



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS PARA
DETERMINAR EL PERFIL DE AMINOÁCIDOS EN
DIETAS FORMULADAS CON PROTEÍNA DE SOYA
EN SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA DE
PESCADO PARA EL CRECIMIENTO DE JUVENILES
DE TOTOABA (*TOTOABA MACDONALDI*)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA EN ALIMENTOS**

PRESENTA

MARIANA VILLEGAS ROMERO

MÉXICO, D.F. 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO ROJO CALLEJAS
VOCAL: M EN C. LUCIA CORNEJO CASILLAS
SECRETARIO: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES
1er. SUPLENTE: M EN C. MINERVA FUENTES CARRASCO
2do. SUPLENTE: Q.F.B. JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE NUTRICIÓN, FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS, UABC
ENSENADA, BAJA CALIFORNIA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES MARINOS
UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Sergio Rodríguez Morales

ASESOR TÉCNICO:

Dr. Mario Alberto Galaviz Espinoza

SUSTENTANTE:

Mariana Villegas Romero

CONTENIDO

Página

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
1. <i>Totoaba macdonaldi</i>	4
1.1 Acuicultura de <i>Totoaba macdonaldi</i>	4
2. Perfil de aminoácidos como criterio de salud de organismos marinos	6
2.1 Introducción	6
2.2 Métodos de cuantificación de proteínas totales	7
2.3 Preparación de muestras para el análisis del perfil de aminoácidos	11
2.4 Métodos para la determinación de aminoácidos en muestras marinas	12
2.5 Derivatizantes más utilizados en la determinación del perfil de aminoácidos	14
3. Validación de un método analítico	17
3.1 Criterios para la validación de métodos analíticos para la determinación del perfil de aminoácidos	17
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	19
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	20
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	21
CAPÍTULO VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA	22
CAPÍTULO VII. RESULTADOS	28
1. Implementación de metodología para determinar el perfil de aminoácidos utilizando el detector ELSD	28
2. Validación de métodos	31
2.1 Validación del método de triptófano	31
2.2 Validación del método de Waters	34
2.3 Validación del método de Agilent	38
3. Criterios de comparación en la metodología para la determinación del perfil de aminoácidos (Waters y Agilent)	41

4. Determinación del perfil de aminoácidos en dietas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado y músculo de <i>Totoaba macdonaldi</i>	46
CAPÍTULO VIII. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	58
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES	64
CAPITULO X. BIBLIOGRAFÍA	65

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

Totoaba macdonaldi es un pez carnívoro endémico del Golfo de California, muy cotizado en Oriente por su vejiga natatoria (buche) que se utiliza para preparar una sopa tradicional china que es altamente demandada por las creencia de sus propiedades medicinales, algunas personas llegan a pagar hasta mil quinientos dólares por el platillo. Su alta demanda produjo una sobreexplotación, por lo que en 1975 la SEMARNAT declaró una veda permanente (NOM-059-ECOL-SEMARNAT-2010) y entro a la lista de especies en peligro de extinción (CITES, 2013).

Además de las regulaciones establecidas por los órganos de gobierno, las instituciones académicas como la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) han realizado diversos estudios con el fin de conocer la especie y así rescatarla del peligro de extinción. Una de las estrategias interesantes para recuperar a *Totoaba Mcdonaldí*, es su reproducción y crecimiento en sistemas de acuicultura, que actualmente se encuentra en fase de desarrollo piloto comercial en la Facultad de Ciencias Marinas de la UABC.

La acuicultura es el sistema de producción de especies acuáticas en un medio controlado o semi-controlado, el cual se puede desarrollar en ambientes naturales o artificiales (Castelló, 1993).

Totoaba al ser un pez carnívoro, tiene como ingrediente principal la harina de pescado, lo cual llega a ser un problema debido a la alta demanda que se ha presentado en los últimos años. De acuerdo a cifras de la FAO en 2008 la industria acuícola utilizaba el 60.8% de la producción de harina de pescado, el resto se destina para elaborar dietas de animales terrestres como los cerdos y las aves, así como para el consumo humano. Una alternativa para disminuir los costos de la alimentación en la piscicultura de especies marinas ha sido la inclusión de proteína de origen vegetal, por ejemplo los cereales, tales como el maíz, el trigo, el arroz con cáscara, entre otros y las harinas o concentrados de leguminosas como la soya, el algodón, la semilla de girasol y la harina de

cacahuete (FAO, 2012). A continuación se muestra una tabla con harinas de origen vegetal que se han utilizado para sustituir la harina de pescado.

Tabla 1. Harinas de origen vegetal para la elaboración de dietas para especies acuícolas

Harinas de proteína vegetal	Nivel de inclusión en dietas para especies acuícolas (porcentaje)
Harina de soja	3 – 60
Harina de gluten de trigo	2 – 13
Harina de gluten de maíz	2 – 40
Harina de colza/nabina	1 – 20
Harina de semilla de algodón	1 – 25
Harina de cacahuete	≈ 30
Harina de semilla de girasol	5 – 9
Harina de haba	5 – 8
Harina de guisantes pardos	3 - 10

Fuente: Adaptado de *Tacon et al, 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects*. FAO Documento Técnico de Pesca y Acuicultura N° 564. Roma.

Como se aprecia en la tabla 1 la harina de soja es uno de los alimentos de origen vegetal más utilizados en la suplementación de la harina de pescado, ya que de acuerdo a algunos estudios la soja ha demostrado tener un buen perfil de aminoácidos (Lim, 1998). En este caso se diseñaron dietas con proteína de soja en sustitución parcial de la proteína de pescado. Pero, ¿cómo saber si las formulaciones suplementadas con proteína de origen vegetal cubrirán las necesidades que totoaba necesita para su óptimo desarrollo? Una estrategia es la determinación del perfil de aminoácidos del músculo de *T. macdonaldi*, el cual servirá como referencia para poder establecer cuál es la dieta que cumple con los requerimientos necesarios o que aminoácidos no se encuentran en la cantidad adecuada.

Para determinar el perfil de aminoácidos existen diferentes metodologías, entre ellas se encuentran la cromatografía de intercambio iónico, la electroforesis capilar o cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, la resonancia magnética nuclear para el caso de los aminoácidos libres y la metodología más empleada es la determinación del perfil de aminoácidos por cromatografía de líquidos, ya sea de alta o ultra alta precisión (CLAR, CLUR), sin embargo, son sistemas que requieren una inversión alta, dado el

equipamiento, pero adicionalmente los costos se incrementan por la adquisición de los derivatizantes y eluentes necesarios para determinar los aminoácidos. Una metodología relativamente nueva es el empleo del detector DDLE (Detector de Difracción de Luz Evaporativo, ELSD en inglés) que es capaz de identificar a los aminoácidos sin necesidad de que sean derivatizados (Peterson, 1999). Por lo que su implementación haría que los costos por análisis disminuyeran.

En este proyecto de investigación se implementaran tres metodologías para determinar el perfil de aminoácidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR, o HPCL en inglés): dos comerciales (sistema AccQ-TAG de Waters y OPA/FMOC de Agilent), las cuales utilizan AQC, OPA y FMOC como derivatizantes con el fin de que los aminoácidos sean visibles al detector de fluorescencia y una tercera con un nuevo detector (DDLE). Adicionalmente, se realizará una comparación de las tres metodologías, tanto a nivel experimental como de costos, para seleccionar la más conveniente. La metodología será validada y aplicada para determinar el perfil de aminoácidos de cada una de las dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado con el músculo de los organismos alimentados con una dieta compuesta por harina de pescado con el fin de determinar si las formulaciones son intercambiables, lo cual llevaría a minimizar los gastos en el cultivo de esta especie, ya que la nutrición de los organismos representa más del 60% de los costos de producción (FAO, 2007).

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

1. *Totoaba macdonaldi*

Totoaba macdonaldi es un pez carnívoro endémico del Golfo de California y una de las especies más grandes perteneciente a la familia *Scianidae*, que puede llegar a medir hasta 2 m de largo y pesar más de 100 kg (Cisneros Mata *et al*, 1995).

La totoaba es una especie de gran importancia ya que es endémica del Golfo de California, aquí los adultos llegan para la reproducción en invierno-primavera por lo que esta zona es conocida como desove y crianza (Valenzuela, 2011). A inicios del siglo XX se estableció la pesquería de *T. macdonaldi*. Su captura aumentó hasta alcanzar un máximo histórico en 1942 con 2261 toneladas y para 1974 a pesar de varios esfuerzos de regulación y conservación la producción total disminuyó a 58 toneladas (Arvizu 1972; Rosales-Juárez y Ramírez-González, 1987). Al siguiente año el gobierno mexicano declara una veda indefinida a su pesca (Diario Oficial de la Federación, 1975), además es incluida en el apéndice I de la Convención Internacional del Comercio de Especies Amenazadas (CITES, 2013) desde 1976. Actualmente se encuentra registrada en la Norma Oficial Mexicana, NOM-059-ECOL-SEMARNAT-2001.

Debido a esta situación a partir de 1933 en la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California se iniciaron las investigaciones para su cultivo. Para 1998 se logró por primera vez la reproducción de *T. macdonaldi*, lo que dio origen a la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) (True, 2012).

1.1 Acuicultura de *Totoaba Macdonaldi*

La acuicultura es el sistema de producción de especies acuáticas en un medio controlado o semi-controlado, el cual se puede desarrollar en ambientes naturales o artificiales (Castelló, 1993). Esta actividad contribuye de manera importante a la seguridad alimentaria, ya que los peces son una excelente fuente de proteína, ácidos grasos indispensables y micronutrientes (vitaminas y

minerales). Además de generar empleos para miles de familias en diversas zonas del mundo (FAO, 2014; SAGARPA, 2012).

La producción acuícola puede clasificarse en acuicultura de aguas continentales y cultivo marino, uno de los objetivos principales es el cultivo de organismos comestibles los cuales comprenden peces de escama, crustáceos, moluscos, anfibios, tortugas de agua dulce y otros animales acuáticos (como pepinos de mar, erizos, ascidias y medusas comestibles) producidos para el uso previsto como alimento destinado al consumo humano. En 2013 la producción acuícola mundial de peces comestibles aumentó el 5.8% (70.5 millones de toneladas) (FAO, 2014).

En México el consumo per cápita de pescados y mariscos es de 12.8 kilogramos anuales. En 2011, la producción acuícola y pesquera fue de 1.6 millones de toneladas de peso vivo, 2.5 % superior a la obtenida en 2010, esto debido a las mayores capturas de sardina, que representa el 41 % de la producción nacional; además del aumento en la captura y cultivo de camarón. (SAGARPA, 2012).

En el caso de *T. macdonaldi* se han realizado diversos estudios para lograr su desarrollo en un medio controlado, algunos de éstos son: la respuesta en el crecimiento de juveniles de *T. macdonaldi* alimentados con diferentes niveles de almidón y lípidos adicionados con un probiótico (González, 2011), la respuesta del metabolismo intermediario, sistema antioxidante, respuesta hematológica y bioquímica sanguínea e histología hepática de juveniles ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina (Bañuelos-Vargas, 2014), así como el efecto del contenido de proteína de soya en la dieta sobre la hematología y química sanguínea en juveniles de totoaba (Espinosa, 2014).

Uno de los factores principales para el cultivo de totoaba es la alimentación ya que esta representa cerca del 60 % de los costos de producción (FAO, 2007). Hasta el momento las dietas formuladas tienen un alto costo ya que el aporte proteínico necesario para el óptimo desarrollo de la especie es proporcionado por la harina de pescado, la cual ha tenido una gran demanda en la industria de la acuicultura. Debido a esto, se están implementando dietas en las cuales haya una sustitución parcial de la harina de pescado por proteína de origen vegetal,

un ejemplo de esto son las leguminosas que contienen un elevado contenido de proteína de buena calidad así como vitaminas y minerales (fosforo y hierro) (Olvera, 1998; Morillo, 2013). Dentro de las leguminosas más utilizadas para reemplazar la harina de pescado se encuentra la soya ya que, además de ser rica en vitaminas, tiene un buen perfil de aminoácidos (Bressani, 1980; NRC, 1993; Lim, 1998).

2. Perfil de aminoácidos como criterio de salud de organismos marinos

2.1 Introducción

Uno de los problemas que se presentan al momento de sustituir la proteína animal por proteína vegetal es afectar la salud de la especie en cuestión ya que los peces carnívoros tienen como factor esencial para su crecimiento a las proteínas. Se ha encontrado que los peces requieren de 2 a 4 veces más proteína que otros vertebrados para su crecimiento, expresado en gramos necesitan de 300 g a 500 g de proteína cruda por kg de dieta (Tacon *et al*, 1985).

Los aminoácidos están directamente relacionados con el crecimiento del organismo, debido a esto, es de gran importancia que todos los aminoácidos indispensables se encuentren en la dieta, ya que si hay una deficiencia en alguno de ellos el crecimiento de los peces se verá disminuido (D'Mello, 2003). Por esto, es necesario realizar la determinación del perfil de aminoácidos ya que, gracias a ellos, se puede determinar la calidad de las proteínas las cuales son esenciales para que el organismo tenga un óptimo desarrollo (Fin, 2010).

Para poder realizar la determinación del perfil de aminoácidos es importante saber qué son los aminoácidos, cuáles son sus características y su importancia en los organismos.

Los aminoácidos están conformados por un grupo amino básico y un grupo carboxilo ácido que, a pH fisiológico (7.3), se mantienen como zwitterion, lo que significa que el grupo carboxilo se desprotona, mientras que el grupo amino se protona. Las cadenas con menos de 50 aminoácidos se llaman péptidos; el

término proteína se utiliza para cadenas más grandes. Los péptidos y las proteínas son polímeros de aminoácidos los cuales se encuentran unidos por medio de un enlace peptídico o amida, el cual está formado por el grupo amino (-NH₂) de un aminoácido y el grupo carboxilo (-CO₂H) de otro (McMurry, 2010). Además de las proteínas, los aminoácidos y sus metabolitos son reguladores importantes de las rutas metabólicas, las cuales son necesarias para el mantenimiento, crecimiento, inmunidad, metamorfosis larval, reproducción, así como la resistencia a factores de estrés ambiental (Li, 2008).

Los aminoácidos pueden ser clasificados como dispensables o indispensables; los primeros son los que el organismo es capaz de sintetizar, mientras que los segundos son los que no pueden ser sintetizados y es necesario que sean ingeridos por medio de la dieta. En el caso de los peces, los aminoácidos indispensables son: fenilalanina (Phe), leucina (Leu), isoleucina (Ile), metionina (Met), lisina (Lys), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (Trp), histidina (Hys) y arginina (Arg) (Li, 2009; D'Mello, 2003).

2.2 Métodos de cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de proteínas es muy importante para poder aislarlas y caracterizarlas, además es un paso previo para el análisis en electroforesis o cromatografía, a fin de aplicar la cantidad necesaria de proteína para su correcto análisis. En el caso del perfil de aminoácidos, la cuantificación de las proteínas totales es vital para determinar la cantidad de aminoácidos presentes en una determinada muestra (García, 1998).

Para poder elegir el método ideal para la cuantificación de las proteínas es importante tener los siguientes puntos a considerar: la concentración de proteína presente en la muestra, la especificidad del método, los compuestos que puedan generar interferencia, así como la facilidad y reproducibilidad del método. Los métodos para determinar proteína total se pueden clasificar como espectrofotométricos, colorimétricos y basados en la determinación del nitrógeno total. A continuación se presentan los principales métodos reportados (Wrolstad *et al*, 2002).

2.2.1. Espectrofotométricos

La cuantificación por espectrofotometría es muy utilizada para proteínas purificadas, ya que en los alimentos puede haber compuestos que interfieran con la lectura.

2.2.1.1 Absorción a 280 nm

La mayoría de las proteínas tienen una absorción a 280 nm, debido a la presencia de los grupos fenólico, indólico y aromático presentes en la tirosina, triptófano y fenilalanina, respectivamente. Para la cuantificación se utiliza una proteína de concentración conocida, se realiza una curva de calibración y se interpola la absorbancia de las muestras. El rango de cuantificación es de 20 a 300 $\mu\text{g/mL}$ de proteína. Su principal ventaja es que no se utilizan reactivos y la muestra no es destruida o dañada durante todo el análisis. Los compuestos que contengan purina y pirimidina pueden interferir en el método.

2.2.1.2 Absorción a 205 nm

Esta metodología se basa en la absorbancia de los enlaces peptídicos a 205 nm y presenta las mismas ventajas y desventajas que la absorción a 280 nm. Es importante señalar que esta técnica es más sensible, ya que se pueden medir concentraciones de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

2.2.1.3 Fluorescencia

Es un método basado en la emisión de fluorescencia del triptófano y solo sirve para cuantificar a las proteínas que lo contengan. Para cuantificar se realiza una curva de calibración y las concentraciones que se pueden determinar van de 5 a 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína.

2.2.2. Colorimétricos

Los métodos colorimétricos incluyen procedimientos más rápidos, simples y menos laboriosos que los basados en la estimación del contenido total de nitrógeno, sin embargo es necesario que las proteínas estén solubilizadas para su cuantificación.

2.2.2.1 Biuret

Este método es específico para la medición del enlace peptídico por lo que solo se recomienda para la cuantificación de proteínas, más no de hidrolizado. Se utiliza una solución diluida de sulfato cúprico en tartrato fuertemente alcalino; este se adiciona a la solución de proteína, de lo que resulta un color entre púrpura y violeta que absorbe a 540 nm, obtenido del acomplejamiento del Cu^{2+} con el enlace peptídico. La desventaja de esta técnica es que tiene una baja sensibilidad, pues se requieren de 20 a 40 mg de proteína para una adecuada detección.

2.2.2.2 Lowry

Combina la reacción de biuret con la reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-túngstico) por la oxidación de tirosina, triptófano, histidina y asparagina de las cadenas se da la formación de un compuesto azul característico. La absorbancia se mide a 750 nm para proteínas concentradas y se requiere de una curva patrón que es recomendable hacer con la misma proteína que se cuantifica. La sensibilidad del método va de 0.2 a 300 $\mu\text{g/mL}$. Su desventaja es que algunas sustancias no proteínicas interfieren y producen un color azul o inhiben el desarrollo de color por la proteína.

2.2.2.3 Bradford

En este método las proteínas se unen al colorante azul brillante de Coomasie G-250 el cual cambia de color rojo al azul provocando un máximo de absorción de 465 a 595 nm. La reacción ocurre en 2 min y el complejo se mantiene estable durante 1 hora, además de tener un alto coeficiente de extinción por lo tanto es más sensible que el ensayo de Lowry. La presencia de detergentes puede presentar interferencia.

2.2.3. Nitrógeno total

La determinación de nitrógeno total es una forma indirecta para la cuantificación de proteínas en compuestos orgánicos como son los alimentos, el método más utilizado es el método de Kjeldahl, sin embargo, el método de Dumas y de combustión tiene la ventaja de tener tiempos cortos de análisis (Current_protocols_in_Food-analysis).

Deben aplicarse factores de conversión de nitrógeno a proteína, que son específicos para los distintos tipos de proteínas. Se calculan al dividir 100 entre el porcentaje de nitrógeno particular de la proteína en cuestión. El factor que se aplica sin discriminación es 6.25 resultante de una generalización del contenido de nitrógeno de las proteínas de 16% por lo que su factor de conversión será $100/16 = 6.25$. Sin embargo, en términos estrictos debe calcularse el factor para cada proteína (Badui, 2013).

2.2.3.1 Método de Kjeldahl

El método consiste en la digestión de la muestra con H_2SO_4 y la formación de NH_4OH que es recibido en ácido para ser titulado con un álcali de concentración conocida. El método no hace distinción entre el nitrógeno que proviene de las proteínas (grupos amino y amida) y el no proteínico (urea), lo que da lugar a errores de cálculo. Los compuestos nitrogenados no proteínicos que causan una sobreestimación de la técnica son: glutatión, carnitina, carnosina, dopamina, urea, ornitina, colina y ácido aminobutírico.

2.2.3.2. Dumas

El nitrógeno liberado por la pirolisis de la muestra y su combustión es arrastrada por una corriente de CO_2 en un nitrómetro. El dióxido de carbono se absorbe en KOH y el volumen de nitrógeno residual se mide y se convierte a su equivalente de proteína mediante un factor numérico (AOAC, 1999b)

2.2.3.3. Método de combustión

El método de combustión fue derivado del método de Dumas y como un método alternativo al método de Kjeldahl que emplea un catalizador de mercurio. Presenta dos ventajas: se utiliza menos tiempo para su determinación y no se emplean reactivos tóxicos y peligrosos.

El nitrógeno es alimentado de la combustión de la muestra a una alta temperatura en oxígeno puro y se mide por un detector de conductividad térmica. Después el nitrógeno total determinado es convertido a su equivalente en proteínas por un factor numérico. Es muy empleado para cereales, aceites y alimentos para animales.

2.4 Métodos para la determinación de aminoácidos en muestras marinas

Una vez que las proteínas han sido hidrolizadas y se tienen los aminoácidos libres, hay que utilizar un método que proporcione una buena separación entre ellos para que su detección y cuantificación se hagan de manera óptima. En la actualidad existen diversos métodos para la determinación del perfil de aminoácidos, entre los más conocidos se encuentra la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE o HPLC por sus siglas en inglés) donde se utilizan columnas en fase reversa o intercambio catiónico acoplado a un detector de UV o fluorescencia. También existe el UPLC, este equipo trabaja a altas presiones y se utilizan columnas empacadas con 1.7 μm de partículas lo cual reduce de 3 a 5 veces el tiempo de análisis en comparación con el HPLC. Recientemente se ha incorporado el espectrómetro de masas (ES o MS por sus siglas en inglés) ya que ofrece una mayor selectividad (Kaspar *et al*, 2009).

Gracias a la carga que poseen los aminoácidos es posible separarlos por medio de electroforesis capilar, para la detección se puede utilizar un espectrómetro de masas con ionización mediante electrospray con un analizador de triple cuadrupolo, donde no es necesaria la derivatización. En el caso de los aminoácidos libres se ha utilizado la resonancia magnética nuclear (RMN) la cual se encuentra dentro de los límites de detección (Kaspar *et al*, 2009). A continuación se muestra una tabla con algunas de las metodologías más importantes.

Tabla 2. Métodos para determinar aminoácidos.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Cromatografía de líquidos acoplado un detector óptico	<ul style="list-style-type: none"> * Altamente reproducible. *Equipo a bajo costo. *Buena linealidad en un amplio intervalo. 	<ul style="list-style-type: none"> *Precipitación de las proteínas y derivatización de aminoácidos. *Falta de especificidad en el analito. *Sustancias que coeluyen no se pueden distinguir 	Le Boucher, 1997
UPLC-MS	<ul style="list-style-type: none"> *Rápida separación. *Buena resolución. 	<ul style="list-style-type: none"> *Es necesaria la precipitación de las proteínas *Altas presiones requieren un equipo especial. 	Boogers, 2008
CE-MS	<ul style="list-style-type: none"> *No es necesaria la derivatización. *Baja cantidad de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> *Es necesario la precipitación de las proteínas. *Sólo se pueden inyectar bajos volúmenes. 	Soga, 2004
RMN	<ul style="list-style-type: none"> *No es necesaria la derivatización ni separación. *Cuantificación robusta. *Mínima preparación de muestra. 	<ul style="list-style-type: none"> *Baja sensibilidad. *Largos tiempos de análisis. 	

2.5 Derivatizantes más utilizados en la determinación del perfil de aminoácidos

La determinación directa de aminoácidos no es posible ya que éstos carecen de grupos cromóforos o fluoróforos, a excepción del triptófano el cual posee un grupo indol que presenta una fuerte fluorescencia a las longitudes de onda 280 nm y 340 nm (excitación y emisión respectivamente). La fluorescencia se define como la capacidad que tienen ciertos compuestos para excitarse con energía a ciertas longitudes de onda (Skoog, 2001). Debido a esto es necesario que el resto de los aminoácidos sean derivatizados, ya sea pre o post-columna, para su posterior detección por métodos UV, fluorescentes o radiactivos (Malaver, 2009).

La mayoría de los derivatizantes reaccionan con el grupo amino de los aminoácidos, pero esto solo incluye a los aminoácidos primarios, debido a esto existen otros derivatizantes que reaccionan con el grupo carboxilo (Kaspar *et al*, 2009). Los reactivos para derivatizar aminoácidos más utilizados se mencionan a continuación así como una breve explicación de sus características.

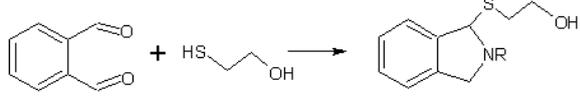
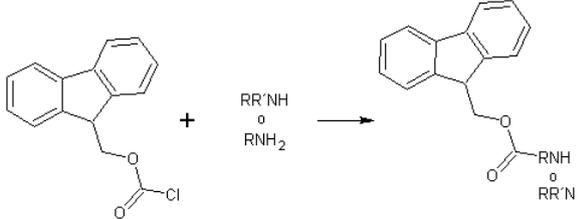
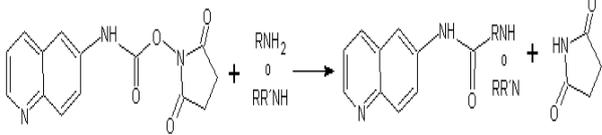
Para empezar está el o-ftalaldehído (OPA) que se puede utilizar post-columna con una columna de intercambio catiónico o pre-columna usando fase reversa; este reactivo reacciona con los compuestos aminados en presencia de un tiol como el mercaptoetanol el cual forma un compuesto fluorescente que es detectado a 340 nm en UV y a 340 nm (emisión) y 450 nm (excitación) en fluorescencia (Kaspar *et al*, 1983). A continuación se encuentra el cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) y cloruro de *N,N*-dimetilaminoftalensulfonilo (Cloruro de Dansilo) son utilizados para una derivatización pre-columna, en estos el tiempo varía dependiendo del número de analitos.

Después se tiene al fenilisotiocianato (PITC) que reacciona con los aminoácidos primarios y secundarios; esta reacción, en la que el compuesto obtenido es leído a 254 nm en el UV, es conocida como degradación de Edman y es la base del método Pico-Tag de Waters. Para generar compuestos fluorescentes más estables se ha introducido el carbamato de 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidilo (AQC) dando lugar al método AccQ-Tag de Waters donde la

detección puede ser por medio de UV, fluorescencia, electroquímica y/o espectrometría de masas (Pappa-Louisi *et al*, 2007).

A continuación se muestra una tabla con los derivatizantes más comunes, la reacción de derivatización que ocurre y algunas ventajas y desventajas de los mismos.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los derivatizantes más comunes

Derivatizante	Reacción de derivatización	Ventajas	Desventajas
O-ftalaldehído (OPA) (Kaspar, 2009; Reverte,1997)		*Tiempos cortos de derivatización. *Derivados altamente fluorescentes.	*Sólo reacciona con aminoácidos primarios. *Derivados inestables con lys, gly, ala y orth
Cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) (Kaspar, 2009)		*Tiempos cortos de derivatización. *Derivados estables y altamente fluorescentes.	*Produce múltiples derivados. *El reactivo es por sí mismo fluorescente e interfiere en el cromatograma.
Fenilisotiocianato (PITC) (Kaspar, 2009; Woo, 1996)		* Reacciona con los aminoácidos primarios y secundarios.	*Tiempos largos de derivatización. *Baja sensibilidad.
Carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC). (Reverte, 1997)		*Reacciona con aminoácidos primarios y secundarios. *Derivados tienen buena estabilidad. *Tiempos cortos en derivatización.	*Lisina muestra una menor fluorescencia por el "quenching interno" *El exceso de amonio puede distorsionar el análisis

Como se mencionó, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) es uno de los métodos más empleados para la determinación del perfil de aminoácidos. Anteriormente el análisis se realizaba por medio de la cromatografía de intercambio iónico en combinación con la derivatización post-columna con ninhidrina (Horwitz, 2002). En la actualidad los métodos comerciales como son los utilizados por Waters y Agilent utilizan una columna

en fase reversa y la derivatización es pre-columna, lo que hace que el análisis sea más rápido, sensible y menos costoso.

Una vez que se ha realizado la separación y detección de los aminoácidos hay que determinar la concentración de cada uno, para esto se realiza la división del área bajo la curva del aminoácido entre el área bajo la curva del estándar interno, este valor se sustituye en la ecuación de la recta y se obtiene la concentración. El estándar interno es utilizado para corregir la pérdida de la muestra durante el manejo y la preparación de la misma, éste debe ser añadido antes de cualquier tratamiento que se le vaya a dar a la muestra. El reactivo a utilizar debe estar en la misma concentración y tiene que ser una molécula muy parecida a los analitos que se van a analizar pero cuidando que este lo bastante separado para no tener errores al momento de cuantificar los aminoácidos (Gardner, 1985). Los estándares internos más utilizados en la determinación del perfil de aminoácidos son la norleucina, el ácido alfa aminobutírico (AABA) y el 1-metil triptófano en el caso del triptófano (Gardner, 1985; Reverte, 1997; Delgado, 2005).

Uno de los factores más importantes en la determinación del perfil de aminoácidos es el precio ya que los derivatizantes incrementan el costo por análisis. En el caso de Waters, los insumos necesarios para la determinación de aminoácidos es de \$ 26 000 M/N (costo sólo del derivatizante y eluyente A) y utilizando la metodología de Agilent el precio es alrededor de \$21 000 M/N (derivatizante y eluyente), sin contar el costo de la columna y de los consumibles, que llegan a incrementar el costo aproximado de cada muestra en \$7,000.00.

Una alternativa es utilizar el detector de difracción de luz evaporativa el cual no requiere que los aminoácidos sean derivatizados, ya que el principio se basa en la nebulización del eluyente a la salida de la columna del HPLC con un gas (N_2), secando las gotas en una cámara a elevada temperatura, detectando el residuo no volátil por dispersión de luz y amplificación en un tubo fotomultiplicador. La cantidad de luz dispersada depende de la cantidad de partículas que haya en la muestra (Peterson, 1999). Si se logra implementar una metodología en la cual no sea necesario utilizar derivatizantes, se reducirían los costos por análisis lo que sería de gran ayuda para la industria de la acuicultura.

3. Validación de un método analítico

3.1 Criterios para la validación de métodos analíticos para la determinación del perfil de aminoácidos

Todos los métodos analíticos deben validarse, lo que significa que se debe confirmar y demostrar que los datos obtenidos son confiables.

Los parámetros a evaluar para la validación de un método son los siguientes (Reason, 2003):

- **Especificidad:** es la capacidad de analizar un analito inequívocamente en presencia de otros compuestos. Para evaluar esto, se realiza el hidrolizado de una muestra y se compara con el estándar de aminoácidos para comprobar que no haya interferencia de otros compuestos en la determinación.
- **Linealidad:** se define como la capacidad del método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Para esto se realiza una curva estándar y se inyecta por duplicado. Posteriormente se grafica el área bajo la curva del estándar del aminoácido entre el área bajo la curva del estándar interno contra la concentración y con ello se obtienen la ecuación de la recta y la R ajustada que debe ser mayor a 0.988. Si la relación es lineal se evalúa estadísticamente.
- **Alcance:** se establece mediante la confirmación de que el procedimiento analítico es aceptable de linealidad, exactitud y precisión.
- **Precisión:** se determina mediante la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad con el fin de asegurar la mínima variación en el método.
- **Repetibilidad:** para determinar este parámetro se realizan seis inyecciones en el mismo laboratorio y por el mismo operador en un tiempo corto y se determina el coeficiente de variación el cual debe ser menor al 5%.
- **Precisión intermedia:** es la variabilidad a largo plazo del proceso de medición y puede ser determinada por un método de ejecución en diferentes días y/o por diferentes operadores.

- Reproducibilidad: Se expresa como la precisión del método que hay entre laboratorios. Se determina el coeficiente de variación y este debe ser menor al 10%. La ecuación para determinar este valor es la siguiente:

$$Cv: \frac{\alpha}{|\bar{x}|} \cdot 100$$

Donde α es la desviación estándar y $|\bar{x}|$ es la media, se multiplica por 100 para obtener el valor en porcentaje.

- Robustez: la robustez es una revisión de los parámetros críticos en el método y pasos que puedan minimizar la variación como: estabilidad de los productos derivatizados, influencia en la variación del pH en la fase móvil, influencia en la composición de la fase móvil, diferencia en las columnas, temperatura y flujo.
- Límite de detección: el límite de detección se establece como la cantidad mínima detectada y se determina mediante la siguiente ecuación:

$$DL: \frac{3.3 \alpha}{S}$$

Donde α es la desviación estándar de la línea de mejor ajuste y S es la pendiente.

- Límite de cuantificación: es la cantidad que se debe cuantificar de manera precisa y exacta; el pico debe ser tres veces mayor que el ruido y se determina mediante la siguiente ecuación:

$$QL: \frac{10\alpha}{S}$$

Donde α es la desviación estándar de la línea de mejor ajuste y S es la pendiente.

CAPÍTULO III.

JUSTIFICACIÓN

Hasta ahora no se ha logrado diseñar una dieta que cumpla con todos los nutrimentos necesarios para el óptimo desarrollo de totoaba y que además sea de bajo costo. Costos que se incrementan al determinar el perfil de aminoácidos por los métodos comerciales (Waters y Agilent), los cuales implican derivatizar a los aminoácidos para que puedan ser visibles con el detector de fluorescencia. Por lo que se implementará una nueva metodología utilizando el detector DDLE (Detector de Difracción de Luz Evaporativo, ELSD en inglés) en el cual no es necesario derivatizar los aminoácidos, con esto los costos por análisis disminuirán considerablemente.

CAPÍTULO IV.

HIPÓTESIS

La determinación del perfil de aminoácidos de las diferentes dietas dará a conocer si éstas cumplen con los requerimientos necesarios para el crecimiento y desarrollo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* bajo condiciones de acuicultura.

CAPÍTULO V.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de aminoácidos de músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* y de dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado, con el fin de establecer si una de las dietas cumple con los requerimientos que *Totoaba* necesita.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar las muestras para la determinación del perfil de aminoácidos
- Implementar una nueva metodología utilizando el detector DDLE para la determinación de aminoácidos.
- Comparar las tres metodologías con el fin de determinar cuál es el mejor método para determinar el perfil de aminoácidos.
- Determinar el perfil de aminoácidos de dietas elaboradas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado y músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* utilizando los métodos comerciales AccQ*Tag de Waters y OPA-FMOC de Agilent.
- Determinar si alguna de las formulaciones cumple con los requerimientos que *Totoaba* necesita para su óptimo desarrollo.

CAPÍTULO VI.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Reactivos e instrumentación.

Todos los reactivos empleados fueron al menos grado RA, mientras que los disolventes utilizados fueron grado HPLC.

Para realizar el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR, HPLC en inglés) se emplearon dos sistemas:

- 1) **Sistema CLAR Varian Prostar 210**, con dos bombas Polaris 210, inyector automático 417, un detector UV-Vis 325 y un detector Evaporativo de Difracción de Luz (DEDL, ELSD en inglés) Polymer ICE.
- 2) **Sistema CLAR Agilent 1260**: Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Inyector automático Infinity 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260 y un detector de arreglo de diodos (DAD) 1260

Implementación de metodología para determinar el perfil de aminoácidos utilizando Detector Evaporativo de Difracción de Luz (DEDL, ELSD en inglés)

Para implementar la nueva metodología se empezó a trabajar con las condiciones publicadas por Wang Yuhong *et al.* en 2011 el cual utilizó como fase móvil A (agua + 0.1% de ácido trifluoroacético + 0.2% de ácido heptafluorobutírico) y como fase móvil B (metanol) en un gradiente de 0 a 45% de B. Para ello, se preparó un estándar de 16 aminoácidos (10 mM), luego se realizaron diluciones seriadas y se inyectaron 20 μ L por duplicado para determinar el límite de detección. Posteriormente se prepararon soluciones de cada aminoácido (5 mg/mL) y se inyectaron 20 μ L por triadas para hacer la identificación de los picos.

Debido al traslape de los picos se utilizaron las condiciones reportadas en la literatura (Zhang *et al.* 2013) utilizando como fase móvil A (agua + 0.1% de ácido trifluoroacético + 0.2% de ácido heptafluorobutírico) y como fase móvil B (acetonitrilo) en un gradiente de 0 a 35 % de B. A partir de estas condiciones se utilizaron diferentes gradientes de elución para establecer las condiciones ideales de separación.

- Detección: DEDL Temp. Nebulización: 35 °C, Temp. Evaporación: 70 °C
Flujo de nitrógeno: 2.5 mL/min.

Dietas experimentales

Las dietas analizadas fueron diseñadas en la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Se formularon ocho dietas isoproteínicas e isoenergéticas, a partir de una dieta control la cual contenía 100% de harina de pescado se fue haciendo una sustitución parcial por proteína de soya en las siguientes proporciones 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 100 %. La composición de cada una de las dietas se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Formulación de las dietas con diferentes porcentajes de proteína de soya

Ingrediente	Control (%)	PS15 (%)	PS30 (%)	PS45 (%)	PS60 (%)	PS75 (%)	PS90 (%)	PS100 (%)
Harina pescado	57.70	49.00	15.50	12.30	9.30	8.30	4.60	0.00
H. pescado Desg	0.00	0.00	24.10	19.00	14.00	8.90	2.00	0.00
Proteína de soya	0.00	8.60	16.90	25.40	33.60	40.00	51.00	57.70
Gelatina	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Harina de krill	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Almidón de maíz	14.00	14.00	13.50	13.00	11.50	12.20	12.00	9.00
Celulosa	2.80	2.40	1.50	1.50	2.60	1.50	0.90	3.30
Aceite de pescado	5.0	5.5	8.0	8.3	8.5	8.6	9.0	9.5
Mezcla minerales	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Mixvit (0.01+0.18)	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
Cloruro de colina	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina C	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Vitamina E	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Taurina	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
Lisina	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Metionina	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Marcador	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TOTAL	100.0							

Obtención del músculo de *Totoaba macdonaldi*

Los juveniles de *Totoaba macdonaldi* fueron alimentados con las diferentes dietas durante doce semanas en un sistema semi-cerrado "Guelph" de recirculación de agua bajo condiciones de fotoperiodo (12:12 luz y oscuridad) a una temperatura de 23 ± 1 °C y oxígeno disuelto en una concentración de 5 mg/L. Terminado el periodo de crecimiento, el equipo de la UBP hizo la disección de los organismos, extrayendo el músculo y liofilizándolo para poder realizar la determinación del perfil de aminoácidos.

Determinación del perfil de aminoácidos

Extracción de lípidos (método de Folch, *et al* 1957)

Las muestras fueron pesadas (200 mg) en un vial de 15 mL, por duplicado, se adicionaron 4 mL de diclorometano-metanol (2:1 v/v), seguido de 4 mL de KCl al 0.88%, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, se desecharon los disolventes, se lavó el sólido con 4 mL de diclorometano, se volvió a centrifugar y una vez obtenido el sólido, se evaporó el disolvente restante bajo un flujo de nitrógeno, para finalmente secar las muestras en la estufa a una temperatura de 40 °C durante 3 horas.

Hidrólisis

Básica

Para cada muestra, se pesó el equivalente a 10 mg de proteína, se adicionaron 40 µL del estándar interno (1-metilriptófano, 0.025 M). 5 mg de almidón de papa y 0.5 mL de NaOH 4.2 M, se desplazó el aire por nitrógeno y se dejó en la estufa durante 18 horas a una temperatura de 108 °C. Posteriormente se neutralizó con HCl 6 N, se filtró por medio de un acrodisco (GHP, 0.4 µm, 13 mm) y finalmente se aforó a 10 mL.

Ácida

De manera análoga, Se pesó el equivalente a 10 mg de proteína de la muestra, se adicionaron 40 μL del estándar interno (AABA, 0.25M) y 400 μL de HCl 6 N con 0.06% de fenol para cada una de las muestras, se dejó en la estufa durante 18 horas a una temperatura de 108 °C.

Se llevaron las muestras a sequedad bajo un flujo de nitrógeno utilizando un baño de agua caliente (70 °C). Posteriormente se reconstituyó la muestra con 1 mL de HCl 20 mM y se filtró por medio de un acrodisco (0.45 μm), seguido de esto se realizó una dilución 1:100.

Derivatización de muestras

Método de Waters

Para derivatizar las muestras se utilizó el kit AccQ*FluorReagent Kit de Waters. Se tomaron 10 μL de la dilución 1:100 de la muestra, 70 μL del buffer de boratos y 20 μL del derivatizante AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidilo carbamato), la mezcla se calentó en un termobloque a una temperatura constante de 55 °C durante 10 min.

Método de Agilent

La derivatización por este método es automática y la realiza el automuestreador Infinity 1260, el cual se programó, de acuerdo al protocolo establecido por Agilent (5990-4547Eng) Brevemente: se toman 2.5 μL del buffer de boratos, 0.5 μL de la dilución 1:100 de la muestra, 0.5 μL del primer derivatizante OPA (o-ftaldehído) y 0.5 μL del segundo derivatizante FMOC (flúoretímetoxi cloroformato), se mezclan durante 1 minuto.

Validación de metodologías

Validación del método de triptófano

Se determinó la concentración de triptófano en albúmina bovina (A-7906, Sigma-Aldrich). Se inyectó por duplicado la curva estándar de cinco puntos (6.75 pmol a 100 pmol) utilizando el 1-metiltriptófano (447439, Sigma-Aldrich) como estándar interno en una concentración de 100 pmol. Se inyectaron 5 μ L de los estándares en el sistema CLAR Agilent 1260, las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

- **Condiciones de separación:** Columna Poroshell 120 (EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7 Micron) Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (20:80 v/v), flujo 0.5 mL/min. Detección: λ_{exc} : 280 nm, λ_{emss} : 340 nm

Validación del método de Waters

Para validar el método se utilizó como estándar albúmina bovina (A-7906, Sigma-Aldrich), se inyectó por duplicado la curva estándar de tres puntos (25 a 250 pmol) utilizando un estándar de aminoácidos y el ácido alfa-aminobutírico (AABA, 162663, Sigma-Aldrich) como estándar interno en una concentración de 100 pmol. Se inyectaron 5 μ L de los estándares en el sistema CLAR Agilent 1260, las condiciones de análisis se muestran a continuación:

- Agilent 1260 **Condiciones de separación:** Columna Hypersil (AA-ODS, 2.1 x 200 mm, 5 μ m) Fase Móvil A: Eluyente A de Waters, Fase Móvil B: **Acetonitrilo:Agua** (60:40 v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 minutos, 0 a 2% de B de 0 a 0.5 min, 2 a 7% de B de 0.5 a 15 min, 7 a 10% de B de 15 a 19 min, 10 a 33% de B de 19 a 32 min, 33% de B de 32 a 33min, 33 a 100% de B de 33 a 34min, 100% B de 34 a 39 min, 100 a 0% de B de 39 a 40 min, 0% B de 40 a 45 min, con un flujo de 0.5 mL/min. Detección: λ_{exc} : 250 nm, λ_{emss} : 395 nm.

Validación del método de Agilent

Para validar el método se utilizó como estándar albúmina bovina (A-7906, Sigma-Aldrich), se inyectó por duplicado la curva estándar de tres puntos (25 a 250 pmol) utilizando un estándar de aminoácidos y el ácido alfa-aminobutírico (AABA, 162663, Sigma-Aldrich) como estándar interno en una concentración de 100 pmol. Se inyectaron 5 μ L de los estándares en el sistema CLAR Agilent 1260 -**Condiciones de separación:** Columna Zorbax Eclipse (AAA, 4.6 x 150 mm, 3.5 Micron) Fase Móvil A: Fosfato de sodio dibásico 40 mM (ajustado a pH: 7.8 con H_3PO_4 5.2 M), Fase Móvil B: Acetonitrilo:Metanol:Agua (45:45:10 v/v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 a 1.9 minutos, 0 a 10% de B de 1.9 a 5 min, 10 a 20% de B de 5 a 12 min, 20 a 57% de B de 12 a 23.1 min, 57 a 100% de B de 23.1 a 23.6 min, 100% de B de 23.6 a 27.3min, 100 a 0% de B de 27.3 a 28.2 min, 0% B de 28.2 a 31 min, con un flujo de 2 mL/min. Detección: λ_{exc} : 260 nm, λ_{emss} : 450 nm.

Inyección de las muestras

Se inyectaron 5 μ L de cada una de las muestras derivatizadas bajo las condiciones utilizadas en la validación de cada una de las metodologías.

Análisis estadístico de los datos

Se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación en los datos obtenidos de la curva estándar así como de las concentraciones para cada uno de los aminoácidos, esto con el fin de asegurar la precisión en los resultados.

CAPÍTULO VII.

RESULTADOS

1. Implementación de metodología para determinar el perfil de aminoácidos utilizando el detector DEDL

El primer paso en este trabajo de investigación fue buscar en diferentes artículos las condiciones ideales para la implementación de una nueva metodología, la cual utiliza el detector Evaporativo de Difracción de Luz (para identificar los aminoácidos y que estos no tengan que ser derivatizados. Los parámetros seleccionados fueron tomados del artículo publicado por Wang en el año 2011, los cuales se muestran a continuación.

Condiciones de separación: Dos columnas en serie, Columna PFP fase reversa (3.6u-150 x 4.6 mm Phenomenex, Inc. USA) y Columna AerisPeptide fase reversa (3.6u XB-C18, 150 x 4.6 mm Phenomenex, Inc. USA). Temp. Nebulización: 40 °C, Temp. Evaporación: 70 °C, flujo de nitrógeno: 2.5 mL/min y detector de U.V. a 215 nm. Fase móvil A: Agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético y 0.2% de ácido heptafluorobutírico, como fase móvil B: Metanol. Flujo: 0.8 mL/min, volumen de inyección: 20 μ L el gradiente se muestra en la siguiente tabla.

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	100	0
8	100	0
11	78	22
21	73	27
30	45	55
38	100	0
40	100	0

Tabla 5. Gradiente bajo condiciones Wang, 2009

En la figura 1 se muestra el cromatograma obtenido con las condiciones seleccionadas, se puede apreciar que no hay una buena separación, ya que no se logran distinguir los 16 aminoácidos incluidos en el estándar.

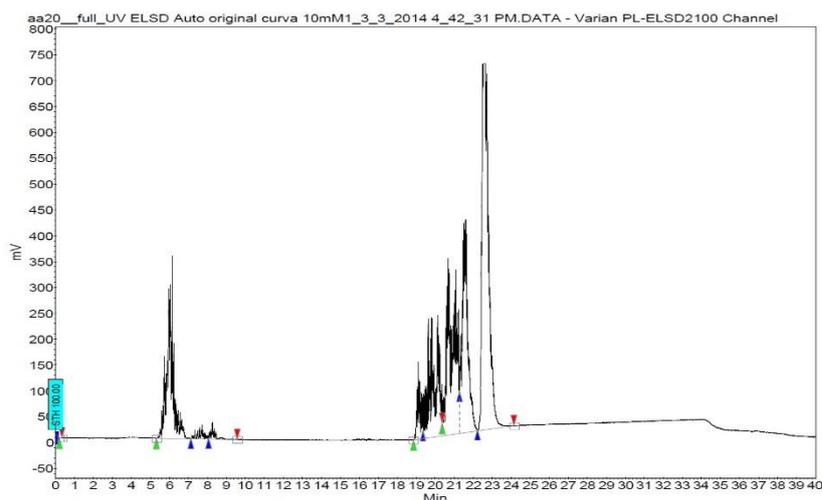


Figura 1. Cromatograma del estándar de 16 aminoácidos condiciones reportadas por Wang, 2011.

Para lograr una mejor separación se utilizaron las condiciones reportadas por Yan *et al* en el año 2007, el cual utiliza como fase móvil A: agua con 0.1 % de ácido trifluoroacético y 0.2% de ácido heptafluorobutírico y como fase móvil B: acetonitrilo, el gradiente se muestra en la siguiente tabla.

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	100	0
5	100	0
10	85	15
25	65	35
35	100	0

Tabla 6. Condiciones de separación Yan *et al*, 2007

El cromatograma obtenido con las nuevas condiciones se presenta en la figura 2 donde se puede apreciar una mejor separación, ya que se observan 13 picos, el estándar inyectado contiene 16 aminoácidos por lo que existen tres aminoácidos que no lograron separarse.

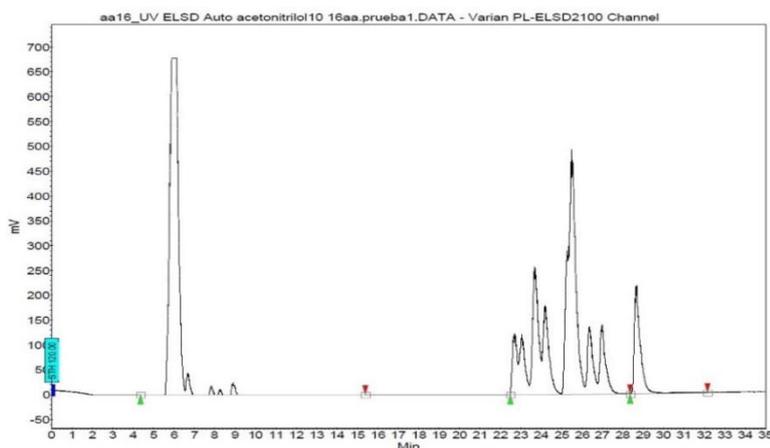


Figura 2. Cromatograma del estándar de 16 aminoácidos en gradiente de 0 a 45%B.

Se realizaron cambios en el gradiente con el fin de lograr una mejor separación y poder distinguir los 16 aminoácidos contenidos en el estándar, las modificaciones se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Modificación de las condiciones de separación (Yan *et al*, 2007)

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	100	0
10	95	5
15	90	10
20	85	15
25	65	35
30	0	100
35	100	0

Después de realizar las modificaciones se inyectó el estándar de aminoácidos, en esta ocasión se observó una mejor separación, sin embargo, solo se aprecian 14 de los 16 aminoácidos que contenía el estándar.

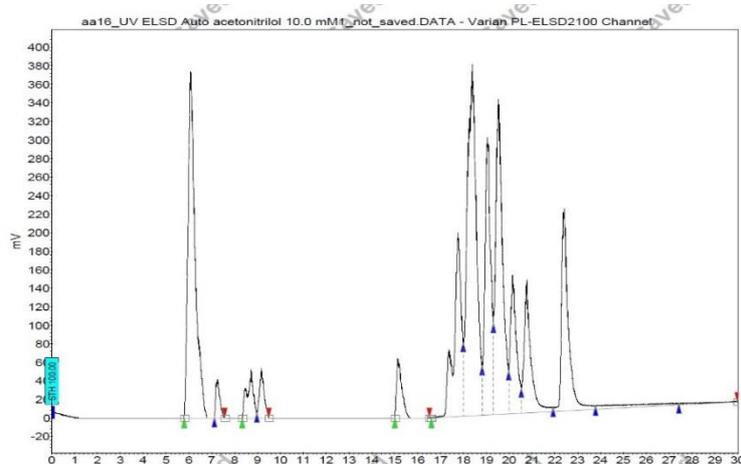


Figura 3. Cromatograma del estándar de 16 aminoácidos en gradiente 0 a 100% de B de 0 a 35 minutos y 100 a 0% B del minuto 35 al 40.

Después de realizar varias modificaciones al método no se logró separar los 16 aminoácidos que contenía el estándar, para esto es necesario que se hagan más modificaciones, para esta investigación no fue posible implementar la metodología con el DELD, por lo que el siguiente paso fue validar y comparar las metodologías comerciales (Waters y Agilent) para determinar cuál es la mejor para determinar el perfil de aminoácido.

2. Validación de métodos

2.1 Validación del método de triptófano

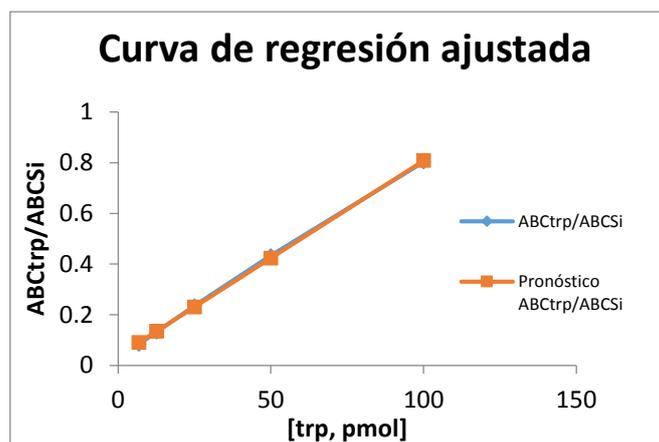
Como se mencionó en los antecedentes, para la validación de un método es necesario considerar diversos criterios analíticos, en este trabajo se tomaron en cuenta la especificidad, selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

Para determinar la especificidad y selectividad en el método para la cuantificación de triptófano, se inyectó en el sistema de análisis un hidrolizado (condiciones básicas y ácidas) de colágeno (200 pmol), proteína que carece de triptófano. Los hidrolizados no presentaron señales en el tiempo de análisis, corroborando las propiedades de fluorescencia del triptófano. La inyección de un estándar de triptófano y 1-Metiltriptófano adicionados a un hidrolizado de colágeno, sólo presentaron señales en tiempos específicos y separados uno del otro.

La linealidad en el intervalo de concentración de trabajo, se evaluó al inyectar por triplicado una curva estándar de cinco puntos. En la tabla 8 se presenta el promedio de los datos, así como la desviación estándar y el coeficiente de variación correspondiente a cada punto de la curva. En la gráfica 1 se puede apreciar la curva estándar para la determinación de triptófano.

Tabla 8. Datos de curva de estándar para determinación de triptófano

[trp, pmol]	ABCtrp/ABCSi	S.D.	C.V
6.75	0.0828	0.0011	1.32
12.5	0.1310	0.0012	0.90
25	0.2358	0.0031	1.30
50	0.4334	0.0073	1.68
100	0.8029	0.0128	1.60



Gráfica 1. Curva estándar de triptófano. La ecuación de la recta es $y = 129.7315x + 4.8923$
 $R^2: 0.9991$

La curva estándar mostrada en el gráfico 1 presentó un comportamiento lineal ya que tiene una r ajustada de 0.9991, con respecto al coeficiente de variación se puede apreciar que los valores son aceptables (Reason, 2003) donde porcentajes menores a 10% se consideran adecuados para un método analítico.

Para establecer la sensibilidad del método (límite de cuantificación y detección), se utilizaron los valores correspondientes a la concentración más baja de la curva y se sustituyeron en la siguiente ecuación.

3 Límite de cuantificación: $LC: \frac{10\alpha}{S}$

4 Límite de detección: $LD: \frac{3.3\alpha}{S}$

Donde α es la desviación estándar de la línea de mejor ajuste y S es la pendiente.

El resultado obtenido en pmol fue: **L.C: 1.41** y **L.D: 0.47**

En la figura 4 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos al inyectar la curva estándar de triptófano, este corresponde a la concentración de 100 pmol de triptófano. Se puede apreciar una separación de 0.776 minutos entre el triptófano y el 1-metiltriptófano lo cual es ideal ya que reduce los problemas al momento de hacer la cuantificación.

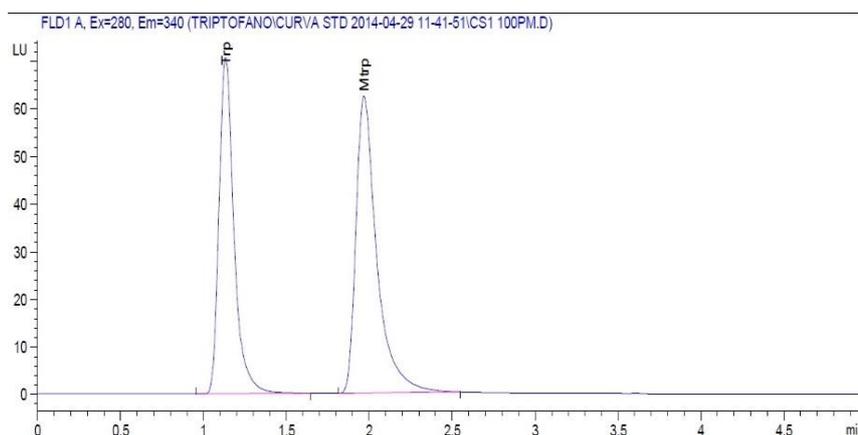


Figura 4. Cromatograma del punto correspondiente a 100 pmol en la curva estándar de triptófano. **Sistema UPLC:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 280 nm, λ_{emss} : 340 nm. **Condiciones de separación:** Columna Poroshell 120 (EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7 Micron) Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (20:80 v/v), flujo 0.5 mL/min.

Para verificar la exactitud del método se utilizó como estándar albúmina bovina la cual posee dos moles de triptófano por cada mol de albúmina (Singh Priyanka, 2013) esto equivale a 0.62 gramos de triptófano por cada 100 gramos de proteína.

Tabla 9. Concentración de triptófano en albúmina bovina

Muestra	g trp/100 g proteína	S.D.	% recuperación	C.V.
Albúmina	0.42	0.00	67.74	0.32

2.2 Validación del método de Waters

Para validar la metodología de Waters se empezó por la selectividad que se evaluó al inyectar un estándar de aminoácidos, donde aparecen los 18 picos esperados para cada uno de los aminoácidos, los cuales fueron identificados en triadas de acuerdo a la polaridad; con base en los tiempos de retención se identificó cada uno. A continuación se inyectó un blanco de reactivos, así como uno solo con agua HPLC reveló el tiempo en el cual eluyen los aminoácidos (de 14 a 37 minutos), no se presentan señales, corroborando la especificidad del método.

Para la curva estándar se prepararon tres puntos los cuales iban de 25 pmol a 250 pmol, en la tabla 10 se muestran los datos con la desviación estándar correspondiente a cada uno de los aminoácidos.

Tabla 10. Datos de curva estándar para determinar perfil de aminoácidos

Aminoácido	25 pmol	100 pmol	250 pmol
	ABCaa/ABCSi	ABCaa/ABCSi	ABCaa/ABCSi
Ácido aspártico	0.08 ± 0.00	0.45 ± 0.01	0.92 ± 0.00
Ácido glutámico	0.12 ± 0.00	0.51 ± 0.00	1.27 ± 0.00
Serina	0.09 ± 0.00	0.38 ± 0.01	0.92 ± 0.00
Histidina	0.11 ± 0.00	0.46 ± 0.01	1.18 ± 0.00
Glicina	0.18 ± 0.00	0.74 ± 0.00	1.99 ± 0.00
Treonina	0.16 ± 0.00	0.68 ± 0.00	1.68 ± 0.00
Arginina	0.19 ± 0.00	0.81 ± 0.01	2.07 ± 0.00
Alanina	0.15 ± 0.00	0.69 ± 0.01	1.64 ± 0.00
Tirosina	0.08 ± 0.00	0.34 ± 0.00	0.82 ± 0.00
Prolina	0.06 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.63 ± 0.00
Valina	0.18 ± 0.00	0.73 ± 0.01	1.92 ± 0.00
Metionina	0.31 ± 0.00	1.23 ± 0.01	2.99 ± 0.00
Fenilalanina	0.25 ± 0.00	1.06 ± 0.01	2.59 ± 0.00
Isoleucina	0.16 ± 0.00	0.62 ± 0.03	1.44 ± 0.00
Leucina	0.38 ± 0.00	1.53 ± 0.02	3.70 ± 0.00
Lisina	0.40 ± 0.01	1.62 ± 0.02	3.90 ± 0.01

En la tabla 11 se muestra la ecuación de la recta y la *r* ajustada obtenida para cada uno de los aminoácidos en donde se puede apreciar que las rectas tuvieron un comportamiento lineal al presentar valores muy cercanos a uno.

Tabla 11. Ecuación de la recta y *r* ajustada para determinar el perfil de aminoácidos

Aminoácido	Ecuación de la recta	<i>R</i> ²
Ácido aspártico	Y=0.00806233x+0.02651156	0.9743
Serina	Y=0.01125057x-0.00667429	0.9999
Ácido glutámico	Y=0.00808508x+0.0025683	0.9993
Glicina	Y=0.01047131x-0.01333196	0.9998
Histidina	Y=0.01781992x-0.04194085	0.9990
Treonina	Y=0.01484049x-0.0038239	0.9998
Arginina	Y=0.01836759x-0.02072506	1.0000
Alanina	Y=0.01440011x+0.01045715	0.9975
Prolina	Y=0.00600467x+0.00716584	0.9995
Cisteína	Y=0.00557722x-0.00424953	0.9999
Tirosina	Y=0.01712826x-0.02877337	0.9996
Valina	Y=0.02617251x+0.02139889	0.9997
Metionina	Y=0.02279791x+0.00391417	0.9997
Lisina	Y=0.01243378x+0.03066972	0.9985
Isoleucina	Y=0.0323018x+0.03541339	0.9996
Leucina	Y=0.03407201x+0.03593836	0.9995
Fenilalanina	Y=0.04687471x-0.03949312	1.0000

Para establecer la sensibilidad del método (límite de cuantificación y detección), se utilizaron los valores correspondientes a la concentración más baja de la curva y se sustituyeron en la siguiente ecuación.

5 Límite de cuantificación: $LC: \frac{10\alpha}{S}$

6 Límite de detección: $LD: \frac{3.3\alpha}{S}$

Donde α es la desviación estándar de la línea de mejor ajuste y *S* es la pendiente.

El resultado obtenido en picomol fue: *L.C.*: 0.05 (Arg) – 4.80 (Glu)

L.D.: 0.02 (Arg) – 1.58 (Glu)

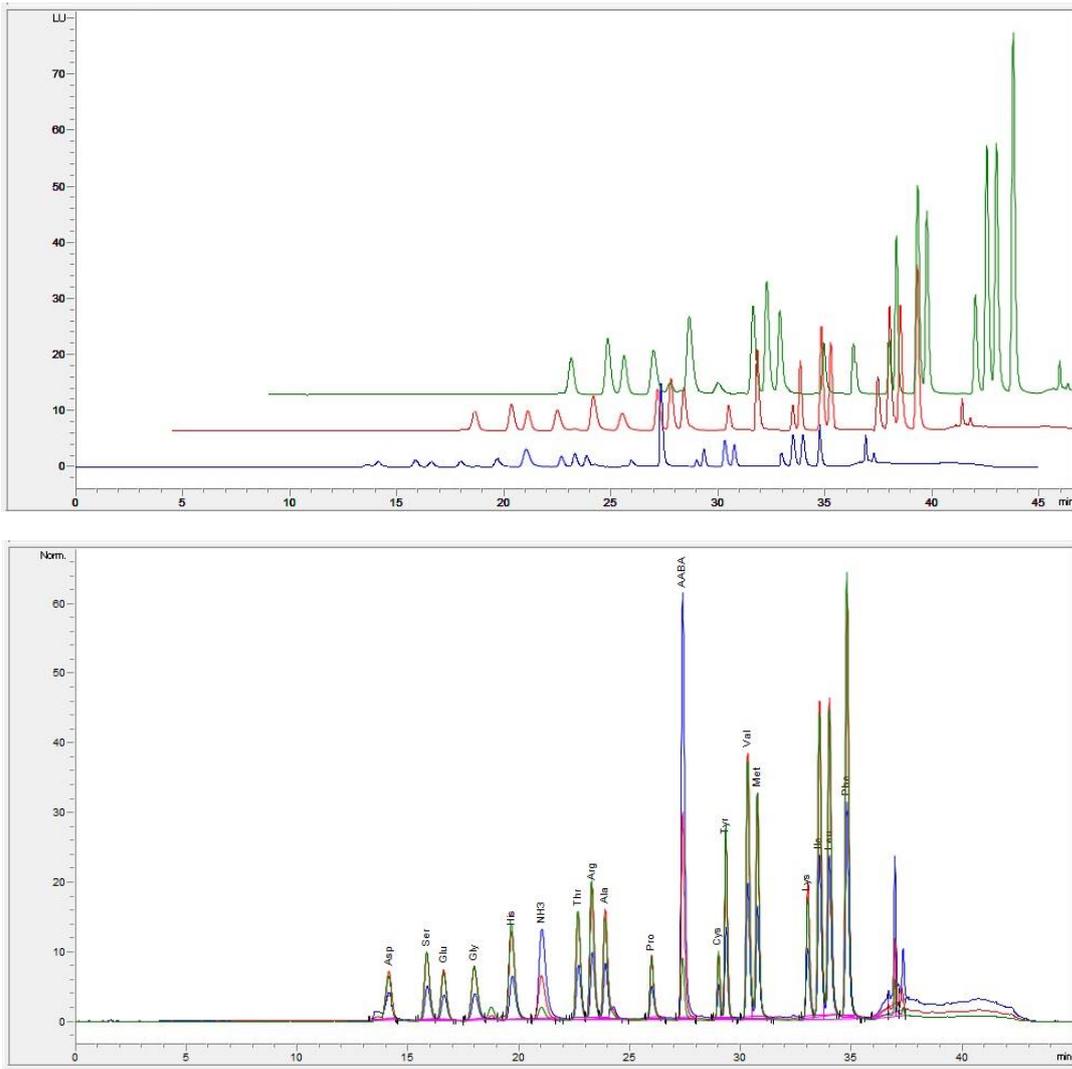


Figura 5. Cromatogramas de los tres puntos de la curva estándar para el perfil de aminoácidos. **Sistema HPLC:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 250 nm, λ_{emss} : 395 nm. **Condiciones de separación:** Columna Hypersil (AA-ODS, 2.1 x 200 mm, 5Micron) Fase Móvil A: Eluyente A de Waters, Fase Móvil B: Acetonitrilo:Agua (60:40 v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 minutos, 0 a 2% de B de 0 a 0.5 min, 2 a 7% de B de 0.5 a 15 min, 7 a 10% de B de 15 a 19 min, 10 a 33% de B de 19 a 32 min, 33% de B de 32 a 33 min, 33 a 100% de B de 33 a 34 min, 100% B de 34 a 39 min, 100 a 0% de B de 39 a 40 min, 0% B de 40 a 45 min, con un flujo de 0.5 mL/min.

En la figura 5 se presentan los cromatogramas con los tres puntos de la curva estándar para la determinación del perfil de aminoácidos. Se puede apreciar una buena separación de los picos, lo que facilita la identificación y cuantificación en las muestras.

Para demostrar la exactitud del método se determinó el perfil de aminoácidos de albúmina bovina y se comparó con el perfil reportado (Boorges, *et al.*, 2008), en la siguiente tabla se muestran los resultados con la desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual demuestra la precisión del método.

Tabla 12. Comparación del perfil de aminoácidos de albúmina bovina.

Aminoácido	Boorges, <i>et al</i>, 2008	Waters	% recuperación	C.V.
Asx	0.74 ± 0.02	0.69 ± 0.03	92.5	0.43
Ser	0.35 ± 0.01	0.24 ± 0.04	69.3	2.13
Glx	1.07 ± 0.03	1.05 ± 0.13	96.8	1.00
Gly	0.25 ± 0.02	0.17 ± 0.07	69.2	6.95
His	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.14	93.5	3.33
Thr	0.44 ± 0.01	0.33 ± 0.12	75.4	3.57
Arg	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.18	97.6	3.57
Ala	0.63 ± 0.02	0.58 ± 0.07	91.9	1.68
Pro	0.40 ± 0.02	0.35 ± 0.08	86.8	2.31
Tyr	0.28 ± 0.01	0.24 ± 0.15	84.8	3.95
Val	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.14	103.1	2.90
Met	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.06	90.6	7.82
Lys	0.81 ± 0.02	0.83 ± 0.13	101.0	1.20
Ile	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.09	86.9	4.55
Leu	0.85 ± 0.02	0.83 ± 0.29	96.7	3.15
Phe	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.23	95.3	4.24

Se puede apreciar que el método es preciso, ya que los valores del coeficiente de variación son menores al 10%, valor máximo para que un método analítico sea considerado como preciso (Reason, 2003). Además, se observa que el porcentaje de recobro es mayor al 70 % en la mayoría de los aminoácidos, esto significa que la exactitud del método es aceptable.

2.3 Validación del método de Agilent

Al igual que en el método de Waters la selectividad se evaluó al inyectar un estándar de aminoácidos, donde aparecen los 18 picos esperados para cada uno de los aminoácidos, los cuales fueron identificados en triadas de acuerdo a la polaridad; con base en los tiempos de retención se identificó cada uno. La inyección de un blanco de reactivos, así como uno solo con agua HPLC reveló que en el tiempo en el cual eluyen los aminoácidos (de 1.7 a 19 minutos) no se presentan señales corroborando la especificidad del método.

Para realizar la comparación con el método de Waters, se utilizaron las mismas concentraciones para los tres puntos de la curva estándar, esta se inyectó por duplicado, en la tabla 13 se muestra el promedio de cada uno de los valores utilizados para diseñar la curva, así como la desviación estándar y coeficiente de variación correspondiente a cada punto.

Tabla 13. Datos de curva estándar para determinar perfil de aminoácidos

Aminoácido	25 pmol	100 pmol	250 pmol
	ABCaa/ABCSi	ABCaa/ABCSi	ABCaa/ABCSi
Ácido aspártico	2.38 ± 0.00	0.69 ± 0.00	1.56 ± 0.07
Ácido glutámico	2.16 ± 0.00	0.64 ± 0.00	1.47 ± 0.07
Serina	2.99 ± 0.00	0.83 ± 0.00	1.94 ± 0.11
Histidina	1.66 ± 0.00	0.51 ± 0.01	1.14 ± 0.14
Glicina	3.11 ± 0.00	0.88 ± 0.01	2.07 ± 0.12
Treonina	2.78 ± 0.00	0.79 ± 0.01	1.81 ± 0.07
Arginina	3.59 ± 0.00	0.98 ± 0.01	2.20 ± 0.08
Alanina	3.15 ± 0.00	0.89 ± 0.01	2.05 ± 0.16
Tirosina	4.05 ± 0.00	1.16 ± 0.01	2.61 ± 0.12
Prolina	1.30 ± 0.01	0.43 ± 0.03	1.02 ± 0.12
Valina	3.66 ± 0.00	1.07 ± 0.01	2.35 ± 0.09
Metionina	3.58 ± 0.01	1.05 ± 0.05	2.13 ± 0.14
Fenilalanina	4.74 ± 0.01	1.29 ± 0.05	2.70 ± 0.21
Isoleucina	3.87 ± 0.01	1.08 ± 0.03	2.26 ± 0.05
Leucina	3.75 ± 0.01	1.04 ± 0.05	2.32 ± 0.06
Lisina	0.89 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.39 ± 0.14

En la tabla 14 se muestra la ecuación de la recta y la r ajustada obtenida para cada uno de los aminoácidos en donde se puede apreciar que las rectas tuvieron un comportamiento lineal al presentar valores muy cercanos a uno, con excepción de metionina y lisina.

Tabla 14. Ecuación de la recta y r ajustada para determinar el perfil de aminoácidos

Aminoácido	Ecuación de la recta	R^2
Ácido aspártico	$y=0.011522x+0.029569$	0.9953
Ácido glutámico	$y=0.010842x+0.022826$	0.9952
Serina	$y=0.014269x+0.030513$	0.9975
Histidina	$y=0.008446x+0.022584$	0.9917
Glicina	$y=0.015282x+0.024252$	0.9980
Treonina	$y=0.013332x+0.033977$	0.9959
Arginina	$y=0.016078x+0.058654$	0.9954
Alanina	$y=0.015135x+0.032322$	0.9972
Tirosina	$y=0.019170x+0.059318$	0.9943
Prolina	$y=0.007667x-0.001691$	0.9962
Valina	$y=0.017237x+0.063107$	0.9918
Metionina	$y=0.015348x+0.110792$	0.9762
Fenilalanina	$y=0.019419x+0.130507$	0.9861
Isoleucina	$y=0.016292x+0.103092$	0.9857
Leucina	$y=0.016907x+0.067609$	0.9935
Lisina	$y=0.002616x+0.046773$	0.9343

De manera análoga que en el método de Waters, para establecer la sensibilidad del método (límite de cuantificación y detección), se utilizaron los valores correspondientes a la concentración más baja de la curva y se sustituyeron en la siguiente ecuación.

7 Límite de cuantificación: $LC: \frac{10\alpha}{S}$

8 Límite de detección: $LD: \frac{3.3\alpha}{S}$

Donde α es la desviación estándar de la línea de mejor ajuste y S es la pendiente.

El resultado obtenido en picomol fue: $L.C: 0.54$ (Val) – 12.65 (Pro)

$L.D: 0.18$ (Val) – 4.17 (Pro)

En la figura 6 se presentan los cromatogramas con los tres puntos de la curva estándar para la determinación del perfil de aminoácidos. Se puede apreciar una buena separación de los picos lo que permite una correcta identificación y cuantificación en las muestras.

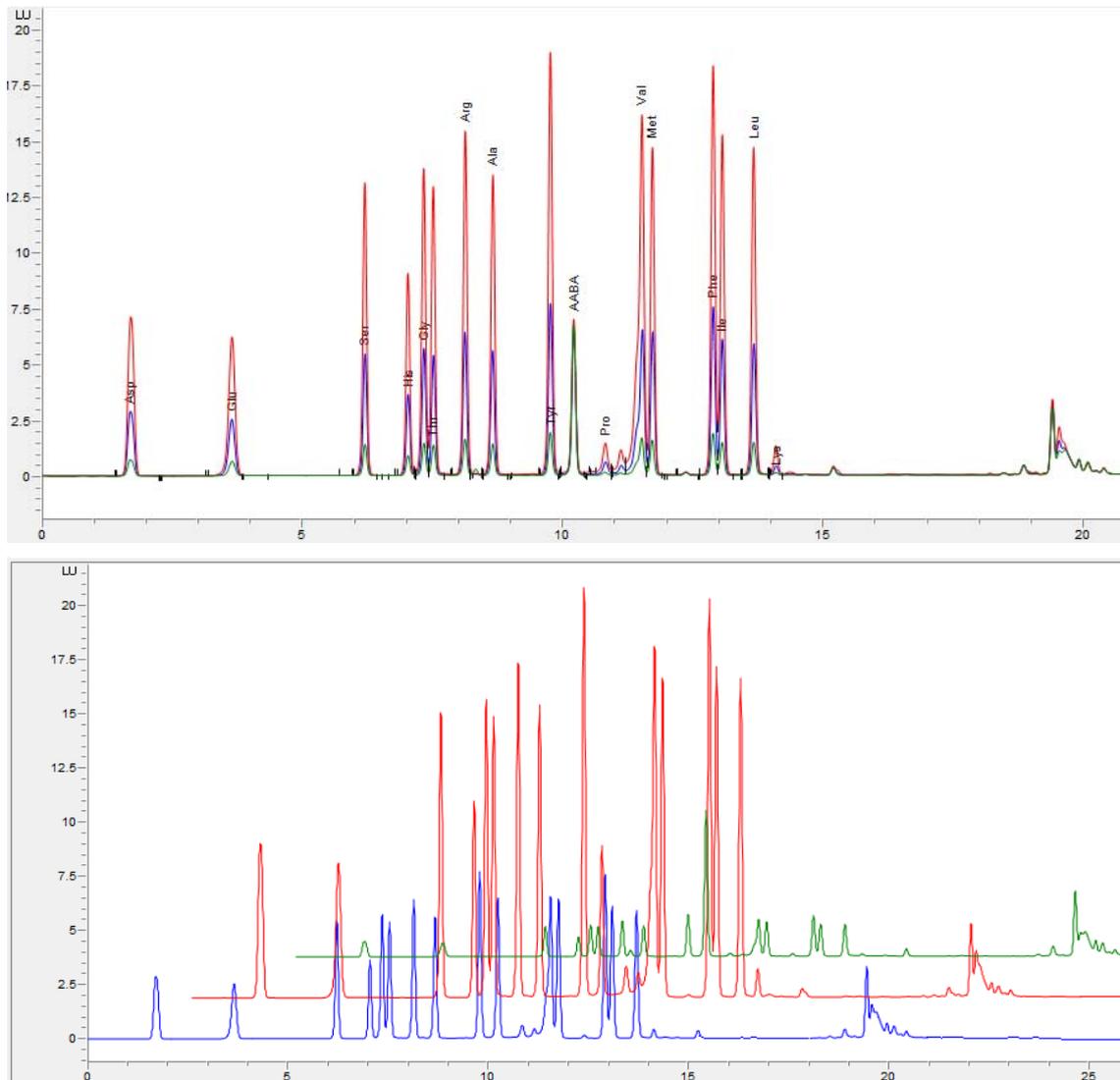


Figura 6. Cromatogramas de los tres puntos de la curva estándar para el perfil de aminoácidos. **Sistema HPLC:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 260 nm, λ_{emss} : 450 nm. **Condiciones de separación:** Columna Zorbax (Eclipse AAA, 4.6 x 150 mm 3.5Micron) Fase Móvil A: Fosfato de sodio dibásico 40 mM (ajustado a pH:7.8), Fase Móvil B: Acetonitrilo:Metanol:Agua (45:45:10 v/v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 minutos, 0% de B de 0 a 1.9 min, 0 a 10% de B de 1.9 a 5 min, 10 a 20% de B de 5 a 12 min, 20 a 57% de B de 12 a 23.1 min, 57 a 100% de B de 23.1 a 23.6 min, 100% de B de 23.6 a 27.3min, 100 a 0% B de 27.3 a 28.2 min, 0% de B de 28.2 a 31 min, con un flujo de 2 mL/min.

Para demostrar la exactitud del método se determinó el perfil de aminoácidos de albúmina bovina y se comparó con el perfil reportado (Boorges, *et al.*2008), en la siguiente tabla se muestran los resultados con la desviación estándar y el coeficiente de variación el cual demuestra la precisión del método.

Tabla 15. Comparación del perfil de aminoácidos de albúmina bovina.

Aminoácido	Boorges, <i>et al.</i>, 2008	Agilent	% recuperación	C.V.
Asx	0.74 ± 0.02	0.64 ± 0.00	86.1	0.40
Ser	0.35 ± 0.01	0.23 ± 0.00	66.5	0.61
Glx	1.07 ± 0.03	0.82 ± 0.01	76.5	0.71
Gly	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.01	84.2	3.57
His	0.23 ± 0.01	0.16 ± 0.01	70.6	4.14
Thr	0.44 ± 0.01	0.24 ± 0.02	54.4	6.97
Arg	0.34 ± 0.01	0.22 ± 0.00	65.6	2.12
Ala	0.63 ± 0.02	0.47 ± 0.00	75.4	0.07
Pro	0.40 ± 0.02	-	-	-
Tyr	0.28 ± 0.01	0.200 ± 0.00	70.4	2.22
Val	0.48 ± 0.01	0.333 ± 0.01	68.1	4.55
Met	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.00	149.5	1.47
Lys	0.81 ± 0.02	0.58 ± 0.01	71.6	1.14
Ile	0.19 ± 0.01	0.13 ± 0.00	67.7	2.62
Leu	0.85 ± 0.02	0.42 ± 0.01	49.4	2.74
Phe	0.38 ± 0.01	0.23 ± 0.01	59.4	4.14

Se puede apreciar que el método es preciso, ya que los valores del coeficiente de variación son menores al 10%, valor máximo para que un método analítico sea considerado como preciso (Reason, 2003). Con base en los porcentajes de recuperación se observa que el método no es preciso para todos los aminoácidos ya que en el caso de serina, treonina, arginina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina el valor de recuperación es menor al 70 %. En el caso de la prolina no fue posible realizar la identificación en la muestra.

3. Criterios de comparación en la metodología para la determinación del perfil de aminoácidos (Waters y Agilent)

Para establecer que metodología es la ideal para la determinación del perfil de aminoácidos en dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado, se consideraron los siguientes parámetros: tiempo de análisis, costos, sensibilidad, precisión y exactitud de cada uno de los métodos.

Para determinar los costos se tomó en consideración lo siguiente: el precio de los derivatizantes, disolventes, eluyente A de Waters y el volumen requerido de reactivos por tiempo de análisis.

Se consideraron lotes de 40 muestras a analizar, tomando en cuenta que el derivatizante contiene 1 mL y que en el caso de Waters se utilizan 20 µL por muestra. Los costos de los disolventes (grado HPLC), eluente A de Waters y acetato de sodio para preparar la fase móvil A de Agilent se muestran a continuación.

Tabla 16. Costos de reactivos para determinar perfil de aminoácidos

Reactivo	Costo (m.n.)
4 L Acetonitrilo	\$ 1 556
4 L Metanol	\$ 914
4 L Agua	\$ 925
950 mL Eluente A de Waters	\$ 5 365
500 g de acetato de sodio	\$ 1 641

Waters

Para el caso de los derivatizantes del sistema AccQ-Tag de Waters, el kit contiene cinco sets que incluyen el buffer de boratos, acetonitrilo como disolvente y el AQC, el kit tiene un costo de \$ 11 197.19 m.n. Con un set se pueden analizar 40 muestras.

El volumen utilizado de la fase móvil A y B va a depender del método, para Waters cada análisis dura 45 min y el flujo es de 0.5 mL por minuto. A pesar de que el volumen de cada una de las fases va cambiando, en un día se realizan 8 inyecciones. Por lo que para realizar un aproximado se multiplicó 0.5 mL por 45 minutos, lo cual da como resultado 22.5 mL de fase móvil lo cual corresponde a una inyección, esto se multiplica por las 8 inyecciones que se realizan al día y da un valor de 180 mL, por lo que en un día se preparan 500 mL de fase móvil A, ya que se considera la estabilización de la columna durante 10 minutos con esta fase, mientras que de la fase B se preparan 250 mL, ya que esta solo se utiliza al final del análisis. Se está considerando que para inyectar 40 muestras se requieren ocho días por lo que se multiplican los 500 mL de la fase móvil A por ocho dando un volumen de 4 L, en el caso de la fase móvil B el volumen utilizado es de 2 L. En el caso de la fase móvil A se utilizan 400 mL del eluente A y 3.6 L de agua grado HPLC, en el caso de la fase B es una relación 60:40 acetonitrilo:agua por lo que se consideran 1200 mL de acetonitrilo y 800 mL de agua para las 40 muestras.

A continuación se muestra una tabla con el volumen y costo correspondiente a las 40 muestras, en el caso de los derivatizante se dividió el costo del kit entre el número de sets (cinco) y para el eluyente A se determinó el costo de los 400 mL utilizados.

Tabla 17. Costos de reactivos para metodología de Waters

Volumen	Costo en pesos (m.n.)
5 L agua	\$ 1 156
1.2 L acetonitrilo	\$ 466.8
400 mL de eluyente A de Waters	\$ 2 259.3
Un set de AQC, Buffer de boratos y acetonitrilo	\$ 2 239.3
Total	\$ 6 121.4

Agilent

Para el caso de Agilent es necesario adquirir un kit de 6 ampollas de OPA el cual tiene un precio de \$ 4 637.06 M.NEI FMOC con 10 ampollas tiene un costo de \$ 5 086.81 M.N el buffer de boratos que contiene 100 mL y tiene un precio de \$ 2 667.47 M.N

En la metodología de Agilent cada análisis dura 31 minutos y el flujo es de 2 mL por minuto. Por lo que en un análisis el volumen gastado es de 62 mL, ya que el tiempo de análisis es menor para procesar 40 muestras; se requieren 6 días, por lo que en un día se realizan 10 inyecciones y el volumen gastado es de 620 mL pero debido al acondicionamiento de la columna y a que la fase móvil tiene que ser aforada, se prepara 1 L al día de la fase A y 800 mL de la fase B. Durante los 6 días de análisis se utilizan 6 L de agua y 42.72 g de acetato de sodio, mientras que para la fase móvil B que tiene una relación 45:45:10 acetonitrilo:metanol:agua se gastan 2.16 L de metanol, 2.16 L de acetonitrilo y 640 mL de agua para las 40 muestras.

Cabe mencionar que la derivatización en esta metodología se realiza de forma automática, por lo que el volumen de OPA y FMOC es de 0.5 μ L de cada uno por muestra, por lo tanto es posible analizar 325 muestras por ampolla, sin embargo, si no se analizan este número de muestras el derivatizante tendrá que ser desechado; ya que su vida útil es de una semana después de ser abierto.

A continuación se muestra una tabla con el volumen y costo correspondiente a las 40 muestras, en el caso del derivatizante se dividió el costo de cada kit entre el número de ampollas que trae cada uno y se hizo la relación para determinar cuál sería el costo real por las 40 muestras.

Tabla 18. Costo de reactivos para metodología de Agilent

Volumen	Costo en pesos (m.n.)
7 L agua	\$ 1 618.75
2.16 L acetonitrilo	\$ 840.24
2.16 L metanol	\$ 493.26
42. 72 g de acetato de sodio	\$ 140.20
OPA, FMOC y 4 mL de buffer de boratos	\$ 1 281.48
Total	\$ 4 374.00

Como se mencionó anteriormente, una vez que el derivatizante ha sido abierto solo se tiene una semana para utilizarlo por lo que el costo total que se muestra en la tabla es considerando el volumen que se utiliza para 40 muestras. Si se analizarán más muestras el costo se incrementaría debido al volumen de las fases utilizadas.

A modo de comparación se realizó una tabla, la cual se muestra a continuación, donde se puede apreciar que el método propuesto por Agilent tiene menor costo y tiempo de análisis (31 min), pero en cuanto a sensibilidad el método de Waters es mejor, ya que logra detectar y cuantificar concentraciones más bajas.

Tabla 19 . Comparación del método de Waters vs método de Agilent

	Waters	Agilent
Costos	\$ 6 121 m.n.	\$ 4 374 m.n.
Tiempo	45 min	31 min
Sensibilidad	<i>L.D:</i> 0.02 (Arg) – 1.58 (Glu)	<i>L.D:</i> 0.18 (Val) – 4.17 (Pro)
	<i>L.C:</i> 0.05 (Arg) – 4.80 (Glu)	<i>L.C:</i> 0.54 (Val) – 12.65 (Pro)

En cuanto a precisión y exactitud se muestra una tabla con el porcentaje de recobro y coeficiente de variación obtenido del perfil de aminoácidos de albúmina bovina (Sigma-Aldrich) para cada uno de los métodos.

Tabla 20 . Comparación del perfil de aminoácido de albumina bovina.

Aminoácido	Waters % recuperación	C.V.	Agilent % recuperación	C.V.
Asx	92.5	0.43	86.1	0.40
Ser	69.3	2.13	66.5	0.61
Glx	96.8	1.00	76.5	0.71
Gly	69.2	6.95	84.2	3.57
His	93.5	3.33	70.6	4.14
Thr	75.4	3.57	54.4	6.97
Arg	97.6	3.57	65.6	2.12
Ala	91.9	1.68	75.4	0.07
Pro	86.8	2.31	-	-
Tyr	84.8	3.95	70.4	2.22
Val	103.1	2.90	68.1	4.55
Met	90.6	7.82	149.5	1.47
Lys	101.0	1.20	71.6	1.14
Ile	86.9	4.55	67.7	2.62
Leu	96.7	3.15	49.4	2.74
Phe	95.3	4.24	59.4	4.14

De acuerdo a la tabla 20 se puede apreciar que ambos métodos son precisos ya que el coeficiente de variación mostrado es menor al 10 %, sin embargo, la exactitud es mayor en el método de Waters ya que la mayoría de los aminoácidos muestran valores alrededor del 90 % de recuperación, mientras que en el método de Agilent la mayoría de los valores son menor al 70 % lo cual disminuye la confiabilidad de los resultados.

Por lo tanto, con base a los resultados mostrados se determina que la mejor metodología para analizar el perfil de aminoácidos en dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado es el método de Waters, ya que presenta la mejor precisión y mayor sensibilidad, a pesar de que los costos y tiempo de análisis es alto, la confiabilidad de los resultados es mayor.

4. Determinación del perfil de aminoácidos en dietas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado y músculo de *Totoaba macdonaldi*.

La determinación del perfil de aminoácidos en dietas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado y músculo de *Totoaba macdonaldi* se realizó en el laboratorio de nutrición de la UABC donde se implementaron las metodologías descritas anteriormente.

Para la determinación de triptófano, se utilizó la curva estándar presentada en la validación del método con valores de 6.75 pmol a 100 pmol (grafica 1). En la determinación del perfil de aminoácidos por la metodología de AccQ*Tag Waters, se utilizó la curva estándar de tres puntos mostrada anteriormente con las concentraciones de 25 pmol, 100 pmol y 250 pmol.

Se inyectaron 5 μ L de cada muestra en el sistema CLAR. Primeramente se determinó la concentración de triptófano y posteriormente el perfil de aminoácidos. En las figuras 7 y 8 se presentan respectivamente los cromatogramas correspondientes a la determinación de triptófano, mientras que en el figura 9 y 10 se muestran los cromatogramas del perfil de aminoácidos de la dieta formulada con 100 % de proteína de soya y el músculo de los juveniles de totoaba alimentados con dicha dieta.

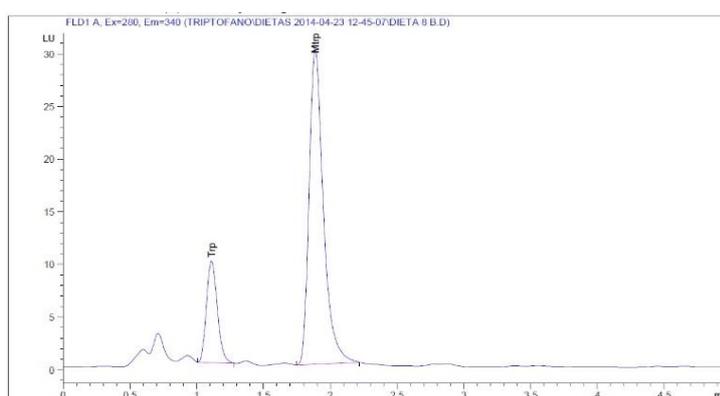


Figura 7. Cromatograma de dieta con 100% de proteína de soya. **Sistema CLAR:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 280nm, λ_{emss} : 340nm. **Condiciones de separación:** Columna Poroshell 120 (EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7 Micron) Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (20:80 v/v), flujo 0.5 mL/min.

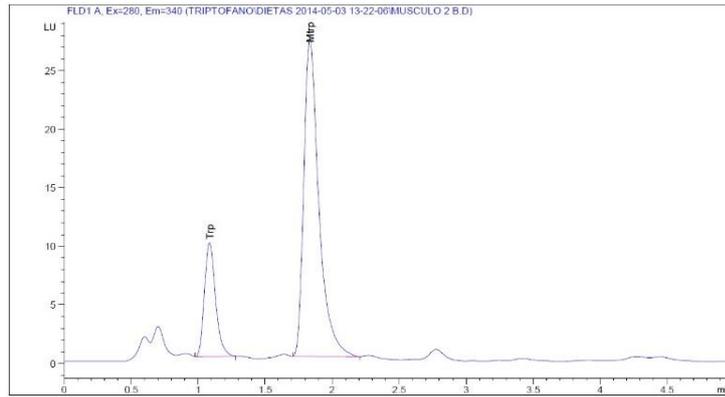


Figura 8. Cromatograma de músculo de juveniles de totoaba alimentado con la dieta 100% de proteína de soya. **Sistema CLAR:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 280nm, λ_{emss} : 340nm. **Condiciones de separación:** Columna Poroshell 120 (EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7 Micron) Fase Móvil: Acetonitrilo: Agua con 0.1% de ácido trifluoroacético (20:80 v/v), flujo 0.5 mL/min.

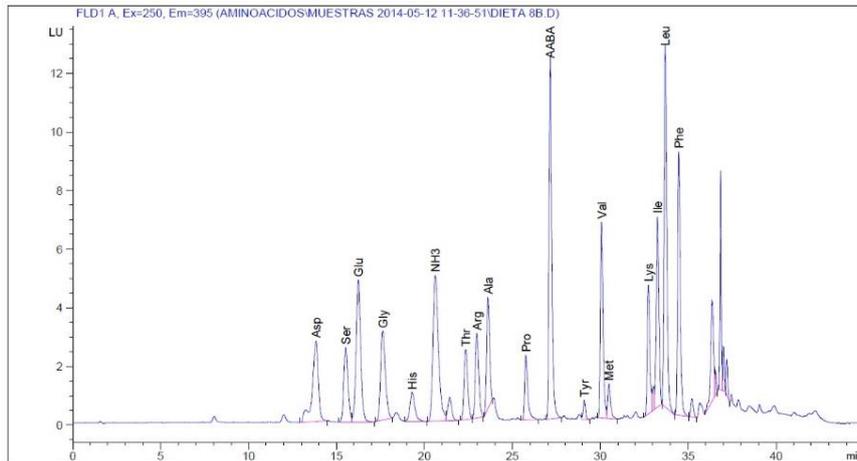


Figura 9. Cromatograma de dieta con 100% de proteína de soya. **Sistema CLAR:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 250nm, λ_{emss} : 395nm. **Condiciones de separación:** Columna Hypersil (AA-ODS, 2.1 x 200mm, 5Micron) Fase Móvil A: Eluyente A de Waters, Fase Móvil B: Acetonitrilo:Agua (60:40 v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 minutos, 0 a 2% de B de 0 a 0.5 min, 2-7% de B de 0.5 a 15 min, 7 a 10% de B de 15 a 19 min, 10 a 33% de B de 19 a 32 min, 33% de B de 32 a 33min, 33 min a 100% de B de 33 a 34min, 100% B de 34 a 39 min, 100-0% de B de 39 a 40 min, 0% B de 40 a 45 min, con un flujo de 0.5 mL/min.

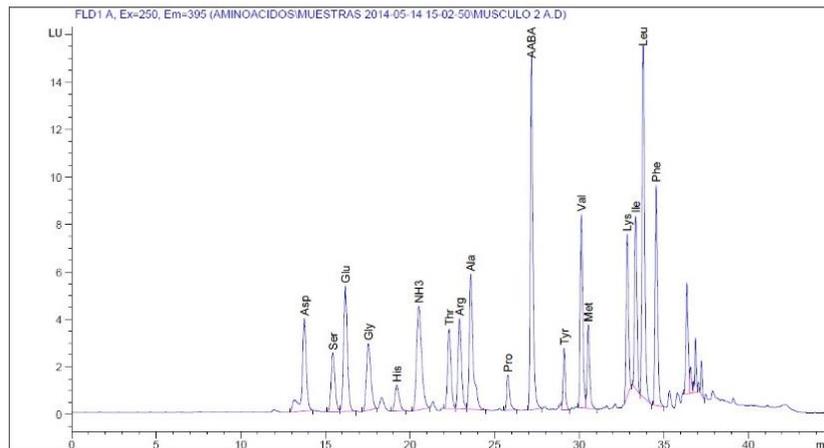
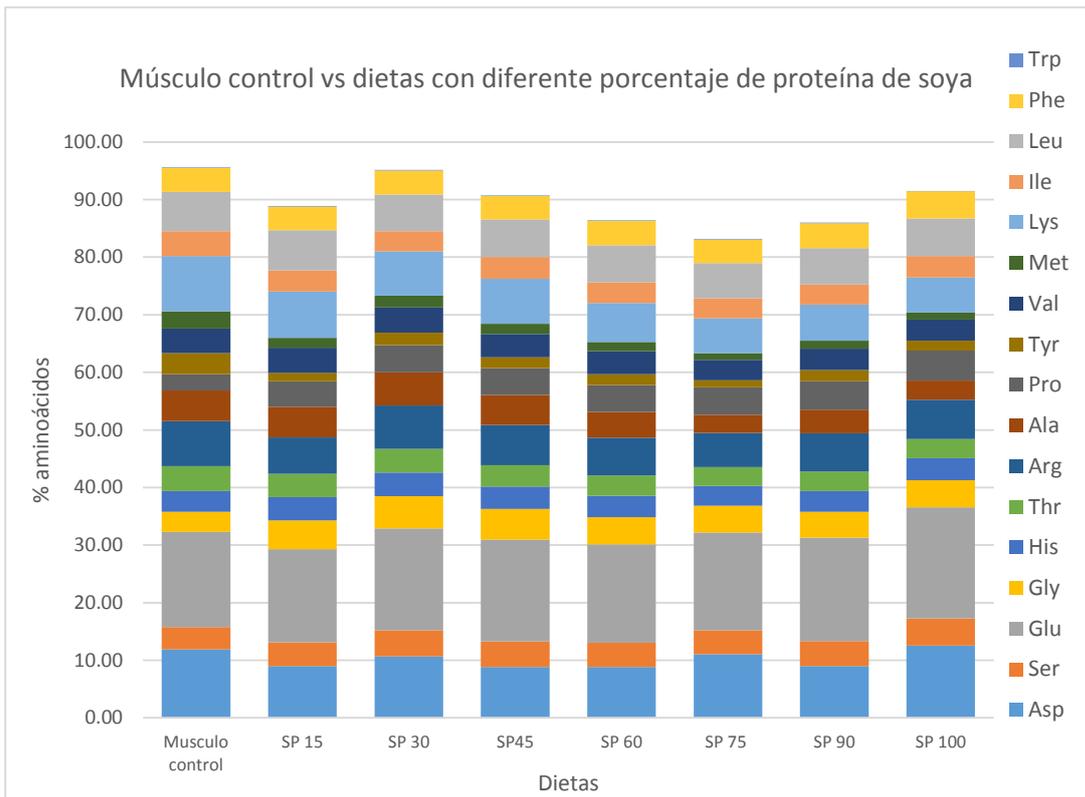


Figura 10. Cromatograma de músculo de juveniles de totoaba alimentado con la dieta 100% de proteína de soya. **Sistema CLAR:** Sistema de bombeo Dual (Bin Pump) Agilent 1260, Detector de fluorescencia de onda múltiple Agilent 1260, λ_{exc} : 250nm, λ_{emss} : 395nm. **Condiciones de separación:** Columna Hypersil (AA-ODS, 2.1 x 200mm, 5Micron) Fase Móvil A: Eluyente A de Waters, Fase Móvil B: Acetonitrilo:Agua (60:40 v/v), se utilizó un gradiente de 0% de B en el tiempo de 0 minutos, 0 a 2% de B de 0 a 0.5 min, 2 a 7% de B de 0.5 a 15 min, 7 a 10% de B de 15 a 19 min, 10 a 33% de B de 19 a 32 min, 33% de B de 32 a 33min, 33 a 100% de B de 33 a 34 min, 100% B de 34 a 39 min, 100 a 0% de B de 39 a 40 min, 0% B de 40 a 45 min, con un flujo de 0.5 mL/min.

En los cromatogramas presentados se puede apreciar que tanto la separación de los picos como la identificación de los mismos fueron ideales para poder realizar la cuantificación de los aminoácidos.

Una vez que se analizaron las muestras, se procedió a hacer la comparación del perfil de aminoácidos del músculo de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados con proteína de pescado contra las diferentes dietas elaboradas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado, esto para poder establecer cuál de las dietas es la que más se acerca al perfil ideal. En la gráfica 2 se presenta la comparación del perfil de aminoácidos del músculo contra las dietas.



Gráfica 2. Comparación del músculo control contra las dietas con diferentes porcentajes de proteína de soya.

En la gráfica 2 se puede apreciar de manera general que los aminoácidos que se presentan en mayor porcentaje son ácido aspártico y ácido glutámico, seguidos de arginina y lisina, para los dos primeros aminoácidos es notorio que el porcentaje es mucho mayor que en los demás, debido a que el valor reportado es derivado de la contribución de la glutamina y asparagina, que en condiciones experimentales, se hidrolizan a ácido aspártico y glutámico, respectivamente.

Ya que esta es una gráfica donde se muestra el contenido de todos los aminoácidos presentes en las dietas, se observa que la variación en el contenido de aminoácidos es mínima ya que las dietas fueron elaboradas isoproteícamente.

La primera barra corresponde al músculo de pescado, el cual muestra el porcentaje ideal de cada uno de los aminoácidos, se puede apreciar que la barra tres que corresponde a la dieta elaborada con 30 % de soya es la que tiene el porcentaje más parecido en cuanto al total de los aminoácidos requeridos,

seguida de la que tiene 100 % de proteína de soya y siendo la de 75 % proteína de soya la que mostró el valor más bajo.

Como se observa no se presentó una tendencia clara de cambio en el porcentaje de los aminoácidos conforme se aumentaba la cantidad de proteína de soya en las dietas, lo que se puede apreciar es que a partir de la dieta con 45 % de soya se ve una disminución hasta llegar a la dieta con 90 % y 100 % de proteína de soya, en estas últimas se ve que el porcentaje de los aminoácidos aumenta. Es posible que la soya tenga uno o varios aminoácidos que no presentan una concentración importante a menos que la soya sea adicionada en grandes cantidades, para explicar mejor esto es necesario analizar cada aminoácido por separado con el fin de identificar cuáles son los aminoácidos que están aumentando y disminuyendo conforme el porcentaje de proteína de soya va aumentando.

Para que los juveniles de totoaba tengan un óptimo desarrollo no solo es importante que las dietas presenten el mismo porcentaje de proteína si no que el porcentaje de cada uno de los aminoácidos sea igual al porcentaje del músculo del organismo que ha sido alimentado con proteína de pescado. Para esto se reportó la concentración de cada uno de los aminoácidos presentes en las dietas así como en el músculo de los organismos alimentados con dichas formulaciones.

Como se dijo anteriormente es importante que las dietas presenten el porcentaje adecuado de cada uno de los aminoácidos, principalmente de los indispensables, recordando que estos son aquellos que el organismo no es capaz de sintetizar por lo tanto la única manera de obtenerlos es por medio de la dieta. En el caso de los peces los aminoácidos indispensables son los siguientes: fenilalanina (Phe), leucina (Leu), isoleucina (Ile), metionina (Met), lisina (Lys), treonina (Thr), valina (Val), triptófano (trp), histidina (Hys) y arginina (Arg) (Li, 2008).

Analizando las gráficas, se puede observar que hay tres aminoácidos que no presentan los requerimientos presentes en el musculo (control): isoleucina, metionina y tirosina. Dos de ellos, son aminoácidos esenciales (Ile y Met), por lo que será necesario ver la forma de suplementarlos en la dieta. La tirosina, es un aminoácido dispensable condicional (D'aniello), si no está presente la fenilalanina, sin embargo, todas las dietas cumplen con el requerimiento de este aminoácido indispensable.

Debido a que los aminoácidos dispensables pueden ser sintetizados por el organismo, se decidió darle prioridad a la concentración obtenida de los aminoácidos indispensables, por lo tanto se realizaron tablas y gráficas de acuerdo a esta clasificación.

En las tablas 21 y 22 se muestran los resultados de la concentración de los aminoácidos indispensables y dispensables respectivamente presentes en las dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado.

En las tabla 23 y 24 se muestran los resultados con la concentración de los aminoácidos indispensables y dispensables respectivamente, presentes en músculos de juveniles de totoaba alimentados con las formulaciones diseñadas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado.

Cabe mencionar que en la concentración reportada para glutamina y asparagina no se puede reportar su valor, debido a condiciones metodológicas, la hidrólisis de proteínas es una reacción de ruptura del enlace peptídico (un enlace amida), característica principal de estos dos aminoácidos, que se convierten en su forma ácida, que es ácido glutámico y ácido aspártico respectivamente, debido a esto se está reportando una mezcla de ambos aminoácidos. Para el caso de la cisteína no es posible cuantificarla debido a la poca absorción del derivado fluorescente y la oxidación que sufre por las condiciones de hidrólisis (Davidson, 2003).

Tabla 21. Aminoácidos indispensables en dietas con proteína de soya en sustitución parcial de proteína de pescado. (Concentración expresada en g de aminoácido/100 g de proteína \pm SD)

Aminoácido	Dieta control	SP 15	SP 30	SP45	SP 60	SP 75	SP 90	SP 100
His	3.94 \pm 0.10	4.06 \pm 0.14	4.11 \pm 0.13	3.87 \pm 0.01	3.72 \pm 0.17	3.48 \pm 0.07	3.61 \pm 0.10	3.83 \pm 0.14
Thr	4.13 \pm 0.04	3.99 \pm 0.14	4.09 \pm 0.04	3.74 \pm 0.12	3.57 \pm 0.06	3.24 \pm 0.08	3.36 \pm 0.26	3.36 \pm 0.13
Arg	6.54 \pm 0.02	6.37 \pm 0.28	7.52 \pm 0.07	6.96 \pm 0.58	6.53 \pm 0.23	5.95 \pm 0.19	6.67 \pm 0.48	6.78 \pm 0.76
Val	4.46 \pm 0.00	4.35 \pm 0.14	4.42 \pm 0.02	4.05 \pm 0.04	3.95 \pm 0.00	3.56 \pm 0.06	3.72 \pm 0.29	3.70 \pm 0.13
Met	1.88 \pm 0.07	1.72 \pm 0.09	2.01 \pm 0.00	1.80 \pm 0.02	1.64 \pm 0.08	1.13 \pm 0.04	1.41 \pm 0.14	1.20 \pm 0.24
Ile	4.00 \pm 0.23	3.68 \pm 0.12	3.49 \pm 0.03	3.78 \pm 0.03	3.60 \pm 0.03	3.45 \pm 0.02	3.51 \pm 0.27	3.74 \pm 0.19
Leu	7.00 \pm 0.02	6.96 \pm 0.25	6.38 \pm 0.04	6.54 \pm 0.02	6.48 \pm 0.04	6.12 \pm 0.01	6.31 \pm 0.45	6.52 \pm 0.18
Phe	3.95 \pm 0.09	4.10 \pm 0.21	4.18 \pm 0.08	4.04 \pm 0.11	4.19 \pm 0.12	4.10 \pm 0.09	4.33 \pm 0.28	4.71 \pm 0.36
Lys	8.63 \pm 0.31	8.05 \pm 0.15	7.74 \pm 0.02	7.80 \pm 0.05	6.73 \pm 0.12	6.08 \pm 0.06	6.25 \pm 0.46	6.08 \pm 0.23
Trp	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.00

SP: proteína de soya ND: no detectada

Tabla 22. Aminoácidos dispensables en dietas con proteína de soya en sustitución parcial de proteína de pescado. (Concentración expresada en g de aminoácido/100 g de proteína \pm SD)

Aminoácido	Dieta control	SP 15	SP 30	SP45	SP 60	SP 75	SP 90	SP 100
Asx	8.44 \pm 0.65	9.00 \pm 0.20	10.65 \pm 0.06	8.85 \pm 0.13	8.86 \pm 0.34	11.03 \pm 0.16	8.98 \pm 0.64	15.52 \pm 0.16
Ser	4.04 \pm 0.12	4.12 \pm 0.16	4.55 \pm 0.04	4.42 \pm 0.07	4.20 \pm 0.03	4.21 \pm 0.12	4.34 \pm 0.32	4.27 \pm 0.13
Glx	15.63 \pm 0.54	16.17 \pm 0.41	17.72 \pm 0.18	17.67 \pm 0.17	17.07 \pm 0.12	16.92 \pm 0.15	17.95 \pm 1.27	19.31 \pm 0.46
Gly	5.24 \pm 0.08	5.02 \pm 0.19	5.59 \pm 0.03	5.35 \pm 0.19	4.69 \pm 0.05	4.66 \pm 0.01	4.53 \pm 0.33	4.70 \pm 0.23
Ala	5.93 \pm 0.21	5.33 \pm 0.16	5.79 \pm 0.04	5.21 \pm 0.34	4.50 \pm 0.02	3.17 \pm 0.01	4.09 \pm 0.29	3.35 \pm 0.49
Pro	4.17 \pm 0.10	4.41 \pm 0.24	4.68 \pm 0.01	4.67 \pm 0.05	4.67 \pm 0.02	4.74 \pm 0.06	4.96 \pm 0.36	5.21 \pm 0.14
Cys	ND							
Tyr	1.51 \pm 0.03	1.46 \pm 0.04	2.16 \pm 0.10	1.85 \pm 0.01	1.90 \pm 0.10	1.23 \pm 0.03	1.90 \pm 0.19	1.70 \pm 0.55

SP: proteína de soya ND: no detectada

Tabla 23. Aminoácidos indispensables en músculo de totoaba alimentada con dietas formuladas con diferentes porcentajes de soya. (Concentración expresada en g de aminoácido/100 g de proteína \pm SD)

Aminoácido	Músculo control	SP 15	SP 30	SP45	SP 60	SP 75	SP 90	SP 100
His	3.57 \pm 0.11	3.00 \pm 0.06	3.56 \pm 0.03	3.54 \pm 0.14	3.32 \pm 0.08	3.41 \pm 0.08	2.90 \pm 0.03	3.42 \pm 0.10
Thr	4.34 \pm 0.00	3.31 \pm 0.16	4.10 \pm 0.03	4.22 \pm 0.10	4.07 \pm 0.09	4.04 \pm 0.13	3.07 \pm 0.13	4.07 \pm 0.11
Arg	7.79 \pm 0.00	5.90 \pm 0.22	7.54 \pm 0.02	7.06 \pm 0.23	6.84 \pm 0.15	7.18 \pm 0.15	5.54 \pm 0.06	7.52 \pm 0.23
Val	5.36 \pm 0.07	4.31 \pm 0.13	4.51 \pm 0.01	4.99 \pm 0.11	5.02 \pm 0.06	5.32 \pm 0.09	4.18 \pm 0.17	5.28 \pm 0.15
Met	2.83 \pm 0.01	2.75 \pm 0.08	2.87 \pm 0.00	3.05 \pm 0.05	2.77 \pm 0.10	2.78 \pm 0.11	2.67 \pm 0.06	2.86 \pm 0.06
Ile	4.30 \pm 0.28	2.01 \pm 0.18	3.31 \pm 0.04	3.82 \pm 0.06	3.87 \pm 0.05	3.61 \pm 0.07	1.77 \pm 0.15	3.69 \pm 0.14
Leu	6.87 \pm 0.21	5.55 \pm 0.21	6.42 \pm 0.02	7.18 \pm 0.13	7.03 \pm 0.11	6.51 \pm 0.19	5.23 \pm 0.25	6.47 \pm 0.09
Phe	4.14 \pm 0.01	3.33 \pm 0.11	4.04 \pm 0.08	4.13 \pm 0.08	3.85 \pm 0.08	3.58 \pm 0.07	2.92 \pm 0.01	3.73 \pm 0.00
Lys	9.58 \pm 0.32	7.89 \pm 0.43	8.21 \pm 0.02	10.24 \pm 0.16	9.82 \pm 0.33	9.33 \pm 0.58	7.61 \pm 0.67	9.08 \pm 0.25
Trp	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00

SP: proteína de soya ND: no detectado

Tabla 24. Aminoácidos dispensables en músculo de totoaba alimentada con dietas formuladas con diferentes porcentajes de soya. (Concentración expresada en g de aminoácido/100 g de proteína \pm SD)

Aminoácido	Músculo control	SP 15	SP 30	SP45	SP 60	SP 75	SP 90	SP 100
Asx	11.86 \pm 0.31	8.00 \pm 0.19	8.63 \pm 0.01	9.17 \pm 0.17	8.96 \pm 0.08	8.67 \pm 0.30	7.98 \pm 0.31	8.34 \pm 0.13
Ser	3.92 \pm 0.02	3.48 \pm 0.01	3.81 \pm 0.02	3.87 \pm 0.04	3.57 \pm 0.06	3.84 \pm 0.18	3.38 \pm 0.00	3.83 \pm 0.06
Glx	16.50 \pm 0.17	14.03 \pm 0.33	15.93 \pm 0.05	16.81 \pm 0.42	16.38 \pm 0.13	16.35 \pm 0.52	13.68 \pm 0.47	16.33 \pm 0.49
Gly	3.52 \pm 0.04	3.11 \pm 0.07	3.63 \pm 0.18	3.47 \pm 0.10	3.24 \pm 0.02	3.48 \pm 0.10	3.07 \pm 0.07	3.55 \pm 0.04
Ala	5.36 \pm 0.07	4.31 \pm 0.13	4.51 \pm 0.01	4.99 \pm 0.11	5.02 \pm 0.06	5.32 \pm 0.09	4.18 \pm 0.17	5.28 \pm 0.15
Pro	2.83 \pm 0.01	2.75 \pm 0.08	2.87 \pm 0.00	3.05 \pm 0.05	2.77 \pm 0.10	2.78 \pm 0.11	2.67 \pm 0.06	2.86 \pm 0.06
Cys	ND							
Tyr	3.65 \pm 0.01	2.95 \pm 0.13	3.38 \pm 0.07	3.42 \pm 0.09	3.36 \pm 0.08	3.17 \pm 0.10	2.74 \pm 0.07	3.33 \pm 0.15

SP: proteína de soya ND: no detectado

Para apreciar los resultados de una manera más clara y así poder establecer cuál de las dietas se acercó más al perfil ideal, se realizaron gráficas donde se compara cada una de las formulaciones diseñadas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado contra el músculo de totoaba alimentado con la dieta control (100% harina de pescado), éste se muestra como una barra verde y se utilizó como referencia para conocer la cantidad del aminoácido requerido para el óptimo desarrollo de *T. macdonaldi*. En la figura 11 se muestran las gráficas que comparan cada uno de los aminoácidos indispensables respecto al músculo y dieta control.

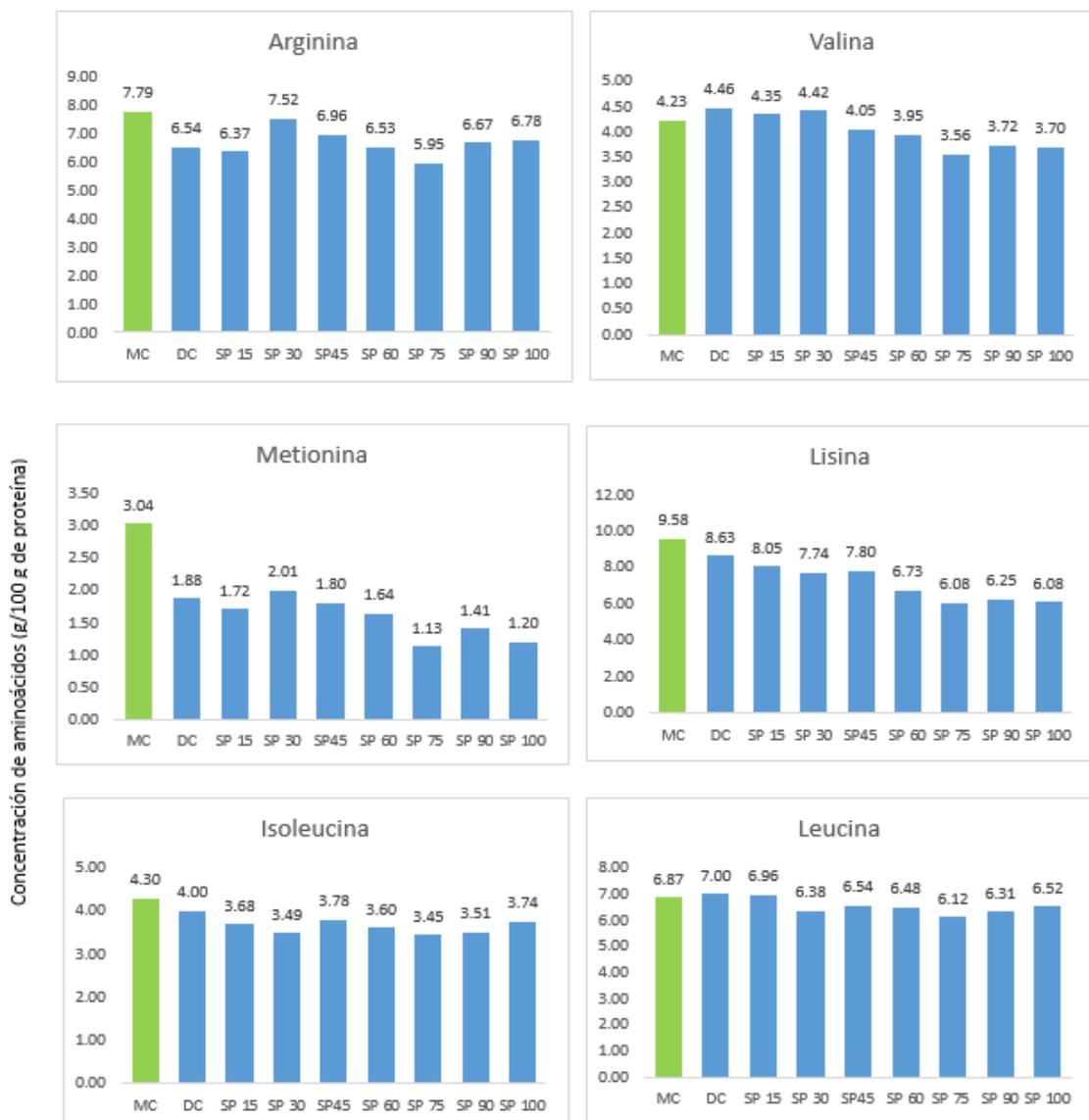


Figura 11. Comparación de aminoácidos indispensables presente en la dietas contra músculo.

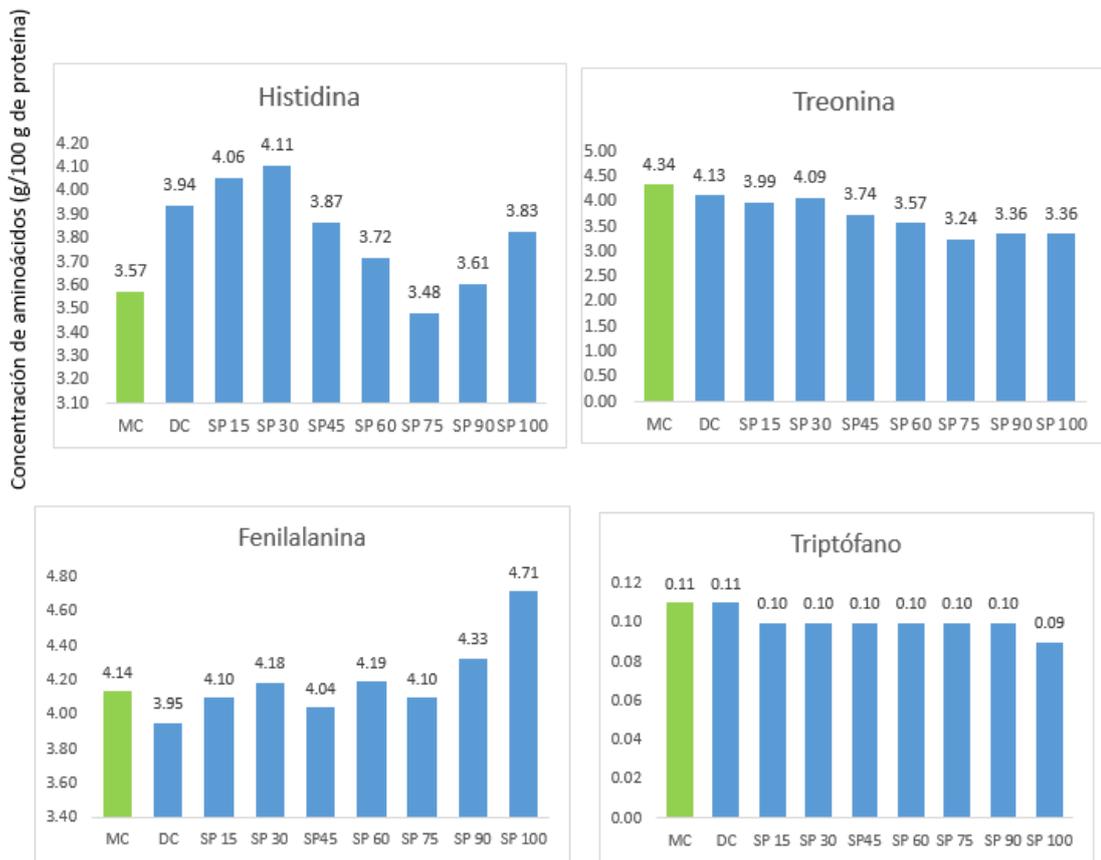


Figura 11. (continuación) Comparación de aminoácidos indispensables presente en la dietas contra músculo.

De manera general se observa que conforme el porcentaje de soya aumenta la concentración de treonina, metionina, isoleucina y lisina disminuye en la dieta, mientras que para fenilalanina se observó un aumento en la concentración el cual fue proporcional al aumento del porcentaje de la proteína de soya en las formulaciones. En cuanto a la concentración mínima necesaria para que el desarrollo de totoaba sea óptimo, se puede apreciar que isoleucina y lisina no cumplieron con el porcentaje mínimo en ninguna de las dietas.

En la siguiente figura se muestran las gráficas que comparan cada uno de los aminoácidos dispensables con respecto al músculo y dieta control.

Concentración de aminoácidos (g/100 g de proteína)

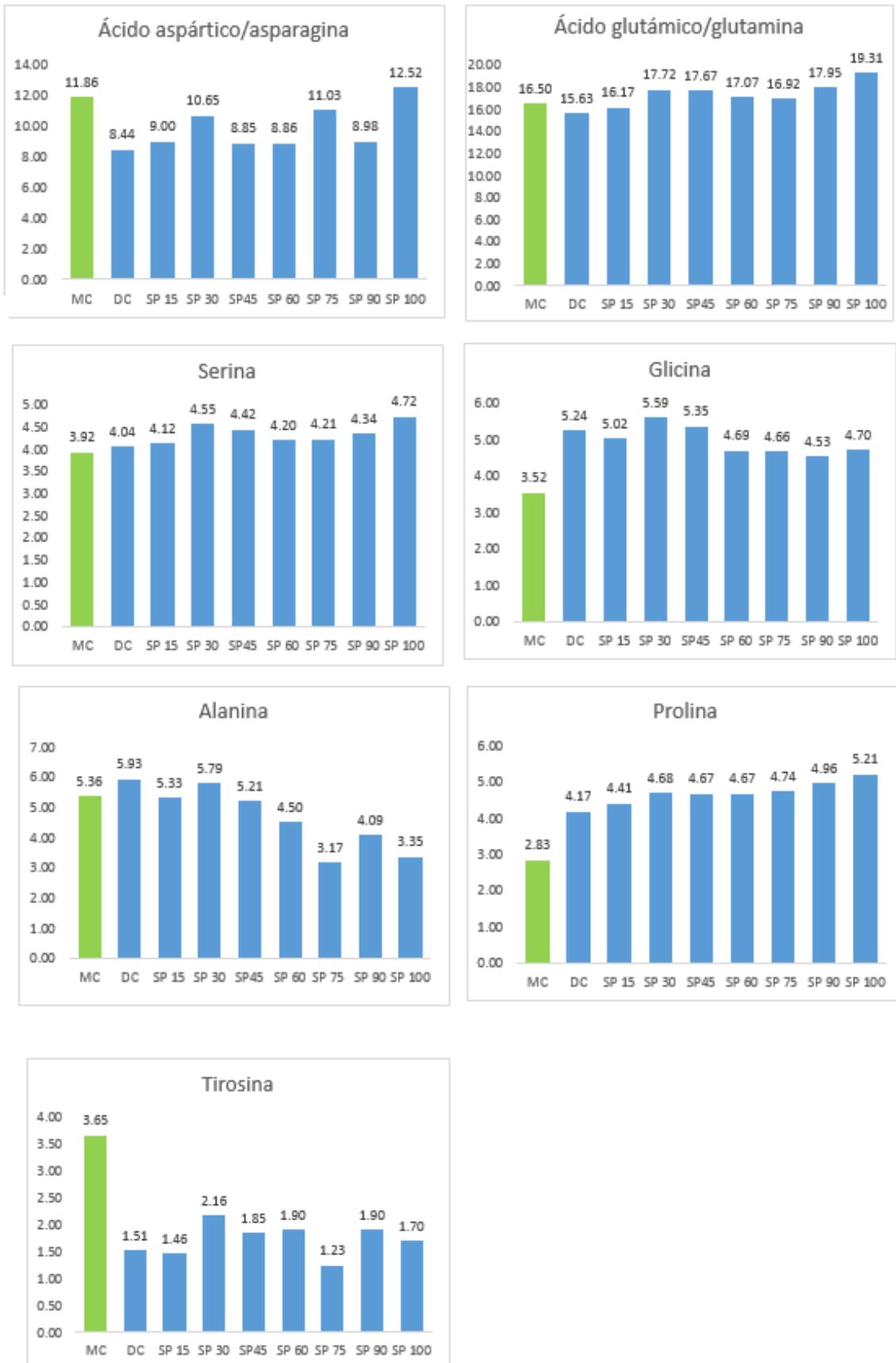


Figura 12. Comparación aminoácidos dispensables presentes en las dietas contra músculo

Para los aminoácidos dispensables se observó que a mayor porcentaje de proteína de soya, la concentración de ácido glutámico/glutamina, serina y prolina aumento proporcionalmente, mientras que la alanina disminuyó su concentración conforme el porcentaje de soya era menor. En el caso de la tirosina ninguna dieta cumplió con la concentración mínima necesaria.

Una vez realizadas las comparaciones de cada uno de los aminoácidos dispensables e indispensables en las dietas con diferentes porcentajes de proteína de soya con respecto al músculo y dieta control, se observó que ninguna de las dietas formuladas cumple al 100% los requerimientos que totoaba necesita, sin embargo, las dietas con 15% y 30% de proteína de soya fueron las que más se acercaron cumpliendo en un 60 y 70 por ciento los requerimientos necesarios.

CAPÍTULO VIII.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con el fin de disminuir los costos de análisis, el primer paso en el presente trabajo fue la realización de diferentes pruebas con el fin de implementar una metodología en la cual no fuera necesario derivatizar los aminoácidos, para esto se utilizó el detector evaporativo de difracción de luz (ELSD por sus siglas en inglés). Como se aprecia en el capítulo 6 (resultados) esto no fue posible, inicialmente se utilizaron las condiciones reportadas por Wang en el año 2004 pero los picos no mostraban una buena separación, esto debido a que los aminoácidos eluían al mismo tiempo, para mejorar la separación se hizo una búsqueda en la literatura; se encontró que Wang, *et al.* en el año 2011 y Yan *et al.* en 2006 lograron separar 14 aminoácidos utilizando acetonitrilo en vez de metanol como fase móvil B.

Un punto muy importante para obtener una buena separación es la combinación de las fases móviles, en este caso la fase móvil A constituye la parte acuosa (polar) ya que contiene agua, 0.1 % de ácido trifluoroacético y 0.2% de ácido heptafluorobutírico, por esto la fase móvil B de preferencia debe tener una polaridad intermedia o baja, en el caso del acetonitrilo es menos polar que el metanol por lo que se esperaba que al momento de generar el gradiente iniciando con 100 % de la fase móvil A salieran los aminoácidos más polares y conforme se adiciona el acetonitrilo vayan saliendo los aminoácidos de polaridad intermedia y finalmente los menos polares.

Como se aprecia en la figura 1 se separaron 13 de los 16 aminoácidos que contenía el estándar, para mejorar esto se modificó el gradiente de concentración, se hizo que el cambio de gradiente fuera más lento para que los aminoácidos fueran saliendo poco a poco, se llevó a 100 % de la fase móvil B para que los analitos menos polares salieran por completo y por último 100 % de la fase móvil A para limpiar la columna de cualquier residuo que pudiera quedar, con estas modificaciones solo se pudieron apreciar 14 de los de 16 aminoácidos presentes en el estándar (figura 2), por lo tanto no fue posible implementar la

metodología con el detector de luz evaporativa dispersa. Una desventaja en el empleo del detector DEDL, es su baja sensibilidad, se requiere que la cantidad de muestra sea al menos de 10 mg para que las señales de los aminoácidos sean visibles.

Es posible que realizando más cambios en el gradiente se logren separar todos los aminoácidos, sin embargo, por cuestiones de tiempo, se procedió en la siguiente fase del proyecto: validar y comparar las metodologías comerciales (Waters y Agilent).

El siguiente paso fue realizar la validación de las metodologías para determinar el perfil completo de aminoácidos, los métodos son: determinación de triptófano, AccQ*Tag de Waters y OPA-FMOC de Agilent, donde se consideraron los siguientes parámetros: sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión.

En el caso del triptófano, los resultados obtenidos fueron aceptables, con respecto a la exactitud se presentó un recobro del 67 % lo cual es aceptable de acuerdo con los parámetros establecidos por la AOAC (1998) donde dice que el porcentaje de recobro puede ser del 40 % al 120 % cuando se manejan concentraciones de ppb (pmol). En cuanto a precisión, se presentó un coeficiente de variación del 0.32 % esto significa que la variación en los resultados es mínima y es un valor adecuado para un método analítico con base en lo reportado por Reason (2003) que indica que el porcentaje de variación debe ser menor al 10 %. Los límites de cuantificación y detección fueron de 1.41 y 0.47 pmol respectivamente, estos valores determinan la sensibilidad del método coincidiendo con lo publicado por Delgado en 2005 y muestran que es posible determinar concentraciones de hasta 2 picomoles de triptófano en una muestra.

La metodología para determinar triptófano en una muestra resultó ser confiable, a pesar de tener un bajo porcentaje de recobro, además una de las ventajas es que el tiempo de análisis es de 5 minutos.

En el caso de las metodologías comerciales (Agilent y Waters) se utilizaron los parámetros ya mencionados para poder realizar la validación; además se consideraron los costos y el tiempo de análisis para poder establecer el método óptimo para la determinación del perfil de aminoácidos.

Para el método de Waters la sensibilidad obtenida fue *L.C*: 0.05 (Arg) – 4.8 (Glu) y *L.D*: 0.02 (Arg) – 1.58 (Glu), los valores presentados están en el orden de los picomoles lo que indica que es posible determinar concentraciones muy bajas de aminoácidos en las muestras. Para establecer la precisión del método se comparó el perfil de aminoácidos determinado por Boogers (2008) en albúmina bovina, el recobro obtenido por el método de Waters estuvo entre 90 % y 103 % con excepción de serina y glicina los cuales mostraron un porcentaje de recobro del 69 %, esto coincide con lo publicado por Callejón en 2007 que presenta un porcentaje de recobro del 80 % al 102 % y en el caso de serina el recobro es del 64 %, en cuanto a la exactitud todos los aminoácidos presentaron coeficientes de variación menores al 10 % (ver tabla 12), lo que significa que la variación en los resultados es baja.

En la metodología de Agilent se obtuvo una sensibilidad de *L.C*: 0.54 (Val) – 12.65 (Pro) y *L.D*: 0.18 (Val) – 4.17 (Pro), comparado con el método de Waters se puede apreciar que Agilent tiene menor sensibilidad. En cuanto a precisión se observó que serina, treonina, arginina, valina, isoleucina, leucina y fenilalanina muestran un porcentaje de recobro menor al 70 %, respecto a la exactitud todos los aminoácidos tuvieron coeficientes de variación menores al 10 % (tabla 15) por lo que se apreció que este método presenta poca variabilidad en los resultados, sin embargo, la precisión es baja en comparación con el método de Waters, ya que en la mayoría de los aminoácidos se presentó un valor mucho menor al real.

Otro factor importante para la comparación de las metodologías son los derivatizantes utilizados, en el caso de Waters se utilizó el 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo carbamato (AQC), este compuesto reacciona con los aminoácidos primarios y secundarios (Reverté, 1997); los productos de reacción son muy estables a temperatura ambiente y tienen una vida útil de una semana,

esto es una gran ventaja ya que una vez derivatizados los aminoácidos estos pueden almacenarse e irse inyectando poco a poco, además el reactivo se mantiene siete días en buenas condiciones bajo refrigeración (Callejón, 2007).

En la metodología de Agilent se utilizan dos derivatizantes o-ftalaldehído (OPA) que reacciona con los aminoácidos primarios y cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) que reacciona con aminoácidos primarios y secundarios. La ventaja de estos derivatizantes es que los tiempos de reacción son cortos y los derivados son altamente fluorescentes (Kaspar, 2009), sin embargo, para el caso de OPA presenta la desventaja de tener baja estabilidad en los productos de reacción, por lo tanto, si no se tiene un sistema automatizado para hacer la derivatización e inyección de las muestras los compuestos pueden degradarse (Callejón, 2007). Además el FMOC es fluorescente por sí mismo y esto puede generar interferencias al momento de hacer la detección. Cabe mencionar que estos derivatizantes; una vez abierta la empolleta, su vida útil es de una semana.

Al realizar la comparación entre los derivatizantes, se puede apreciar que el AQC presenta mayores ventajas, ya que los aminoácidos tienen buena estabilidad una vez que han sido derivatizados lo que da mayor tiempo para poder analizar las muestras. En cambio, con el OPA/FMOC una vez que han sido abiertos solo se podrán inyectar muestras durante la semana que dura el reactivo en buenas condiciones ya que los productos de la derivatización no son estables por tiempos prolongados.

Finalmente, se aprecia que la metodología de Waters es la mejor opción para determinar el perfil de aminoácidos, a pesar de que en tiempo y en costos es mayor, los productos derivatizados tienen mejor estabilidad y el método presenta una mayor precisión en los resultados, lo cual es crucial en un método analítico.

Una vez que se estableció la metodología de Waters como la más óptima para la determinación del perfil de aminoácidos, se cuantificaron 17 aminoácidos en las dietas formuladas con diferentes porcentajes de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado, así como en el músculo de totoaba alimentados con

dichas dietas, estableciendo como referencia el músculo del organismo, que fue alimentado con la dieta que contenía 100 % harina de pescado.

Se logró apreciar que las dietas presentaron deficiencias en lisina, metionina, isoleucina y treonina (figura 11), esto coincide con otros autores los cuales mencionan que las dietas con proteínas de origen vegetal, especialmente la soya tiene deficiencias en estos aminoácidos (Olvera, 1998; Mai, 2006; Li, 2008). Para el caso de la lisina, se hizo la inclusión del 1% en cada una de las formulaciones, a pesar de eso no se obtuvo la concentración óptima, esto puede deberse a las reacciones de Maillard que existen en el proceso de extrusión del alimento entre la lisina y los hidratos de carbono presentes en la dieta (Csapo' *et al.* 2008). Debido a esto, es necesario adicionar los aminoácidos que no presentaron la concentración deseada ya sea de forma directa o incluyendo un alimento que los contenga de forma natural, en el primer caso la principal preocupación es la lixiviación de aminoácidos libres en el agua, así como su degradación por los enterocitos y/o microflora en el tracto gastrointestinal (Wu, 1998).

Interesante, se observó que a mayor inclusión de proteína de soya la concentración de la fenilalanina aumentaba proporcionalmente, comparando con el perfil de aminoácidos reportado por Bañuelos I. (2014) en dietas formuladas con diferentes porcentajes de proteína de soya, los valores obtenidos muestran la misma tendencia respecto a este aminoácido.

Uno de los parámetros que se consideran para evaluar la calidad de una dieta, es el crecimiento de los organismos en cuestión a lo largo del experimento, para el caso de las dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado utilizadas en este experimento, se reportó en la tesis realizada por Espinosa (2014) la ganancia en peso de los peces alimentados con dichas dietas, dando como resultado que las formulaciones con 15% y 30% de soya proporcionaron el mayor crecimiento para los organismos, incluso más que la dieta control, lo cual coincide con el perfil de aminoácidos obtenido en la presente tesis, así mismo, en otro estudio realizado para totoaba donde se evaluó el efecto de la inclusión de 30% y 60% de soya en sustitución de la proteína de pescado, se observó que los peces alimentados con la dieta que

contenía 30% de soya mostraron un mayor crecimiento (Bañuelos, 2014) lo cual coincide con los resultados mostrados en este trabajo.

Comparando con otras especies carnívoras donde se ha realizado la sustitución parcial de proteína de pescado por proteína de soya, se han encontrado similitudes en el caso de la brema marina (*Sparus aurata*), donde el nivel de inclusión máximo de harina de soya en las dietas es del 20% sin que los organismos presenten problemas de crecimiento, otro estudio reporta que para tambor rojo (*Sciaenops ocellatus*), se puede hacer una sustitución con un máximo del 50% de harina de soya (Reigh and Ellis, 1992; Nengas et al., 1995, 1996, Olvera, 1998),

El porcentaje de proteína de soya que pueda ser incluida en las dietas dependerá de muchos factores entre ellos la especie, la disponibilidad de los nutrimentos para ser asimilados, la palatabilidad y atractabilidad del alimento, como el estudio reportado por Silva-Carillo et al. (2012) donde se observó que una sustitución con un máximo de 40% de proteína vegetal no afectó el crecimiento, sobrevivencia y consumo del alimento en juveniles de pargo lunajero (*L. guttatus*). Berge et al. (1999) reportaron que para juveniles de *H. hippoglossus* se logró sustituir el 22% de la proteína de pescado por concentrado de soya sin mostrar afecciones en el crecimiento de los organismos.

La aportación de esta investigación radicó en hacer un estudio integral para la formulación de dietas de *Totoaba macdonaldi*, primero estableciendo la metodología que diera los resultados más confiables, seguido de la determinación del perfil de aminoácidos ideal para juveniles de *Totoaba macdonaldi*, ya que existen pocos datos respecto al perfil adecuado para el óptimo desarrollo de esta especie, como se mencionó anteriormente no es suficiente que el porcentaje de proteína sea el adecuado, es necesario determinar el porcentaje de cada uno de los aminoácidos, principalmente los indispensables. De esta manera es posible realizar una dieta que incluya los nutrimentos necesarios, aunado a las pruebas piloto que se realizan con los organismos para ver su desarrollo.

CAPÍTULO IX.

CONCLUSIONES

- Se probaron diferentes condiciones para separar los aminoácidos con el detector DEDL, sin embargo, no se logró una separación óptima, debido a esto no fue posible implementar esta metodología para determinar el perfil de aminoácidos.
- Se compararon las metodologías de AccQ*Tag de Waters y OPA-FMOC de Agilent dando a conocer que el método AccQ*Tag Waters presentó mejores resultados en cuanto a precisión, exactitud y sensibilidad.
- Se determinó el perfil de aminoácidos de las dietas formuladas con proteína de soya en sustitución parcial de la proteína de pescado y del músculo de los organismos alimentados con dichas dietas por el método de AccQ*Tag de Waters.
- El perfil de aminoácidos dio a conocer que las dietas con 15 y 30% de proteína fueron las más cercanas a cumplir el perfil ideal de aminoácidos, encontrando deficiencias en tirosina, isoleucina y lisina.

CAPÍTULO X.

BIBLIOGRAFÍA

- Arvizu J, Chávez H, 1972, Sinopsis sobre la biología de la Totoaba *Cynoscion macdonaldi*, 1891. Fisheries Synopsis N 8, UN Food and Agriculture Organization, Italia, pp26
- Bañuelos, I., 2014, Respuesta del metabolismo hepático y fisiológico de juveniles de Totoaba *macdonaldi* ante la inclusión de proteína de soya y almidón en dietas suplementadas con taurina. Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Marinas, Ensenada, pp 44.
- Badui, 2013, Química de Alimentos. Pearson. Quinta edición. México. pp 130 – 132
- Berge G, Grisdale B., Helland S 1999. Soy protein concentrates in diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Aquaculture 178, 139-148
- Boorges, I., Plugge, Y., Stokkermans, et al., 2008, Ultra-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in protein hydrolysates using an automated pre-column derivatization method, Journal of chromatography. A, 1189, 406-409.
- Bressani R, 1980, Nutritional value of legume crops for humans and animals, Advances in Legume Science Royal Botanic Gardens, Londres pp 135-55.
- Callejón R, Tesfave W, Torija M, Mas A. Troncoso A, Morales M, 2007, HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. Eur Food Res Technol, 227:93-102
- Castelló, F. 1993. Acuicultura Marina: Fundamentos biológicos y tecnologías de producción. Edición II. Título III. Colección I. Editorial Universidad de Barcelona. pp. 288.
- Cisneros M, Montemayor G, Rodríguez R, 1995, Life History and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. Conservation Biology, pp 806-814

- Csapo´ J, Varga E, Lo´ki K, Albert C, Salamon S, 2008 The influence of extrusion on loss and racemization of amino acids. *Amino Acids* 34:287–292
- CITES. 2013. Apéndices I, II y III (12/06/2013). Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre, Ginebra, Suiza, pp 33.
- D´Mello, J.P.F, 2003, *Amino Acids in Animal Nutrition*, 2ª Edición, Edinburgo, CABI Publishing. pp 71 – 83
- Davidson I, 2003, *Hydrolysis of Samples for Amino Acid Analysis*. pp 793 - 804
- Delgado C, Rufián J, Jiménez S, Morales F, 2005, Tryptophan determination in milk-based ingredients and dried sport supplements by liquid chromatography with fluorescence detection, Departamento de nutrición y bromatología. Granada, España. pp 580 - 585
- Espinosa H, 2014, Efecto del contenido de proteína de soya en la dieta sobre la hematología y química sanguínea en juveniles de *Totoaba macdonaldi*. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada
- FAO, 2012. Estado Mundial de Pesca y Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. pp. 3-22
- FAO, 2007. Estado Mundial de Pesca y Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma pp. 109
- FAO, 2014. Estado Mundial de Pesca y Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma
- García H, Vázquez R, 1998. Cuantificación de proteínas: una revisión. Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, pp. 77-88
- González D, 2011. Respuesta en crecimiento de juveniles de *Totoaba macdonaldi* alimentados dietas con diferentes niveles de almidón y lípidos y adicionadas con un probiótico. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada.

- Peterson A, Lorenz L, Risley D, Sandman B, 1999, Amino acid analysis of peptides using HPLC with evaporative light scattering detection, *J. liq. Chrom.*, pp 1009 - 1025
- Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner P, 2009, •Advances in amino acid analysis, *Anal Bioanal Chem*, pp 445-452
- Khee C. Rhee, "Determination of Total Nitrogen," in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (John Wiley & Sons, Inc., 2001), <http://dx.doi.org/10.1002/0471142913.fab0102s00>.
- Lim C, Klesius PH, Higgs DA., 1998, *Substitution of canola-meal for soybean-meal in diets for channel catfish *Ictalurus punctatus**, *Journal of the World Aquaculture Society*, Alabama, Estados Unidos, 29:161-168.
- Li P, Mai K, Trushenski J, Wu G, 2008, *New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds*, Springer
- Mai K, Wan J, Ai Q, Xu W, Liufu Z, Zhang L, Zhang C, Li H, 2006 Dietary methionine requirement of juvenile yellow croaker *Pseudosciaena crocea* R. *Aquaculture* 251:564–572
- Malaver L, Alméciga C, Morales I, Echeverri O, Guevara J, Zuluaga E, Córdoba O, Barrera L. 2009, Cuantificación de aminoácidos en plasma empleando cromatografía de alta eficiencia, vol. 43, núm. 4, Argentina, pp 647-661.
- Manual de la técnica de ACCQ·tag <http://www.waters.com/waters/supportList.htm?cid=511442&q=%2520accqtag%2520aminoacids&qTemp=+accqtag+aminoacids&filter=document type%7CUSR> (último acceso el 18 de marzo de 2014).
- Manual de la técnica de Agilent Zorbex <http://www.chem.agilent.com/search/?Ntt=Improved+Amino+Acid+Methods+using+Agilent+ZORBAX+Eclipse+Plus+C18+Columns+for+a+Variety+of+Agilent+LC+Instrumentation+and+Separation+Goals> (último acceso el 18 de marzo de 2014).
- McMurry J., 2010, *Química Orgánica*, Cengage Learning, 7a edición, México.

- Meneses J, Porres J, Urbano G, Martínez E, Gil A, 2008, Evaluación biológica de la calidad de una mezcla de proteínas para uso en nutrición enteral, *Nutrición Hospitalaria*. vol 23, num 3, pp 206-211.
- Morillo M, Visbal T, Altuve D, Ovalles F, Medina A, 2013 Valoración de dietas para alevines de *Colossoma macropomum* utilizando como fuentes harinas: de lombriz (*Eisenia foetida*), soya (*Glycine max*) y caraotas (*Phaseolus vulgaris*), *Rev Chil Nutr*, Vol. 40, No 2, Chile
- National Research Council (NRC), 1993 Nutrient requirements of warm water fishes and shellfishes, National Academy Press, Washington, D.C.,
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, Diario Oficial, 2010.
- Olvera M, Olivera L, 1998, Potencialidad del uso de las leguminosas como fuente proteica en alimentos para peces, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N (CINVESTAV) Unidad Mérida, Yucatán. pp 327 - 348
- Pappa A, Nikitas P, Agrafiotou P, Papageorgiou A, 2007, Optimization of separation and detection of 6-aminoquinolyl derivatives of amino acids by using reversed-phase liquid chromatography with on line UV, fluorescence and electrochemical detection, Departamento de Química, Grecia.
- Peterson J., Lorenz L., Risley D., Sandman B., 1999, *Amino acid analysis of peptides using HPLC with evaporative light scattering detection*, *Journal liquid chromatographic & rel. Technology*, 22(7), 1009-1025.
- Ravindran, V, 2005. Apparent ideal digestibility of amino acids in dietary ingredients for broiler chickens. *Animal Science* 81: 85-97.
- Reason Andrew J. 2003. Validation of aminoacids method. B. J. Smith. *Methods in Molecular Biology, Protein Sequencing Protocols*. United States. © Humana Press Inc. Cap 16. pp 181 – 191
- Reverter M, 1997, Determination of free amino acids in pig plasma, *Journal of chromatography*, Suiza. pp 1 - 8

- Rosales-Juarez F, Ramírez-González E, 1987, Estado actual sobre el conocimiento de la Totoaba (*Cynoscion macdonaldi*, Gilbert 1890), Primera edición. Secretaría de Pesca, México, pp. 42.
- Sánchez D, Chavira B, López J, 2008, High-performance liquid chromatography with fluorescence detection for quantitation of tryptophan and tyrosine in a shrimp waste protein concentrate, Departamento de biotecnología y ciencias alimentarias. Sonora. pp 88 - 93
- Silva Y., Hernández C, Hardy R., Gonzáles B., Castillo S., 2012. The effect of substituting fish meal with soybean meal on growth, feed efficiency, body composition and blood chemistry in juvenile spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*, *Aquaculture* 364–365, 180–185.
- Singh, P., Chowdhury, P. (2013). Crowding-Induced Quenching of Intrinsic Tryptophans of Serum Albumins: A Residue-Level Investigation of Different Conformations. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 4, 2610–2617.
- Skoog D., Holler F., Nieman T, 2001, *Principios de análisis instrumental*, Quinta edición, Madrid, Mc Graw Hill.
- Tacon, *et al*, 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. Roma.
- True, C, 2012, Desarrollo de la biotecnia de cultivo. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada
- Valenzuela. F, Garcia de León F. 2011. La Totoaba del golfo ¿Una especie en peligro de extinción? *Interciencia*, vol 36, num 9.
- Wang Y, Keyu S, Peng L, Junyi Z, Yan C, 2011, Simultaneous determination of 20 underivatized amino acids by high performance liquid Chromatography-evaporative light-scattering detection, *Chinese Journal of Chromatography (SE PU)*, 29(9), pp 908-911
- W. Horwitz (Ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, vol. I, 17th ed., AOAC, Gaithersburg, MD, USA, 2002, p. 994.12 (Chapter 4, p. 6C).
- Woo K, Hwang Q, Su H, 1996, Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbamyl amino acid, compared to the

conventional phenylthiocarbonyl derivatives and ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, pp 631-701

- Wrolstad R, Acree T, An H, Decker E, 2002, Current protocols in food analytical chemistry.
- Wu G (1998) Intestinal mucosal amino acid catabolism. *J Nutrition*, 128:1249–1252
- Yan D, Li G, Xiao X, Dong X, Li Z, 2007, Direct determination of fourteen underivatized amino acids from *Whitmania pigra* by using liquid chromatography-evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1138, pp 301-304