden tener espectros UV similares o espectros de masas similares, es raro que tengan ambos.<sup>19</sup>



**FIGURA 6. Componentes de un HPLC acoplado a Masas.**  
Fuente: Agroindustrial Science.<sup>10</sup>

## Aplicaciones

LC-MS es adecuada para muchas aplicaciones, desde el desarrollo farmacéutico hasta el análisis ambiental. Su capacidad para detectar una amplia gama de compuestos con gran sensibilidad y especificidad lo ha hecho popular en una variedad de campos.<sup>19</sup>

La Determinación de Peso Molecular, es una aplicación fundamental de LC-MS. Esta información es clave para la identificación de los analitos. La Determinación Estructural, es otra aplicación fundamental de LC-MS ya que permite obtener información sobre la estructura molecular. Esto puede brindar información de peso molecular si la identidad del analito es ya conocida.<sup>19</sup>

En Farmacéutica, la información disponible en un espectro de masas permite que algunos compuestos se separen aunque estén cromatográficamente sin resolver.<sup>19</sup>

En Bioquímica, se usa para la Identificación rápida de proteínas (aminoácidos) mediante LC-MS/MS capilar y búsqueda de bases de datos.<sup>19</sup>

Los métodos tradicionales de identificación de proteínas generalmente requieren el aislamiento de proteínas individuales mediante electroforesis en gel bidimensional. La combinación de LC-MS/MS capilar con adquisición inteligente, dependiente de datos y búsqueda de bases de datos basadas en la probabilidad, permite identificar rápidamente hasta 100 proteínas en un solo análisis.<sup>19</sup>

En Alimentos, para la identificación por ejemplo de aflatoxinas en los alimentos. Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos en los alimentos por ciertos hongos.<sup>19</sup>

### **2.2.5. Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC)**

Sin duda la introducción de la Cromatografía Líquida de Ultra Resolución (UPLC) ha marcado un cambio radical al abrir nuevas puertas para que los investigadores tengan técnicas rápidas de separación analítica sin sacrificar los resultados de alta calidad obtenidos anteriormente por la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Muchos expertos de laboratorio indican que UPLC sustituirá en última instancia todas las técnicas convencionales de HPLC. El método tradicional de separación HPLC tiene muchas ventajas como robustez, facilidad de uso, sensibilidad y selectividad, pero la principal limitación es la falta de eficiencia en comparación con la cromatografía de gases o la electroforesis capilar.<sup>20</sup>

La técnica UPLC es un derivado de HPLC cuyo principio subyacente es que a medida que disminuye el tamaño de partícula del relleno de la columna, aumenta la eficiencia y, por tanto, la resolución.<sup>20</sup>

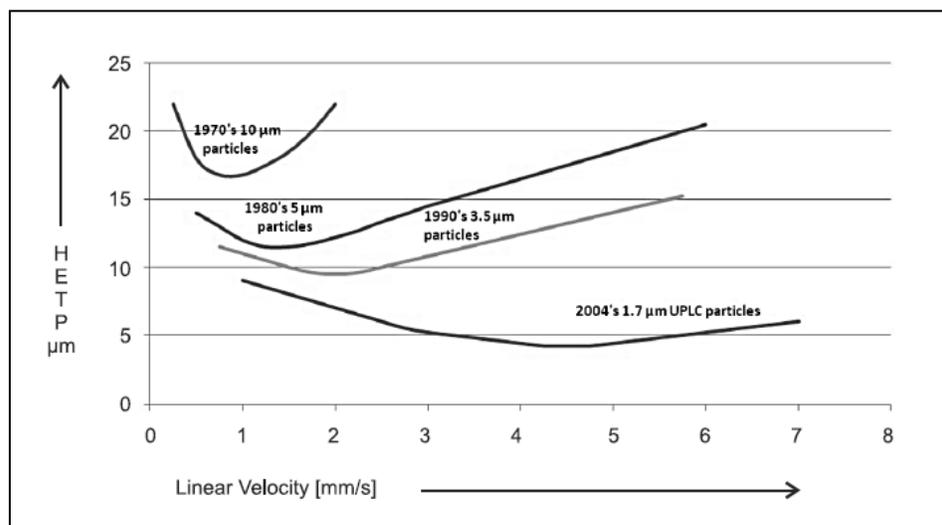
Por ejemplo, si disminuimos el tamaño de partícula a menos de 2  $\mu\text{m}$ , la eficiencia muestra una ganancia significativa y no disminuye a velocidades o caudales lineales incrementados de acuerdo con la ecuación común de Van Deemter. Mediante el uso de partículas más pequeñas, la velocidad de análisis y la capacidad máxima, es decir, el número de picos resueltos por unidad de tiempo, puede prolongarse hasta los valores máximos y estos valores son mucho mejores que los valores obtenidos anteriormente por HPLC.<sup>20</sup>

Además, para mejorar la eficiencia, es necesario llevar a cabo las siguientes acciones:

- Se debe emplear un rango de temperatura elevado, lo que permitirá un alto caudal de la fase móvil reduciendo su viscosidad y así reduciendo significativamente la contrapresión.<sup>20</sup>
- Se deben usar columnas monolíticas, que consisten en una sola pieza de sólido que posee esqueletos interconectados y vías de flujo interconectadas (a través de los poros). Anteriormente, se introdujeron columnas monolíticas exclusivamente para materiales basados en polímeros orgánicos incluyendo geles blandos comprimidos, mientras que columnas cortas (aproximadamente 1mm; Discos monolíticos) para la separación rápida de proteínas. Estas columnas tienen una estructura de soporte porosa polimerizada que proporciona una menor resistencia al flujo que las columnas convencionales.<sup>20</sup>

UPLC es una técnica que comprime las características antes mencionadas y se considera mejor que la técnica HPLC de muchas maneras, ya que muestra una mejor resolución cromatográfica, realiza análisis más sensibles, consume menos tiempo, reduce el consumo de disolvente y tiene alta velocidad de análisis.<sup>20</sup>

La Contribución de pequeñas partículas en UPLC, es el principio basal de esta técnica ya que se rige por la ecuación de Van Deemter. Esta ecuación muestra que la mejora en la eficacia de la técnica de UPLC no puede lograrse sin utilizar un tamaño de partícula más pequeño que los usados en la técnica de HPLC convencional.<sup>20</sup>

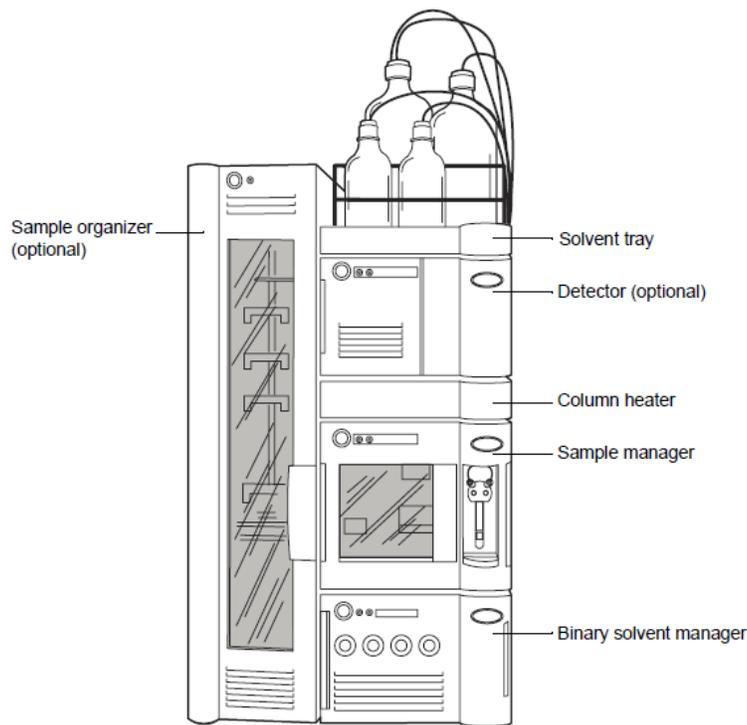


**FIGURA 7. Gráfico Van Deemter ilustra la evolución del tamaño de las partículas en las últimas tres décadas**  
 Fuente: Waters Corporation.<sup>20</sup>

En la Figura 7, el gráfico de Van Deemter demuestra que a medida que el tamaño de partícula disminuye a menos de 2 µm, hay una ganancia significativa en el rendimiento, y esta condición se mantiene bien incluso si hay un aumento en el caudal o velocidades lineales.

### **Componentes de un UPLC:**

El instrumento básico para desarrollar la técnica UPLC tuvo que mantener su tiempo para aprovechar la velocidad, la resolución superior y la mayor sensibilidad proporcionada por partículas pequeñas. Se requirió un diseño con tecnología avanzada en la bomba, inyector automático, detector, sistema de datos y diagnósticos en servicio para cumplir el propósito.



**FIGURA 8. Diagrama de un sistema Waters ACQUITY UPLC System**  
 Fuente: Waters Corporation.<sup>20</sup>

Una bomba ideal para UPLC tiene una capacidad de suministrar disolvente a una presión más alta, alrededor de 15000 psi para el caudal óptimo con una eficiencia máxima a través de una columna de 15 cm de largo rellena con partículas de 1,7  $\mu\text{m}$ . UPLC utiliza dos bombas en serie.<sup>20</sup>

Con un límite de presión de 1000 bar y tienen válvulas selectoras de disolventes incorporadas, que tienen la capacidad de elegir la proporción exacta de disolventes (de hasta cuatro disolventes para este modelo).<sup>20</sup>

El sistema UPLC con su gestor de muestras de diseño de agujas, aborda tres desafíos de diseño para un rendimiento fiable: sellado robusto de la aguja a mayor presión, minimizando la extensión de banda de columna extra para picos estrechos y realizando proceso de

inyección libre de pulso para proteger la columna de fluctuaciones de presión extrema.<sup>20</sup>

Cuando se inicia una inyección, la válvula de inyección desvía el flujo de la aguja para recoger la muestra del vial. La aguja se inserta en el vial para retirar el volumen exacto de la muestra requerida y luego vuelve al puerto de inyección. La aguja es empujada contra la superficie de sellado interno del puerto y la válvula de inyección gira, así la muestra es empujada hacia abajo al puerto de inyección. La dispersión de la muestra puede minimizarse manteniendo una menor distancia entre el orificio de inyección y la válvula de inyección.<sup>20</sup>

Después de inyectar la muestra, la aguja se lava durante un período de tiempo especificado para minimizar el arrastre de la muestra.<sup>20</sup>

## **Columnas**

Las columnas UPLC están constituidas por partículas pequeñas que tienen un tamaño inferior a 2  $\mu\text{m}$ . Las partículas se unen en matriz ya que la fase estacionaria fija es necesaria para proporcionar retención y selectividad. En el mercado están disponibles algunas columnas de fase estacionaria adherida fabricadas por ACQUITY, que pueden ser utilizadas en la técnica UPLC:

- Columnas BEH C18 y C8, estas son cadenas alquilo lineales, las columnas UPLC más preferidas, ya que pueden usarse en un amplio rango de pH. Los ligandos trifuncionales producen estabilidad de pH bajo, que se combina con la alta estabilidad de pH de 1,7 micras partículas BEH para producir la gama de funcionamiento pH utilizable más ancho.<sup>20</sup>
- Columnas BEH Shield R18, que ofrecen selectividad a UPLC ya que complementa columnas C18 y C8.<sup>20</sup>

- BEH Columnas fenílicas, que Poseen alquil C6-etilo trifuncional entre los anillos fenílicos y la funcionalidad sililo.<sup>20</sup>
- Columnas BEH Amide, que son la combinación de la fase amida unida trifuncionalmente con partículas pequeñas BEH proporciona un tiempo de vida de la columna excepcional. Facilitan el uso de una amplia gama de pH de fase, es decir, de pH 2 a 11.<sup>20</sup>

### **Detectores**

Los detectores de fotodiodos UV/visibles ACQUITY PDA y ACQUITY PDA e $\lambda$ , se utilizan generalmente para el análisis de rutina y el desarrollo de métodos, ya que tienen la potencia de detectar y cuantificar las impurezas de trazas.<sup>20</sup>

Las velocidades de datos de estos detectores son de hasta 80 Hz con una especificación de bajo ruido, es decir, 10 Au con una amplia gama de análisis de espectros hasta 500 nm (detector PDA) y 800 nm (detector e $\lambda$ )<sup>20</sup>

Para evitar la dispersión de bandas y la variación de concentración, se utilizan células de flujo de luz de bajo volumen que comprenden Teflon AF, que elimina la absorción interna mediante el uso del principio de reflexión interna total para mejorar la eficiencia de transmisión de luz.<sup>20</sup>

#### **2.2.6. Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC) acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS)**

La cromatografía líquida de alto rendimiento, acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) se ha establecido como el método de elección para la determinación sensible y simultánea de diferentes tipos de vitaminas B (folatos) en una matriz particular, especialmente cuando sólo están disponibles cantidades

mínimas de material. Utilizando un método UPLC-MS/MS previamente desarrollado y validado como punto de partida, en el informe sobre el desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida de ultra-rendimiento (UPLC-MS/MS) para el análisis de folatos en arroz, se demuestra el rendimiento y mejor resolución de la técnica UPLC que se realizó en condiciones de gradiente en una columna Acquity HSS T3, seguido de detección por espectrometría de masas en tándem. El método fue validado en base a linealidad, sensibilidad, precisión y efectos de matriz. Los límites de detección y los límites inferiores de cuantificación variaron entre 0,06 y 0,45 microg / 100 g y 0,12 y 0,91 microg / 100 g, respectivamente. Se establecieron dos curvas lineales de calibración, una para el bajo y otra para el rango de alta concentración. El análisis de la distribución y de los niveles de folatos en el arroz silvestre y en el biofortificado con folato mostró un enriquecimiento de hasta 50 veces en arroz biofortificado, con niveles totales de folato de hasta 900 microg / 100 g de arroz. Esta es la primera implementación exitosa de un método UPLC para la determinación cuantitativa rápida y sensible de folatos en material vegetal.<sup>21</sup>

### **Aplicaciones**

El mayor éxito de esta técnica ha sido aplicado al campo farmacéutico en la identificación y cuantificación de numerosos fármacos  $\beta$ -bloqueantes y fármacos diuréticos en formulaciones farmacéuticas con el objetivo de reducir el tiempo de análisis y mantener una buena eficiencia.<sup>22</sup>

Algunos de puntos de discusión de esta técnica son:

- Análisis rápido de productos.
- Identificación de metabolitos.
- Estudios de bioequivalencia.

- Detección de impurezas.
- Pruebas de disolución.

### **2.2.7. Electroforesis Capilar (CE) acoplada a Espectrometría de Masas (MS)**

El último objetivo de la investigación metabolómica es abordar eficazmente un problema biológico o clínico específico. Para lograr este objetivo, las técnicas de separación analítica se utilizan cada vez más para analizar el perfil global de metabolitos (endógenos) en muestras biológicas. En la actualidad, el perfil de los metabolitos endógenos se realiza comúnmente con Cromatografía Líquida acoplado a Masas (LC-MS). Independientemente de los desarrollos importantes en la tecnología y metodología de las columnas de LC, el análisis selectivo y eficiente de los metabolitos ionogénicos (altamente) polares sigue siendo muy difícil.<sup>13</sup>

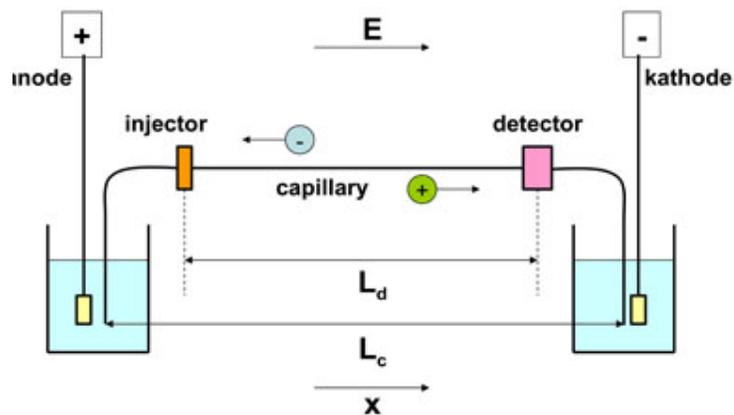
En CE, los compuestos se separan en base a diferencias en su movilidad electroforética intrínseca, que depende de la carga y del tamaño del analito.<sup>13</sup>

Por lo tanto, CE es muy adecuado para el análisis de metabolitos polares y cargados. Además, dado que el mecanismo de separación de CE es fundamentalmente diferente de las técnicas de separación cromatográficas, se proporciona una vista complementaria sobre la composición de metabolitos presentes en muestras biológicas.<sup>13</sup>

En comparación con otras técnicas analíticas, el uso de CE-MS en el campo de la metabolómica es todavía relativamente bajo. CE-MS a menudo se considera un desafío técnico con enfoque en sus limitaciones tales como su sensibilidad a baja concentración, la variabilidad del tiempo de migración y la robustez del método puede

haber impedido el uso generalizado de esta tecnología. Sin embargo, es interesante observar que CE-MS se ha utilizado para el perfil global y reproducible de péptidos nativos y (endógenos) metabolitos en un entorno clínico durante más de una década.<sup>13</sup>

Montaje estandarizado de un aparato CE:



**FIGURA 9: Sistema capilar con detección instrumental**

Fuente: Chromedia Analytical Science.<sup>13</sup>

La dirección del campo eléctrico es de izquierda a derecha; La longitud del capilar entre los electrodos es  $L_c$ , entre el inyector y el detector  $L_d$ . Los iones que tienen una movilidad positiva ( $\mu > 0$ ) se mueven en dirección positiva, es decir, de izquierda a derecha, los iones que tienen una movilidad negativa ( $\mu < 0$ ) se mueven en dirección negativa, es decir, de derecha a izquierda. La misma regla se aplica al flujo electro osmótico.

La Electroforesis Capilar se ha utilizado ampliamente para el análisis de aminoácidos durante la última década, ya que los instrumentos de electroforesis capilar se han vuelto más robustos y fiables.<sup>23</sup>

## Aplicaciones

En Clínica, por ejemplo Mischak y colaboradores han perfilado péptidos nativos en más de 20,000 muestras de orina humana por CE-MS en diferentes laboratorios con una reproducibilidad entre laboratorios aceptable. Los primeros enfoques CE-MS utilizados para el perfil metabólico global de muestras biológicas fueron introducidos por Soga et al. Sobre la base de estas estrategias desarrolladas de CE-MS, los autores iniciaron Human Metabolome Technologies (HMT), la empresa con sede en Japón que está proporcionando métodos y flujos de trabajo para la metabolómica basada en CE-MS. Hasta el momento, los enfoques y protocolos del HMT se han utilizado para una amplia gama de estudios metabolómicos. En general, los estudios descritos anteriormente demuestran claramente la utilidad y el valor añadido de CE-MS en el campo de la metabolómica.<sup>24</sup>

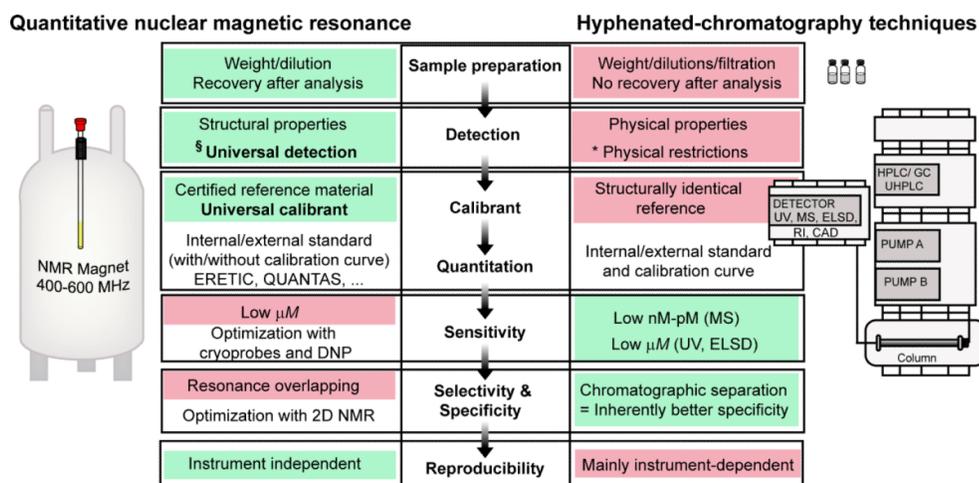
En Alimentos, por ejemplo para caracterizar la composición metabólica de la leche materna humana, Andreas et al. Utilizó una combinación de técnicas analíticas, incluyendo RP LC-MS, GC-MS, RMN 1H y CE-MS, para perfilar una amplia gama de metabolitos. Se definieron un total de 710 metabolitos que abarcan múltiples clases moleculares, de los cuales la mayoría fueron identificados por RP LC-MS.<sup>24</sup>

Los aminoácidos se pueden analizar selectivamente mediante CE-MS en condiciones de separación de pH bajo utilizando un capilar de sílice fundido.<sup>24</sup>

### **2.2.8. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) acoplada a Espectrometría de Masas (MS)**

La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una herramienta analítica esencial para la elucidación de estructuras desconocidas de compuestos sintéticos y naturales. Además, la RMN tiene la ventaja inherente de proporcionar acceso simultáneo a información tanto cualitativa como cuantitativa.

Esta última se define por la regla de razón primaria: la intensidad de la señal es directamente proporcional al número de núcleos que dan lugar a una resonancia específica. Las mejoras en la instrumentación y tecnología de RMN tales como imanes de alto campo protegidos o blindados, criosondas, técnicas de supresión de disolventes y secuencias de pulso versátiles han llevado a muchos investigadores a explotar más la técnica RMN como una herramienta cuantitativa viable, a pesar de su menor sensibilidad en el rango bajo  $\mu\text{M}$  (Limite de detección LOD) en comparación con la espectrometría de masas (MS, LOD en el rango bajo  $\text{pM}$ ). Hasta la fecha, las mediciones cuantitativas por RMN (qNMR) son al menos tan confiables y precisas como las obtenidas por las técnicas basadas en cromatografía más habituales, a la vez que proporcionan varias ventajas incluyendo desarrollo de métodos simples, preparación de muestra sencilla, tiempos de análisis relativamente cortos y calibración múltiple sin necesidad de materiales de referencia idénticos.<sup>25</sup>



**FIGURA 10. Características de qNMR en comparación con métodos cromatográficos.**  
Fuente: National Institutes of Health.<sup>25</sup>

Las propiedades destacadas en verde y rojo son ventajas e inconvenientes, respectivamente. Las diferentes detecciones hífenizadas con cromatografía analítica (por ejemplo, ultravioleta, UV, espectrometría de masas, MS, evaporación de la dispersión de la luz de detección, ELSD, índice de refracción, RI, detector de aerosol cargado, CAD) se basan en las propiedades físicas de los diferentes analitos en una muestra, restringiendo así la detección a cierto tipo de metabolitos.<sup>25</sup>

Estas propiedades de detección explican las principales diferencias en calibración y cuantificación entre las metodologías. La detección universal y la naturaleza cuantitativa inherente de la técnica RMN permiten el uso de múltiples métodos de calibración con estándares no estructuralmente idénticos, como cualquier material de referencia certificado. La capacidad de detectar todos los metabolitos en una muestra también evita que qNMR sea un método analítico selectivo/específico, especialmente con respecto a las resonancias solapadas.<sup>25</sup>

Adicionalmente, qNMR sufre de sensibilidad relativamente baja de detección, particularmente cuando se compara con la detección de MS. La reproducibilidad de la cromatografía hifenizada puede verse obstaculizada en cada nivel del sistema analítico (es decir, inyección de muestras, bombas, eficiencia de la columna y calibración del detector). Por el contrario, qNMR combina el análisis de muestras y la detección en un proceso de un solo paso.<sup>25</sup>

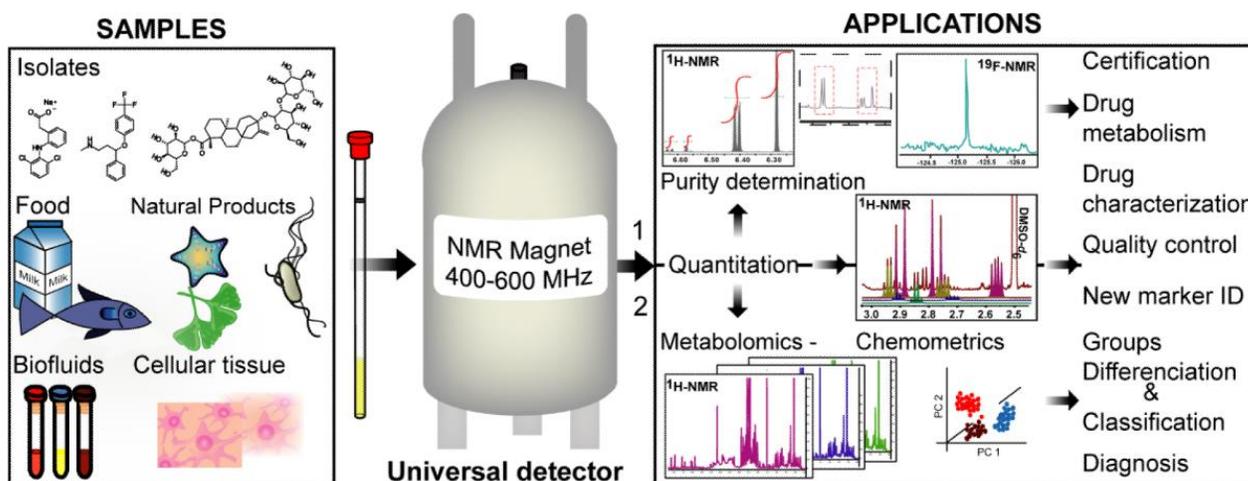


FIGURA 11. Variedades de muestras y panel de aplicaciones de qNMR  
Fuente: National Institutes of Health.<sup>25</sup>

## Aplicaciones

Las aplicaciones actuales de qNMR se pueden dividir en dos grupos principales:

- Cuantificación absoluta y determinación de pureza de compuestos orgánicos (fármacos, metabolitos primarios, productos naturales).
- Metabolómica y cuantificación de múltiples analitos en matrices naturales complejas (por ejemplo, alimentos, botánicos, biofluidos).

Esencialmente, todos los tipos de metabolitos (por ejemplo, azúcares, ácidos grasos, ácidos orgánicos, esteroides) pueden detectarse por la

técnica RMN, explicando por qué se puede investigar una amplia gama de muestras. Por lo tanto, las aplicaciones de qNMR cubren la certificación de pureza, la identificación y cuantificación de metabolitos de fármacos, el control de calidad de productos alimenticios y remedios herbales, la identificación de biomarcadores en matrices naturales complejas (por ejemplo, mezclas de hierbas, biofluidos) y finalmente el diagnóstico clínico.<sup>25</sup>

La Resonancia Magnética Nuclear fue promovida por diversos científicos que por ejemplo estudiaron el perfil de metabolitos en suero para identificar biomarcadores en posibles candidatos que pueden predecir la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama. Se estudiaron por ejemplo los perfiles metabólicos de suero de pacientes con tratamiento completo (n ¼ 8), parcial (n ¼ 14) y sin respuesta (n ¼ 6) a la quimioterapia utilizando una combinación de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR), Espectrometría de Masas acoplada a Cromatografía Líquida (LC-MS) y métodos de análisis estadístico. Las concentraciones de cuatro metabolitos, tres (treonina, isoleucina, glutamina) de NMR y uno (ácido linolénico) de LC-MS fueron significativamente diferentes al comparar la respuesta a la quimioterapia. Un modelo de predicción desarrollado mediante la combinación de metabolitos derivados de NMR y MS identificó correctamente al 80% de los pacientes cuyos tumores no mostraron respuesta completa a la quimioterapia. Estos resultados son prometedores para estudios más amplios que podrían resultar en protocolos de tratamiento más personalizados para pacientes con cáncer de mama.<sup>26</sup>

La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear se utiliza también para estudiar la estructura de moléculas, la interacción de

varias moléculas, la cinética o dinámica de moléculas y la composición de mezclas de soluciones biológicas, sintéticas o compuestos.<sup>27</sup>

El tamaño de las moléculas analizadas puede variar desde una pequeña molécula orgánica o metabolito hasta un péptido de tamaño medio o un producto natural, hasta llegar a proteínas de varias decenas de kDa (unidad de masa atómica unificada) de peso molecular.<sup>27</sup>

La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear complementa otras técnicas estructurales y analíticas tales como rayos X, cristalografía y espectrometría de masas MS.<sup>27</sup>

La ventaja de la RMN es la capacidad única de un espectrómetro nuclear para permitir tanto el estudio no destructivo como el cuantitativo de moléculas en solución y en estado sólido, así como para permitir el estudio de fluidos biológicos.<sup>27</sup>

En Seguridad Alimentaria, la cadena mundial de suministro de alimentos plantea serios desafíos a los productores, marcas, Gobiernos. Una competencia mundial cada vez más intensa, un creciente número de contaminantes y una fuerte demanda de control de calidad de los alimentos están aumentando constantemente el número de regulaciones estrictas.<sup>27</sup>

Por ejemplo, en el estudio “El análisis espectral de RMN 1H como un nuevo aspecto para evaluar la estabilidad de algunos aceites comestibles”: La estabilidad oxidativa es uno de los indicadores más importantes para mantener la calidad de los aceites comestibles. La huella digital de RMN 1H se usa para evaluar la estabilidad de aceites comestibles a temperatura ambiente.<sup>28</sup>

Las asignaciones de las señales de RMN 1H de los componentes mayor y menor de los aceites comestibles no oxidados y la predicción de la estabilidad del aceite se dieron como sigue: El aceite de oliva virgen extra (EVOO) mostró b-sitosterol, mientras que el aceite de moringa (MO) mostró b-sitosterol y estigmasterol. MO mostró una fracción de no-glicéridos, cadenas alifáticas y olefinas. El aceite de girasol (SO) se podría distinguir fácilmente debido a su alto contenido de ácido linolénico seguido de aceite de semilla de albaricoque (AKO). El orden de estabilidad de los aceites comestibles en el estudio fue: MO> EVOO> AKO> SO. Los datos espectrales de RMN 1H coincidieron con los resultados obtenidos con el método Rancimat para la determinación de la estabilidad oxidativa de los aceites comestibles estudiados. Las principales ventajas de la técnica RMN son el corto tiempo de análisis, la posibilidad de analizar muestras sin ningún tratamiento preliminar y la pequeña cantidad de muestra requerida.<sup>28</sup>

En Farmacéutica y Alimentos, la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear es una técnica analítica universal y cuantitativa. Al ser una herramienta estructural única, la RMN también compite con las técnicas metrológicas para la determinación de la pureza y el análisis del material de referencia. En la investigación farmacéutica, las aplicaciones de RMN cuantitativa (qNMR) cubren principalmente la identificación y cuantificación de fármacos y metabolitos biológicos.<sup>25</sup>

qNMR se ha convertido en el método de elección para estudios metabolómicos y control de calidad de muestras naturales complejas tales como alimentos, plantas o remedios herbales, y biofluidos, ofreciendo una visión imparcial de la composición de la muestra y la posibilidad de cuantificar simultáneamente compuestos múltiples. En este sentido, se han incrementado considerablemente los estudios

metabolómicos basados en la RMN, dedicados tanto a la caracterización de los remedios herbales como al diagnóstico clínico.<sup>25</sup>

### **2.2.9. Otras técnicas**

#### **Espectroscopia Infrarroja Cercana (NIR)**

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) es una técnica analítica rápida, barata y generalmente no destructiva que ha ido ganando prominencia en aplicaciones de control de calidad de producto / proceso en industrias agrícolas, alimentarias, farmacéuticas y químicas. La base de esta tecnología radica en el hecho de que la energía electromagnética NIR es absorbida por moléculas orgánicas y, según la ley de Beer, la información composicional de una muestra puede extraerse de su espectro de absorbancia NIR. El proceso de extracción de información sobre la concentración de un componente específico a partir de datos espectrales - calibración - es el principal paso para hacer que la espectroscopia NIR funcione para una aplicación cuantitativa o cualitativa específica.<sup>23</sup>

El propósito del procedimiento de calibración del espectrómetro es establecer una relación matemática satisfactoria entre las propiedades ópticas (reflectancia o datos espectrales de transmitancia) del material bajo investigación y la concentración conocida de uno o de algunos de sus constituyentes. Una vez que este modelo matemático se encuentra y se valida (prueba), puede aplicarse para la predicción de la concentración del constituyente en muestras con composición desconocida. La exactitud y la precisión de los valores de concentración previstos dependen de muchos factores instrumentales (hardware y software) y factores relacionados con el operador, siendo el principal el modelo de calibración. A diferencia de la predicción, la calibración suele ser un proceso costoso y que consume mucho

tiempo. Por lo tanto, para asegurar la efectividad de este proceso, es muy importante no solo conocer los pasos involucrados, sino también comprender sus implicaciones.<sup>23</sup>

El proceso de calibración del espectrómetro NIR se puede dividir en cuatro grandes pasos secuenciales:

- Recopilación de datos,
- Preparación de conjuntos de datos de calibración y validación,
- Desarrollo de un modelo de calibración,
- Validación del modelo.

## **Aplicaciones**

Con el desarrollo de métodos modernos en la fabricación piensos, por ejemplo aumentar el valor nutricional de la soja mediante la regulación de su composición de aminoácidos ha ganado más atención en la comunidad industrial. Esto, a su vez, ha llamado al desarrollo de nuevas técnicas rápidas y rentables para la medición de aminoácidos.<sup>29</sup>

Por ejemplo en la tesis doctoral *Determination of amino and fatty acid composition of soybeans using near-infrared Spectroscopy* de Igor Vasylyovych Kovalenko, la Espectroscopia del Infrarrojo Cercano (NIR) ha sido aplicada a este problema. El propósito de este experimento fue desarrollar calibraciones NIR y comparar su desempeño para dieciocho aminoácidos usando PLS, redes neuronales artificiales (ANN), y (SVM) métodos de regresión y cinco modelos de espectrómetros NIR. La validación de los modelos de predicción calculados dio como resultado coeficientes de determinación que oscilaron entre 0,04 (triptófano) y 0,91 (leucina y lisina). La mayoría de

los modelos desarrollados fueron utilizables para fines de investigación y cribado de muestras, sin embargo, no se encontró correlación suficiente entre los datos espectrales y las concentraciones de aminoácidos tan importantes como la cisteína y el triptófano. Se estableció que la variación en la capacidad predictiva de los modelos NIR se determinó por la forma en que un determinado aminoácido se correlaciona con la proteína de referencia.<sup>29</sup>

Por lo tanto, la investigación futura debería intentar romper esta correlación mediante la introducción de muestras de calibración con perfiles de aminoácidos no típicos. La comparación de los métodos de calibración demostró que el rendimiento de PLS y LS-SVM fue significativamente mejor que el de ANN, y la elección del método de modelado preferido fue espectrómetro-dependiente.<sup>29</sup>

### **2.3. Fabricación de alimentos para animales mayores (piensos)**

Los alimentos para animales e ingredientes de piensos deben fabricarse y conservarse en condiciones estables para protegerlos de la contaminación por plagas o por contaminantes químicos, físicos o microbiológicos u otras sustancias objetables durante su producción, manipulación, almacenamiento y transporte. Los piensos deben estar en buenas condiciones y cumplir las normas de calidad generalmente aceptadas. Cuando proceda, deberán aplicarse las buenas prácticas agrícolas, las buenas prácticas de fabricación (BPF) y, si corresponde, los principios del Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP) para controlar los peligros que puedan presentarse en los alimentos. Se considerarán las posibles fuentes de contaminación procedente del medio ambiente. Es necesario que quienes producen piensos o ingredientes para piensos, quienes crían animales para obtener alimentos y quienes elaboran tales productos de origen animal colaboren en la identificación de los posibles peligros y de los niveles de

riesgo que entrañan la salud de los consumidores. Esta colaboración permitirá elaborar y mantener opciones apropiadas de gestión de riesgos y prácticas seguras de alimentación animal.<sup>5</sup>

### **2.3.1. Ingredientes de los piensos**

Los ingredientes de los piensos deberán obtenerse de fuentes seguras, y someterse a un análisis de riesgos, si se han obtenido mediante procesos o tecnologías no evaluadas hasta el momento desde el punto de vista de la inocuidad de los alimentos. El procedimiento utilizado deberá ajustarse a los Principios de Aplicación Práctica para el Análisis de Riesgos en el Marco del Codex Alimentarius. En particular, los fabricantes de aditivos para piensos deberán proporcionar al usuario una información clara que permita su empleo correcto e inocuo. La vigilancia de los ingredientes de piensos debe incluir su inspección, muestreo y análisis para determinar la presencia de contaminantes, aplicando protocolos basados en el riesgo. Dichos ingredientes deberán ajustarse a normas aceptables y, cuando sea el caso, reglamentarias en lo referente a los niveles de agentes patógenos, micotoxinas, plaguicidas y contaminantes que puedan suponer peligros para la salud de los consumidores.<sup>5</sup>

### **2.3.2. Producción, elaboración, almacenamiento, transporte y distribución de piensos y sus ingredientes.**

La responsabilidad de la producción, la elaboración, el almacenamiento, el transporte y la distribución de piensos e ingredientes de piensos inocuos y adecuados recae en todos los operadores de la cadena de piensos: agricultores, fabricantes de ingredientes de piensos, fabricantes de piensos compuestos, transportistas, etc. Cada integrante de la cadena de piensos es

responsable de todas las actividades que se encuentren bajo su control directo, y en particular deben cumplir todos los requisitos reglamentarios aplicables.<sup>5</sup>

**El cumplimiento de los requisitos reglamentarios aplicables.** Los piensos e ingredientes de piensos no deberán producirse, elaborarse, almacenarse, transportarse ni distribuirse en instalaciones ni con equipos en que posibles operaciones incompatibles puedan afectar su inocuidad y determinar efectos nocivos para la salud de los consumidores. Debido a las características peculiares de la acuicultura, en la aplicación de estos principios generales se deberán tomar en consideración las diferencias entre la acuicultura y la producción terrestre.<sup>5</sup>

Cuando proceda, los operadores deberán aplicar las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y, si corresponde, los principios de HACCP para controlar los peligros que puedan afectar a la inocuidad de los alimentos. El objetivo es garantizar la inocuidad de los piensos y, en particular, evitar la contaminación de los piensos y los alimentos de origen animal, en la medida que pueda razonablemente alcanzarse, teniendo en cuenta que en muchas circunstancias es imposible conseguir la eliminación total de los peligros.<sup>5</sup>

### **2.3.3. Métodos de muestreo y análisis**

**Muestreo.** La guía: *FAO e IFIF. 2014. Buenas prácticas para la industria de piensos – Implementación del Código de Prácticas Sobre Buena Alimentación Animal. Manual FAO de producción y sanidad animal. No 9. Roma. 2014* recomienda que los protocolos de muestreo deban cumplir principios y procedimientos científicos reconocidos.<sup>5</sup>

**Análisis.** Deberán aplicarse técnicas analíticas elaboradas y validadas utilizando principios y procedimientos científicos reconocidos. Al seleccionar los métodos también deberá tenerse en cuenta su viabilidad, dando preferencia a los que sean fiables y puedan aplicarse en análisis de rutina. Los laboratorios que realicen los análisis de rutina de los piensos e ingredientes de piensos deberán asegurar su competencia analítica para cada método aplicado, y mantener la documentación apropiada.<sup>5</sup>

## **III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo de Investigación.**

El presente trabajo es una revisión no experimental, descriptiva, transversal, prospectiva, que sintetiza los resultados de múltiples investigaciones primarias.

### **3.2. Muestra.**

La información en el presente trabajo se obtuvo a través de la revisión bibliográfica de artículos de investigaciones científicas tanto nacionales como internacionales que tuvieron como tema principal el desarrollo de Técnicas Analíticas para la Identificación de Aminoácidos; de todos los artículos que se encontraron, se incluyeron los dos más importantes según nivel de evidencia.

### **3.3. Procedimiento de recolección de datos.**

La recolección de datos se realizó a través de la revisión de artículos científicos, libros, bibliografía, pág. Web de entidades internacionales (FAO, AOAC, ISO etc.), de proveedores de instrumentación analítica e investigadores. Se utilizaron también las siguientes bases de datos: EBSCO, Pubmed, Scielo, Cochrane Plus y Google académico.

### 3.4. Métodos y Técnicas analíticas de referencia

#### **AOAC Official Method 942.12 (1997) Amino Acids in Feeds**

##### **Performic Acid Oxidation with Acid Hydrolysis – Sodium Metabisulfite Método usando HPLC MS/MS.<sup>31</sup>**

Aplicable para la determinación de aminoácidos (incluidos la Metionina y Cisteína) en alimentos. No aplicable para la determinación de Tirosina y Triptófano.<sup>30</sup>

**Principio**, La oxidación ácida eficaz se lleva a cabo antes de la hidrólisis para oxidar cisteína y metionina a ácido cisteico y sulfona de metionina, respectivamente.<sup>30</sup>

El grano de maíz se hidroliza en dos matraces diferentes según el método AOAC 994.12 (Aplicable para la determinación de aminoácidos [Incluidos Metionina y Cisteína] en alimentos. No aplicable para la determinación de Tirosina y Triptófano).<sup>31</sup>

**Procedimiento**, Pasar la muestra por un tamiz de 0,25mm de apertura, luego pesar con precisión de 0,1mg entre 100 – 1000 mg de la muestra (equivalente a 10mg de contenido de Nitrógeno), pasar la muestra a los tubos de digestión. Colocar un magneto en el interior de cada tubo y llevarlos a un baño de hielo (0°). Después de que la muestra está fría adicionar 5mL de ácido per fórmico en los tubos de digestión y cubrirlos con una luna, agitarlos con un agitador magnético durante 15 minutos, después regresar los tubos al baño de hielo y dejarlos oxidar por 16 horas. Retirar la luna y adicionar 0,84gr de metasulfito de sodio a cada tubo para descomponer el ácido per fórmico, agitar por 15 minutos para liberar el SO<sub>2</sub>.<sup>31</sup>

Los aminoácidos se liberan de la proteína mediante hidrólisis con HCl 6M. Los hidrolizados se diluyen con tampón de citrato sódico o se neutralizan, se

ajusta el pH a 2,20 y se separan los componentes individuales de aminoácidos en un HPLC de intercambio iónico. La tirosina se destruye por oxidación. El triptófano es destruido por la hidrólisis, por lo que estos aminoácidos no se pueden determinar.<sup>30</sup>

### **AOAC Official Method 942.12 (1997)**

#### **Amino Acids in Feeds Performic Acid Oxidation with Acid Hydrolysis – Sodium Metabisulfite Method (usando UPLC).<sup>32</sup>**

Aplicable para la determinación de aminoácidos (incluidos la Metionina y Cisteína) en alimentos. No aplicable para la determinación de Tirosina y Triptófano.<sup>32</sup>

**Aplicación**, en la nota de aplicación ANALYTICAL SOLUTIONS FOR THE ANALYSIS OF BOUND AND FREE AMINO ACIDS IN FOODS AND FEEDS de Waters Coportoration se suministró Albúmina de Suero Bovino Hidrolizada (BSA) a una concentración estimada de 1,0 mg / mL. El BSA hidrolizado se diluyó 1:10 con HCl 0,1 M antes de la derivatización (consiste en transformar un compuesto químico en un producto que posee un estructura química similar).<sup>32</sup>

El alimento de pollo peletizado se trituró a un polvo fino y se hidrolizó con y sin oxidación de ácido perfórmico, de acuerdo con AOAC Official Method 994.12. Las muestras hidrolizadas se diluyeron 1:10 con HCl 0,1 M antes de la derivatización.<sup>32</sup>

**Procedimiento**, Pasar la muestra por un tamiz de 0,25mm de apertura, luego pesar con precisión de 0,1mg entre 100 – 1000 mg de la muestra (equivalente a 10mg de contenido de Nitrógeno), pasar la muestra a los tubos de digestión. Colocar un magneto en el interior de cada tubo y llevarlos a un baño de hielo (0°). Después de que la muestra está fría adicionar 5mL de ácido perfórmico en los tubos de digestión y cubrirlos con una luna, agitarlos

con un agitador magnético durante 15 minutos, después regresar los tubos al baño de hielo y dejarlos oxidar por 16 horas. Retirar la luna y adicionar 0,84gr de metasulfito de sodio a cada tubo para descomponer el ácido perbórico, agitar por 15 minutos para liberar el  $\text{SO}_2$ .<sup>31</sup>

Los aminoácidos se liberan de la proteína mediante hidrólisis con HCl 6M. Los hidrolizados se diluyen con tampón de citrato sódico o se neutralizan, se ajusta el pH a 2,20 y se separan los componentes individuales de aminoácidos en un HPLC de intercambio iónico. La tirosina se destruye por oxidación. El triptófano es destruido por la hidrólisis, por lo que estos aminoácidos no se pueden determinar.<sup>30</sup>

El alimento para cerdos, alimento para aves de corral, la soja entera y las muestras de harina de soja se hidrolizaron con ácido en un laboratorio independiente como parte de un estudio colaborativo. Las muestras se suministraron a una concentración estimada de 1,0 mg / mL en HCl 0,1 M y se sellaron bajo argón en ampollas. Se usó el estándar NIST 2389 Amino Acids en 0,1 mol/L de HCl como material de referencia. Las muestras se diluyeron 1:16 y la con HCl 0,1 M antes derivatización.<sup>32</sup>

El protocolo de derivatización estándar se modificó para incluir la neutralización de exceso y con NaOH. Las muestras se derivatizaron en lotes, y se mantuvieron estables a temperatura ambiente durante una semana y se taparon fuertemente.<sup>32</sup>

### 3.5. Otros Estudios

**Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*).**<sup>11</sup>

**Procedimiento,** Se pesó aproximadamente entre 1 a 6 mg de los 20 L-aminoácidos (Sigma-Aldrich) en una fiola de 10 mL y se enrasó con agua destilada. Se tomó 0,5 mL de la solución y se agregó 0,5 mL de HCl 12N, 30 mL de 2-mercaptoetanol y se burbujeó la mezcla con gas nitrógeno, calentando a 110 °C por 24 horas.<sup>11</sup>

De igual manera, se tomó 0,5 mL de la mezcla de aminoácidos y añadió 0,5 mL de NaOH 8 N y se burbujeó la mezcla con gas nitrógeno y se calentó a 110 °C por 24 horas. Ambas soluciones hidrolizadas se neutralizan y concentran; después se traspasa a una fiola de 10 mL y se enrasa con solución de bicarbonato de sodio 50 mM. Para preparar la curva de calibración de aminoácidos se tomó alícuotas de 20, 40, 80 y 160 µL de la solución stock de mezcla de aminoácidos y se llevó cada solución a un volumen final de 160 µL con solución de bicarbonato de sodio 50 mM. Se adicionó luego a cada tubo 260 µL de la solución de cloruro de dabsilo 12,4 mM. Se calentó las mezclas a 70 °C por 10 minutos, luego de los cuales se agregó 580 µL de solución buffer de fosfato: etanol (1:1). Se inyectó 10 µL de las mezclas derivatizadas en el HPLC.<sup>11</sup>

Se pesó aproximadamente 1-3 mg de muestra y se hidrolizó y derivatizó de manera similar al procedimiento para la mezcla de estándares de aminoácidos. Se inyectó 10 µL de la muestra derivatizada en el HPLC.<sup>11</sup>

## **Obtención del concentrado proteico y determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (*Lupinus Mutabilis Sweet*).<sup>12</sup>**

**Procedimiento,** La determinación del perfil de aminoácidos del concentrado proteico de Tarwi mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), se realizó con el equipo HPLC ELITE La Chrom versión Pump L-2130; las muestras utilizadas en el análisis fueron los tratamientos realizados a 40°C para la variedad Negra de Sacacatani y 40°C para la variedad Yunguyo I. Las muestras se sometieron a previa hidrólisis ácida para eliminar los compuestos orgánicos no nitrogenados. Cervilla et al. (2012) menciona que la hidrólisis ácida es el método empleado comúnmente en la determinación de aminoácidos ya que permite liberar la mayoría de ellos durante el proceso. Sin embargo, bajo esas condiciones se produce destrucción total de los residuos de Triptófano; mientras que la Cisteína, la Metionina, la Serina y la Treonina se degradan parcialmente. Los valores obtenidos para el Ácido Apartico y Glutámico comprenden tanto a estos como a sus derivados aminados, Asparragina y Glutamina, ya que la hidrolisis ácida convierte a estos últimos en los primeros.<sup>12</sup>

## **Uso de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la cuantificación rápida y precisa de Triptófano en maíces colombianos.<sup>9</sup>**

**Procedimiento,** Las muestras de maíz fueron procesadas en un molino marca Thomson<sup>®</sup> usando malla #40 y continuando con el proceso de desengrase según la Metodología AOAC 920.39, 1995 se usó un equipo Goldfish<sup>®</sup>.<sup>9</sup>

**Hidrólisis alcalina.** El contenido de triptófano en las accesiones de maíz se determinó mediante la metodología de la AACC 07-25 (1984). A 0,04 g de muestra se le adicionó 1 mL de NaOH 4,2 N y 20 µL de n-octanol colocando inmediatamente en un baño de hielo, eliminando el oxígeno mediante bomba

de vacío y reemplazándolo por nitrógeno (este ciclo se corrió tres veces durante 3 minutos) para dejarlo en atmósfera de nitrógeno.<sup>9</sup>

El tubo fue tapado herméticamente y colocado en estufa a 105 °C por 24 horas. Se adicionaron 400 µL de buffer de citrato de sodio pH 4,25, 0,5 N y 350 µL de HCl concentrado; la mezcla resultante se agitó y se enfrió a temperatura ambiente.<sup>9</sup>

Después, el pH de la muestra fue llevado a valores entre 4 y 5 con HCl 6N ó NaOH 2N. Posteriormente, se transfirió el hidrolizado a un balón aforado de 5 mL completando su volumen con buffer citrato pH 4,25, 0,5 N. La muestra fue entonces filtrada a través de papel Whatman No. 1 y centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos, tomando una alícuota que fue filtrada nuevamente a través de membranas de 0,45 µm, quedando así lista para la determinación por HPLC.<sup>9</sup>

**Determinación del contenido de triptófano por HPLC.** El análisis cromatográfico fue realizado en un cromatógrafo Shimadzu LC-6A®, equipado con horno para columna Shimadzu CTO-6A®, Sistema controlador Shimadzu SCL-6B®, Bomba Shimadzu LC-6A®, autoinyector Shimadzu SIL-6B® y detector Shimadzu SPD-6 AV UV-Vis®. La columna usada fue una RP-18 ref. Shim Pack CLC ODS 0,15 m x 6 mm; el sistema de elución fue isocrático con fase móvil Metanol:Acetato de sodio 8,5 mM, pH 4 (5:95) y detección UV a 280 nm. A 0,5 mL/minuto y temperatura de 45°C. El tiempo de corrida fue 42 minutos con un tiempo de retención de 36,16 minutos. El volumen de inyección fue de 50 µL de muestra.<sup>9</sup>

**Lectura por NIRS.** Se usó un instrumento Foss NIRSystems Modelo 6500®, con un módulo transportador y detector de reflectancia. El procesamiento de los espectros y la calibración se realizaron mediante el software WinISI II® v 1,02 a.<sup>9</sup>

Las accesiones de maíz que fueron analizadas por el método directo de HPLC se escanearon por NIRS en el rango visible 400 – 1,098 nm y en el infrarrojo cercano 1,100 – 2,498 nm cada 2 nm, utilizando una microcubeta de 1,5 g (Ref. TKIH–0348) y un portacubeta circular (Ref. TKIH–0317). Cada muestra fue escaneada 16 veces, obteniéndose un valor de reflectancia de cada longitud de onda expresada como  $\log (1 / R)$  usando una cerámica interna como referencia.<sup>9</sup>

### **Derivatización y Análisis de Aminoácidos por GC-MS.<sup>33</sup>**

**Procedimiento,** Se secó una alícuota de 50  $\mu$ L de una solución que contenía una mezcla de L-aminoácidos a 91  $\mu$ g / mL en HCl 0,1 N y se añadieron 100  $\mu$ L del reactivo de Sililación N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) puro, seguido de 100  $\mu$ L de acetonitrilo. La mezcla se calentó a 100 ° C durante 4 horas. La muestra se neutralizó luego con bicarbonato de sodio y se sometió a análisis de GC-MS en una columna de 20 x 0,18 mm I.D. x 0,18  $\mu$ m de columna capilar SLB™ -5 ms.

### **Validación de un método genérico de análisis por RMN de 1H para el análisis de productos naturales.<sup>34</sup>**

**Procedimiento,** Las muestras se pesaron con precisión directamente en tubos NMR (Landisville, NJ, Norell, 5 mm x 177,8 mm, XR -55, lotes D0 80107CX y D030 508CSX) y se disolvió en 600 mL de DMSO-d6 (estándar para calibración interna Andover, MA, Isótopos Cambridge, Lote 8 L- 052, 99,8% D), siguiendo las indicaciones del estándar. La concentración de DMSO-d5 se calculó usando la curva de calibración para  $y = 1$  como 80,0 mM (0,66%).<sup>34</sup>

Factor		Value I		Value II
Integration method	A	Internal calibrant (DMSO <sub>2</sub> )	a	Mod 100% method <sup>a</sup>
Integral region	B	5 $\omega_{1/2}$ <sup>b</sup>	b	1.5 $\omega_{1/2}$ <sup>b</sup>
Baseline correction	C	Polynomial	c	Other algorithm <sup>c</sup>
Phasing	D	Manual phase correction	d	Autophase <sup>d</sup>
Zero filled to	E	256 k	e	128 k
Window function	F	Lorentzian–Gaussian multiplication <sup>e</sup>	f	Exponential multiplication <sup>f</sup>
Calibration signal	G	H-8 (1H, $\delta_1$ , 8.000 ppm)	g	Me group (3H, $\delta_1$ , 3.868 ppm)

<sup>a</sup>Modified 100% method: parameters were as follows: integration range: –5–15 ppm, excluding the HDO and DMSO-*d*<sub>5</sub> signals, not accounting for <sup>13</sup>C signals.

<sup>b</sup>Width-at-half-height of the calibration signal.

<sup>c</sup>NUTS: 'BF' command; Mnova: Whittaker smoothing; Topspin: 'absd' command.

<sup>d</sup>NUTS: 'QP' command; Mnova: 'autophase'; Topspin: 'apk0' then 'apk1'.

<sup>e</sup>NUTS: 'GM' command (LB = 3.0); Mnova: 'Gaussian' (LB = 3.0);

<sup>f</sup> Topspin: 'GM' (LB = –0.3, GB = 0.05).

<sup>g</sup>LB = 3.0 was used in all software packages.

**TABLA 2. Parámetros de Procesamiento (PP) fueron evaluados en un ensayo de robustez de Youden y Steiner.<sup>34</sup>**

El valor I y el valor II representan los dos extremos en los que se puede realizar la etapa (factor) de procesamiento respectiva, permitiendo así la determinación del impacto del factor correspondiente en los resultados de qHNMR.<sup>34</sup>

Los espectros fueron desplazados químicamente con referencia a la señal residual de disolvente (ajustada a  $\delta$ 2.500 ppm, señal de referencia DMSO-*d*<sub>5</sub>as). Los productos naturales (NP) investigados fueron: Ginkgolida B (Hillsborough, NJ, Indo fine, lote 0704023, 99% (CofA), 98,9% por qHNMR / 100% con H-8, 1H, dd,  $\delta$ 1,730 ppm); Ginkgolide A (Tübingen, Alemania, HWI, lote 10629, 99% (Cof A), 98,3% byqHNMR / método del 100%, usando H-8, 1H, dd,  $\delta$ 1,7 10 ppm) Kgobiloba Terpene Lactone, que fue amablemente proporcionada por la Convención Farmacopea de los Estados Unidos (Rockville, MD).<sup>34</sup>

Se usaron Estándares de calibración externa de RMN Dimethylsulphone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; DMSO<sub>2</sub>, Lot 099 K16 15) y Caffeine (Sigma-Aldrich, lote 00102EJ).<sup>34</sup>

Los datos de RMN se procesaron con el software TopSpin (versiones 1.3 y 3.0, proveedor Bruker, Karlsruhe, Alemania), NUTS (versión 20100424, Acorn

NMR Inc., San Francisco, CA) y Mnova (versión 7.0.3-8830), Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain).<sup>34</sup>

Se usó un espectrómetro RMN Avance 600 de Bruker (Karlsruhe, Alemania) equipado con una criosonda TXI de 5 mm, manteniéndose la temperatura ambiente a 25,0 °C (298,0 K). Para la preparación de muestras de RMN se utilizó una jeringuilla estanca a los gases de 1 mL (Pressure-Lok, VICI Precision Sampling, Baton Rouge, LA).<sup>34</sup>

### **Determinación de la composición de aminoácidos y ácidos grasos de la soja mediante Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano.**<sup>35</sup>

**Procedimiento,** Un conjunto de calibraciones de 526 muestras de soja de la cosecha de 1997-2001 y un conjunto de ensayos de 147 muestras se usaron varias líneas de todas las regiones de los Estados Unidos a partir de la cosecha de 2002 para el desarrollo y la prueba del modelo. Los espectros NIR de la soja completa se obtuvieron utilizando cinco espectrómetros NIR: Analizador de grano FOSS Infratec 1241 (FOSS, [www.foss.dk](http://www.foss.dk)), DICKEY-john OmegaAnalyzerG (DICKEY-John Corporation, [www.dickey-john.com](http://www.dickey-john.com)), Perten DA 7200 (Perten Instruments AB, [www.perten.com](http://www.perten.com)), Bruker Optics / Cognis QTA (Bruker Optics Inc., [www.brukeroptics.com](http://www.brukeroptics.com) y Cognis Corporation, [www.cognis.com](http://www.cognis.com)) y ASD LabSpec Pro (Analytical Spectral Devices Inc., [www.asdi.co](http://www.asdi.co)).

QTA, sugieren la posibilidad para el desarrollo de la base de datos común de la calibración). Los principales 18 aminoácidos se consideraron en este estudio: Alanina (ALA), Arginina (ARG), Ácido Aspártico (ASP), Cisteína (CYS), Ácido Glutámico (GLU), Glicina (GLY), Histidina (HIS), Isoleucina (ISO), Leucina (LEU), Lisina (LYS), Metionina (MET), Fenilalanina (PHE), Prolina (PRO), Serina (SER), Treonina (THR), Triptófano (TRY), Tirosina (TYR) y Valina (VAL). Sus concentraciones se determinaron en Experiment

Station Chemical Laboratories de la Universidad de Missouri, usando el método oficial AOAC 982.30 E (a, b, c) Ch.

Characteristic	Instrument				
	FOSS Infratec 1241 Grain Analyzer	DICKEY-john OmegAnalyzerG	Perten DA 7200	Bruker Optics/Cognis QTA	ASD LabSpec Pro
Technology	Scanning monochromator, Si detector	Scanning monochromator, Si detector	InGaAs photodiode array	FT-NIR, RT-PbS detector	Si and InGaAs photodiode arrays
Mode	Transmittance	Transmittance	Reflectance	Reflectance	Reflectance
Spectral range	850 – 1048 nm	730 – 1100 nm	950 – 1650 nm	12000 – 4000 $\text{cm}^{-1}$ (833 – 2500 nm)	350 – 2500 nm
Spectral resolution	7 nm	(not available)	3.125 nm/diode	2 – 256 $\text{cm}^{-1}$ <sup>a</sup>	3 nm, 10 nm
Sampling interval	2.0 nm	0.5 nm	5.0 nm	7.7 $\text{cm}^{-1}$	1.4 nm, 2.0 nm
Number of data points	100	741	141	1037	2151

<sup>a</sup> Spectral resolution of 16  $\text{cm}^{-1}$  was recommended by the manufacturer for this study.

**TABLA 3. Especificaciones de los espectrómetros NIR utilizados en el experimento.**<sup>35</sup>

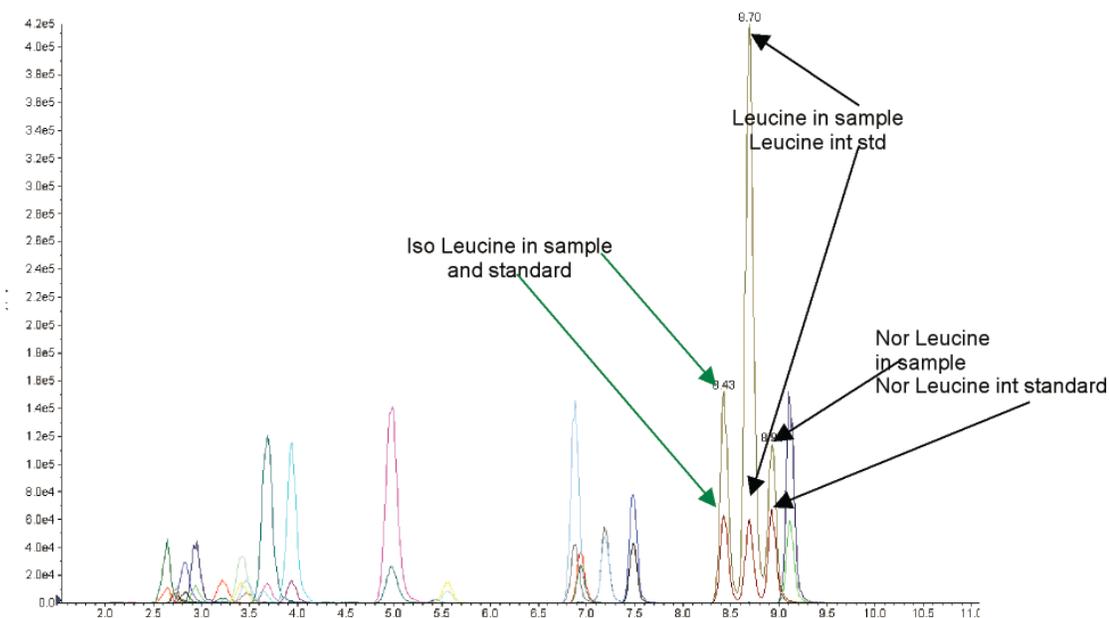
Tal vez la mayor ventaja de esta técnica analítica es que no requiere de preparación de muestra, solo de una molienda fina (malla #18).

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### **AOAC Official Method 942.12 (1997) usando HPLC**

La nota de aplicación Amino Acid Analysis of Animal Feed Hydrolysate de Applied Biosystems utilizando el Analizador de Aminoácidos 20 / 20™ basado en HPLC MS/MS indica que esta técnica/instrumento fue capaz de proporcionar resultados equivalentes a los obtenidos por el sistema basado en nin-hidrina tradicional de acuerdo con el método AOAC 994.12 para la determinación de Aminoácidos en el hidrolizado de piensos para animales. Sin embargo, el enfoque basado en MS del Reactivo iTRAQ™ proporcionó resultados en la mitad del tiempo comparado con el enfoque tradicional. Las separaciones típicas para los sistemas tradicionales tardan 30 minutos o más mientras que el método del sistema del Analizador del Aminoácido 20/20™ proporciona la separación clara para los 20 aminoácidos en 10 minutos.<sup>30</sup>

Esta técnica no es aplicable para determinar Tirosina ni Triptófano.



**FIGURA 12. Cromatograma del Hidrolizado de DDGS por HPLC MS/MS.<sup>30</sup>**

### **AOAC Official Method 942.12 (1997) usando UPLC**

Este método nos brinda el procedimiento para determinar la exactitud de la técnica de identificación de aminoácidos la cual debe confirmar los resultados obtenidos con una muestra de composición conocida (estándar de referencia). La composición esperada se conoce a partir de la secuencia de la proteína. Las proporciones de aminoácidos medidos con el método deben coincidir con esta composición. La consistencia de una medida exacta de la composición también es una medida de la robustez del método. Para esta prueba se utilizó el hidrolizado de BSA (Seroalbúmina Bovina). Además de obtener buenos resultados en menos tiempo (menos de 08 minutos), la identificación de aminoácidos en piensos por la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Ultra Performance (UPLC) se confirma la exactitud de la técnica usando el hidrolizado de BSA ya que los tiempos de retención son los mismos.<sup>32</sup>

La desventaja de esta técnica está en el alto costo de la instrumentación y en la poca base instalada de equipos en nuestro país.

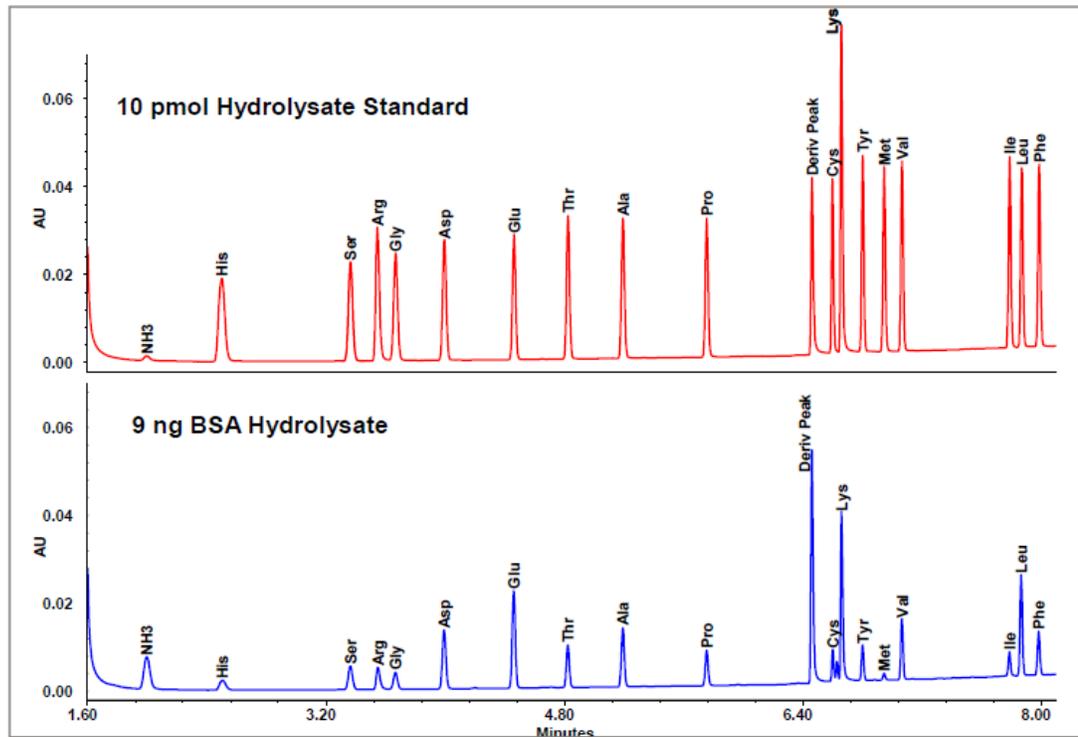


FIGURA 13. Comparación de las separaciones cromatográficas del estándar de aminoácidos hidrolizado con BSA usando UPLC.<sup>32</sup>

**Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*).**

En este estudio se utilizó la técnica de detección HPLC con un detector DAD (arreglo de diodos) y se pudo observar, que a excepción de lisina y leucina, ambas semillas estarían cumpliendo con los requerimientos de aminoácidos en la dieta recomendados por la FAO para todos los grupos etéreos, excepto los infantes.<sup>11</sup>

En el caso de las tortas encontramos una deficiencia en los aminoácidos Lisina, Leucina, Metionina+Cisteína y Fenilalanina+Tirosina. El contenido proteico de las tortas es más alto en *P. volubilis* (59%) en comparación con *P. huayllabambana*

(46%). Sin embargo, ambas especies son deficientes en los aminoácidos esenciales. La técnica utilizada dio buenos resultados y fue selectiva.<sup>11</sup>

Aminoácido	Contenido en mg/g de proteína				FAO/OMS
	<i>P. huayllabambana</i>		<i>P. volubilis</i>		
	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)	
ácido aspártico	19	16	14	11	....
ácido glutámico	41	12	30	21	....
asparagina	124	33	80	46	...
serina	28	15	18	61	...
treonina	40	48	36	64	34
glicina	225	215	218	201	...
alanina	20	13	14	22	...
arginina	39	14	44	17	...
prolina	24	49	23	59	...
valina	52	36	40	47	35
metionina	13	12	14	17	...
isoleucina	30	36	26	30	28
leucina	52	28	37	39	66
fenilalanina	21	19	13	20	...
cisteina	17	10	8	11	...
lisina	31	6	28	12	58
histidina	19	21	17	32	19
tirosina	82	22	58	24	...
glutamina	46	89	31	65	...
triptofano	12	14	13	11	11

TABLA 4. Perfil de aminoácidos por HPLC en semillas y tortas de 2 especies de Plukenetia.<sup>11</sup>

#### Obtención del concentrado proteico y determinación del perfil de aminoácidos de dos variedades de Tarwi (*Lupinus Mutabilis Sweet*)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Performance (HPLC), es un poderoso método de separación y análisis de proteínas, sin embargo, debemos de considerar la versatilidad de esta técnica, ya que está sometida a un sin número de factores y condiciones experimentales, que pueden depender de la

composición y características de cada proteína, es por ello que en la presente investigación se pudo localizar 17 de los 20 aminoácidos establecidos usando un sistema HPLC con un detector UV (ultra violeta), los analitos fueron identificados en el proceso del análisis de componentes en la fase móvil de la técnica, no descartando algún componente aminoácido que pudo ser eliminado debido a la intervención de los solventes empleados en el proceso, que principalmente afectan a los componentes azufrados, sin descartar que estos, debido a su muy baja concentración, no tendrían un papel representativo como lo da en este caso la metionina siendo un analito detectado con el papel fundamental de aminoácido limitante. Los cromatogramas se generaron en una columna de intercambio iónico y con detección fotométrica basada en una reacción post columna de los aminoácidos con un reactivo calorimétrico.<sup>12</sup>

Nº	Aminoácido	Variedad Yunguyo I (µg/g)	Variedad Negra de Sacacatani (µg/g)
1	Ácido aspártico	1.915 ± 0.041 b	4.055 ± 0.033 a
2	Treonina*	1.000 ± 0.071 a	1.030 ± 0.060 a
3	Serina	2.385 ± 0.027 b	2.542 ± 0.053 a
4	Ácido Glutámico	37.516 ± 0.147 a	37.602 ± 0.054 a
5	Prolina	2.018 ± 0.081 a	0.459 ± 0.021 b
6	Glicina	12.000 ± 0.098 b	15.000 ± 0.052 a
7	Alanina	7.000 ± 0.098 b	8.000 ± 0.058 a
8	Cisteina	31.758 ± 0.037 a	29.179 ± 0.030 b
9	Valina*	9.000 ± 0.110 a	7.500 ± 0.052 b
10	Metionina*	0.458 ± 0.041 a	0.500 ± 0.030 a
11	Isoleucina*	7.400 ± 0.105 b	9.600 ± 0.049 a
12	Leucina*	2.835 ± 0.075 a	1.349 ± 0.111 b
13	Tirosina	5.000 ± 0.104 b	7.500 ± 0.061 a
14	Fenilalanina*	8.000 ± 0.160 b	9.300 ± 0.097 a
15	Histidina*	5.100 ± 0.049 b	6.500 ± 0.011 a
16	Lisina*	1.200 ± 0.071 b	1.400 ± 0.041 a
17	Arginina*	1.600 ± 0.020 b	1.800 ± 0.104 a

(n=3)

Fuente: Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, UCSM.

\* Aminoácidos Esenciales

**TABLA 5. Perfil de aminoácidos de los concentrados proteicos de Tarwi.<sup>12</sup>**

## Uso de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) para la cuantificación rápida y precisa de Triptófano en maíces colombianos

En este estudio primero se uso y valido la técnica para identificación y cuantificación de Triptófano por HPLC mediante el método de cuantificación de estándar externo, la técnica presentó una linealidad del 99% y una recuperación del 90,8%, para lo cual los datos de HPLC fueron corregidos por este factor de recuperación.<sup>9</sup>

Las muestras utilizadas para calibración y validación del método de NIRS incluyeron muestras con niveles bajos, medios y altos en contenido de Triptófano, medido por HPLC.<sup>9</sup>

MUESTRAS PARA CALIBRACIÓN						MUESTRAS PARA VALIDACIÓN					
ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**	ID	Trip (%)**
MET 329	0.033 ± 0.00053	NAR 554	0.044 ± 0.00050	SAS 366	0.051 ± 0.00041	BOY 474	0.058 ± 0.00125	NAR 332	0.044 ± 0.00086	HUI 347	0.052 ± 0.00088
MET 315	0.033 ± 0.00119	COR 310	0.044 ± 0.00036	BOY 516	0.051 ± 0.00078	VAL 372	0.058 ± 0.00064	NAR 616	0.047 ± 0.00044	TOL 389	0.053 ± 0.00105
CUN 335	0.035 ± 0.00163	CAL 371	0.045 ± 0.00055	CUN 446	0.051 ± 0.00062	CAL 317	0.058 ± 0.00046	CUN 350	0.049 ± 0.00121	BOY 463	0.053 ± 0.00046
NAR 540	0.037 ± 0.00103	VAL 395	0.045 ± 0.00092	SAS 340	0.052 ± 0.00087	BOY 451	0.059 ± 0.00095	VAL 341	0.049 ± 0.00068	CAU 330	0.055 ± 0.00050
TOL 390	0.043 ± 0.00022	HUI 365	0.045 ± 0.001224	CHO 307	0.054 ± 0.00132	TOL 369	0.059 ± 0.00070	VAL 311	0.050 ± 0.00080	BOY 475	0.056 ± 0.00042
CAU 312	0.043 ± 0.00052	CAQ 307	0.046 ± 0.00064	CAU 436	0.055 ± 0.00062	CAU 368	0.060 ± 0.00057	HUI 349	0.050 ± 0.00093	CUN 554	0.056 ± 0.00067
COR 330	0.043 ± 0.00028	HUI 344	0.048 ± 0.00006	CUN 515	0.056 ± 0.00062	CAU 447	0.060 ± 0.00045	MAG 355	0.050 ± 0.00012	TOL 311	0.059 ± 0.00065
PUT 358	0.043 ± 0.00055	MAG 418	0.050 ± 0.00137	SAN 304	0.056 ± 0.00052	HUI 327	0.061 ± 0.00063	CUN 316	0.050 ± 0.00230	TOL 345	0.059 ± 0.00039
BOY 466	0.044 ± 0.00064	BOY 489	0.050 ± 0.00081	ANT 497	0.057 ± 0.00083	ANT 493	0.062 ± 0.00073	CAL 372	0.051 ± 0.00062	ANT 539	0.061 ± 0.00045
HUI 358	0.044 ± 0.00035	SAS 327	0.050 ± 0.00059	PUT 340	0.058 ± 0.00097	NAR 379	0.083 ± 0.00089	BOY 439	0.052 ± 0.00026	ANT 494	0.062 ± 0.00053

\* Muestras provenientes del United States National Plant Germoplasm System en el NCRPIS (North Central Regional Plant Introduction Station).

\*\* Promedio de 4 réplicas, ± desviación estándar.

IDEN Muestras que fueron eliminadas por H y/o T.

**TABLA 6. Contenido de triptófano por HPLC en muestras de maíz colombiano provenientes del NCRPIS.<sup>9</sup>**

Las muestras de calibración presentaron un rango en el contenido de triptófano de 0,033 % a 0,083 %, con un valor medio de 0,051 % y una desviación estándar de 0,0095.

Las muestras de validación presentaron valores entre 0,044% y 0,062% con un valor medio de 0,053 % y una desviación estándar de 0,0048.<sup>9</sup>

Variable	Triptófano (%) HPLC			Triptófano (%) NIRS			Datos de validación NIRS		
	media	min.	máx.	media	min.	máx.	SEP*	RSQ <sub>val</sub>	SLOPE**
Triptófano	0,053	0,044	0,062	0,049	0,035	0,066	0,008	0,152	0,251

<sup>a</sup> Número de muestras, n = 20 muestras.

\* SEP: Error Estándar de Predicción.

RSQ<sub>val</sub>: Coeficiente de correlación de muestras independientes de validación. \*\* SLOPE: Pendiente.

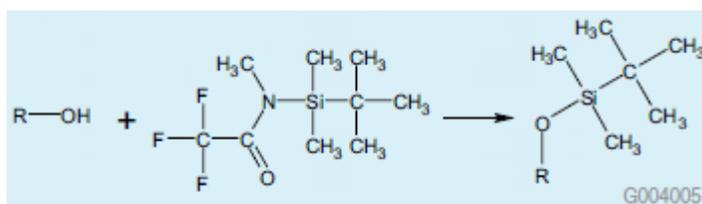
**TABLA 7. Estadística de la validación NIRS de maíz.<sup>9</sup>**

Se concluye que el modelo de calibración por NIRS se desarrollo exitosamente para la identificación y cuantificación del aminoácido Triptófano con una precisión del 98%, se aplicó la prueba del Ji Cuadrado comparando los valores observados (NIRS) con los valores teóricos esperados (por HPLC), los valores no presentaron diferencia significativa entre ellos, aceptando dicha ecuación de calibración a un nivel confianza del 95%.<sup>9</sup>

Para mantener estos niveles de confianza es necesario mantener constantemente el ingreso de valores a la curva de calibración del equipo NIRS, esto tal vez podría considerarse una desventaja ya que se deben recurrir a técnicas primarias como HPLC para obtener los resultados que se debe ingresar a la curva de calibración.

### **Derivatización y Análisis de Aminoácidos por GC-MS.<sup>33</sup>**

Para la derivatización e identificación de aminoácidos en este estudio se uso el reactivo de Sililación N-terc-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) que presenta la siguiente estructura:



A continuación se presenta un cromatograma de los derivados TBDMS de los aminoácidos. Los datos espectrales obtenidos de los picos ayudaron a identificar los derivados de aminoácidos. El reemplazo de un hidrógeno activo por un grupo TBDMS añade 114 al peso molecular.

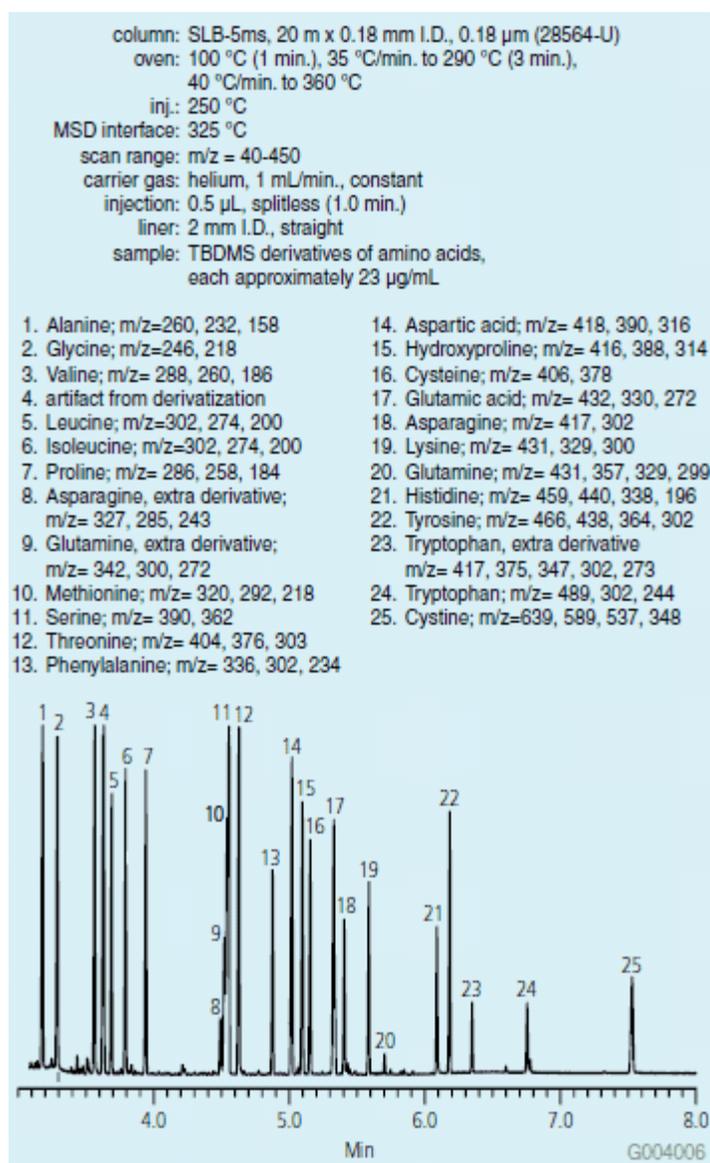
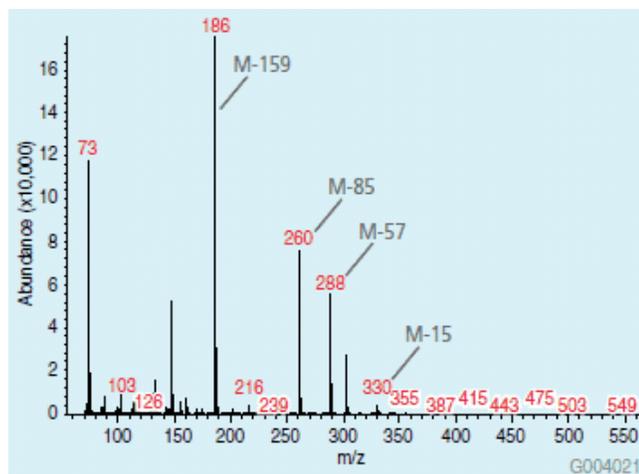


FIGURA 14. Análisis GC-MS de Derivados de Aminoácidos en la SLB-5ms (28564-U).<sup>33</sup>

Se muestra también un ejemplo de este patrón de fragmentación en el espectro de TBDMS-valina.<sup>33</sup>



**FIGURA 15. Espectro de Masas del Derivado TBDMS de Valina (PM del derivado= 345).<sup>33</sup>**

Los espectros de impacto de electrones de estos derivados contienen fragmentos típicos que corresponden al peso molecular del derivado menos CH<sub>3</sub> (M-15), C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (M-57), C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> + CO (M-85) y CO-O-TBDMS (M - 159).<sup>33</sup>

Bajo las condiciones de reacción utilizadas, la mayoría de los aminoácidos produjeron un derivado, con hidrógenos activos en grupos hidroxilo, amina y tiol (en el caso de Cisteína) reemplazados por TBDMS. Algunos aminoácidos produjeron múltiples derivados, específicamente Asparagina, Glutamina y Triptófano. En el caso de estos aminoácidos, una modificación en las condiciones de reacción, tal como, reducir la temperatura o cambiar el tiempo de reacción, puede evitar que esto ocurra.<sup>33</sup>

El estudio concluye, típicamente que la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se recomienda para el análisis de aminoácidos. Sin embargo, la técnica analítica Cromatografía de Gases GC también se puede utilizar, y en algunos casos la disponibilidad de los costos de instrumentación u operación puede hacer que esta técnica sea una mejor opción. Este estudio realiza una comparación entre la GC y la HPLC para analizar aminoácidos, pero es concluyente al

recomendar el uso de la técnica HPLC para este fin, sin embargo se propone evaluar la base instalada de equipos en el laboratorio y los costos por análisis que implica una técnica analítica.

### Validación de un método genérico de análisis por RMN de $^1\text{H}$ para el análisis de productos naturales.<sup>34</sup>

Suponiendo que se cumplan las condiciones cuantitativas, se puede utilizar cualquier conjunto de datos HNMR para estudios de cuantificación relativa utilizando el método del 100% para la evaluación de la pureza, comparando las relaciones integrales de las resonancias, United States Pharmacopeial Conv., 2011; Gödecke et al., 2012. Para la cuantificación del valor absoluto, hay que controlar cuidadosamente una serie de parámetros adicionales. El probetuning (preparación de la probeta) es crítico para la reproducibilidad y la intensidad máxima de la señal. El ajuste óptimo es importante para la homogeneidad del campo y la forma resultante.<sup>34</sup>

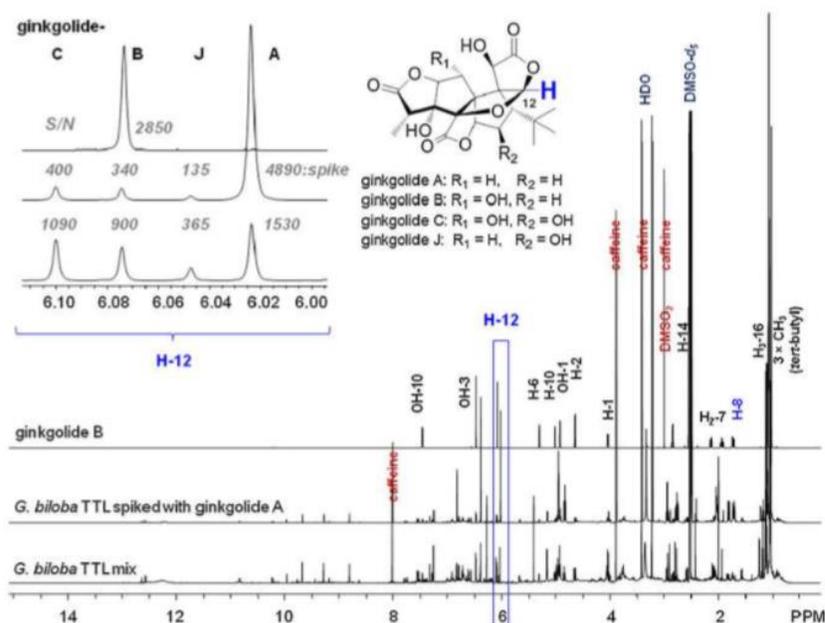


FIGURA 16. Espectros de qHNMR de los ejemplos de productos naturales Ginkgolida B y Ginkgo terpenetrilactona (TTL).<sup>34</sup>

El reporte espectral de qHNMR de los ejemplos de productos naturales (analizados a 600 MHz, DMSO - d<sub>6</sub>). GinkgoL B (5,6 mM, DMSO<sub>2</sub>: 1,5 mM), muestra la mezcla compuesta de Ginkgo terpeno trilactona (TTL) (4,07 mg / mL, cafeína: 7,3 mM) y TTL (1,43 mg / mL, cafeína: 6,9 mM) (6,0 mM). Se usó la región espectral que contenía el Hs-12 para el análisis cuantitativo de las cuatro lactonas terpénicas presentes en la mezcla.

Este estudio usa la técnica de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear - NMR (qNMR) validada para estudios metabolómicos y control de calidad de muestras naturales complejas tales como alimentos para animales (piensos), plantas o remedios herbales, y biofluidos, ofreciendo una visión de la composición de la muestra y la posibilidad de cuantificar simultáneamente compuestos múltiples.

El estudio concluye, sin dudar que la Resonancia Magnética Nuclear – NMR se convertirá muy pronto en la técnica analítica seleccionada para la determinación de diversos metabolitos, debido a que es una técnica no destructiva, muy rápida y que permite diversos tipos de calibraciones. Otra ventaja de esta técnica está en que no usa reactivos controlados ni peligrosos.

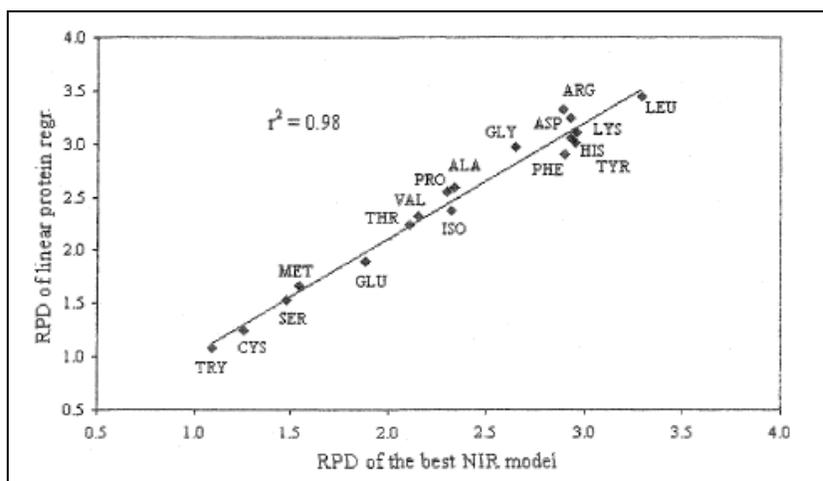
La desventaja de esta técnica está en el alto costo de la instrumentación y en la poca base instalada de equipos en nuestro país, se estima que solo hay 03 de equipos en Perú (fuente QSI – Representante exclusivo de Bruker Karlsruhe, Alemania).

### **Determinación de la composición de aminoácidos y ácidos grasos de la soja mediante Espectroscopia en el Infrarrojo Cercano.<sup>35</sup>**

Este artículo tuvo como propósito desarrollar calibraciones en Espectrometría Infrarroja Cercana (NIR) y comparar su desempeño para dieciocho aminoácidos usando PLS, redes neuronales artificiales (ANN), y (SVM) métodos de regresión usando cinco modelos de espectrómetros NIR. La validación de los modelos de

predicción calculados dio como resultado coeficientes de determinación que oscilaron entre 0,04 (Triptófano) y 0,91 (Leucina y Lisina). La mayoría de los modelos desarrollados fueron utilizables para fines de investigación y cribado de muestras, sin embargo, no se encontró correlación suficiente entre los datos espectrales y las concentraciones de aminoácidos tan importantes como la Cisteína y el Triptófano.<sup>35</sup>

El estudio concluye, que si bien la Espectrometría Infrarroja Cercana (NIR) no es considerada una técnica oficial para la determinación de aminoácidos en piensos el desarrollo de técnicas rápidas y sin la necesidad de destruir la muestra se vuelve cada vez más necesaria en los laboratorios de control de calidad. La ventaja de esta técnica está en que no usa reactivos controlados ni peligrosos, tampoco requiere de una preparación de muestras muy exhaustiva (molienda a malla #18).



**FIGURA 17. Diagrama de la dispersión de los valores de los modelos de regresión lineal de proteínas frente a los de los mejores modelos de calibración NIR.<sup>35</sup>**

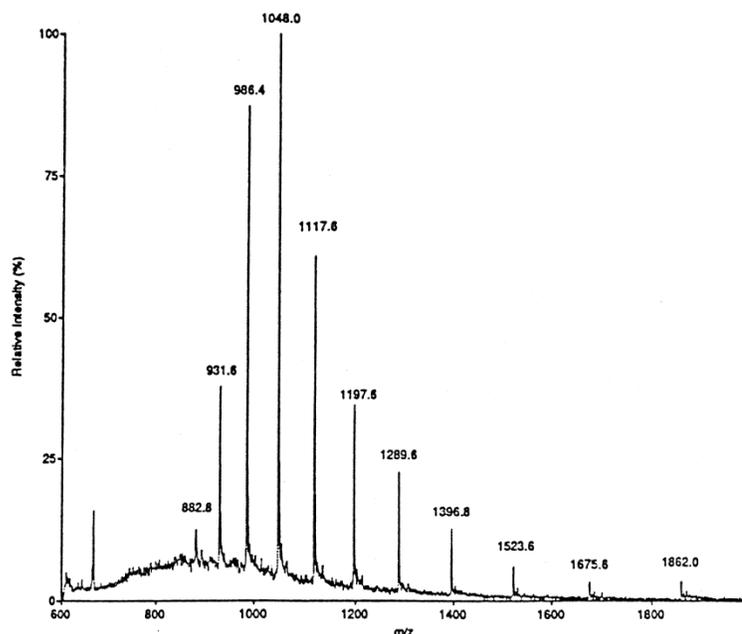
**Informe del comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios.<sup>7</sup>**

Este informe es concluyente sobre el uso y control de aminoácidos en la formulación de piensos para animales e indica que en función de la información disponible en la actualidad y teniendo en cuenta las consideraciones reflejadas en el informe del Comité Científico de 28 de noviembre de 2012, la propuesta de una cantidad máxima diaria de la suma de L-isoleucina, L-leucina y L-valina de 5,45 g es aceptable desde el punto de vista de su seguridad en su uso como complemento alimenticio manteniendo además la advertencia respecto a que no deben ser consumidos estos aminoácidos por mujeres embarazadas, niños, ni durante periodos prolongados de tiempo sin control médico.<sup>7</sup>

La identificación de estos aminoácidos que serán incluidos en la alimentación de humanos y animales se debe realizar con una técnica confiable, reproducible a un buen costo/beneficio.

**Journal of Chromatography A. 4 July 2000; (893): 1–21.<sup>8</sup>**

Este artículo revisa el rápido incremento del uso de HPLC acoplado a MS para la identificación y caracterización de proteínas y péptidos en alimentos, demuestra también las claras ventajas de usar ESI-MS (Espectrometría de Masas en Tándem con Ionización por Electrospray) y MALDI-TOF-MS (Espectrometría de Masas de Desorción / Ionización asistida por Tiempo de Vuelo) en términos de precisión, sensibilidad, reproducibilidad y análisis en tiempos cortos obteniendo además información estructural.<sup>8</sup>



**FIGURA 18. Espectro de masas de ESI-MS interpretado típicamente de polipéptido de pescado de carpa con M de 16 751.<sup>8</sup>**

Este Journal nos muestra la aplicación de HPLC acoplado a MS en Carne y pescado, en comparación con las proteínas de la leche y el huevo. Si bien es cierto ha habido relativamente menos estudios de MS sobre proteínas de carne y pescado, el uso de ESI-MS reveló la presencia de al menos 25 polipéptidos con valores de M que van desde 2000 a 42 800 en el extracto de nitrógeno soluble de carpas frescas de pescado; un espectro de masa ESI-MS interpretado típicamente de polipéptido de pescado con una M de 16 751 se ilustra en la Figura 18.

### **Técnicas analíticas empleadas en metabolómica de alimentos.<sup>10</sup>**

Este estudio describe que el monitoreo de cientos o más metabolitos requiere de técnicas de alto rendimiento y alta calidad y que no es posible analizar todos los metabolitos de bajo peso molecular con una sola técnica analítica.<sup>10</sup>

El estudio concluye, que la mayoría de las técnicas analíticas metabolómicas encontradas en análisis de alimentos, seguridad y calidad alimentaria son: Cromatografía de Gases GC, Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC, Cromatografía Líquida de Ultra Performance UPLC, Electroforesis Capilar CE

acoplados a espectrometría de masas MS y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear RMN.<sup>10</sup>

Si bien este estudio plantea el uso de diferentes técnicas analíticas para el monitoreo de diferentes metabolitos, se propone la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) como la técnica más recomendada para este fin, porque es una de las técnicas que más se ha desarrollado en nuestro país y por su costo/beneficio. El costo promedio de un HPLC es de USD 75 – 100K, un UPLC bordea los USD 250K, mientras que un equipo de RMN de 400MHz puede llegar hasta los USD 600K.

### **Métodos estandarizados para el análisis de aminoácidos de los alimentos.<sup>23</sup>**

Este artículo demuestra que la Electroforesis Capilar - CE se ha utilizado ampliamente para el análisis de aminoácidos en alimentos para animales (piensos) durante la última década, ya que los instrumentos de electroforesis capilar se han vuelto más robustos y fiables.<sup>23</sup>

El estudio concluye, que la técnica analítica de Electroforesis Capilar ha sido ampliamente revisada en los últimos seis años y los principales desarrollos han sido la mejora de la sensibilidad mediante la derivatización, diodos emisores de láser más robustos para la fluorescencia inducida por láser y la detección más sensible de MS. Estos avances van a permitir que se amplíen las investigaciones de esta técnica para la determinación de aminoácidos en piensos.<sup>23</sup>

De acuerdo a los resultados obtenidos de la revisión, se demuestra que las entidades como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) que regulan las actividades de producción y control de calidad de los piensos recomiendan aplicar técnicas analíticas elaboradas y validadas utilizando principios y procedimientos científicos reconocidos, por ejemplo la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC) tiene registrados diversos

métodos oficiales para la determinación de aminoácidos en alimentos para animales que describen el uso de instrumentación analítica como HPLC y UPLC.

Tomando también como referencia la política de los Laboratorios Químicos de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Missouri (USA) quienes declaran las principales referencias para los métodos oficiales que se emplean para los servicios de ensayos realizados y / o solicitados rutinariamente en esta casa de estudios se listan diversos métodos oficiales de AOAC para la identificación y cuantificación de aminoácidos en piensos.<sup>36</sup>

Por todo ello, la elección la de técnica analítica para la identificación de aminoácidos en piensos se deberá elegir teniendo en cuenta variables como la Repetibilidad y Reproducibilidad, la rapidez en la que se obtienen los resultados y el costo de la implementación de la técnica y su instrumentación.

La presente revisión contribuye a actualizar información sobre los nuevos avances en la instrumentación analítica y métodos rápidos para la identificación de aminoácidos en alimentos para animales, la optimización de recursos y evitar el uso de reactivos peligrosos y controlados usando técnicas que no requieren de estos insumos se vuelve tendencia entre los diversos laboratorios donde se realizan estos análisis.

**TABLA 8. Resumen de resultados y discusiones.**

TECNICA ANALÍTICA	Preparación Muestra	Tiempo Análisis	Métodos Referencia	Repetibilidad	Reproducibilidad	Costo Instrumento	Costo Implementación	Consumibles Mantenimiento
<b>GC</b>	SI	Minutos	SI	Buena	Buena	USD 70K	USD 10K	SI
<b>GC-MS</b>	SI	Minutos	SI	Muy Buena	Buena	USD 120K	USD 10K	SI
<b>HPLC</b>	SI	Minutos	SI	Buena	Buena	USD 50K	USD 8K	SI
<b>HPLC-MS</b>	SI	Minutos	SI	Muy Buena	Buena	USD 150K	USD 8K	SI
<b>UPLC</b>	SI	< Minutos	SI	Buena	Buena	USD 200K	USD 10K	SI
<b>UPLC-MS</b>	SI	< Minutos	SI	Muy Buena	Buena	USD 250K	USD 10K	SI
<b>CE-MS</b>	SI	Minutos	NO	Buena	Buena	USD 50K	USD 5K	NO
<b>RMN</b>	NO	Segundos	NO	Buena	Base Instalada	USD 500K	USD 20K	NO
<b>NIR</b>	NO	Segundos	NO	Dependiente técnica primaria	Dependiente técnica primaria	USD 60K	USD 3K	NO



Los costos de los instrumentos y la implementación son aproximados a lo encontrado en el mercado nacional (fuente QSI 2017).

## V. CONCLUSIONES

La revisión no sistemática de los artículos científicos evidencian que aun no se ha desarrollado una técnica analítica que identifique e inclusive cuantifique todos los aminoácidos en un solo análisis.

Es importante destacar que hay evidencia suficiente que recomienda la técnica analítica de Cromatografía Líquida de Alta Performance - HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) como una técnica con buena Repetibilidad y Reproducibilidad, aun costo/beneficio que es accesible para los diferentes laboratorios que realizan estos análisis, sin embargo; acoplar a esta técnica detección con Espectrometría de Masas o Masas/Masas potenciaría la capacidad para identificar y cuantificar aminoácidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arboledas D. Jerarquía estructural de las proteínas. 1ra ed. Alicante: Club Universitario; 2011. Pág. 32.
2. Voet D. Bioquímica. 3ra ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006. Pág. 71.
3. FAO e IFIF. Buenas prácticas para la industria de piensos – Implementación del Código de Prácticas Sobre Buena Alimentación Animal. Roma. Manual FAO de producción y sanidad animal. No 9. 2014. 110p. ISSN 1810-1143.
4. Mora B. Nutrición Animal. 1ra ed. San Jose: Universidad Estatal a Distancia; 2007. Pág. 68.
5. Véjar E. Prácticas de Bioquímica Descriptiva. 1ra ed. Sonora: UniSon; 2005. Pág. 171.
6. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. 3ra ed. Barcelona: Reverté S. A.; 2007. Pág. 1.
7. Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Madrid Revista del Comité Científico de la AESAN Nro 18. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios – 2. 2013:1:71-94.
8. H.F. Alomiraha, I. Allia, Y. Konishib. Applications of mass spectrometry to food proteins and peptides. Journal of Chromatography A. 4 July 2000;(893):1–21.
9. Vásquez, Diana Rocío, Mayorga, Olga Lucía, Uso de la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIR S) para la cuantificación rápida y precisa de triptófano en maíces colombianos. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria [en línea] 2005, 6 (Enero-Junio) : [Fecha de consulta: 1 de septiembre de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945018007>> ISSN 0122-8706.
10. Wilson S., Victor V., Carmen R. Técnicas analíticas empleadas en metabolómica de alimentos. Trujillo. Agroindustrial Science. 2015:1:191-210.

11. Candy R, Camilo D, José A, Rosario R. Análisis Proximal, Antinutrientes, Perfil de Ácidos Grasos y de Aminoácidos de Semillas y tortas de 2 especies de Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*). Lima: Rev Soc Quím Perú; 2013 Enero. Pág. 8.
12. Yeny L. Obtención del Concentrado Protéico Determinación del Perfil de Aminoácidos de dos Variedades de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2012. Pág. 87.
13. Harold Mc. GC (basic theory) [Internet]. Virginia: Virginia Tech, USA 2017 Marzo [actualizada 27 de marzo 2017; consultado 27 de marzo de 2017]. Disponible en:<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHiemBpdmBIIcCzB>.
14. Miriam B. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. 1ra ed. San Jose: UCR; 2006. Pág. 13.
15. Duraisamy G.; Manokaran K., Ganesan R., Kanakasabapathi D., Chandrasekar U. GC-MS analysis of bioactive compounds from the whole plant ethanolic extract of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *J Food Sci Technol*. 2015; 52(2):1212–1217.
16. Rebolledo M., Cocho J., Castiñeiras D., Bóveda M., Fraga. Aplicación de la Espectrometría de Masas en Tándem al análisis de aminoácidos, acilcarnitinas, acilglicinas y ácidos orgánicos en muestras de orina en papel. *Química Clínica*. 2006;25(2):64-74.
17. Brian B. Practical HPLC Methodology and Applications. 1ra ed. New York USA: Editorial John Wiley & Sons, INC; 1992.
18. Agilent Technologies: HPLC Basics: Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC) [<https://www.agilent.com>] USA; c2007 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en:<https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/HPLC%20Separation%20Fundamentals.pdf>
19. Agilent Technologies: Basics of LC/MS [<https://www.agilent.com>] USA; c2001 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>
20. Waters Corporation 2006: ACQUITY UPLC System Quick Start Guide [[www.waters.com](http://www.waters.com)] USA; c2006 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en:[www.waters.com/webassets/cms/support/.../71500082503rc](http://www.waters.com/webassets/cms/support/.../71500082503rc).

21. De Brouwer V., Storozhenko S., Stove C., Van D., Van der S., Lambert W. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) for the sensitive determination of folates in rice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;1:878(3-4):509-13.
22. Kumar A, Saini G, Nair A, Sharma R. UPLC: A Preeminent Technique In Pharmaceutical Analysis. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2012;69(3):371-380.
23. Otter E., Standardised methods for amino acid analysis of food. 2012: 108, S230–S237.
24. Rawi R, Govert W., Gerhardus J. CE–MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2014–2016. *Electrophoresis* 2017;38:190–202.
25. Charlotte S., José N., James B., Shao-Nong Ch., Guido F. Universal Quantitative NMR Analysis of Complex Natural Samples. National Institutes of Health. 2014: 0: 51–59.
26. Siwei Wei, Lingyan Liu, Jian Zhang, Jeremiah Bowers, G.A. Nagana Gowda, Harald Seeger et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Molecular Oncology* 7 2013:297:307.
27. Bruker: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) [<https://www.bruker.com>] Alemania; c2017 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en: <https://www.bruker.com/products/mr/nmr.html>
28. Rania I., Magda H., M.H. El-Kalyoubi, A.A. El-Sharkawy. <sup>1</sup>H NMR spectral analysis as a new aspect to evaluate the stability of some edible oils. *Annals of Agricultural Science.* 2014;59(2):201–206.
29. Vasylyovych I., Determination of amino and fatty acid composition of soybeans using near-infrared Spectroscopy. 2005:1:1-104.
30. Applied Biosystems 2007: Application Note Amino Acid Analysis of Animal Feed Hydrolysate [[www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)] USA; c2007 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en: [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_042758.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_marketing/documents/generaldocuments/cms_042758.pdf)

31. AOAC Official Method 942.12 Amino Acids in Feeds Performic Acid Oxidation with Acid Hydrolysis – Sodium Metabisulfite Method. 1997:1-11.
32. Waters Corporation 2009: Analytical Solutions For The Analysis Of Bound And Free Amino Acids In Foods And Feeds [www.waters.com] USA; c2009 [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en:  
[http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=es\\_ES&lid=10127476&cid=511436](http://www.waters.com/waters/library.htm?locale=es_ES&lid=10127476&cid=511436)
33. Katherine K. The Derivatization and Analysis of Amino Acids by GCMS. 2011: Reporter US Volume 25.3.
34. Tanja G, Jose N, Maria R, Shao-Nong Ch, Birgit J, David L, Guido P. Validation of a Generic Quantitative <sup>1</sup>H NMR Method for Natural Products Analysis [Internet]. Chicago, IL USA: Phytochemical Analysis; 2013 Junio [citado 2017 Setiembre 02]. 17p. Disponible en:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.2436/epdf>
35. Igor V. Determination of amino and fatty acid composition of soybeans using near-infrared spectroscopy. [Tesis]. Iowa: Iowa State University; 2005. 104p.
36. University of Missouri 2015. Agricultural Experiment Station Chemical Laboratories - Method References Standard Amino Acid Analyses [<http://www.aescl.missouri.edu>] USA; c2015. [actualizada 09 Abril; consultada 09 Abril]. Disponible en:<http://www.aescl.missouri.edu/MethRefs.html#aminoacids>