



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA

**ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN EL RESIDUO DE
CABEZA DE CAMARÓN FERMENTADO POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTA

JESUS ALFREDO ROSAS RODRÍGUEZ

CD. OBREGÓN, SONORA

MAYO DE 2005

DEDICATORIAS

A DIOS, por ser mi guía espiritual y guiar mis pasos.

A mi FAMILIA a quienes debo mis triunfos y logros, durante los cuales siempre están brindándome su apoyo, por permitir compartir con ellos este gran esfuerzo y estar a mi lado siempre.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por darme salud y fortaleza para enfrentar la vida.

A mis PADRES Alfredo y Alicia, por la confianza que depositan en mí, por estar siempre a mi lado en cada paso en mi camino, dándome su apoyo incondicional, en los buenos y en los malos momentos, son para mi realmente un ejemplo a seguir, estoy infinitamente agradecido.

A mis HERMANOS Julio, Miguel, Pilar y Lupe María, por compartir el esfuerzo y comprensión al no poder vernos a diario y aun así contar con su apoyo.

A los DOCTORES Jaime López y Dalia Sánchez, por sus enseñanzas, dedicación y sobre todo por brindarme la oportunidad de aprender y confiar en mi para participar en sus proyectos.

A mis AMIGOS Oliviert, Karina, Lilian, Raul y Sayda por trabajar y convivir durante todo este tiempo, siempre dando ánimo de alguna u otra manera.

A todos mis COMPAÑEROS de carrera, por pasar tantos momentos agradables en estos cuatro años y medio, de los cuales de cada uno de ellos me llevo algo de enseñanza, los aprecio mucho y no voy a olvidarlos.

“Cuando deseas algo, el universo entero conspira para que lo realices”

Paulo Coelho:

Este trabajo fue aceptado para presentarse en:

**28th International Symposium on Capillary Chromatography and
Electrophoresis. Las Vegas, Nevada, May 22-25, 2005.**

**Analysis of Free Amino Acids in Fermented Shrimp Waste by High-
Performance Liquid Chromatography**

Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez-Machado*, Jesús A. Rosas Rodríguez

Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Sonora, P. O. Box 541, Cd. Obregón,
Sonora, México.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Composición química del camarón.....	11
2	Composición en aminoácidos del hidrolizado de la cabeza de camarón.....	11
3	Composición del cefalotórax o cabeza de camarón.....	12
4	Tratamientos de preparación de la muestra.....	31
5	Ensayos de distintas investigaciones utilizando reactivos para derivatizar.....	34
6	Condiciones cromatográficas de distintas investigaciones en análisis de aminoácidos.....	35
7	Programa de la bomba (flujo en gradiente).....	39
8	Condiciones cromatográficas establecidas para el análisis.....	42
9	Recta patrón para alanina.....	44
10	Recta patrón para valina.....	44
11	Recta patrón para isoleucina.....	45
12	Calibración y precisión del método para los diferentes aminoácidos considerados.....	45
13	Recuperación del método.....	47
14	Resultados del análisis de muestras de camarón	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pag
1	Partes del camarón.....	10
2	Estructura de los aminoácidos.....	17
3	Cromatograma.....	20
4	Reacción de aminoácido con OPA.....	26
5	Reacción de aminoácido con ninhidrina.....	27
6	Reacción química de FMOC-Cl con alanina.....	28
7	Reacción química entre FMOC-Cl y ADAM.....	29
8	Cromatograma de patrón de aminoácidos para pruebas de calibración del método.....	43
9	Datos de linealidad del patrón de alanina.....	44
10	Datos de linealidad del patrón de valina.....	45
11	Datos de linealidad del patrón de isoleucina.....	46
12	Cromatogramas. A) Solución patrón de aminoácidos. B) Hidrolizado obtenido de la fermentación láctica de residuo de camarón.....	49

ÍNDICE

RESUMEN.....	lx
I. INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	6
HIPÓTESIS.....	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Hidrolizado proteico obtenido por fermentación láctica de cabeza de camarón.	9
2.1.1 Características fisicoquímicas de la cabeza de camarón.....	9
2.1.2 Fermentación láctica.	12
2.2 Proteínas y aminoácidos de los hidrolizados proteicos.	14
2.2.1 Proteínas y aminoácidos.	14
2.2.2 Hidrolizados de proteínas.....	16
2.2.3 Importancia de los aminoácidos.	18
2.3 Cromatografía.	19
2.3.1 Teoría de cromatografía.	19
2.3.2 Columnas.	20
2.3.3 Detectores.	21
2.3.4 Validación de métodos analíticos.....	23
2.3.5 Reactivos para derivatización de aminoácidos.....	25
2.4 Antecedentes bibliográficos de los métodos de determinación de aminoácidos libres.....	29
2.4.1 Tratamientos utilizados en la preparación de la muestra.....	30
2.4.2 Derivatización.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Patrones y reactivos químicos.	36
3.2 Recuperación del hidrolizado.	37
3.2.1 Fermentación.	37
3.2.2 Centrifugación.	37

3.3 Preparación de la muestra para cuantificación de aminoácidos.....	37
3.3.1 Tratamiento de la muestra.	37
3.3.2 Derivatización de los aminoácidos con FMOC.	38
3.4 Equipo y condiciones HPLC.	38
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Preparación de la muestra.	40
4.2 Precisión del método.	41
4.3 Recuperación del método.	46
4.4 Análisis de las muestras	47
V. CONCLUSIÓN	
BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

Este trabajo se realizó en el laboratorio Lv-712 de la unidad Nainari del Instituto Tecnológico de Sonora, en el cual se presenta un método HPLC para la cuantificación de aminoácidos libres en el hidrolizado de cabeza de camarón obtenido mediante fermentación láctica, para su análisis las muestras fueron derivatizadas con 9-fluorenil metil cloroformato (FMOC) y detección por fluorescencia (ex: 270 nm, em: 316 nm) en una columna SGE Hypersil ODS C18 250 mm x 4.6 mm, 5 µm, se utilizaron tres soluciones como fase móvil para el análisis: fase A: 30 mM fosfato de amonio (pH 6.5) en 15:85 metanol/agua, fase B: 15:85 metanol/agua y la fase C: 90:10 acetonitrilo/agua, con un flujo de bomba de 1.20 mL/min, con una temperatura de columna de 38°C. El método fue utilizado para cuantificar los aminoácidos presentes en el licor obtenido como producto final en la fermentación láctica. Se encontró que la linealidad, precisión y recuperación del método son adecuadas para la cuantificación de los aminoácidos seleccionados, las muestras analizadas contienen 20.40, 24.8 y 18.8 µg/g materia seca de alanina, valina e isoleucina respectivamente. Existe un interés considerable en el uso de este producto en alimentación.

I. INTRODUCCIÓN

Las proteínas desempeñan un papel por demás importante desde el punto de vista nutricional, estas se encuentran presentes en casi todos los alimentos, aunque en algunos casos en cantidades muy reducidas, su valor radica en que son fuente de aminoácidos esenciales; debido a esto se ha incrementado el interés en la innovación de técnicas analíticas para el estudio de los aminoácidos que sean rápidos, sencillos, precisos y sobre todo confiables. Se han propuesto varios métodos para el análisis de los aminoácidos entre ellos la cromatografía de gases, cromatografía líquida de alta resolución y la electroforesis (Sánchez, *et. al*, 2003).

El análisis de los aminoácidos utilizando una precolumna de derivatización y cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa ha tenido buenos resultados. Esta técnica requiere tiempos cortos de análisis y es muy sensible en contraste a los métodos tradicionales utilizando columnas de intercambio iónico y derivatización postcolumna (Gildberg y Stenberg, 2001).

Existen varios reactivos para derivatizar a los aminoácidos con características distintas y según sus especificaciones se recomienda su uso; algunos de los más utilizados para el análisis de aminoácidos es el fenilisotiocianato (PITIC) (Sanchez, *et. al*, 2003, Shang y Wang, 1996, Hagen, *et. al*, 1989), Orto-ftalaldehido (OPA) (Herbert, *et. al*; 2004, Kutlán y Molnár, 2002), aunque presentan una baja sensibilidad y la reacción no es muy estable, otro reactivo es el 9 – fluorenil metil cloroformato (FMOC-Cl) (Fabiani, *et. al*; 2002, Haynes y Sheumack, 1991), un reactivo de protección para los grupos amino durante la síntesis de péptidos, ha mostrado ser muy útil para el análisis de aminoácidos primarios y secundarios por fluorescencia (Sánchez, *et. al*; 2003).

En México la producción de camarón se ha incrementado considerablemente a la par del desarrollo industrial y tecnológico, la producción total de camarón en México fue de 94,173 toneladas, representando un aumento del 17% de la producción total del año anterior (SAGARPA, 2003). La cabeza de camarón comprende del 35 al 45% en peso del producto total y ha surgido un gran interés en su uso como aromatizante en algunos alimentos y como suplemento alimenticio en la acuicultura (Oyedapo, 1996). Actualmente la fermentación láctica es utilizada para el tratamiento y reducción de los desechos de camarón, de la cual adicionalmente se pueden recuperar productos de alto valor agregado tales como quitina, pigmentos y proteína. (Cira, *et. al*; 2002).

Uno de los ingredientes más caros en la producción de alimentos son las proteínas. Se han utilizado distintas fuentes de proteína para reducir los costos, entre ellas la soya, aunque esta no puede ser utilizada como única fuente de proteína porque su contenido en algunos aminoácidos esenciales es bajo. Los hidrolizados de proteína han sido propuestos como una alternativa par mejorar la composición del alimento debido al aporte de aminoácidos esenciales (Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002).

En este trabajo se presenta un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución utilizando derivatización con 9 – fluorenil metil cloroformato, para el análisis de los aminoácidos libres presentes en el licor obtenido de la fermentación láctica de la cabeza de camarón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del trabajo es la identificación y cuantificación de aminoácidos libres en el hidrolizado proteico obtenido de la fermentación láctica del residuo de cabeza de camarón mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar fermentaciones lácticas del residuo de cabeza de camarón para la recuperación de proteínas.
-
-

-
- Desarrollar un método validado para la cuantificación de aminoácidos libres mediante HPLC utilizando derivatización con FMOC-Cl (9-Fluorenilmetil cloroformato) y detección por fluorescencia.
 - Determinar el contenido de aminoácidos libres en los hidrolizados proteicos obtenidos del residuo de cabeza de camarón.
-

JUSTIFICACIÓN

La fermentación láctica se ha propuesto como alternativa para el tratamiento de residuos de cabeza de camarón, ya que ofrece atractivas ventajas tales como bajos costos de inversión, lo cual es muy importante en lugares donde no se cuenta con infraestructura, además el dar un uso integral a los desechos ya que se pueden separar productos de alto valor comercial como quitina, pigmentos y proteínas. Por otro lado, los fermentados lácticos presentan un adecuado valor nutricional que pueden ser empleados para alimentación animal.

El déficit en proteínas nutricionales es, por desgracia, muy alto para algunos segmentos de la población global y puede agravarse más en el futuro a medida que la población mundial continua incrementándose, especialmente por el costo de la producción de proteína que la de carbohidratos o lípidos. Para satisfacer esta demanda es necesario encontrar nuevas fuentes de proteínas y desarrollar métodos idóneos para su utilización.

El procesar el residuo de camarón no solo resuelve un problema ambiental, sino que también ayuda a obtener un hidrolizado proteico. Por ello, en este trabajo se propone una técnica analítica para cuantificar los aminoácidos libres mediante HPLC, para en el futuro determinar las posibles aplicaciones de este concentrado en alimentación animal en base al valor biológico de las proteínas.

HIPÓTESIS

A partir de la fermentación láctica de cabezas de camarón es posible obtener un hidrolizado proteico con un alto contenido de aminoácidos libres, para cuantificarse mediante HPLC.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

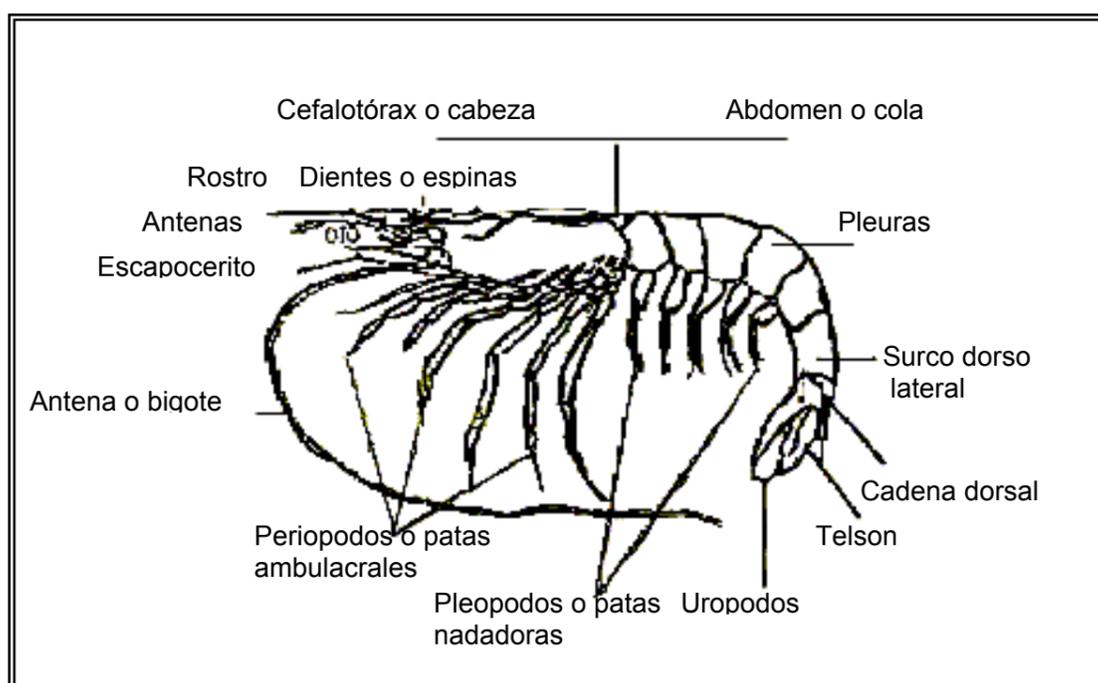
2.1 Hidrolizado proteico obtenido por fermentación láctica de cabeza de camarón.

2.1.1 Características fisicoquímicas de la cabeza de camarón

El camarón es un crustáceo decápodo, macruro de color variable. Su cuerpo es algo encorvado y está dividido en dos partes, cefalotórax y abdomen, comercialmente conocidos como cabeza y cola, respectivamente. El cefalotórax, una combinación de cabeza y tronco en una sola unidad, está cubierto por un caparazón que contiene a la cabeza, los órganos vitales del animal, tres pares de patas prensoras y dos caminadoras. La cresta en la parte superior es rígida, dentada y termina en un rastro alargado por delante de la cabeza. El abdomen se divide en seis segmentos. El último de ellos termina en una punta fina llamada

telson y por debajo esta la cola que le sirve para nadar (figura 1). Por dentro del abdomen están los intestinos (Dore y Frimodt, 1987).

El camarón es excepcionalmente nutritivo. Es un alimento con alto contenido de proteínas y bajo en grasas (tabla 1). Además este ha sido utilizado para extraer productos de alto valor comercial como quitina y pigmentos (Cira, *et. al*, 2002). Las secuencias de aminoácidos que conforman a las proteínas del cefalotórax de camarón incluyen a todos los aminoácidos esenciales (tabla 2) y constituyen aproximadamente el 50% del peso seco del camarón (tabla 3) según Oyedapo (1996); estas proteínas son empleadas como una fuente alimenticia y como formulación para preparar medios de cultivo para microorganismos.



Fuente: Soluap, 1998

Figura 1. Partes del camarón

Tabla 1. Composición química del camarón

Componente	Cantidad Porción comestible
Agua	78.2 %
Proteína	18.1 g
Grasa	0.8 g
Carbohidratos	1.5 g
Calorías	91.0 Kcal
Calcio	63.0 mg
Fósforo	166.0 mg
Hierro	1.60 mg
Tiamina	0.02 mg
Niacina	3.20 mg
Riboflavina	0.03 mg

(100 g de porción comestible)
Fuente: Charley, 2001.

Tabla 2. Composición en aminoácidos del hidrolizado de la cabeza de camarón

Aminoácido	Hidrolizado de la cabeza
<u>Esenciales</u>	
Histidina	3.12 ± 0.00
Isoleucina	5.77 ± 0.03
Leucina	8.86 ± 0.09
Lisina	8.31 ± 0.32
Metionina	3.30 ± 0.04
Fenilalanina	5.55 ± 0.09
Treonina	6.04 ± 0.02
Valina	6.72 ± 0.04
<u>No esenciales</u>	
Tirosina	5.08 ± 0.06
Ácido aspártico	2.84 ± 0.26
Ácido glutámico	8.92 ± 0.57
Glicina	6.76 ± 0.01
Serina	6.29 ± 0.04
Arginina	8.90 ± 0.21
Alanina	7.58 ± 0.01
Prolina	5.67 ± 0.00
Cisteina	0.34 ± 0.02

Los valores están dados en base a g/100 g
Fuente: Gildberg, 2001

Tabla 3. Composición de cefalotórax o cabeza de camarón

Componente	% en base seca
Proteína cruda	41.93
Lípidos	10.2
Carbohidratos	2.47
Fibra cruda	15.17

Fuente: Oyedapo, 1996.

2.1.2 Fermentación láctica

En términos generales, la fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica catalizadas por enzimas (Ward, 1989).

La fermentación láctica, es un proceso artesanal utilizado para incrementar la conservación de la calidad nutricional del alimento, realizado por bacterias ácido lácticas en condiciones anaerobias regularmente, disminuyendo el pH del medio debido a la producción de ácido, logrando una degradación o proteólisis del residuo fermentado (Oyedapo, 1996).

Estas bacterias lácticas encargadas de realizar la fermentación, son gram positivas y, según Brock (1999), normalmente son inmóviles, no esporuladas y dan lugar al ácido láctico como principal producto de su metabolismo fermentativo, estas crecen en medio anaerobio pero a diferencia de otros organismos no son sensibles al oxígeno, por lo tanto la presencia o ausencia del mismo no les afecta. Cuando el ácido láctico es el único producto final de la fermentación, ésta se conoce como homoláctica, que se diferencia de la heteroláctica en que, además del ácido láctico, se obtienen cantidades significativas de etanol y CO₂ (Monroy, 1990).

➤ **Condiciones para la fermentación**

Para que se lleve a cabo la fermentación con resultados satisfactorios se deben cuidar ciertos parámetros durante el proceso, entre ellos el organismo utilizado, la fuente de carbono, la cantidad de inóculo agregado, el pH al inicio y durante la fermentación, la temperatura y tiempo de fermentación y el utilizar algún reactor eficiente (Mukku, 1996).

Al igual que en las reacciones químicas y enzimáticas, el crecimiento celular varía en función de la temperatura. La mayoría de los microorganismos crecen entre 25 y 30° C aunque la temperatura real a la que crece un microorganismo particular depende de su naturaleza psicrófila, mesófila o termófila. El pH influye en el crecimiento microbiano de la misma forma que lo hace en la actividad enzimática. La mayoría de los microorganismos crecen dentro de un rango de pH comprendido entre 3 y 4 unidades. Otro factor que puede afectar son las concentraciones elevadas de carbohidratos, las cuales pueden inhibir el crecimiento debido a los efectos osmóticos (Ward, 1989).

➤ **Probiótico**

Parker (1974), fue el primero en utilizar el término probiótico en el mismo sentido en el cual es utilizado hoy. El definió los probióticos como “organismos y sustancias las cuales contribuyen al balance de la flora intestinal”.

Las bacterias ácido lácticas son uno de los microorganismos probióticos de mayor importancia asociado con el tracto intestinal humano. Tradicionalmente la bacteria ácido láctica ha sido clasificada en base a sus propiedades fenotípicas, morfología, degradación de glucosa, crecimiento a distintas temperaturas, y fermentación de varios carbohidratos (Wilhelm, *et. al*; 2001).

2.2 Proteínas y aminoácidos de los hidrolizados proteicos

2.2.1 Proteínas y aminoácidos

Las proteínas son macromoléculas complejas que pueden representar más del 50% del peso seco de las células, en cuya estructura y función juegan un papel fundamental. Son múltiples las que se han aislado y purificado. Su peso molecular oscila entre 5000 y muchos millones de daltons. Estos biopolímeros están compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y habitualmente, azufre. Algunas contienen también hierro, cobre, fósforo o zinc. La hidrólisis total (ácida, alcalina o enzimática) de las proteínas rinde aminoácidos de configuración L, que se diferencian entre sí por la naturaleza de sus cadenas laterales. Los aminoácidos de la mayor parte de las proteínas pertenecen a un grupo reducido, constituido por veinte de estos compuestos. Los aminoácidos se unen para formar a las proteínas mediante enlaces amida llamados enlaces peptídicos, formando cadenas polipeptídicas que contienen hasta varios cientos de unidades (Cheflel, *et. al;* 1993).

Las proteínas pueden clasificarse en dos grupos: homoproteínas que constan sólo de aminoácidos, y heteroproteínas, que además de aminoácidos contienen varios compuestos no proteicos, denominados colectivamente grupos prostéticos. De acuerdo con la naturaleza química del grupo prostético, se pueden distinguir nucleoproteínas (como las presentes en los ribosomas y los virus), lipoproteínas (como la gammaglobulina), fosfoproteínas (como las caseínas), hemoproteínas (como la hemoglobina y el citocromo C, la catalasa y la mioglobina) y metaloproteínas (como el alcohol deshidrogenasa y la carbónico anhidrasa), (Cheflel, *et. al;* 1993).

Las proteínas pueden clasificarse también de acuerdo con su organización estructural. Se distingue, así, entre proteínas globulares y proteínas fibrosas. Las proteínas globulares tienen formas esféricas o elipsoidales resultantes del

plegamiento de la(s) cadena(s) polipeptídica(s) sobre sí misma(s). En cambio las proteínas fibrosas son moléculas con forma de varilla, formadas por cadenas polipeptídicas lineales enrolladas (por ejemplo, tropomiosina, colágeno, queratina, y elastina). Las proteínas fibrosas pueden formarse también vía la agregación lineal de pequeñas proteínas globulares; las proteínas fibrosas tienen siempre una función estructural (Damodaran, 2000).

Con el término estructura primaria se hace referencia a la secuencia de aminoácidos en una proteína. Por estructuras secundarias y terciaria se entiende la organización tridimensional de la cadena polipeptídica. La expresión estructura cuaternaria se refiere al acoplamiento geométrico de varias cadenas polipeptídicas, ligadas a través de enlaces que en la mayor parte de los casos no son covalentes. Las proteínas poseen una enorme diversidad de funciones que permite clasificarlas arbitrariamente en tres grupos fundamentales: proteínas estructurales, proteínas con actividad biológica y proteínas alimentarias (Cheflel, *et. al*; 1993).

Los aminoácidos, como su nombre lo indica se caracterizan por tener en su molécula un grupo amino y un ácido carboxílico, de los cuales se conocen más de 140 que se encuentran en distintos tejidos de origen animal y vegetal, así como en microorganismos (Badui, 1999).

Principalmente las proteínas están compuestas de 20 aminoácidos esenciales (figura 2). La principal fuente de aminoácidos para el humano son las proteínas, las cuales son digeridas por enzimas liberando los aminoácidos constituyentes (Badui, 1999).

Los aminoácidos comparten aspectos comunes en su estructura química. Casi todos los aminoácidos son derivados del ácido α -amino carboxílico, en el cual hay una sustitución adicional en el carbono α .

De los aminoácidos procedentes de las proteínas, sólo el triptófano, la tirosina y la fenilalanina absorben radiaciones ultravioletas y tienen un máximo de absorbancia a 278, 274.5 y 269 nm respectivamente. La cistina absorbe ligeramente a 238 nm y todos los aminoácidos lo hacen a longitudes de onda próximas a 210 nm.

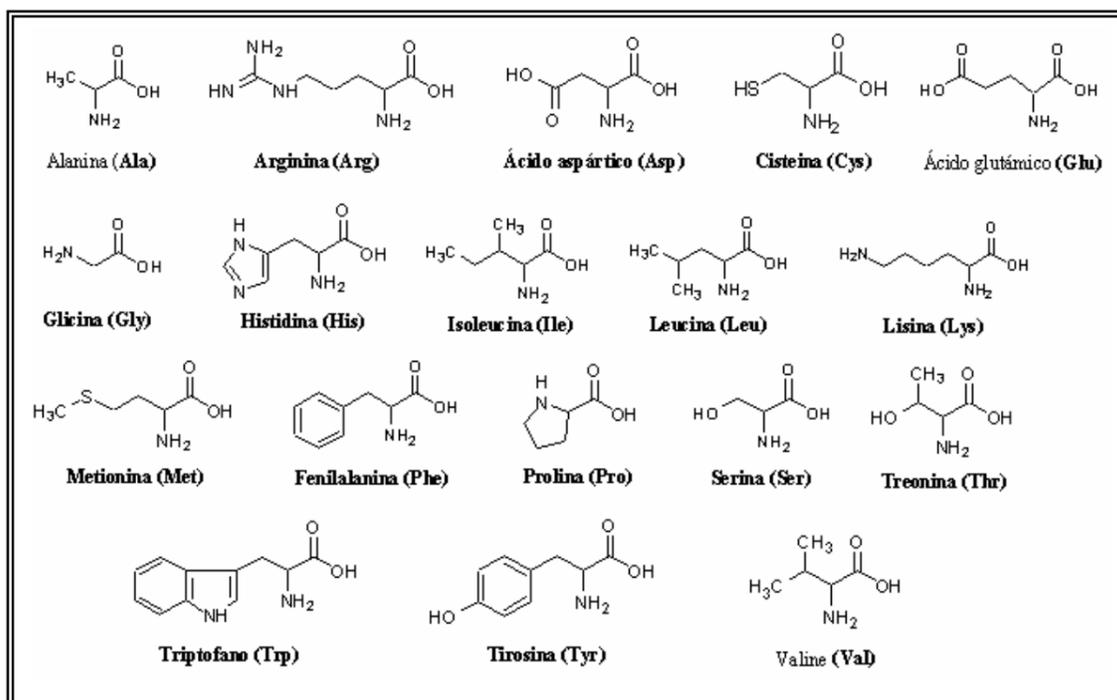
El triptófano, la tirosina y la fenilalanina son los únicos aminoácidos que muestran fluorescencia natural. La fluorescencia del triptófano persiste incluyendo cuando el aminoácido está formando parte de una proteína (excitación a 287 nm; máximo de fluorescencia a 348 nm) (Cheflel, *et. al*; 1993).

Estas similitudes y diferencias son las que ayudan a realizar su análisis químico. Muy pocos aminoácidos tienen compuestos cromóforos para una detección en su separación. Afortunadamente la presencia de los grupos funcionales comunes (ácido carboxílico y amino), permiten su derivatización para lograr una detección espectrofotométrica después de su separación (Badui, 1999).

Según Badui (1999), el contenido de las proteínas de los productos marinos es muy variable, va del 12 a 23% (en base húmeda) y están distribuidas en: 70 a 80% globulinas, de 10 al 20% son albúminas y de 2 a 4% son queratinas y colágena. Estos contienen muy poca cantidad de tejido conectivo y un alto contenido de lisina.

2.2.2 Hidrolizados de proteínas

Los hidrolizados de proteína son productos que se caracterizan por una degradación más o menos importante de la materia prima, en este caso de la cabeza de camarón, de los cuales se obtienen productos solubles que contienen un elevado porcentaje de péptidos, oligopéptidos y aminoácidos.



Fuente: <http://web.mit.edu/esgbio/www/lm/proteins/aa/aminoacids.html>

Figura 2. Estructura de los aminoácidos

Dependiendo del método que se utilice para obtener el hidrolizado, se clasifican en hidrolizados químicos, los cuales son los más empleados y se efectúan en medio ácido o alcalino con condiciones extremas, esta hidrólisis tiene la ventaja de conservar las muestras por mayor tiempo, pero se debe tener cuidado ya que puede descomponer algunos aminoácidos, sobre todo el triptófano; los hidrolizados enzimáticos, los cuales se llevan a cabo por medio de enzimas, generalmente proteasas; y muy similar a este proceso se encuentran los hidrolizados biológicos, los cuales son producidos por células microbianas que contienen proteasas (Bourgeois, 1986).

El licor obtenido por fermentación láctica, además de ser un proceso económico y sin daño al ambiente por uso de químicos, puede ser utilizado como suplemento de proteínas y minerales para consumo humano o alimentación animal (Rao, 2000).

2.2.3 Importancia de los aminoácidos

Es importante el análisis de los aminoácidos debido a que para muchas poblaciones es necesario conocer el contenido exacto de aminoácidos en alimentos comunes. Además, cuando la ingesta de proteínas totales es muy alta, y las fuentes de proteínas son tan variables que incrementan el interés en el análisis de los aminoácidos. De acuerdo con Baxter (1996), algunas razones para estudiar el contenido de aminoácidos son:

- Única fuente nutricional. Cuando un producto alimenticio en particular es la única fuente de nutrición, es de suma importancia que el perfil de aminoácidos sea conocido. Esta información debe ser utilizada para determinarse si la cantidad de aminoácidos agregados están en las cantidades suficientes. Uno de los ejemplos de esta categoría son los alimentos para niños (formulas).

 - Productos fortificados. Especialmente en productos de tipo nutracéutico que normalmente están dirigidos a personas con necesidades metabólicas inusuales. Para reunir estos elevados requerimientos, los productos son fortificados con aminoácidos libres específicos. Estos deben ser examinados para asegurar que el aminoácido de interés ha sido propiamente suplementado. Un ejemplo de esto son los productos nutricionales suplementados con glutamina para rehabilitación después de trauma intestinal.
-

- Verificación de ausencia. Las personas pueden sufrir de varios errores metabólicos innatos que ocasionan que algunos aminoácidos tengan efectos tóxicos si se consumen en ciertos niveles, estos aminoácidos deben ser estudiados para no sobrepasar los niveles adecuados. Por ejemplo quienes son intolerantes a la fenilalanina (fenilcetonuria).
- Prueba de aceptación. Estas pruebas son realizadas al momento de agregar los componentes del alimento, para ver sus efectos y si realmente es necesario la adición de ellos, evitando pérdida de dinero.
- Aspectos reguladores. Los requerimientos legales varían según el país y sus normas, pero en sí engloba la información de elaboración del producto (contenido de aminoácidos).

2.3 Cromatografía

2.3.1 Teoría de cromatografía

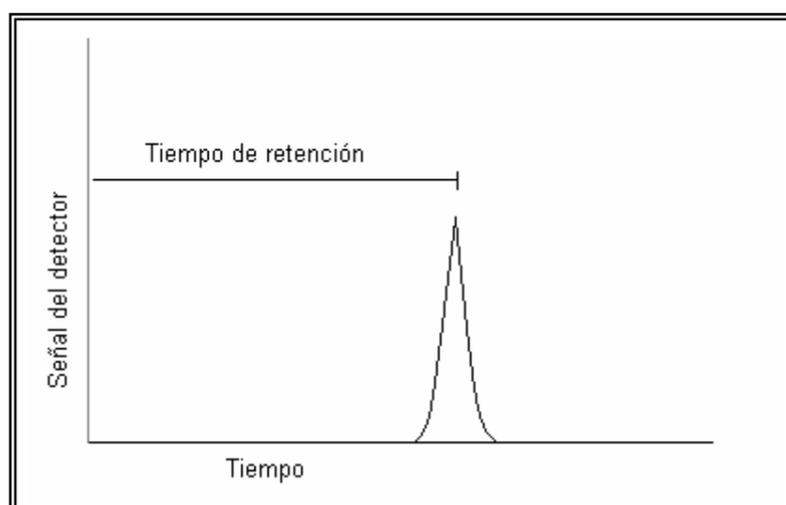
La cromatografía por elución es un método para separar en sus componentes una mezcla de solutos, además es empleada con el propósito de purificar productos de interés. Esta se efectúa en columnas empacadas con adsorbentes que pueden ser sólidos, sólidos porosos o geles (Tejeda, 1995).

La elución implica el transporte de una especie a través de una columna por la adición continuada de nueva fase móvil (Skoog, 2001).

En la cromatografía por elución isocrática la composición del eluyente se mantiene constante durante el proceso. En la elución por gradiente la composición del eluyente se varía gradualmente. Existen varias técnicas cromatográficas basadas en la interacción de una fase móvil líquida y una fase estacionaria, y según el principio que se maneje se denominan como cromatografía líquido-líquido,

cromatografía de filtración en gel o por exclusión y cromatografía por adsorción (Tejeda, 1995).

Según Skoog, *et. al.* (2001), si un detector que responde a la concentración del soluto se coloca al final de la columna y se registra su señal en función del tiempo (o volumen de fase móvil añadido), en forma de pico, este gráfico se denomina cromatograma (figura 3), es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra, y además las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.



Fuente: Skoog, (2001).

Figura 3. Cromatograma

2.3.2 Columnas

Skoog, *et. al.* (2001), reportan que las columnas para cromatografía de líquidos se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme, aunque en algunas ocasiones se encuentran tubos de vidrio de paredes resistentes. La mayoría de las columnas tienen una longitud entre 10 y 30 cm. Por lo común, las columnas son rectas y se pueden alargar, si es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas es a menudo

de 4 a 10 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 5 o 10 μm . La columna más frecuentemente utilizada es la de 25 cm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, y rellena con partículas de 5 μm .

Los típicos rellenos de las partículas porosas para cromatografía de líquidos están formados por micropartículas porosas con diámetros entre 3 y 10 μm , con la menor dispersión posible con respecto a un tamaño determinado. Las partículas son de sílice, alúmina, de una resina sintética de poliestireno-divinilbenceno o resinas de intercambio iónico, aunque, sílice es el material de relleno más común en cromatografía de líquidos.

2.3.3 Detectores

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debe poseer las siguientes características: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos que se extienda a varios órdenes de magnitud, tiempo de respuesta corto independiente del caudal, alta fiabilidad y manejo sencillo, respuesta semejante para todos los solutos y no destructivo a la muestra (Skoog, 2001).

➤ Fluorescencia y ultravioleta en forma nativa

Muchos tipos de especies químicas tienen la propiedad de fluorescer, es decir, absorben radiaciones de longitudes de onda corta y luego emiten radiaciones de longitudes de onda más largas. Bajo ciertas condiciones, estas presentan una intensidad de fluorescencia que puede relacionarse fácilmente con la concentración. Las bases para el fenómeno de la fluorescencia son, primeramente, la excitación de las especies a un nivel electrónico superior mediante radiación electromagnética; segundo, pérdida de parte de la energía suplementaria por medio de colisiones, y tercero, radiación, después de un período muy corto, de menos energía de la que fue absorbida. La intensidad de la fluorescencia es notablemente sensible a las condiciones tales como la

concentración, la presencia de sustancias extrañas, el pH y la temperatura. Todas estas afectan la estabilidad del estado electrónico excitado o la estructura de las especies fluorescentes (Strobel, 1982).

La mayoría de los aminoácidos (excepto aquellos con cadenas aromáticas) no poseen grupos cromóforos para la detección en el espectrofotómetro, a menos que se lea a longitudes de onda muy bajas (210 nm) y existen muchos compuestos orgánicos que absorben a esa longitud de onda, resultando una selectividad pobre y picos de interferencia en los resultados.

➤ **Índice de refracción**

El índice de refracción de un medio es una medida de su interacción con la radiación. La interacción implicada en la transmisión puede atribuirse a la polarización (deformación transitoria de las nubes de electrones asociados a los átomos o a las moléculas, causado por el campo electromagnético alternante de la radiación) periódica de las especies atómicas y moleculares que constituyen el medio (Skoog, 2001).

La desventaja de este método es que cualquier componente de la muestra será detectado como señal. El índice de refracción no es selectivo, esto lo hace incompatible con el gradiente de dilución, además los resultados del detector varían conforme cambia la temperatura en el laboratorio haciendo más problemático el uso de este equipo para aminoácidos.

➤ **Electroquímico**

Un grupo importante de los métodos analíticos se basa en las propiedades electroquímicas de las soluciones. Considérese la solución de un electrolito contenida en un recipiente de vidrio y en contacto con dos conductores metálicos.

Siempre que una corriente directa pasa a través de una celda electrolítica se lleva a cabo una reacción de oxidación-reducción (Ewing, 1978).

El análisis de aminoácidos se realiza por detección directa, mediante un electrodo (carbón) con un potencial constante, el cual reconoce los aminoácidos que poseen grupos aromáticos o sulfurados.

➤ **Nitrógeno quimioluminiscente**

El método de quimioluminiscencia, se basa en el espectro de emisión de una especie excitada que se forma en el curso de una reacción química. En algunos casos, las partículas excitadas son los productos de una reacción entre el analito y un reactivo adecuado (normalmente un oxidante fuerte como el ozono o el peróxido de hidrógeno); el resultado es un espectro característico del producto de oxidación del analito o del reactivo en lugar del espectro del propio analito; en este tipo de análisis no se requiere una fuente de radiación externa, la propia muestra es el emisor (Skoog, 2001).

Nuevos métodos para detección de aminoácidos por HPLC han sido publicados y no entran en la clasificación general de las detecciones. Una de estas técnicas publicada por Fujinari y Manes (1994), es nitrógeno quimioluminiscente. La detección se realiza mediante la oxidación a altas temperaturas (1000 – 1100°C) de cualquier compuesto nitrogenado que contenga la muestra eluída por la columna, como resultado el nitrógeno cambia a óxido nítrico el cual es medido.

2.3.4 Validación de métodos analíticos

Según la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (2001), para lograr un buen análisis es necesario validar el método, que significa tener una evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de las

especificaciones y los atributos de calidad establecidos. Validar es verificar documentalmente que un método o proceso hace lo que tiene que hacer. Una de las etapas para la validación es poner a punto el método, que incluye desde los primeros estudios de tanteo con patrones, hasta la utilización de muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis.

Las características de fiabilidad son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación.

Selectividad: Capacidad de un método analítico para medir y/o identificar simultáneamente o separadamente los analitos de interés, de forma inequívoca, en presencia de otras sustancias químicas que puedan estar presentes en la muestra.

Linealidad: Se define como la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

Rango: Se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior para las cuales se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método.

Precisión: es la capacidad de un método para proporcionar resultados próximos entre sí. Se puede a tres niveles: repetibilidad: evalúa la precisión del método (precisión intraensayo); precisión intermedio: evalúa la precisión frente a variaciones de analista, equipo y día; reproducibilidad: evalúa la precisión entre laboratorio (precisión interlaboratorios).

Repetibilidad del sistema instrumental: Este parámetro estudia la variabilidad debida únicamente al instrumento, y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces.

Repetibilidad del método: Se efectúa con una serie de alícuotas de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista. Puede realizarse con un mínimo de 6 muestras a la concentración nominal o un mínimo de 3 muestras a tres niveles de concentración cubriendo el intervalo especificado (un total de 9 muestras).

Exactitud: expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Límite de cuantificación: Se define como la cantidad mínima de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión.

Límite de detección: Se define como la mínima cantidad de un analito en una muestra que puede ser detectado aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud.

2.3.5 Reactivos para derivatización de aminoácidos

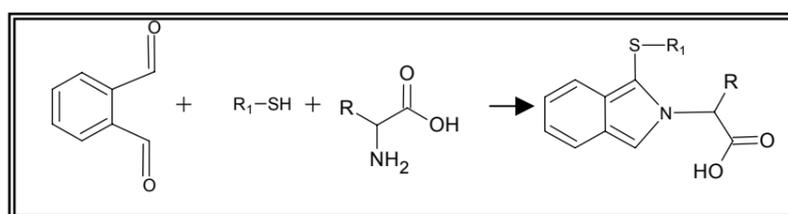
Existen diversos reactivos de derivatización y cada uno de ellos tiene características funcionales distintas, así como sus ventajas y desventajas específicas, por ello en ocasiones son utilizadas en conjunto para obtener mejores resultados.

➤ **PITIC (fenilisotiocianato) $\lambda_{Abs}= 254$ nm**

Es estable a temperatura ambiente (1 día) reacciona con aminoácidos primarios y secundarios con un tiempo de reacción de 5 minutos aproximadamente. Pero su sensibilidad es baja comparada con los métodos de determinación fluorométrica (Sánchez Machado, *et. al*, 2003).

➤ **OPA (orto-ftalaldehído)**

En la reacción del OPA con el aminoácido (figura 4), la derivatización no es muy estable (dura unos minutos). Es utilizado en post columna. Reacciona solo con aminas primarias. Para la reacción con aminoácidos necesita de un cofactor (Schuster, 1988).

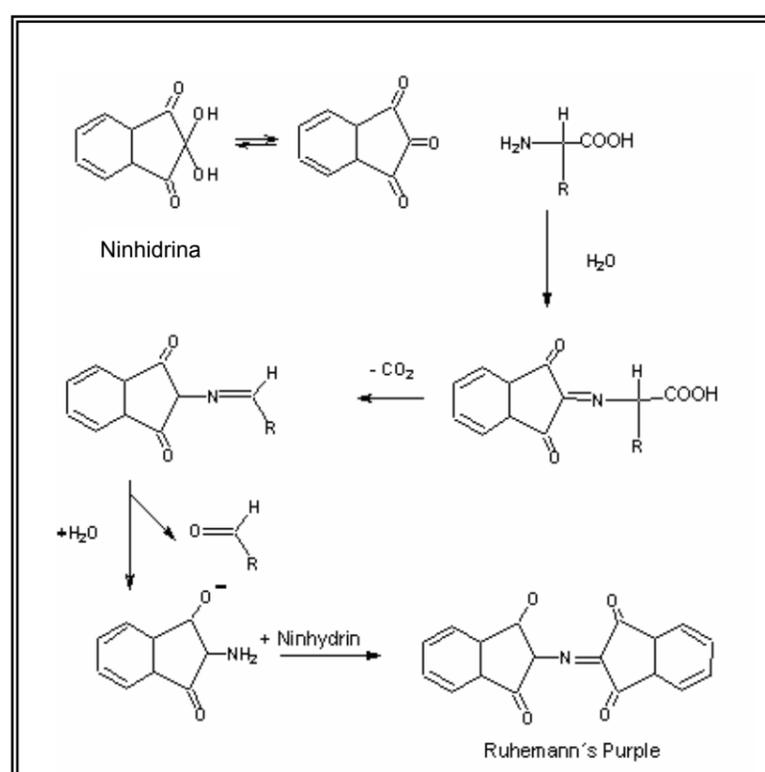


Fuente: Kivi, 2000

Figura 4. Reacción de los aminoácidos con OPA

➤ **Ninhidrina (2,2-Dihidroxi-1,3-indanodiona)**

No es posible realizar derivatización en precolumna. La reacción con aminoácidos primarios da como resultado un compuesto cromóforo llamado Ruhemann's purple ($\lambda_{Abs} = 570$ nm) (Figura 5). El aminoácido secundario reacciona de manera distinta dando una absorción a una longitud de onda menor, 440 nm.



Fuente : Kivi, 2000

Figura 5. Reacción de aminoácidos con ninhidrina

- **Dansyl Chloride (5-N,N-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonyl chloride)**

Los derivatizados son estables (durante días, si se protege de la luz); y pueden ser formados de aminoácidos primarios y secundarios. Su detección es fluorométrica pero absorbe también a 250 nm. Si se utiliza en exceso puede interferir con la separación, ya que es muy fluorescente. El tiempo de reacción es lento, aproximadamente 1 hora a 60 °C (Kivi, 2000).

➤ **Dabsyl chloride (4-dimethyl-aminoazobenzene-4-sulfonyl chloride)**

$\lambda_{\text{abs}} = 420 \text{ nm}$

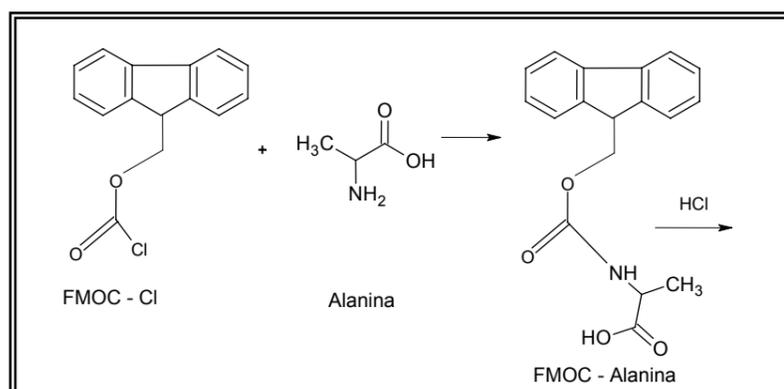
Los productos derivatizados son estables (algunos días) y pueden formarse a partir de aminoácidos primarios y secundarios. Su detección es solo por absorción. El tiempo de reacción es de 10 minutos a 70 °C. La presencia de sal afecta los resultados de la reacción (Krause, 1995).

➤ **AQC (6-aminoquinoly-N-hidroxysuccinimidylcarbamate)**

La derivatización es muy estable (días) a temperatura ambiente y puede ser formado a partir de aminoácidos primarios y secundarios. La presencia de sales, lípidos, detergentes y otros componentes de la muestra no interfieren con la reacción. Su tiempo de reacción es rápido (Cohen et al, 1993).

➤ **Fmoc (9-fluorenil- metil cloroformato)**

La derivatización es estable (días) y puede interaccionar con aminoácidos primarios y secundarios. El reactivo es muy fluorescente en su forma nativa. Tiene un rápido tiempo de reacción, 90 segundos aproximadamente.

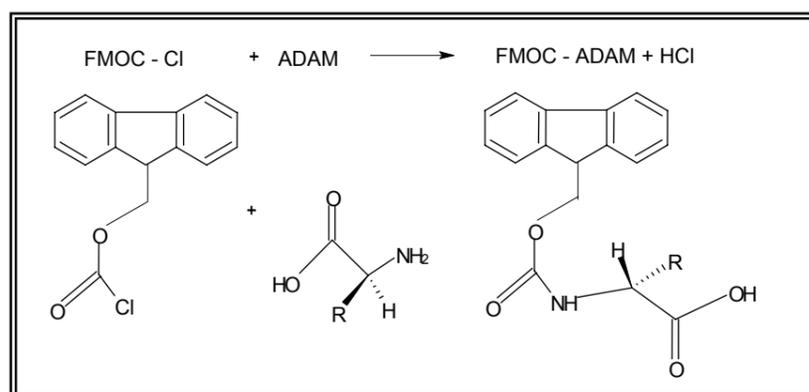


Fuente: Fabiani, et. al. 2002.

Figura 6. Reacción química de FMOC-Cl con Alanina

FMOC-Cl ha sido utilizado junto con ADAM (1-amino-adamantane hydrochloride) para el análisis de aminoácidos en hidrolizados de proteína (Einarsson, 1983).

ADAM es una amina hidrofóbica que reacciona en exceso con FMOC - Cl para formar un complejo (FMOC - ADAM) para reducir la interferencia cromatográfica del FMOC - OH que se forma en ambiente alcalino.



Fuente: Fabiani, et. al; 2002.

Figura 7. Reacción química entre FMOC-Cl y ADAM

2.4 Antecedentes bibliográficos de los métodos de determinación de aminoácidos libres

Las metodologías predominantes para el análisis de aminoácidos en los alimentos se basan en Cromatografía Líquida de Alta Resolución, HPLC, por sus siglas en inglés High Performance Liquid Chromatography.

Pero también existen algunos métodos alternativos, varias de las determinaciones se han logrado mediante pruebas microbiológicas y otros bio-ensayos, pero presentan algunas desventajas. Las principales variables que se ven afectadas son, el costo y el largo tiempo de análisis requerido, al igual que estos métodos están propensos a resultados negativos y con una alta variabilidad.

La de mayor aceptación como alternativa del HPLC en el análisis de aminoácidos es la Cromatografía de Gases, GC (Gas Chromatography), Fantozzi y Montedoro (1974), indican que esta técnica requiere de una cuidadosa extracción de la muestra y un proceso de preconcentrado, así como los procesos de elaboración de la precolumna de derivatización y su costo. Dichas dificultades son tomadas en cuenta al realizarse la evaluación de la confiabilidad del método.

El método más adecuado es principalmente HPLC fase reversa, con una precolumna de derivatización, la cual tiene la ventaja de tiempos cortos de análisis, instrucciones de uso relativamente sencillas y un bajo costo (Sánchez – Machado, *et. al.* 2003).

Godel y otros (1991), confirman las ventajas del método antes mencionado, además agregan que con este método se reducen o evitan pasos de extracción previas de la muestra, así como obtener resultados de sensibilidad similares a los encontrados por GC y una simple automatización, lo cual hace el método útil para procesar gran número de muestras.

2.4.1 Tratamientos utilizados en la preparación de la muestra

La metodología para la determinación de aminoácidos consta básicamente de dos etapas; la primera es la preparación de la muestra, mientras que la segunda involucra el análisis cromatográfico. En la tabla 4 se presenta la metodología sugerida para el manejo de muestra realizado por diversos autores en investigaciones previas. Para la determinación del contenido total de aminoácidos se requiere la hidrólisis química de las proteínas (Jean, *et. al* (2000), Haynes y Sheumack (1991), Sánchez, *et. al* (2003), Shang y Wang (1996), Hagen, *et. al* (1989)) y en la cuantificación de aminoácidos libres la preparación de la muestra implica solamente su dilución y filtración (Fabiani, *et. al* (2002), Shangguan, *et. al* (2001), Herbert, *et. al* (2000)).

Tabla 4. Tratamientos de preparación de la muestra

Autor	Procedimiento
Jean, <i>et. al</i> (2000)	La muestra se somete a hidrólisis ácida (HCl 6 N) para minimizar las reacciones con los azúcares reductores y los aldehídos, el tratamiento se hace a 105-115°C tras neutralización del ácido se lleva a sequedad, se redisuelve en un volumen pequeño y se analiza.
Haynes y Sheumack (1991).	Las muestras se colocan en viales y son secadas al vacío durante 1 hora y se hidrolizan con ácido clorhídrico 6M a 110° C durante 24 horas y después fueron secadas al vacío de nuevo. Se agregan 10 µL de trietilamina-etanol-agua (2:2:1) y evaporada para remover el residuo de HCl, después se redisuelve en 5 µL del buffer de derivatización.
Fabiani, <i>et. al</i> (2002).	Las muestras fueron jugos de frutas comerciales, por lo que solo se centrifugaron a 1500 g por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue derivatizado y filtrado.
Sánchez, <i>et. al</i> (2003).	Se utilizaron distintas cantidades de muestra (100, 200 y 300 mg), y distintas cantidades de HCl 6M (10, 15 y 20 mL) y se encontró que las condiciones óptimas de hidrólisis fueron con 100 mg de muestra (20 mg de proteína) y 10 mL 6M HCl a 110°C por 24 hr.
Shang y Wang (1996).	La muestra fue secada en un horno a una temperatura de 50°C, una vez seco se trituró en un mortero y se realizó una hidrólisis de la muestra con HCl 6 M con 1% de fenol (100 µL de fenol se agregan a 10 mL de HCl) en un horno de microondas durante 5 min a 300 W, después las muestras se filtraron y se analizaron por HPLC.
Shangguan, <i>et. al</i> (2001)	Se mezclaron las soluciones de aminoácidos con gel de silica alcalino y se secaron a 60 °C durante 3 hr para evaporar el agua, se tomo una cantidad de ésta muestra y se agrego el reactivo para derivatizar, se adiciona el eluyente y filtra para el análisis.
Hagen, <i>et. al</i> (1989)	Se pesa en un tubo de ensayo la cantidad de muestra suficiente para tener 40 mg de proteína a la cual se agregaron 15 mL de HCl 6 N, se cerro el tubo al vacío con nitrógeno. Se hidrolizó durante 24 horas a 110°C, se enfrió a temperatura ambiente y se derivatizó para el análisis.
Herbert, <i>et. al</i> (2000)	Las muestras líquidas se hicieron pasar a través de un filtro whatman no.4 y se diluyeron 1:4 (v/v) con la solución estándar de 62.5 mmoles/L en acido clorhídrico 0.1 M y se filtro de nuevo con un filtro de 0.45 mm antes del análisis.

➤ Aminoácidos libres

La preparación de las muestras para el análisis de aminoácidos libres por lo general involucra dos pasos. El primero es asegurar la disolución completa del blanco o muestra de aminoácidos. En las muestras líquidas no hay problema porque ya se encuentran en ese estado pero en el caso de los sólidos, es requerido un poco más de esfuerzo el cual normalmente incluye una homogenización de la muestra y luego una extracción de los aminoácidos. El segundo paso en el análisis es la limpieza de la muestra para evitar que los componentes de la matriz interfieran con el análisis.

Extracción

Una vez homogenizada la muestra, la extracción de los aminoácidos libres es un proceso simple en el que se disuelve la muestra en el solvente apropiado, la temperatura ayuda a la disolución pero debe cuidarse de no dañar el contenido de aminoácidos.

Limpieza

En las muestras de alimentos las matrices contienen gran variedad de componentes que pueden interferir en el análisis de aminoácidos.

Por lo regular, los péptidos y proteínas son los responsables de una disminución de la resolución, así como la aparición de picos erróneos y dobles que impiden una adecuada interpretación de resultados.

Los resultados más eficientes del método HPLC en fase reversa con una precolumna de derivatización para aminoácidos, se han logrado utilizando solventes orgánicos como agentes precipitantes.

➤ Aminoácidos totales o proteinogénicos

De acuerdo con Lehninger (1990), una vez que la cadena polipeptídica a examinar se ha obtenido en forma homogénea, sin que quede ya ningún enlace transversal disulfuro o grupos sulfhidrilo libres, se somete a hidrólisis completa y se determina su composición en aminoácidos. Los enlaces peptídicos se hidrolizan con facilidad por calefacción, ya sea con un ácido o con una base. La calefacción de los polipéptidos con exceso de ácido clorhídrico 6 N, entre 100 y 120 °C durante 10 a 24 h, normalmente en un tubo cerrado en el que se ha hecho el vacío, constituye el procedimiento más frecuente de efectuar la hidrólisis completa. En estas condiciones apenas se produce la racemización de los aminoácidos. Sin embargo, no todos los aminoácidos pueden recuperarse cuantitativamente después de una hidrólisis ácida; el triptófano generalmente, se destruye por este tratamiento, el cual provoca también la pérdida de alguna cantidad de serina y de treonina. Además, los grupos amida de la asparagina y de la glutamina experimentan hidrólisis completa transformándose en ácidos, para rendir los ácidos aspártico y glutámico respectivamente, y además iones amonio libres.

2.4.2 Derivatización

Los aminoácidos se separan y determinan mediante métodos cromatográficos entre otros. La cromatografía en capa fina proporciona una idea rápida de los aminoácidos mayoritarios de una muestra. Existen además métodos analíticos sensibles que permiten establecer, por ejemplo con la ayuda de HPLC o de analizadores de aminoácidos, resultados no solo cualitativos, sino también cuantitativos. Para la determinación rápida de aminoácidos libres se utiliza la valoración con formol, que conduce de manera rápida y sencilla a un punto final nítido que permite extraer conclusiones, especialmente en los zumos de frutas. Se conocen además métodos basados en las reacciones químicas de detección que se utilizan en parte debido a su especificidad para la determinación de ciertos aminoácidos o de las proteínas que contienen. Los productos de reacción coloreados se cuantifican fotométricamente (Matissek, 1998). Como se ha

mencionado la derivatización de los aminoácidos para su análisis es una de las alternativas más utilizadas por los resultados obtenidos en investigaciones anteriores (tabla 5). Dependiendo del uso o del compuesto a analizar existen diversos reactivos para llevar a cabo la derivatización, además dependiendo del tipo de muestra que se maneje y de los compuestos de interés a analizar, las condiciones cromatográficas serán distintas, por lo que es necesario hacer referencia a otros trabajos para determinar las condiciones ideales para el análisis (tabla 6).

Tabla 5. Ensayos de distintas investigaciones utilizando reactivos para derivatizar

Autor	Analito	Reactivo
Sánchez – Machado , <i>et. al</i> (2003)	Aminoácidos en algas comestibles	Fenil isotiocianato
Fabiani, <i>et. al</i> (2002)	Aminoácidos en jugos de fruta	9 – fluorenil metil cloroformato
Haynes y Sheumack (1991)	Aminoácidos	9 – fluorenil metil cloroformato.
Shang y Wang (1996)	Aminoácidos	Fenil isotiocianato
Oku, <i>et. al</i> (1986)	Aminoácidos	9 – fluorenil metil cloroformato
Shangguan, <i>et. al</i> (2001)	Aminoácidos y péptidos	9 – fluorenil metil cloroformato
Hagen, <i>et. al</i> (1989)	Aminoácidos en alimentos	Fenil isotiocianato
Herbert, <i>et. al</i> (2000)	Aminoácidos en vino	OPA/FMOC
Liu-Yin Fan, <i>et. al</i> (2003)	Aminoácidos	OPA/ N-acetil-cisteína (NAC)
Herbert, <i>et. al</i> (2004)	Aminoácidos en vino	OPA/FMOC
Kutlán y Molnár-Perl, (2002)	Aminoácidos en vino, cerveza y vinagre	OPA
Iwase, <i>et. al</i> (2000)	Aminoácidos en plasma humano	Ninhidrina

Tabla 6. Condiciones cromatográficas de distintas investigaciones en análisis de aminoácidos

Referencia	Columna	Fase móvil	Detección
Sánchez, <i>et. al</i> (2003).	25 x 4 cm, 5 mm, ODS2	<u>Solución A:</u> 0.14 M buffer acetato de amonio con 0.05% (v/v) TEA. <u>Solución B:</u> 60:40 (v/v) acetonitrilo – agua	254 nm.
Gartenmann y Kochhar (1999)	RP C ₁₈ (Nucleosil 100 – 3 C ₁₈ HD; 3 µm, 2 x 150 mm,)	<u>Solución A:</u> 0.045% ácido trifluoroacético (v/v) en agua. <u>Solución B:</u> 0.05% TFA / 80% ACN (v/v) en agua.	Sin derivatizar : 215 nm Derivatizado : 260 nm
Brückner y Westhauser (2003)	250 mm x 4mm ID y precolumna 20 mm x 4 mm ID, Hypersil ODS 5 µm.	<u>Solución A:</u> 23 mM acetato de sodio. <u>Solución B:</u> mezcla de CH ₃ OH y acetonitrilo	Detector de fluorescencia de 230 nm y 445 nm de emisión.
Antoine, <i>et. al</i> (1999)	Ultrasphere ODS 5 µm, 4.6 mm x 25 cm.	<u>Solución A:</u> 0.05Mbuffer fosfato de sodio, metanol y THF (80:19:1). <u>Solución B:</u> 80% metanol y 20% de buffer NaH ₂ PO ₄ 0.05M.	Fluorescencia , Ex:330 nm y Em: 418 nm.
Herbert, <i>et. al</i> (2000)	C18 (200 x 2.1 mm), precolumna 15 x 2.1 mm	<u>SoluciónA:</u> 20 mM buffer acetato de sodio con 0.018% v/v de trietilamina. <u>Solución B:</u> 20% buffer acetato de sodio 100 mM con Em: 450 nm 40% de acetonitrilo y 40% de metanol.	Ex: 340 nm Em: 450 nm
Fabiani, <i>et. al</i> (2002)	Purospher RP – 18 (250 x 4 mm, 5 µm ID)	<u>Solución A:</u> 50 mM buffer acetato <u>Solución B:</u> acetonitrilo.	MD -1510 diodos 263 nm.
Haynes y Sheumack (1991)	150 x 4.6 mm I.D.Spherisorb 3-µm ODS-2 y 15x3.2 mm I.D, 7 µm ODS.	<u>Eluyente A:</u> 20mM de fosfato de amonio (pH 6.5) – metanol (85:15). <u>Eluyente B:</u> acetonitrilo – agua (90:10).	Fluorescencia Ex: 263 nm Em: 313 nm.

III - MATERIALES Y METODOS

3.1 Patrones y reactivos químicos.

Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura purificada con un sistema Milli-Q (Nano pure Diamond, Barnstead). Fmoc (9-fluorenil metil cloroformato) (Sigma, St. Louis, MO, USA) se disolvió en acetonitrilo (EMD Chemicals Inc. Darmstadt, Germany, Grado HPLC); el buffer de boratos fue preparado con ácido bórico y agua ajustando el pH a 8.5 con hidróxido de sodio 1M (Productos Químicos Monterrey, Nuevo León, México). El reactivo para eliminar el Fmoc sin reaccionar (Cleavage) se preparó utilizando hidróxido de sodio 0.85M con hidroxilamina 0.5M y 2 – metiltioetanol (Sigma-Aldrich); también la solución para ajustar el pH de la reacción (Quench) se preparó con ácido acético glacial y acetonitrilo (Productos Químicos Monterrey, NL, México).

La fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de 3 soluciones de distinta composición: Fase A: 30 mM fosfato de amonio (pH 6.5) disuelto en una mezcla de metanol – agua (15:85); fase B: metanol – Agua (15:85) y la fase C: acetonitrilo – agua (90:10), todos ellos proporcionados por EMD Chemicals Inc.

3.2 Recuperación del hidrolizado

3.2.1 Fermentación

Para la fermentación se depositaron aproximadamente 500g de cabeza molida en recipientes de plástico de 1kg de capacidad, agregando del 6.6% de azúcar (p/v), al igual que el inóculo (probiótico) en 50% (p/v); es importante disminuir el pH de la mezcla por debajo de 6.5 con ácido cítrico al 10% para evitar una putrefacción de la muestra.

Los recipientes con la muestra fueron incubados durante 24 horas a 30°C y se monitoreó el pH y la acidez titulable (NaOH 0.1N) cada 3 horas hasta obtener un pH menor a 4.5 y una acidez titulable de 3.5%.

3.2.2 Centrifugación

Una vez terminada la fermentación la muestra se centrifugó a 6440 g a 8 °C durante 15 minutos para separar las fases (quitina, licor, sobrenadante – pigmentos), recolectando el licor o fase acuosa rica en proteínas.

3.3 Preparación de la muestra para cuantificación de aminoácidos

3.3.1 Liofilización de la muestra

El licor tomado de la centrifugación se congeló y se liofilizó, para obtener un producto concentrado y de fácil manejo, esto se realizó en un liofilizador a - 40°C y una presión por debajo de 133×10^{-3} mBar. Con este tratamiento se garantiza que el producto final no contenga humedad. El polvo liofilizado se almacenó en

bolsas de plástico herméticas y protegidas contra la luz dentro de un desecador, posteriormente se pesaron 25 mg de muestra y se aforaron a 25 ml con la solución buffer de boratos, las muestras se sonificaron durante 2 minutos para que se disolvieran por completo y se agitaron 30 segundos en el vortex. La solución se encuentra lista para la derivatización.

3.3.2 Derivatización de los aminoácidos con FMOC

La derivatización de los aminoácidos se llevo a cabo acorde al método de Haynes y Sheumack (1991), realizando algunas modificaciones. El proceso se inició tomando 300 μL de la solución de muestra y se depositó en un vial con una capacidad de 1.5 mL, se agregaron 300 μL del reactivo FMOC y se agitó en el vortex durante 90 segundos, al terminar el tiempo se añadieron 180 μL del reactivo Cleavage y la solución resultante se mezcló en el vortex, una vez hecho esto se dejó reposar la solución durante 3.5 minutos, posteriormente se agregaron 420 μL del reactivo Quench transcurrido el tiempo de reposo, la solución se mezcló una vez más en el vortex y se filtró utilizando una membrana millipore de 0.45 μm ; después de esto la muestra quedó lista para ser analizada por HPLC.

3.4 Equipo y condiciones HPLC

Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de líquidos equipado con un auto muestreador y un detector de fluorescencia controlado con un software (WinCrom), la temperatura de la columna se controla a 38 °C con un calentador de columna, todo el equipo utilizado es proporcionado por GBC Instrumental, Australia. La separación se lleva a cabo con una columna de fase reversa 4.6 mm SGE Hypersil ODS C18, para el análisis cromatográfico se inyectan 5 μL de la muestra derivatizada.

Para lograr poner a punto el método, esto es que las condiciones cromatográficas sean las más adecuadas para el análisis, se evaluaron distintos parámetros controlables, se probaron diferentes velocidades de flujo de la bomba (0.8 mL/min, 1.0 mL/min, 1.2 mL/min, 1.4 mL/min), diferentes temperaturas de la columna (34°C, 36°C y 38°C) esto con la finalidad de que el método fuese más preciso y exacto. Los aminoácidos se separan con un gradiente de elución el cual se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Programa de la bomba (flujo en gradiente)

Tiempo (min)	Fase A%	Fase B%	Fase C%
0	16.5	69	14.5
26	11	44	45
26.10	0	0	100
30	0	0	100
30.10	16.5	69	14.5
43	16.5	69	14.5

La velocidad de flujo utilizada fue de 1.20 mL/min. La longitud de onda del detector de fluorescencia fue de 270 nm excitación y 316 nm emisión.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras de liofilizado obtenido del fermentado de residuo de camarón fueron detectados 16 aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), glicina (Gly), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) y lisina (Lys). Los patrones de aminoácidos (Sigma, St. Louis, MO, USA) se disolvieron en ácido clorhídrico 0.1N y se realizaron diluciones para obtener diferentes concentraciones, todas éstas preparadas en buffer de boratos (pH 8.5). Para determinar las concentraciones de cada uno de los aminoácidos presentes en la muestra se realizaron rectas de calibración. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

4.1 Preparación de la muestra.

Para la determinación de la cantidad de muestra a utilizar en el análisis cromatográfico se realizaron ensayos preparando soluciones a distintas

concentraciones de muestra (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/mL) y tiempos de sonificación (0, 2, 4 minutos) todas ellas disueltas en buffer de boratos. Al analizar las muestras por HPLC se encontró que las muestras de 0.5 mg/mL y 1.0 mg/mL fueron las que presentaron una mejor resolución de los picos en el cromatograma, con estos resultados se determinó que debido a la cantidad de proteína presente en la muestra es recomendable utilizar concentraciones bajas del polvo liofilizado. A concentraciones de muestra mayores a 2.0 mg/mL, los cromatogramas presentaron picos poco resueltos.

Con estos resultados se decidió que la concentración de muestra a utilizar para el análisis de todas las muestras fuera de 1.0 mg/mL y 2 min de sonificación.

4.2 Precisión del método

Es necesario probar distintas condiciones de prueba con patrones previo al análisis de las muestras, para garantizar que el método está a punto y evitar errores al momento de inyectar la muestra desconocida. Se determinó que la temperatura de 38°C para la columna fue la óptima, debido que los picos se observaron mejor resueltos y más definidos (figura 8 [B]) en comparación del análisis realizado a 34 y 36 °C.

El efecto de la temperatura en el análisis cromatográfico puede observarse claramente en la figura 8, para los picos obtenidos con tiempos de retención entre 15 y 20 min. Para las condiciones cromatográficas utilizadas de 34°C y flujo de 1.0 mL/min (figura A) se presentaron picos empalmados lo cual se solucionó al realizar un incremento de temperatura a 38 °C, dando como resultado tres picos bien resueltos (figura B), además se observa que el tiempo de retención de cada uno de ellos disminuye.

La velocidad de flujo que mostró mejores resultados fue el de 1.2 mL/min, al aumentar o disminuir la velocidad de flujo de la bomba, los tiempos de retención

de los picos fueron modificados, siendo retenidos un mayor o menor tiempo respectivamente, pero si la velocidad de flujo es muy rápida, los picos tienden a juntarse demasiado y no son bien resueltos, al igual que si la velocidad es muy lenta, el pico puede extenderse demasiado y ocasionar una pobre resolución.

Después de evaluar los parámetros para el análisis se determinaron las condiciones óptimas con las cuales la muestra fue analizada (tabla 8). Se realizaron las rectas patrón de cada uno de los aminoácidos a analizarse, las cuales son necesarias para comparar la cantidad de aminoácido presente en cada una de la muestras, agregando distintas cantidades de patrón se obtuvieron rectas con concentraciones que oscilan entre los 4 y 57 $\mu\text{g/mL}$ aproximadamente; las rectas para alanina (tabla 9, figura 9), valina (tabla 10, figura 10) isoleucina (tabla 11, figura 11) fueron satisfactorias ya que presentaron valores de r^2 mayores a 0.999.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas establecidas para el análisis

Parámetro	Condiciones
Columna	4.6mm SGE Hypersil ODS C18 250 mm, 5 μm
Eluyente	Fase A: 30 mM fosfato de amonio Fase B: metanol – agua (15:85) Fase C: acetonitrilo – agua (90:10)
Velocidad de flujo	1.2mL/min
Detección	Fluorescencia Excitación: 270 nm Emisión: 316 nm
Temperatura	38°C

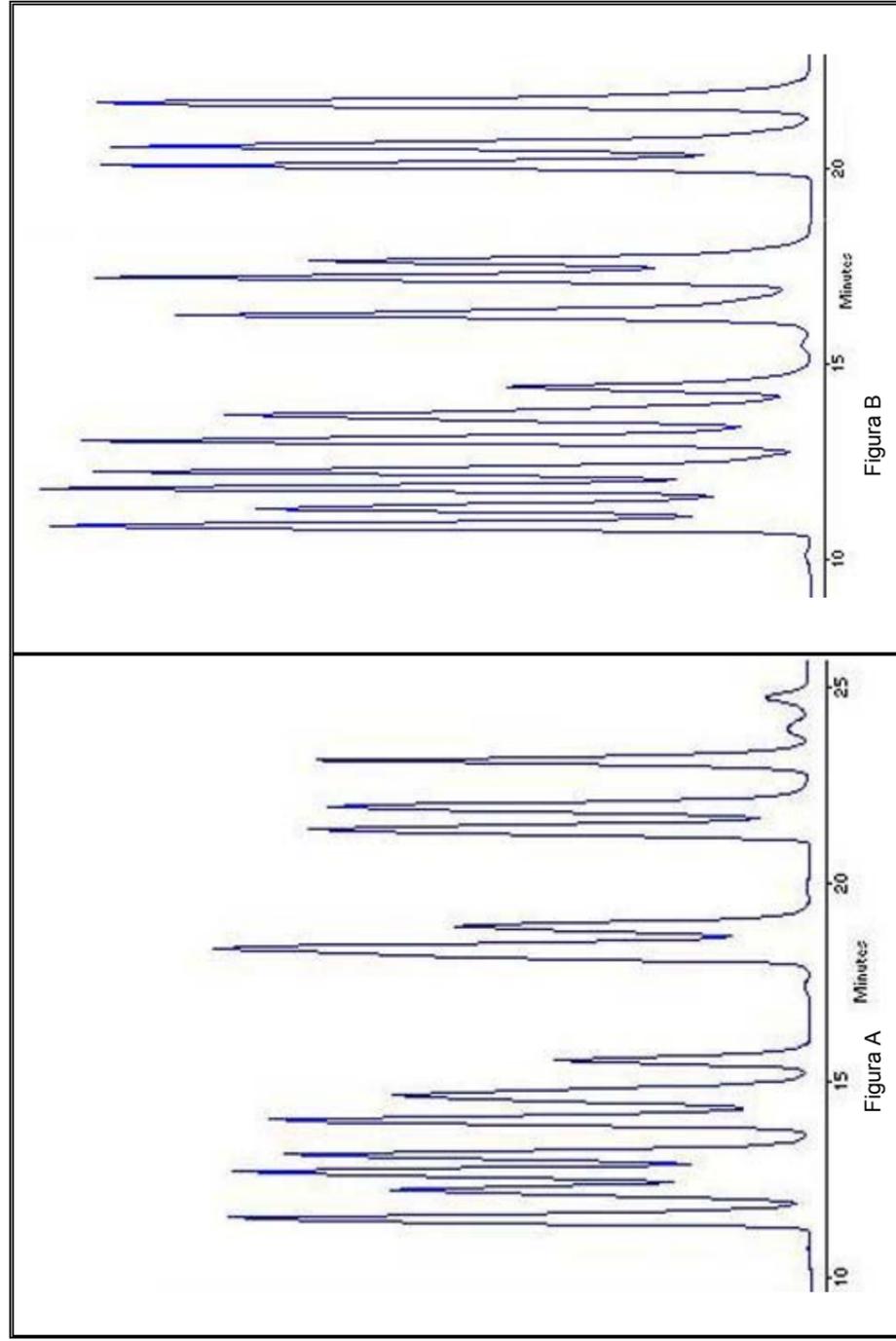


Figura 8. Cromatogramas de patrón de aminoácidos para pruebas de calibración del método. Figura

A. Temperatura de la columna 34° C, con un flujo de 1 mL/min. Figura B. Temperatura 38° C con un flujo de 1.20 mL/min

Con los resultados del estudio de la linealidad se preparó una tabla relacionando las cantidades o concentraciones x (variable independiente o predictiva) y la respuesta y (variable dependiente, por ejemplo áreas, alturas, absorbancias, etc.), la relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión tipo $y = ax + b$. Si la recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. Si existen diferencias apreciables entre los valores experimentales y los puntos de la recta significa que la linealidad no es buena (existe falta de ajuste) o bien que el error experimental es importante.

Tabla 9. Recta patrón para alanina

Patrón	altura 1	altura 2	Concentración $\mu\text{g/ml}$	altura Promedio
1	57309	58331	4,82	57820
2	115385	114036	9,64	114711
3	222418	225135	19,28	223777
4	421086	424763	38,56	422925
5	605133	617484	57,84	611309

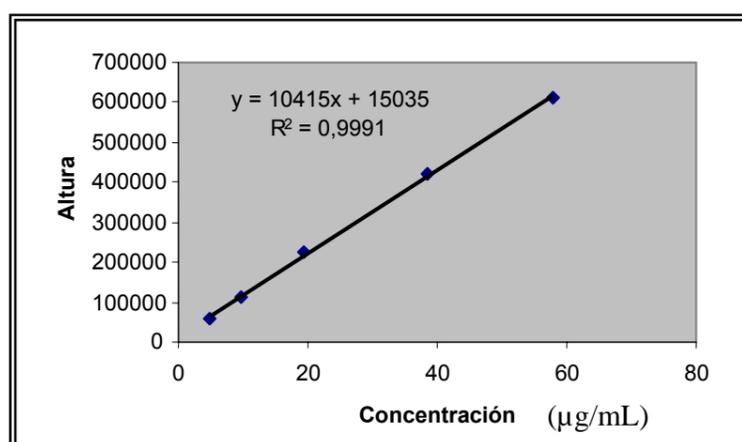


Figura 9. Datos de linealidad del patrón de alanina

Tabla 10. Recta patrón para valina

Patrón	altura 1	altura 2	Concentración µg/ml	altura Promedio
1	48825	51601	6,2	50213
2	103655	102581	12,4	103118
3	199836	203270	24,8	201553
4	385763	381450	49,6	383607

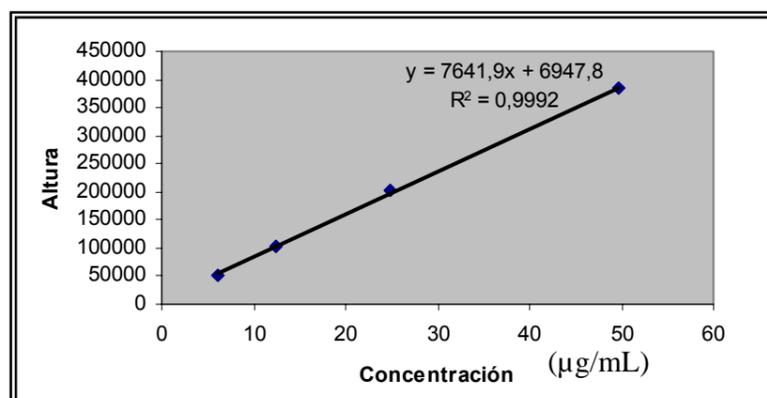


Figura 10. Datos de linealidad del patrón de valina

Tabla 11. Recta patrón para isoleucina

Patrón	altura 1	altura 2	Concentración µg/ml	altura Promedio
1	42120	41182	5,36	41651
2	82343	82003	10,72	82173
3	160990	163181	21,44	162086
4	308779	315925	42,88	312352

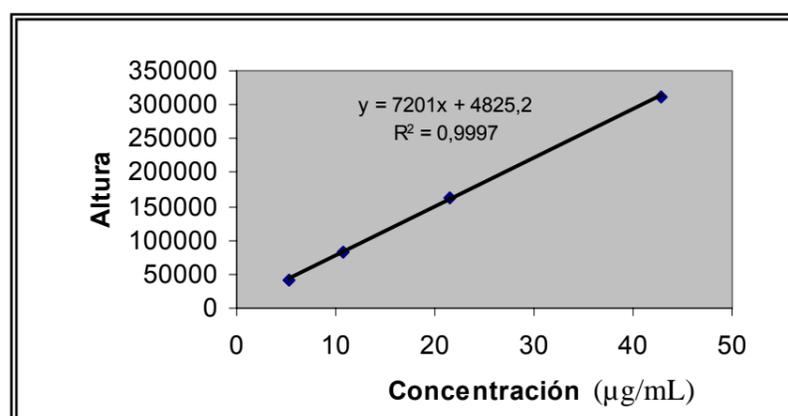


Figura 11. Datos de linealidad del patrón de isoleucina

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable x y la variable y, su valor máximo es 1. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es ≥ 0.999 aunque en caso de impurezas se admite ≥ 0.990 (Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001). Los resultados obtenidos en el análisis se presentan en la tabla 12 en donde la linealidad del método es muy buena según los valores expresados.

Tabla 12. Calibración y precisión del método para los diferentes aminoácidos considerados

Aminoácido	Ecuación de calibración	r^2	mgAA/1g muestra	Precisión (% RSD)
Alanina	$y = 10415x + 15035$	0.9991	31.45	5.60
Valina	$y = 7641.9x + 6947.8$	0.9992	22.69	5.88
Isoleucina	$y = 7201x + 4825.2$	0.9997	17.52	6.24

4.3 Recuperación del método

Como es complicado preparar una muestra idéntica a la analizada con ausencia del aminoácido a analizar, sobre todo tratándose de muestras liofilizadas, es más sencillo utilizar la técnica de adición de patrón. Se utiliza esta aproximación cuando no es posible preparar un placebo de una matriz de la muestra que no contenga el analito.

Se realizó un ensayo con una de las muestras obtenida por fermentación láctica, que se encuentra lista para ser analizada, se le adicionó una cantidad conocida de patrón de aminoácidos a un nivel de concentración (previo a la derivatización de las misma) para determinar que la cantidad de aminoácidos que se esta detectando es el correcto. Este método tiene la ventaja de utilizar muestras reales y no requiere la preparación especial de un placebo cargado. La prueba se realizó 8 veces por duplicado, la recuperación del método fue adecuada, al obtenerse valores mayores al 90% (tabla 13).

Tabla 13. Recuperación del método

Aminoácido	% Recuperación	% RSD
Alanina	91.63	2.46
Valina	95.48	3.47
Isoleucina	96.88	2.70

4.4 Análisis de las muestras

El muestreo se llevó acabo utilizando 16 muestras liofilizadas obtenidas de distintas fermentaciones, realizando corridas por duplicado bajo las mismas condiciones establecidas en el método, identificando los aminoácidos de interés por comparación con el patrón de aminoácidos (figura 12) los resultados de la cuantificación de los mismos se presenta en la tabla 14 .

Tabla 14. Resultados del análisis de muestras de camarón

Aminoácido	Tiempo de retención (min)	µg de AA/ 1g materia seca
Alanina	14.023	20.40
Valina	18.113	24.8
Isoleucina	20.753	18.8

La presencia de aminoácidos libres en el análisis realizado, se atribuye al tipo de muestra con el que se está trabajando, cabe señalar que es un desecho de un proceso industrial, además se está utilizando un hidrolizado obtenido a partir de la fermentación láctica. De acuerdo a Oyedapo (1997), Gildberg y Stenberg (2001), durante la fermentación láctica se produce una desproteización de la quitina lo cual permite obtener una fase acuosa rica en proteínas, péptidos y aminoácidos libres, estos ensayos son realizados con HCl 6 M y 110°C por 24 horas, las cuales son condiciones extremas en donde se garantiza el análisis de aminoácidos totales. Diversos autores (Oyedapo, 1997, Córdova-Murueta y García-Carreño, 2002, Gildberg y Stenberg, 2001) reportan el contenido total de aminoácidos en productos hidrolizados de cabeza de camarón, para ello se aplica la hidrólisis química de las proteínas. La cantidad de aminoácidos libres detectados en las muestras analizadas es inferior a valores presentados por otros autores (Gildberg y Stenberg (2001), Rosa y Nunes (2003), Hossain, *et. al* (2003)), en estudios con camarón y con hidrolizados de pescado, pero en estas investigaciones se cuantificó el contenido total de aminoácidos. En trabajos de investigación posteriores se ha considerado evaluar el contenido total de aminoácidos en muestras semejantes a las aquí estudiadas.

La importancia de los resultados obtenidos en el desarrollo de esta técnica analítica, no solo se basa en la obtención de nuevas técnicas confiables y reproducibles, para la investigación y avance científico, también se busca el dar un uso a un desecho industrial que puede generar beneficios económicos. Esta técnica puede ser aplicada en alimentos de características semejantes como son los hidrolizados de proteínas de origen animal o vegetal.

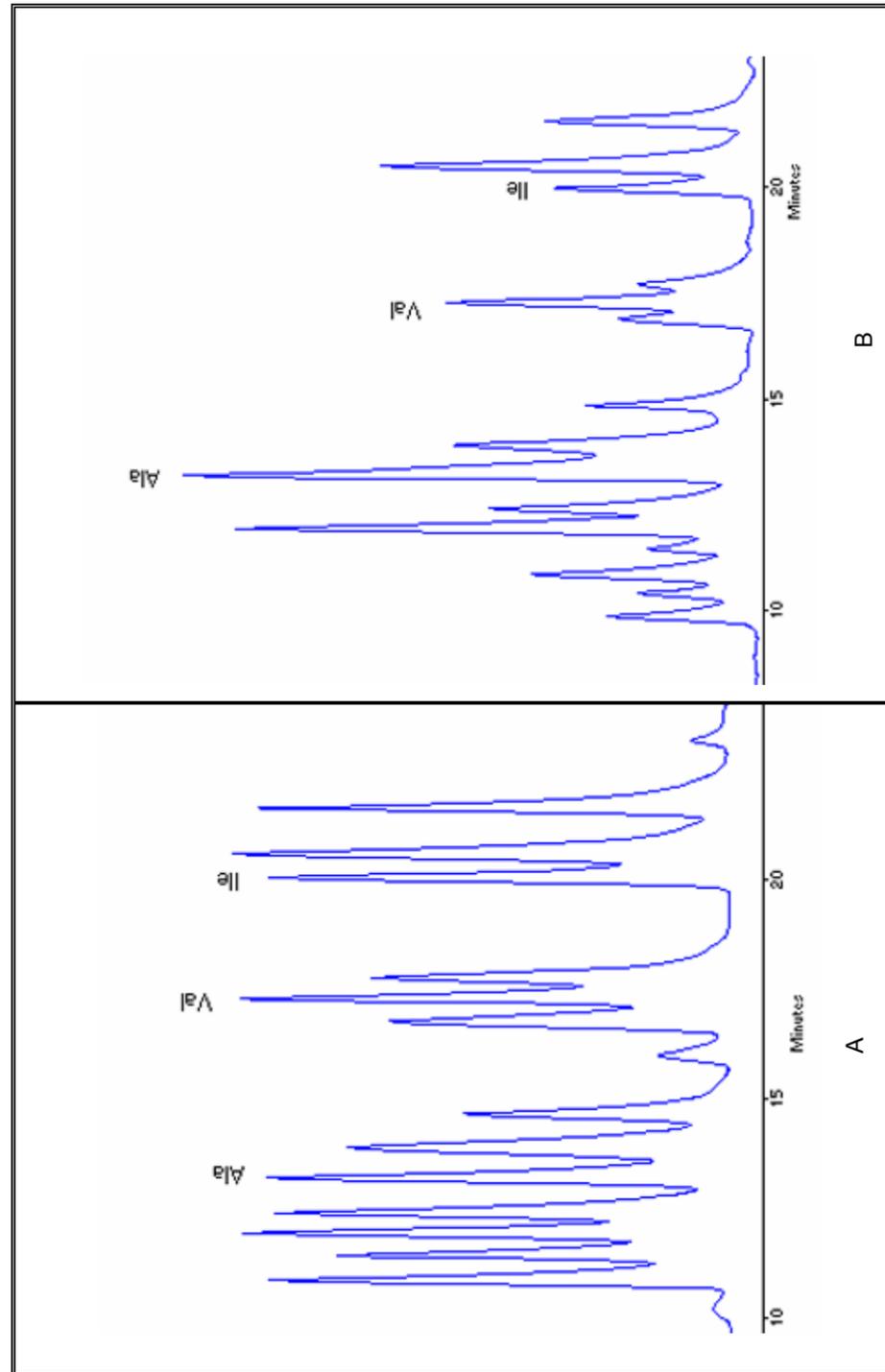


Figura 12. Cromatogramas. A) Solución patrón de aminoácidos. B) Hidrolizado obtenido de la fermentación láctica de residuo de camarón.

V. CONCLUSIÓN

En este trabajo se presentó un método HPLC sensible y reproducible para el análisis simultáneo de los aminoácidos libres presentes en el hidrolizado liofilizado de la cabeza de camarón utilizando una derivatización con FMOC.

La validación del método fue satisfactoria obteniéndose niveles de recuperación mayores al 90% y una buena precisión del método con valores de coeficiente de correlación mayores de 0.999, lo cual implica un gran potencial para la investigación y análisis de rutina.

Además, el valor agregado del hidrolizado obtenido a partir de residuos de cabeza de camarón ha despertado interés en su uso como suplemento alimenticio en la acuicultura así como saborizante en dietas.

BIBLIOGRAFÍA

- Antoine F.R, C.I. Wei, R.C. Littell and M.R. Marshall (1999). **HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization.** *J. Agric. Food Chem.* 47. 5100 – 5107.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (A.E.F.I) (2001). **Validación de métodos analíticos.** Barcelona, España.
- Badui S. (1999). **Química de los alimentos.** 3ed. 5reimpresión Editorial Alambra Mexicana. México, pp.125 –126.
- Baxter. J.H (1996). **Amino acids In: LML.** Ed. Nollet. *Handbook of Food Análisis.* New York: Editorial Marcel Dekker, pp 197 – 228.
- Bidlingmeyer, SA Cohen, TL Tarvin, BA Frost. (1987). **A new, rapid, high-sensitivity analysis of amino acids in food type samples.** *J Assoc off Anal Chem* 70: 241 – 247.
- Bourgeois, P. Le Roux. (1986). **Proteínas animales.** Ed. *El manual moderno,* México D.F. pp. 274 – 80.
- Brock, Madigan M, Martiniko J. (1999). **Biología de los microorganismos.** Octava edición, Ed. Prentice Hall , Madrid.
- Bruckner H. and Westhauser T. (2003). **Chromatographic determination of L- and D- amino acids in plants.** *Amino acids* 24: 43-55.
-
-

- Camarena, T. (1994). **Comunicación personal**. chakay derivados Tulum Quintana Roo, México.
- Cheffel Jean Claude, Jean-Louis Cuq y Lorient Denis (1993). Editado por Fennema Owen R. **Química de los Alimentos**. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Charley, H. (2001). **Tecnología de alimentos**. Limusa, p. 603. México, D.F. México.
- Cira, L.A., Huerta,S., Hall, G.M. and Shirai, K. (2002). **Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery**. *Process Biochemistry* 37, 1359-1366.
- Cira L.A., S. Huerta y K. Shirai* (2002). **Fermentacion lactica de cabezas de camaron (*penaeus sp*) en un reactor de fermentacion solida**. *Revista mexicana de ingeniería química*. Vol. 1 , 45-48.
- Cohen, DP Michaud (1993). **Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6 – aminoquinolyl – N – hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolisate amino acids via high-performance liquid chromatography**. *Anal Biochem* 211: 279 – 287.
- Córdova-Murueta Julio, García-Carreño Fernando (2002). **Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed**. *Aquaculture* 210, 371 – 384.
- Damodaran Srinivasan. Editado por Owen R. Fennema (2000). **Química de los alimentos**. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España.
- Dore, I. and Frimodt, C. (1987). **An illustrated guide to shrimp of the world**. Van Nostrand Reinhold Pub. Pp 19 – 42 N.Y. EEUUA.
- Einarsson, B. Josefsson, and S. Lagerkvist (1983). **Determination of amino acids with 9 – fluorenylmethyl chloroformate and reversed – phase high – performance liquid chromatography**. *J. Chromatogr.* 282: 609-18
- Ewing, W. Galen (1978). **Métodos instrumentales de análisis químicos**. Editorial McGraw Hill. Mexico. 592 pp.
- Fabiani A., Versari A., Parpinello, Castellari M. y Galassi S. (2002), **HPLC Analysis of Free Amino Acids in Fruit Juices Using Derivatization with FMOC-CL**. *Journal of Chromatographic Science* , Vol.40 pp. 14 – 18.
- Fantozzi P. Monteodoro G. (1974). **Determination of free amino acids in must and wines by gas – liquid chromatography**. *Am J Enol Vitic* 25(3): 151 – 156.
-

- Fujinari, EM. JD Manes. (1994). **Nitrogen – specific detection of peptides in liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detector.** *J Chromatogr A* 676: 113 – 120
- Garcilaso P (2001). **Bioquímica descriptiva.** Editorial Unisón. Hermosillo Sonora. p.114 – 115.
- Gartenmann Karin and Kochhar Sunil (1999). **Short-chain peptide analysis by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometer after derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate.** *J. Agric. Food Chem* 47, 5068-5071.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995). **Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics.** *J Nutr.* 125:1401–12.
- Gildberg Asbjørn, Even Stenberg (2001). **A new process for advanced utilisation of shrimp waste.** *Process Biochemistry* 36 pp. 809 – 812.
- Godel H, Seitz P, Verhoer M. (1991). **Automated amino acid analysis using combined OPA and FMOC – Cl pre-column derivatization.** *LC-GC International* 5(2): 44-49.
- Hagen, R. Steven, Frost Beberly, Augustin Jorg (1989). **Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food.** *Anal Chem* Vol 72, No 6.
- Hall, G. M. and De Silva, S. (1994). **Shrimp waste ensilation.** *Infofish International* 2, 27-30.
- Haynes Paul A. and Sheumach David, Lisa G. Greig and Jeffrey Kibby, John W. Redmond (1991). **Applications of automated amino acid analysis using 9 – fluorenylmethyl chloroformate.** *Journal of chromatography,* 588, 107 – 114.
- Herbert Paulo, Maria J. Cabrita, Nuno Ratola, Olga Laureano^c and Arminda Alves (2004). **Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage.** *Journal of Food Engineering* Volume 66, Issue 3, pp 315-322.
- Herbert P., P. Barros, N. Ratola and A. Alves (2000). **HPLC determination of amino acids in musts and port wine usin OPA/FMOC derivatives.** *Journal of food science,* vol 65, no.7 pp. 1130-1133.
-

- Hossain Anwar, Tadashi Ishihara, Kenji Hara, Kiyoshi Osatomi, Abu Ali Khan, Yukinori Nozaki. (2003). **Effect of Proteolytic Squid Protein Hydrolysate on the State of Water and Dehydration-Induced Denaturation of Lizard Fish Myofibrillar Protein.** *J. Agric. Food Chem*, 51, 4769-4774.
- IIB. (1995). **Comunicación personal.** UNAM, Instituto de investigaciones biomédicas, Departamento de biotecnología, México, D.F. México.
- Iwase Hiroshi, Shinichi Ozawa, Makiko Ikuta and Ichiro Ono (1995). **Determination of amino acids in human plasma by liquid chromatography with postcolumn ninhydrin derivatization using a hydroxyapatite cartridge for precolumn deproteination.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, volume 663, Issue 1, pp 15-24.
- Jean Adrian, Jacques Potus, Annie Poiffait, Pierre Dauvillier (2000). **Análisis nutricional de los alimentos.** Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. Pp. 292.
- Jürgen Schrezenmeir and Michael de Vrese (2001). **Probiotics, prebiotics, and synbiotics approaching a definition** *Am J Clin Nutr* 73: 361S-364S.
- Kivi T. Jeffrey (2000). **Food analysis by HPLC.** Editado por Nollet L. Leo. Editorial Marcel Dekker. 1049 pags.
- Krause I, A Bockhardt, H Neckermann, T Henle, H Klostermeyer (1995). **Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives.** *J Chromatogr A* 715: 67-79.
- Kutlán D. and Molnár-Perl L. (2003). **New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A* Vol. 987, Issues 1-2 , pp 311-322.
- Lehninger, Albert L. (1990). **Bioquímica.** Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1117 pp.
- Lilly DM, Stillwell RH (1965). **Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms.** *Science*; 147:747-8.
- Liu-Yin Fan, Hong-Li Chen, Ji-You Zhang, Xing-Guo Chen and Zhi-De Hu (2003). **Continuous on-line derivatization and determination of amino acids by a microfluidic capillary electrophoresis system with a continuous sample introduction interface.** *Analytica Chimica Acta* , vol. 501, Issue 2, pp 129-135.
-

- Martins, AP Afonso (1996). **A practical approach to improve the resolution of dansyl – amino acids by high-performance liquid chromatography.** *J Liq Chromatogr Relat Technol* 19: 467-476
- Matissek Reinhard, Frank –M. Schnepel, Gabriele Steiner (1998). **Análisis de los alimentos.** Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp 416.
- Monroy H., Oscar (1990). **Biología para el aprovechamiento de los desperdicios orgánicos** A.G.T. Editor S.A., México D.F
- Mukku Shrinivas Rao, Pan Yu, Willem F. Stevens, Suwalee Chandkrachang, Attaya Kungsuwan , George M. Hall. (1996). **Drum reactor for extraction of chitin from shrimp waste using lactic acid bacteria.** *2nd ASIA Pacific chitin symposium.*
- Oku Akira, Yamamura Yasunari, Harada Toshiro (1986). **((9-fluorenylmethyl)oxy)carbonyl (Fmoc) acid chlorides. Synthesis, characterization and application to the rapid synthesis of short peptide segments.** *J. Org. Chem* 51, 3732-3734.
- Oyedapo A. Fagbenro. (1996). **Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads.** *Food research international*, Vol. 29, No.7, pp. 595 – 599.
- Parker RB (1974). **Probiotics, the other half of the antibiotic story.** *Anim Nutr Health*; 29:4–8.
- Plascencia, M., Olvera, M.A., Arredondo, J.L., Hall, G.M. y Shirai, K. (2002). **Feasibility of fishmeal replacement by shrimp-head silage protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L)) diets.** *Journal of the Science Food Agriculture* 82, 753-759.
- Rao M. S., Muñoz J., Stevens W. F. (2000). **Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste.** *Appl microbiol biotechnol*, 54: 808 – 813.
- Rosa Rui y Nunes Maria L. (2003). **Nutritional quality of red shrimp, *Aristeus antennatus* (Risso), pink shrimp, *Parapenaeus longirostris* (Lucas), and Norway lobster, *Nephrops norvegicus* (Linnaeus).** *Journal of the science of food agriculture.* 84:89-94.
- Rupsankar Chakrabarti (2002). **Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process.** *Food Biotechnology*, 16(1). 81 – 90.
- SAGARPA en línea (2003).
http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/planeacion/boletin/ind_oct03.htm
-

- Sánchez – Machado, J. López – Cervantes , J. López Hernández , P. Paseiro – Losada , J. Simal – Lozano (2003). **High-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in edible seaweeds oafter derivatization with phenyl isothiocyanate.** *Chromatographia* 58, 159 – 163.
- Shang S. F. and Wang H. (1996). **Sensitive determination of amino acids in kelp by reversed phase high performance liquid chromatography with precolumn derivatization using phenylisothiocyanate.** *Chromatographia*, vol 43, No. 5/6.
- Schuster R. (1988). **Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high – performance liquid chromatography.** *J Chromatogr* 431: 271 - 284
- Shangguan Dihua, Yingxin Zhao, Huiwan Han, Rui Zhao y Guoquan Liu (2001). **Derivatization and fluorescence detection of amino acids and peptides with 9-fluorenilmethyl chloroformate on the surface of a solid adsorbent.** *Anal Chem* 73, 2054-2057.
- Skoog A. Douglas, Holler F. James, Nieman A. Timothy (2001). **Principios de análisis instrumental.** Quinta edición. Editorial McGrall Hill. España. pp, 1028.
- Soluap (1998). **Alternativas de Cultivos Acuícolas.** Tomo II. Ecuador.
- Strobel, A. Howard (1982). **Instrumentación química.** Editorial LIMUNSA, México. 716 pp.
- Tejeda M. Armando (1995). **Bioseparaciones.** Hermosillo, Sonora, México. Editorial UNISON.
- Windsor, Malcolm y Barlow, Stuart (1983). **Introducción a los subproductos de pesquería,** Zaragoza, Editorial ACRIBIA
- Ward P. Owen. (1989). **Bioteología de la fermentación.** Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. p.274.
- Wilhelm H Holzapfel, Petra Haberer, Rolf Geisen, Johanna Björkroth, and Ulrich Schillinger (2001). **Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.** *Am J Clin Nutr.* 73: 365S-373S.
-