

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



Cuantificación de hidroxiprolina en suplementos alimenticios que contienen colágeno mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC/FLD)

Tesis presentada por el Bachiller:

Velasquez Lovon, Johao Antony Arand

ORCID: 0009-0005-8947-5831

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime Dante

ORCID: 0000-0003-1964-3332

Arequipa – Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FARMACIA Y BIOQUIMICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 07 de Enero del 2025

Dictamen: 011156-C-EPFyB-2025

Visto el borrador del expediente 011156, presentado por:

2018702331 - VELASQUEZ LOVON JOHAO ANTONY ARAND

Titulado:

**CUANTIFICACIÓN DE HIDROXIPROLINA EN SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS
QUE CONTIENEN COLÁGENO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA (HPLC/FLD)**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29228284 - DAVILA DEL CARPIO GONZALO HERMILIO
DICTAMINADOR**



**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**40617097 - NIETO MONTESINOS RITA MILAGROS
DICTAMINADOR**



Cuantificación de hidroxiprolina en suplementos alimenticios que contienen colágeno mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC/FLD)

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	6%
2	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
6	es.scribd.com Fuente de Internet	<1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
8	zagan.unizar.es Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A **Dios**, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de este camino, por darme salud, sabiduría y las bendiciones necesarias para alcanzar esta meta.

A mis **padres**, Angelica y Anselmo, por su amor incondicional, sacrificio y apoyo constante. Ustedes son el pilar fundamental en mi vida y mi mayor inspiración para seguir adelante.

A mis **abuelitos**, por su sabiduría, cariño y enseñanzas, que han dejado huellas imborrables en mi corazón.

A **Nataly**, mi enamorada, por su paciencia, comprensión y ánimo en los momentos difíciles. Gracias por creer en mí y ser mi compañera en este viaje.

A mis **docentes**, por compartir sus conocimientos y enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación. Sus enseñanzas han sido clave en mi formación.

A mi **familia**, por su cariño, palabras de aliento y apoyo en cada etapa de mi vida. Gracias por ser parte de este logro.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento, porque sin ustedes esta meta no habría sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Angelica y Anselmo por su amor incondicional, apoyo constante y sacrificios a lo largo de mi vida.

A Nataly por su apoyo y cariño incondicional brindado en todo momento durante este proceso.

A la Universidad Católica de Santa María y a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por la formación profesional recibida.

A mi asesor el PhD. Jaime Cárdenas García por brindarme sus consejos, enseñanzas, apoyo y su tiempo cada vez que fue necesario para la realización de la presente investigación.

A la Dra. Rita Nieto Montesinos y a la Q.F. Liliana Delgado Alvarado por su apoyo y confianza depositada en mi persona.

Al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María.

A mis amigos Dante, Luis, Claudia, Almendra, Eliann, Jimena, Paola, Abraham, Kerly, Lady y Melany por su compañía en todas las etapas de mi desarrollo profesional.

RESUMEN

En los últimos años, el consumo de suplementos alimenticios que contienen colágeno ha aumentado considerablemente en el Perú, impulsado por su popularidad como productos que promueven beneficios para la salud y la estética. Sin embargo, la falta de regulación nacional y la ausencia de controles de calidad generan incertidumbre sobre la composición, seguridad y eficacia de estos productos, permitiendo la comercialización de suplementos que no cumplen con los estándares adecuados. Este estudio se enfocó en evaluar la calidad de suplementos alimenticios que contienen colágeno mediante la cuantificación de hidroxiprolina, un aminoácido esencial que actúa como marcador del colágeno. Para ello, se validó una técnica analítica basada en Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD), la técnica demostró ser selectiva, precisa y exacta, con límites de detección y cuantificación de 0.045 mg/mL y 0.149 mg/mL, respectivamente, y tiempos de hidrólisis (6 horas) y derivatización (20 minutos) óptimos. La técnica validada se aplicó para analizar suplementos comercializados en la ciudad de Arequipa, encontrándose una alta variabilidad en los niveles de hidroxiprolina según la adquisición de las muestras. Las marcas importadas (10.29% - 10.35%), utilizadas como controles, presentaron un contenido promedio superior al 10%, cumpliendo con los estándares de calidad. En contraste, las muestras adquiridas en farmacias (0.21% - 13.91%) y mercados (1.59% - 4.86%) locales mostraron contenidos heterogéneos, con valores que oscilaron desde niveles adecuados hasta concentraciones significativamente bajas. Estos resultados evidencian las diferencias en calidad de los productos disponibles en el mercado arequipeño y resaltan la necesidad de implementar normativas que garanticen la calidad y seguridad de los suplementos alimenticios que contienen colágeno.

Palabras clave: *Control de calidad, Fluorescencia, Hidroxiprolina, Regulación, Suplementos de Colágeno.*

ABSTRACT

In recent years, the consumption of food supplements containing collagen has increased considerably in Peru, driven by their popularity as products that promote health and aesthetic benefits. However, the lack of national regulation and the absence of quality controls generate uncertainty about the composition, safety and effectiveness of these products, allowing the marketing of supplements that do not meet adequate standards. This study focused on evaluating the quality of dietary supplements containing collagen by quantifying hydroxyproline, an essential amino acid that acts as a collagen marker. For this, an analytical technique based on High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector (HPLC/FLD) was validated. The technique proved to be selective, precise and accurate, with detection and quantification limits of 0.045 mg/mL and 0.149 mg/mL, respectively, and optimal hydrolysis (6 hours) and derivatization (20 minutes) times. The validated technique was applied to analyze supplements marketed in the city of Arequipa, finding a high variability in hydroxyproline levels depending on acquisition of the samples. The imported brands (10.29% - 10.35%), used as controls, presented an average content greater than 10%, meeting quality standards. In contrast, samples acquired from pharmacies (0.21% - 13.91%) and local markets (1.59% - 4.86%) showed heterogeneous contents, with values ranging from adequate levels to significantly low concentrations. These results show the differences in quality of the products available in the Arequipa market and highlight the need to implement regulations that guarantee the quality and safety of food supplements that contain collagen.

Keywords: *Quality Control, Fluorescence, Hydroxyproline, Regulation, Collagen Supplements.*

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUCCION 1

HIPOTESIS 4

OBJETIVOS..... 5

 OBJETIVO GENERAL 5

 OBJETIVOS ESPECIFICOS 5

CAPITULO I..... 7

 1.1. Suplemento Alimenticio 7

 1.2. Colágeno 8

 1.2.1. Estructura del Colágeno..... 9

 1.2.2. Hidroxiprolina 10

 1.2.3. Composición del Colágeno..... 13

 1.2.4. Tipos de Colágeno 13

 1.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) 15

 1.3.1. Fase estacionaria..... 15

 1.3.1.1. Columna cromatográfica..... 15

 1.3.2. Fase móvil..... 16

 1.3.3. Aparato 16

 1.3.3.1. Reservorio de Fases Móviles 16

 1.3.3.2. Bomba..... 16

1.3.3.3. Inyector	17
1.3.3.4. Columna analítica	17
1.3.3.5. Detector.....	17
1.3.3.6. Sistema de registro.....	17
1.3.4. Detección de Fluorescencia en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC/FLD)	18
1.3.4.1. Ventajas	19
1.3.4.2. Derivatización.....	19
1.3.4.2.1. Derivatización previa a la columna.....	19
1.3.4.2.2. Derivatización posterior a la columna.....	20
1.3.4.2.3. Derivatizantes.....	20
1.3.4.2.4. Cloroformiato 9-Fluorenilmetil (FMOC-Cl).....	22
1.4. Determinación de Aminoácidos mediante HPLC/FLD	24
1.4.1. Hidrolisis de la muestra	24
1.4.2. Derivatización de los Aminoácidos.....	25
1.4.3. Preparación e Inyección en el HPLC.....	25
1.5. Validación de un Método Analítico.....	26
1.5.1. Cuando es Necesario una Validación	26
1.5.1.1. Desarrollo de un Nuevo Método.....	26
1.5.1.2. Cambio en la Composición o en la Matriz de la Muestra.....	27
1.5.1.3. Modificación de las Condiciones Analíticas	27
1.5.1.4. Requerimientos Regulatorios y Control de Calidad	27
1.5.1.5. Revalidación por Cambios en las Condiciones del Laboratorio o el Equipo ...	27
1.5.2. Parámetros para validar un método analítico	27
1.5.2.1. Selectividad.....	27

1.5.2.1.1. Resolución (Rs).....	28
1.5.2.2. Linealidad	28
1.5.2.3. Límite de Detección y Limite de Cuantificación.....	30
1.5.2.3.1. Límite de Detección	30
1.5.2.3.2. Límite de Cuantificación.....	30
1.5.2.4. Precisión.....	30
1.5.2.5. Exactitud.....	31
CAPITULO II	33
2.1. Materiales.....	33
2.1.1. Equipos.....	33
2.1.2. Materiales	34
2.1.3. Reactivos	35
2.2. Métodos.....	36
2.2.1. Obtención de Muestras	36
Nota. Elaboración Propia.....	37
2.2.2. Tratamiento de Aminoácidos.....	37
2.2.2.1. Hidrolisis.....	38
2.2.2.2. Derivatización.....	39
2.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Performance	40
2.2.3.1. Sistema Cromatográfico	40
Nota. Elaboración Propia.....	40
2.2.3.2. Preparación de la fase móvil.....	41
2.2.3.3. Preparación de la solución Stock y diluciones del estándar de Hidroxiprolina	43
2.2.3.4. Preparación de la muestra	44
2.2.3.5. Validación del Método.....	44

2.2.3.5.1. Selectividad.....	44
2.2.3.5.1.1. Resolución.....	45
2.2.3.5.2. Linealidad.....	46
2.2.3.5.3. Límites de Determinación y Cuantificación.....	47
2.2.3.5.4. Precisión	48
2.2.3.5.5. Exactitud.....	49
2.2.3.6. Muestras.....	50
CAPITULO III.....	53
3.1. Tratamiento de Aminoácidos.....	53
3.1.1. Tiempo de Hidrolisis	53
3.1.2. Tiempo de Derivatización.....	55
3.2. Validación del Método.....	58
3.2.1. Selectividad	58
3.2.1.1. Resolución	60
3.2.2. Linealidad	61
3.2.3. Límite de Detección y Cuantificación.....	65
3.2.4. Precisión	66
3.2.5. Exactitud.....	67
3.3. Aplicación Analítica	68
CONCLUSIONES	79
REFERENCIAS	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de colágeno	14
Tabla 2. Descripción de las Muestras.....	37
Tabla 3. Condiciones del Gradiente Ternario de Fases Móviles.....	40
Tabla 4. Áreas de Tiempos de Hidrolisis	53
Tabla 5. ANOVA de los Tiempos de Hidrolisis	54
Tabla 6. Tukey HSD de Tiempos de Hidrolisis	55
Tabla 7. Áreas de Tiempos de Derivatización.....	56
Tabla 8. ANOVA de los Tiempos de Derivatización.....	57
Tabla 9. Tukey HSD de Tiempos de Derivatización.....	57
Tabla 10. Tiempos de Retención de los compuestos.....	58
Tabla 11. Datos de Gráfico de Calibración de Hidroxiprolina.....	61
Tabla 12. Resultado Estadístico de Regresión para Hidroxiprolina.....	63
Tabla 13. Datos para calcular Limites de confianza.....	64
Tabla 14. Datos para calcular Limite de Deteccion y Cuantificación	65
Tabla 15. Datos para hallar Repetitibilidad.....	67
Tabla 16. Datos para hallar porcentaje de recuperación.....	68
Tabla 17. Análisis de muestras de Suplementos Alimenticios que contienen Colágeno	70
Tabla 18. Comparación según la adquisición de muestras.....	71

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del colágeno tipo I. (A) fibra de colágeno; (B) Estructura de la fibrilla; Triple hélice de colágeno (tropocolágeno); (D) Hélice aislada (14)	9
Figura 2. Secuencia de Aminoácidos del Colágeno. (13)	10
Figura 3. Estructura química 4-hidroxiprolina. Elaboración Propia	11
Figura 4. Equipo HPLC Hitachi. Elaboración Propia	18
Figura 5. Reacción de FMOC-Cl con aminas. Elaboración Propia	22
Figura 6. Metodología para tratar aminoácidos. A) Hidrolisis, B) Derivatización y C) Pretratamiento HPLC. Elaboración Propia	42
Figura 7. Cromatograma de Blanco Reactivo	59
Figura 8. Cromatograma de Estándar.....	59
Figura 9. Gráfico de Calibración de Hidroxiprolina. Elaboración Excel.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC/FLD = Cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia

UE = Unión Europea

Aa = Aminoácidos

FMOC-Cl = Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo

FDA = Food and Drug Administration

DSHEA = Dietary Supplement Health and Education Act

DIGESA = Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria

-OH = Grupo Hidroxilo

-NH- = Grupo Amino

-COOH = Grupo Carboxilo

HCl = Ácido Clorhídrico

t_R = Tiempo de retención

RS = Resolución

R = Coeficiente de correlación

R^2 = Coeficiente de determinación

LOD = Limite de Detección

LOQ = Limite de Cuantificación

Área_{Obs} = Área observada

$\text{Área}_{\text{Pred}}$ = Área predicha

SO = Desviación estándar

$S'O$ = Desviación estándar usada para calcular

CV% = Coeficiente de variación

%R = Porcentaje de recuperación

H0 = Hipótesis nula

H1 = Hipótesis alternativa

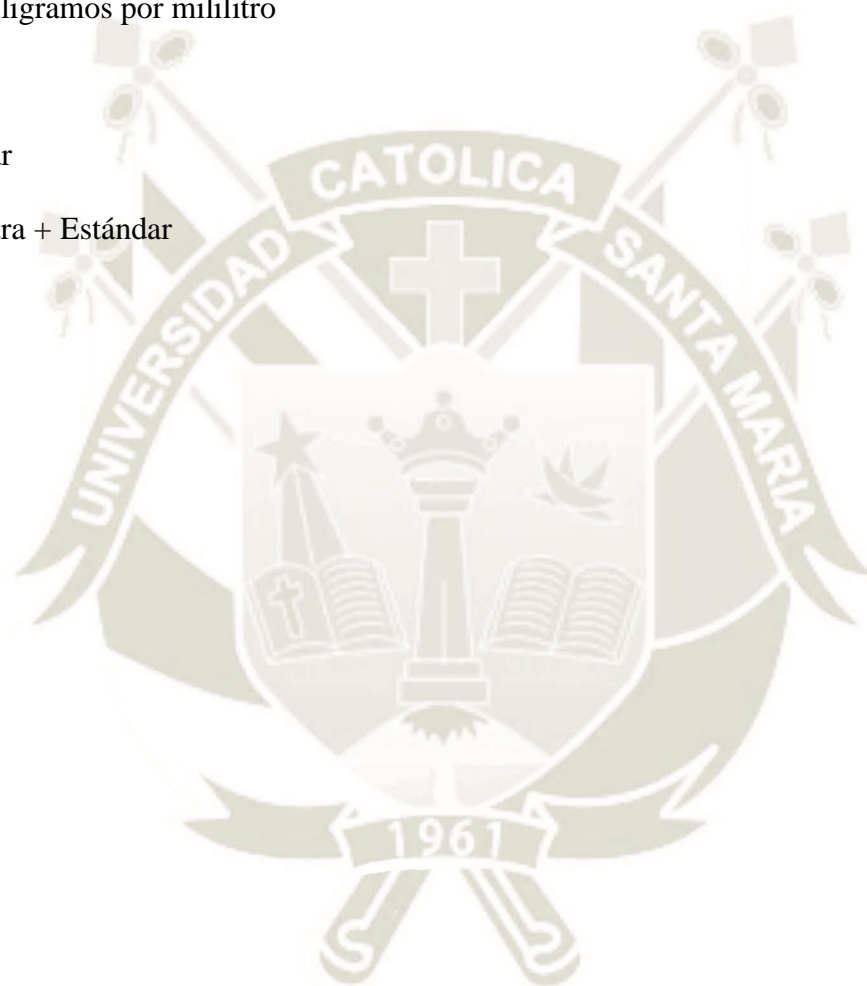
min = Minutos

mg/mL = miligramos por mililitro

M = Muestra

St = Estándar

ME = Muestra + Estándar



INTRODUCCION

El uso de suplementos alimenticios ha experimentado un importante auge en las últimas décadas, dando lugar a debates sobre la idoneidad de estos suplementos.

Uno de los principales desafíos del mal uso actual de suplementos alimenticios es la ausencia y limitada regulación que poseen. Pese a que hay un marco normativo dentro de la Unión Europea (UE) para su aplicación, la ausencia de acuerdo mundial genera un gran hueco que es explotado por aquellos que buscan ganar dinero y engañar. (1)

En el informe publicado en el año 2020 por la Comisión de Libre Comercio del Protocolo Adicional al Acuerdo Marco de la Alianza del Pacífico, detalla la minimización de requerimientos para la comercialización de suplementos alimenticios, lo cual genera una indiscriminada comercialización de estos productos ya que no hay un control. (2)

Desde el punto de vista científico, los suplementos alimenticios requieren cumplir una serie de condiciones para ser considerados como tales, deben demostrar su biodisponibilidad, tener estudios que avalen su eficacia y que sean seguros. Un componente de los suplementos alimenticios que más controversia ha suscitado es el colágeno, sobre todo, por la duda que se alberga acerca de su biodisponibilidad en la piel, cartílagos, huesos, etc.

El colágeno es la proteína más abundante en nuestro organismo y es un componente del tejido conectivo que compone la piel, los cartílagos, los huesos, los tendones y otros tipos de tejidos. El colágeno se compone principalmente de tres aminoácidos (Aa); la glicina, la prolina y la hidroxiprolina, siendo este último el responsable de proporcionar una alta estabilidad al colágeno, por lo que es de gran relevancia.

Debido a alta demanda del consumo de suplementos alimenticios que contienen colágeno, el mercado creció bastante, lo cual generó que muchos de estos no cumplan con las características y

calidades que deberían tener. Al no haber una regulación a nivel nacional no se tiene entendido si estos suplementos que se comercializan en realidad son suplementos de calidad o no.

En el informe publicado en el año 2022 por Gobierno Mexicano, detalla el análisis de 32 productos denominados suplementos de colágeno o colágeno hidrolizado de los cuales 8 tuvieron diferentes irregularidades como un contenido inferior de lo declarado, publicidad engañosa y no comprobaron el contenido de colágeno.(3)

En los últimos años en el Perú, la tendencia de productos alimenticios que contienen colágeno ha ido aumentando de forma exponencial; las personas buscan adquirir suplementos alimenticios que contienen colágeno sin saber la composición, eficacia, seguridad, calidad y veracidad de estos productos; por lo que proponer la evaluación de la cantidad de Hidroxiprolina en suplementos alimenticios que contienen colágeno, es de suma importancia para poder saber sobre la calidad estos productos.

En el artículo publicado en el año 2021 por Gameil A. y colaboradores, detalla que se han desarrollado métodos novedosos para la detección y cuantificación de colágenos en general con la utilización de digestión enzimática, hibridación y fluorescencia, de igual manera se necesita de un método rápido de un solo paso que detecte y cuantifique con facilidad de manera selectiva y sensible el colágeno y sus compuestos similares.(4)

En el artículo publicado en el año 1990 por Miller Edward y colaboradores, detalla un método que implica derivatización precolumna con Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-CL), debido a las propiedades fluorescentes de los derivados. Este método permite realizar análisis completos de aminoácidos en 100 ng de colágeno.(5)

La Hidroxiprolina es un aminoácido que funciona como marcador del colágeno. Dada su importancia, es crucial realizar la cuantificación precisa de dicho aminoácido en suplementos alimenticios que contienen colágeno para valorar la calidad de dichos productos. En este contexto,

en el presente estudio se validó una técnica analítica basada en Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD) para la determinación de hidroxiprolina. Posteriormente a la validación, esta técnica se utilizó para determinar los niveles de hidroxiprolina en suplementos comercializados en la ciudad de Arequipa y se realizó una comparación entre diferentes marcas de origen bovino. Este análisis proporcionará información relevante sobre la calidad y consistencia de los productos de colágeno disponibles en el mercado arequipeño.



HIPOTESIS

Dado que hay una escasa regulación para estos productos, en los últimos años ha habido un aumento en el mercado de Suplementos Alimenticios que Contienen Colágeno; es probable que, estos productos no cumplan con la composición y calidad que deberían tener, es por ello que se propone evaluar la concentración de Hidroxiprolina en estos suplementos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD), ya que este aminoácido es un componente esencial del colágeno.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Cuantificar Hidroxiprolina en Suplementos Alimenticios que contienen Colágeno mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD)

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Validar una Técnica por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD) para determinar Hidroxiprolina
- Determinar los niveles de Hidroxiprolina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD), en Suplementos Alimenticios que contienen Colágeno que son comercializados en la ciudad de Arequipa.
- Comparar los niveles de Hidroxiprolina presentes en diferentes marcas de Suplementos Alimenticios que contienen Colágeno comercializados en la ciudad de Arequipa con Suplementos Importados.



CAPITULO I

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Suplemento Alimenticio

Dado que varias regulaciones utilizan diversos términos y categorías que frecuentemente varían entre países y regiones, no existe un acuerdo universal sobre cómo se deben definir estos productos cuando se trata de suplementos alimenticios.

Según el National Institutes of Health de EE.UU. y la FDA; las vitaminas, minerales, hierbas y sustancias botánicas, aminoácidos, enzimas y otros tesoros nutricionales son los suplementos dietéticos o alimenticios. Estos pueden manifestarse en diversas formas: píldoras clásicas, cápsulas o tabletas, polvo, barras energéticas, gel o incluso en forma de bebidas. (6) Los suplementos dietéticos pueden potenciar o preservar la salud integral, además de contribuir a cubrir las demandas cotidianas de nutrientes esenciales. (7)

En los Estados Unidos, el DSHEA de 1994 define a los suplementos alimenticios como: Artículos diseñados para enriquecer la alimentación, incluyendo vitaminas, minerales, hierbas u otras plantas (a excepción del tabaco), aminoácidos, suplementos que incrementan la ingesta total, o concentrados, metabolitos, componentes, extractos o mezclas de estos ingredientes. Para cumplir con esta normativa del DSHEA, la FDA etiqueta los suplementos alimenticios como alimentos, no como fármacos. Así, las compañías de suplementos no deben probar la seguridad y efectividad de sus productos a menos que se demuestre que son nocivos para la salud. (8)

Uno de los problemas más significativos del mal uso actual de los suplementos alimenticios es la ausencia y limitada regulación que poseen. Aunque hay un marco normativo dentro de la UE para su implementación, la ausencia de acuerdo mundial genera un enorme hueco que es explotado por aquellos que buscan estafar y ganar dinero. (9)

En el Perú actualmente no hay ninguna regulación nacional para los suplementos alimenticios. Además, según la comisión de libre comercio de la Alianza del Pacífico, se eliminaron los obstáculos técnicos al comercio de suplementos alimenticios, lo que genera una controversia con este tema. Por otro lado, la Alianza del Pacífico indica que el encargado de regular los suplementos alimenticios es el Ministerio de Salud a través de la (DIGESA). (2)

En los últimos años, en el Perú, la demanda de suplementos alimenticios con colágeno ha crecido de manera exponencial; las personas buscan obtener suplementos nutricionales que contienen colágeno; desconociendo la composición, eficacia, seguridad, calidad y autenticidad de estos productos, dado que no cuentan con una normativa.

1.2. Colágeno

El colágeno, una proteína tridimensional fibrosa que representa entre el 25%-30% de las proteínas totales en el organismo de los mamíferos, se erige como la pieza clave del tejido conectivo de vertebrados e invertebrados. Como pieza clave del entramado molecular de los seres vivos, desempeña un papel crucial en la estructura vital de los seres vivos: Articulaciones, cartílagos, fibras musculares, tejido conectivo y la piel. Por sus virtudes, el colágeno ha conquistado el mundo farmacéutico, médico y alimentario. (10)

El colágeno, compuesto por tres cadenas de aminoácidos o triples hélices, posee una robustez mecánica excepcional y la habilidad de almacenar humedad. Las tareas primordiales del colágeno son preservar la arquitectura, potenciar la fortaleza, resistencia y elasticidad de los tejidos. (11)

Tras la adolescencia, el organismo disminuye su producción interna de colágeno, disminuyendo un 1% anual. A los 50 años solo presentamos un 35% de colágeno, esencial para rejuvenecer la piel, los huesos, los discos intervertebrales, los músculos, los tendones, los cartílagos, las articulaciones y todos los tejidos que sostienen nuestro cuerpo. (12) Por esta razón, numerosas personas optan por adquirir suplementos nutricionales que contienen colágeno.

1.2.1. Estructura del Colágeno

Las fibras de colágeno, conocidas como fibrillas de colágeno, se distinguen por su elasticidad y forma ondulada, tal como se ilustra en la Figura 1 (A) y (B). Las fibrillas de colágeno, compuestas por tres cadenas de aminoácidos, se entrelazan en una triple hélice, donde tres polipéptidos helicoidales hacia la derecha se entrelazan para formar una cada triple helicoidal hacia la izquierda, tal como se ilustra en la Figura 1 (C). La triple hélice simboliza el entramado cuaternario, donde el hidrogeno y las interacciones de Van der Waals mantienen su equilibrio. Esta entidad, conocida como tropocolágeno, se presenta como una varilla robusta y ostenta un peso molecular de aproximadamente 300 KDa. La triple hélice de colágeno se origina gracias a la arquitectura y composición de sus aminoácidos, tal como se ilustra en la Figura 1 (D). (13) (14)

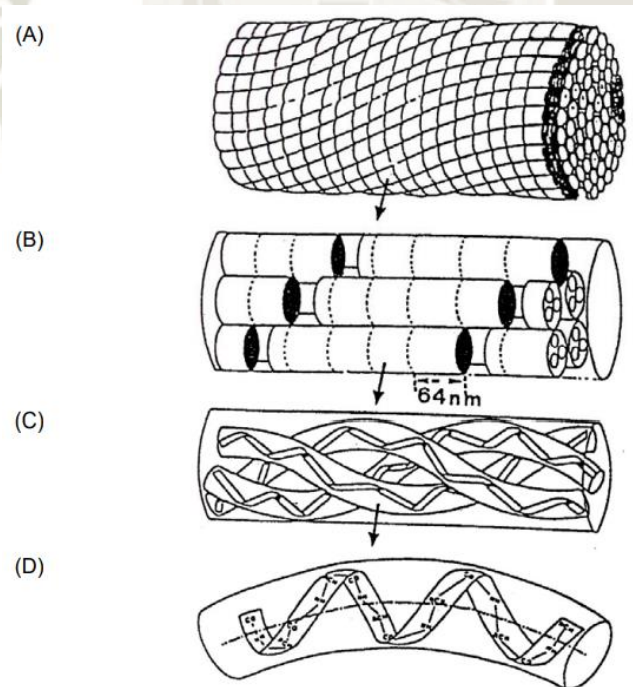


Figura 1. Estructura del colágeno tipo I. (A) fibra de colágeno; (B) Estructura de la fibrilla; Triple hélice de colágeno (tropocolágeno); (D) Hélice aislada (14)

La arquitectura primordial del colágeno se sustenta en una secuencia de aminoácidos ininterrumpida, donde el Aa predominante es la Glicina. El colágeno,

compuesto por 8 Aa de glicina, 4 Aa de prolina y 2 Aa de hidroxiprolina, se repite sin cesar hasta formar las cadenas polipeptídicas que lo componen. (10) A partir de Gly-XY, donde X e Y son prolina e hidroxiprolina, se teje la siguiente danza, tal como se ilustra en la Figura 2

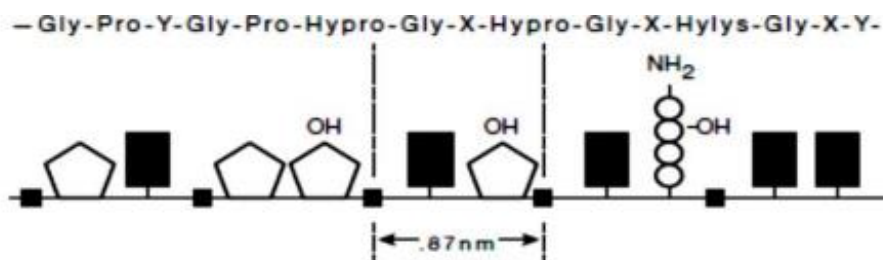


Figura 2. Secuencia de Aminoácidos del Colágeno. (13)

Aunque las secuencias de colágeno fluctúan según las especies, su composición habitual se compone de un 35% de glicina, un 12% de prolina y un 10% de hidroxiprolina, este último elemento es crucial porque asegura la estabilidad de la molécula. (4)

1.2.2. Hidroxiprolina

La hidroxiprolina, un aminoácido no esencial proveniente de la prolina, se distingue por un grupo hidroxilo (-OH) enlazado al carbono en la cuarta posición del anillo de pirrolidina, emblemático de la prolina. Se describe como un rompecabezas de cinco componentes: el grupo amino (-NH-), un grupo carboxilo (-COOH) y un hidroxilo (-OH) en la posición 4, transformándola en la 4-hidroxiprolina (15) como se aprecia en la Figura 3. Este cambio molecular la transforma en una molécula más polar que la prolina, abriendo así la puerta a enlaces hidrógenos adicionales. En consecuencia, cuando las cadenas polipeptídicas de colágeno contienen hidroxiprolina, se produce una nueva clase de puente de Hidrogeno al fusionar el carbonilo de una cadena con el OH

del anillo pirrólico de la hidroxiprolina, lo que forja una estructura secundaria más estable. (10)

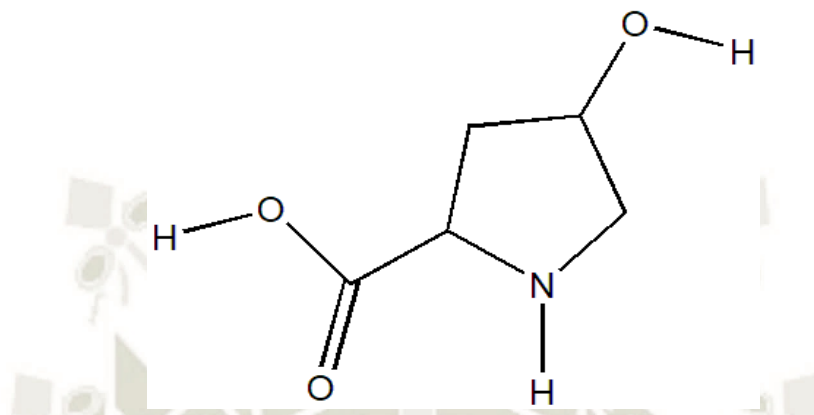


Figura 3. Estructura química 4-hidroxiprolina. Elaboración Propia

La hidroxiprolina es crucial en los Suplementos de colágeno ya que funciona como un indicador específico de colágeno y favorece la estabilidad estructural de dicha proteína, que resulta vital en tejidos como la piel, huesos, tendones y cartílagos. Los Suplementos de colágeno hidrolizado, que incluyen aminoácidos libres y péptidos, se asimilan de manera sencilla en el cuerpo y facilitan la incorporación de hidroxiprolina, elemento vital para preservar la integridad y funcionalidad de los tejidos conectivos.

La existencia de hidroxiprolina se emplea como indicador analítico para valorar la cantidad de colágeno presente en el producto, lo que equivale a calidad. Concretamente, la concentración de hidroxiprolina en el colágeno varía entre especies, en función del tipo genético del colágeno y el tejido del que se aísla. Este último participa en la estabilización de proteínas a través de la creación de puentes de hidrógeno. (16) Su cuantificación es ampliamente utilizada para evaluar la calidad y pureza de productos derivados de colágeno, como suplementos alimenticios. Este aminoácido es relevante porque su concentración refleja directamente el contenido de colágeno en un producto.(17)

Aunque la hidroxiprolina es un indicador importante de la calidad del colágeno, actualmente no existe una normativa internacional específica que establezca valores aceptables de este aminoácido en suplementos alimenticios. Esta ausencia de regulación deja un vacío que podría ser aprovechado por fabricantes para comercializar productos de calidad cuestionable, lo que resalta la necesidad de investigaciones que evalúen la calidad de estos suplementos.

A pesar de la falta de una normativa específica para suplementos alimenticios, la ISO 3496:1994 proporciona un método estandarizado para determinar el contenido de hidroxiprolina en productos cárnicos y caldos. Esta norma reconoce la importancia de cuantificar este aminoácido como indicador de proteínas colagénicas, lo que valida su relevancia en la evaluación de productos derivados de colágeno. La inclusión de la ISO 3496:1994 en el contexto de esta investigación subraya la necesidad de adaptar métodos validados para evaluar suplementos alimenticios de colágeno. Aunque esta norma está diseñada para productos cárnicos, su enfoque en la hidroxiprolina como marcador puede ser una base para el desarrollo de estándares específicos en suplementos alimenticios, contribuyendo a una regulación futura que garantice la calidad de estos productos. (17)

Investigaciones han evidenciado que después de ingerir colágeno hidrolizado, la hidroxiprolina en la sangre fomenta la generación de colágeno en los fibroblastos, células encargadas de la síntesis de colágeno en la piel y otros tejidos, fomentando de esta manera ventajas para la piel y las articulaciones. (18) Además, se utiliza la hidroxiprolina como indicador de autenticidad y pureza del colágeno en productos, dado que otras clases de proteínas no poseen hidroxiprolina en sus secuencias. (19) Debido a esto es habitual en análisis de control de calidad cuantificar la hidroxiprolina en

suplementos para confirmar que el producto posee una cantidad considerable de colágeno.

1.2.3. Composición del Colágeno

El colágeno alberga casi la totalidad de los 20 aminoácidos, pero 3 Aa brillan por su rol en la preservación de la triple hélice y sus características únicas. Estos aminoácidos son la glicina, la prolina y la lisina, quienes, mediante enzimas, se transforman en hidroxiprolina y hidroxilisina. (13)

Aproximadamente un tercio del colágeno se compone de glicina y un 25% de dos aminoácidos únicos: hidroxiprolina e hidroxilisina. La glicina moldea la estructura, mientras que la hidroxiprolina y la hidroxilisina otorgan firmeza a la hélice. En última instancia, otros Aa pueden experimentar glucosilaciones, lo que facilita la creación de múltiples puentes de H que ofrecen una robusta resistencia a las fibras. (20)

1.2.4. Tipos de Colágeno

Diversas sinfonías peptídicas de tropocolágeno moldean variados tipos de colágeno. En el colágeno Tipo I, dos de las cadenas son iguales, mientras que las tres en el Tipo II y III son distintas. Las características de los colágenos tipo IV y V son más vagas, aunque se sospecha que en el tipo IV podrían estar involucradas tres cadenas idénticas. (14)

En la Tabla 1 se despliegan los colágenos más conocidos y su ubicación geográfica.

- Tipo I, la más abundante en el organismo. Tiene una sinfonía única de aminoácidos: un 33% de glicina y un 10% de prolina. Además, alberga un 0.5% de 3-hidroxiprolina, un 10% de 4-hidroxiprolina y un 1% de 5-hidroxilisina. Ubicado en la dermis, cartílago, hueso, capsula de órganos,

tendones y fascias, desempeñando roles de fortaleza a la presión, apoyo y salvaguarda. Para brindar apoyo a la dermis, es frecuentemente empleado en productos de belleza. **(21–23) (24)** Este es el colágeno más abundante en la leche de vaca..

- Tipo II, compuesto por tres cadenas α 1, ubicadas en los cartílagos hialino y elástico. Para resistir la presión y el desliz. En la actualidad, se incorpora en las dietas para combatir dolencias articulares, especialmente la osteoartritis. **(23) (24)**
- Tipo III, compuesto por tres cadenas α 1, se encuentra en la región intermedia de los órganos tubulares y cavitarios, tales como arterias y útero, riñón, hígado, bazo, ganglios linfáticos y músculo liso. Para mantener la arquitectura de estos órganos y apoyar a las células, tales como los miocitos, las células de Schwann, los hepatocitos y las células reticulares **(23)**
- Tipo V, compuesto por tres cadenas α 1 de tipo IV, situadas en laminas y membranas subterráneas, sin tejer fibras ni fibrillas. Para brindar filtrado y respaldo, fue creada por células epiteliales **(23)**

Tabla 1. Principales tipos de colágeno

Tipos	Localización
Tipo I	Huesos, tendones, ligamentos y piel
Tipo II	Cartílago y ojo
Tipo III	Hígado, pulmones y arterias
Tipo IV	Riñón y otros órganos internos
Tipo V	Superficies celulares, pelo y placenta

Nota. La tabla representa la lista de los principales tipos de colágeno. Tomado de: Mamani M. (13)

1.3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Las siglas HPLC simbolizan la cromatografía líquida de alta precisión, conocida como "High Performance Liquid Chromatography". Es una técnica cromatográfica poderosa que permite desmenuzar mezclas intrincadas en un abrir y cerrar de ojos. (25) (26)

En esta modalidad de cromatografía, la muestra recorre una fase estacionaria encapsulada en una columna y es transportada por una fase móvil líquida bajo una presión extremadamente alta. A lo largo de este lapso, los elementos de la muestra se separan en la columna. Tras la división, el detector detecta a los analitos mientras que eluyen de la columna. Capacidad para analizar trazas de materia orgánica y inorgánica en una concentración que oscila entre 10⁻⁶ y 10⁻¹² gramos, según el detector seleccionado. (25) (27)

Entre los elementos del engranaje cromatográfico destacan:

1.3.1. Fase estacionaria

Las fases estacionarias más habituales son la sílice modificada o las microperlas de polímero. Las microperlas se transforman añadiendo hidrocarburos de cadena larga. (28)

1.3.1.1. Columna cromatográfica

La columna es el componente esencial de un cromatógrafo, pues es en su interior donde la separación se materializa. Es vital elegir con precisión la columna ideal para cada separación, ya que una columna deficiente o de baja calidad no permitirá alcanzar resultados, incluso con el equipo más formidable. (29)

En el pasado, las columnas de HPLC eran polares como la sílice, mientras que las fases móviles eran no polares, lo que se conoce como fase normal. En la actualidad, la HPLC se presenta en su versión inversa, donde la columna es hídrica y la fase móvil se compone de una mezcla hídrica y modificadores orgánicos, predominantemente

metanol y acetonitrilo. Así, en este tipo de HPLC, los analitos hidrofóbicos se encuentran más retenidos y se eluyen con mayor facilidad conforme la proporción del componente hidrofóbico en la fase móvil crece. La separación depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en las fase móvil y estacionaria. (25) (26) (30)

1.3.2. Fase móvil

La fase móvil es un disolvente o una mezcla de disolventes, según lo detallado en la monografía de cada sustancia. A menudo, los componentes de la fase móvil pasan por un proceso de filtración para eliminar partículas que superen los 0,45 μm . Las fases móviles de diversos componentes se forman al calcular y fusionar los volúmenes requeridos de cada uno de ellos, empleando disolventes.

Normalmente, se desgasifican antes de ser bombeados con helio, mediante sonicación o utilizando módulos de membrana en vacío para evitar que la celda del detector se llene de burbujas de gas. (31)

En el arte de la HPLC, la fase estacionaria y la móvil se entrelazan con la muestra de manera selectiva. (27)

1.3.3. Aparato

Un cromatógrafo HPLC es un conjunto de herramientas esenciales para su funcionamiento. En la Figura 4 se despliegan esos elementos. (29) (32) (33)

1.3.3.1. Reservorio de Fases Móviles

El cual alimenta al sistema con la fase móvil.

1.3.3.2. Bomba

Fuerza el pasaje de la muestra y de la fase móvil a través de la columna, impulsando la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hasta la columna.

1.3.3.3. **Inyector**

La muestra puede ser introducida sin que el sistema interrumpiera el flujo del solvente.

1.3.3.4. **Columna analítica**

Es el epicentro del mecanismo cromatográfico, el alma del engranaje cromatográfico. Las columnas analíticas eficaces deben poseer una fase estacionaria uniforme y partículas diminutas.

1.3.3.5. **Detector**

Sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna, debe tener la habilidad de detectar una sustancia cuando eluye, transformarla en una señal eléctrica y enviarla al display, donde se revela como una desviación de la línea base.

1.3.3.6. **Sistema de registro**

La captura de información del detector y su posterior tratamiento se realiza mediante un ingenioso sistema de captura y procesamiento de datos, compuesto por un registrador gráfico, un integrador y una computadora.

La HPLC se puede emplear tanto en el ámbito cualitativo como en el cuantitativo. El análisis cualitativo permite descubrir sustancias mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares y muestras. En el ámbito numérico, la HPLC puede emplear estándares externos o internos para crear gráficos de calibración, y luego puede utilizar el área del pico de la muestra en el cromatograma para calcular la concentración. (25)



Figura 4. Equipo HPLC Hitachi. Elaboración Propia

1.3.4. **Detección de Fluorescencia en Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC/FLD)**

La identificación de fluorescencia mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/FLD) es un método frecuentemente empleado en el estudio de sustancias con fluorescencia natural o que pueden ser derivatizadas para inducir dicha característica. Este procedimiento es extremadamente preciso y sensible, y se emplea a menudo para medir aminoácidos, vitaminas y otros compuestos en concentraciones traza, tal como ocurre con la hidroxiprolina en suplementos de colágeno. La HPLC/FLD se fundamenta en la separación cromatográfica de los elementos de la muestra y posteriormente en la identificación de fluorescencia. En este proceso, los analitos son excitados a una longitud de onda determinada y emiten luz en una longitud de onda distinta. Este suceso facilita una selectividad y sensibilidad superiores en la identificación de analitos. (34)

1.3.4.1. **Ventajas**

El detector de fluorescencia en HPLC tiene una sensibilidad significativamente superior a otros tipos de detectores, como los de absorción UV-Vis, en particular para analitos con niveles de concentración bajos. (34) Esta metodología tiene la capacidad de identificar compuestos en niveles de partes por billón (ppb), lo que resulta crucial en el estudio de compuestos biológicos y farmacéuticos. Además, gracias a su elevada selectividad, la HPLC/FLD disminuye considerablemente la interferencia de otras sustancias en la muestra, facilitando una cuantificación exacta y confiable. (35)

1.3.4.2. **Derivatización**

La derivatización combinada con la detección fluorescente en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC/FLD) es un método muy empleado para el análisis de compuestos que no poseen fluorescencia natural. La derivatización se refiere a la incorporación de un grupo funcional fluorescente en el analito, lo que facilita su identificación y cuantificación con gran sensibilidad y precisión. Este procedimiento resulta particularmente beneficioso para el estudio de aminoácidos y otras biomoléculas que exhiben poca o ninguna fluorescencia natural. (34)

Al diseñar un procedimiento de derivatización para un compuesto determinado, se deben estudiar cuidadosamente los efectos de todas las condiciones de reacción (elección del disolvente, concentración de reactivos y catalizadores, temperatura y tiempo de reacción) para obtener condiciones de reacción óptimas. (36)

1.3.4.2.1. **Derivatización previa a la columna**

Es la técnica de derivatización más utilizada con muchas ventajas y pocas desventajas. (37) (38)

Las ventajas son: No hay límite para la cinética de la reacción siempre que la reacción se complete en un tiempo razonable, produciendo derivados del compuesto en cuestión sin la formación de subproductos, libre elección para cambiar las condiciones para optimizar el tiempo de reacción y el rendimiento de la reacción y no es necesario que el disolvente en el que tiene lugar la reacción previa a la columna sea compatible con la fase móvil del sistema HPLC.

La principal desventaja es a veces la formación de productos secundarios que causan problemas en el análisis cromatográfico o en la reproducibilidad de la reacción de derivatización.

1.3.4.2.2. **Derivatización posterior a la columna**

Las reacciones tienen lugar en una parte del sistema HPLC, llamada reactor, entre la columna y el detector. (36) (37) (39)

Las ventajas son: La reacción debe ser reproducible sin necesidad de la formación de un solo derivado y los compuestos no derivatizados se separan y eluyen de la columna y, por lo tanto, pueden detectarse con otros métodos de detección no destructivos antes de derivatizarse.

Las desventajas son: Libertad restringida en la elección de las condiciones de reacción, ensanchamiento de banda en el reactor por ende pérdida de resolución cromatográfica, interferencia por exceso de reactivo y necesidad de modificaciones del instrumento para adaptarse a la reacción.

1.3.4.2.3. **Derivatizantes**

La derivatización para la detección de fluorescencia se lleva a cabo mediante diversos derivatizantes particulares, cada uno adecuado para distintos tipos de compuestos:

- **FMOC-Cl (Cloroformiato 9-fluorenilmetil):** Es uno de los compuestos fluorescentes más habituales para aminoácidos gracias a su elevada sensibilidad y estabilidad. FMOC-CL interactúa con grupos amino con rapidez para generar derivados fluorescentes, lo que resulta especialmente beneficioso en el estudio de aminoácidos y péptidos. Este derivatizante se destaca en usos de HPLC/FLD debido a su elevada fluorescencia y a la estabilidad de los productos de reacción. (40)
- **OPA (orto-ftalaldehido):** Derivatizante frecuentemente empleado para aminoácidos, particularmente en combinación con el 2-mercaptoetanol. A pesar de que OPA ofrece una excelente sensibilidad y se emplea extensamente en la identificación de aminoácidos, su inconveniente es que genera derivados menos estables que los generados con FMOC-CL, restringiendo su aplicación en ciertos análisis de largo plazo. (41)
- **DNS-Cl (cloruro de dansilo):** El cloruro de dansilo es un agente fluorescente valioso para el estudio de aminoácidos y aminas. No obstante, necesita tiempos de respuesta más extensos y genera derivados menos estables que FMOC-CL, lo que convierte a FMOC-CL en la opción favorita para investigaciones que requieren alta precisión. (42)
- **DABS-Cl (cloruro de dabsilo):** Estos derivatizantes, empleados en análisis UV-Vis y fluorescente, ofrecen una señal eficaz, aunque son menos habituales

en investigaciones que demandan una sensibilidad elevada en la identificación de aminoácidos en comparación con FMOC-CL. (43)

1.3.4.2.4. Cloroformiato 9-Fluorenilmetil (FMOC-CL)

Cloruro de 9-fluorenilmetiloxicarbonilo, también llamado Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-CL), es un derivatizante que reacciona con aminas primarias y secundarias y produce derivados altamente fluorescentes y estables. Se ha empleado en la derivatización y estudio de varias clases de aminas, tales como aminas y poliaminas biogénicas; aminas alifáticas de cadena corta; neurotransmisores, como las catecolaminas y metanefrinas. (44)

En la Figura 5 se puede observar la reacción del FMOC-Cl con aminoácidos. (45)

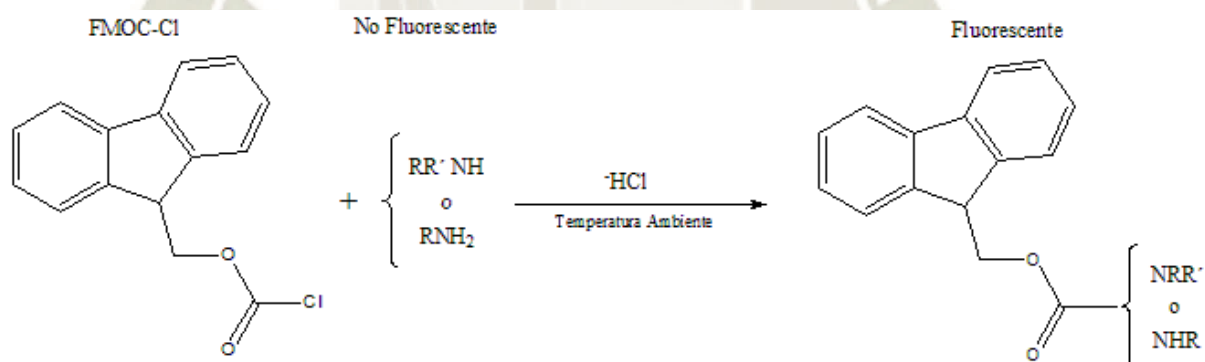


Figura 5. Reacción de FMOC-Cl con aminas. Elaboración Propia

Los químicos analíticos que se dedican al estudio de aminoácidos suelen optar por la HPLC con la derivatización precolumna. Esta derivatización es rápida, se dan en reacciones en soluciones acuosas y a temperatura ambiente. La elaboración de los derivados escogidos es sencilla y lucrativa, resultando en productos de gran sensibilidad y selectividad. (46)

Respecto a la elaboración de la solución madre de FMOC, de acuerdo con las descripciones, en orden de lista, se optó por la acetona y el acetonitrilo (ACN), excepto en una situación donde se empleó el tetrahidrofurano (THF) como disolvente. Esto implica que de 24 sugerencias, 13 fueron de acetona, 7 de ACN y 2 de acetona:ACN (1:1, v/v) utilizadas para disolver FMOC. Se puede atribuir la superioridad de la acetona sobre el ACN a su mayor polaridad, lo que resulta en una mayor rapidez de reacción de los grupos amina con el reactivo. No obstante, el problema de manipular medios de reacción con acetona se mostró como un enorme producto de impureza, que surge entre el FMOC-OH y el exceso de FMOC y/o sus derivados. (46)

En la mayoría de las propuestas se emplea tampón borato para que se dé la reacción, en una extensa gama de concentraciones: desde 0,01 M hasta 0,325 M y desde un pH de 6 hasta un pH de 11,4. Se espera que el tampón borato tenga una capacidad de pH ideal a un pH de 10,2. No obstante, llevar a cabo derivatizaciones en medios de reacción con $\text{pH} \geq 10$ sería una opción desfavorable, dado que estaría vinculada con diversas desventajas, totalmente vinculadas entre sí, como el incremento en la velocidad de hidrólisis del reactivo, la demanda de una elevada concentración de FMOC para garantizar su sobreabundancia, y la aparición de un gran pico de FMOC-OH, presentan retos en la valoración de los derivados de aminoácidos cercanos (la cantidad e identidad de las especies coeluyentes dependen del gradiente aplicado). Respecto a los valores de pH seleccionados del tampón favoritos, hallados en la literatura, se encontraron entre pH 6 y pH 11,4, con un promedio estimado de pH 8,5. (46)

Uno de los inconvenientes del FMOC-CL radica en su reactividad con el agua; tras la hidrólisis y descarboxilación, el alcohol fluorescente, FMOC-OH, se encuentra en el medio cromatográfico. En niveles altos, FMOC-OH se encuentra en superposición con otros aminoácidos en el cromatograma, lo que dificulta la cuantificación de estos últimos. Como FMOC-CL es fluorescente, es necesario eliminar el exceso de reactivo previo a la cromatografía, por ejemplo, a través de la extracción con disolventes orgánicos. Un inconveniente es que se debe supervisar meticulosamente la cantidad de FMOC-CL añadido y el tiempo de reacción, dado que el FMOC-OH se mantiene en la mezcla de reacción. Sorprendentemente, el nuevo método produce volúmenes reducidos del producto de hidrólisis fluorescente de FMOC-OH, reduciendo de esta manera la interferencia de este compuesto con otros aminoácidos en el cromatograma. (47)

1.4. Determinación de Aminoácidos mediante HPLC/FLD

Para identificar aminoácidos a través de HPLC con detector de fluorescencia, el procedimiento incluye diversas fases esenciales, tales como la hidrólisis de la muestra, la derivatización y la administración en el sistema HPLC. A continuación, se explica cada etapa y su relevancia para conseguir resultados exactos.

1.4.1. Hidrolisis de la muestra

La hidrólisis constituye la etapa inicial en el estudio de aminoácidos, pues facilita la ruptura de los enlaces peptídicos en las proteínas para liberar los aminoácidos específicos. En circunstancias ácidas, usualmente se utiliza ácido clorhídrico (HCl) al 6N a 110°C por 16 a 24 horas en atmósfera inerte. Este procedimiento asegura la desintegración total de la estructura proteica, liberando todos los aminoácidos, pese a que ciertos aminoácidos, como el triptófano, pueden degradarse bajo estas

circunstancias y necesitan técnicas particulares. La hidrólisis asegura que todos los aminoácidos puedan ser analizados, facilitando así una cuantificación exacta. Adicionalmente, este procedimiento normaliza la muestra, disminuyendo la variabilidad entre distintas muestras. (48)

1.4.2. Derivatización de los Aminoácidos

La derivatización es esencial para incrementar la detectabilidad de los aminoácidos, dado que gran cantidad de estos no poseen fluorescencia natural. Se emplea un derivatizante fluorescente para el estudio con un detector de fluorescencia, que interactúe con los grupos funcionales de los aminoácidos. El FMOC-CL es uno de los más utilizados, ya que interactúa con los grupos amino para generar derivados fluorescentes estables y de gran sensibilidad. Una vez que los aminoácidos libres se han obtenido, se incorporan a una solución con el derivatizante FMOC-CL en un medio alcalino para facilitar la reacción. Usualmente, esta reacción es ágil y se lleva a cabo a temperatura ambiente o un poco más alta. La derivatización posibilita la identificación rápida de los aminoácidos en el detector de fluorescencia. Además, los derivados de FMOC-CL se mantienen estables bajo condiciones de HPLC, lo que resulta esencial para conseguir datos exactos y reproducibles. (40)

1.4.3. Preparación e Inyección en el HPLC

Después de la derivatización, la muestra se prepara para su inyección en el sistema de HPLC:

Previo a la administración, la muestra pasa por un filtrado para eliminar partículas y posibles impurezas que puedan bloquear la columna o interrumpir la comunicación. En ciertas situaciones, se diluye también para adecuar las concentraciones de los derivados a los límites de cuantificación ideales del HPLC.

La muestra derivada es introducida en el sistema HPLC, que usualmente posee una columna de fase inversa apropiada para la separación de los aminoácidos derivados. La fase móvil generalmente se compone de una combinación de agua, metanol y acetonitrilo, acompañada de un soporte apropiado (como el citrato de sodio). En este escenario, el detector de fluorescencia identifica la señal de cada aminoácido basándose en el característico tiempo de retención. (41)

1.5. Validación de un Método Analítico

Según la Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos, la validación es el arte de delinear un requisito y asegurarse de que sus habilidades cumplan con las aplicaciones requeridas. En el arte de los análisis químicos, la validación de métodos es un requisito crucial. (49)

La validación de un método analítico es un peldaño esencial para asegurar que sus hallazgos sean auténticos. El propósito es determinar de forma estadística que el método es adecuado para alcanzar las metas propuestas. (50)

1.5.1. Cuando es Necesario una Validación

La validación de un método analítico es esencial cuando se incorpora un nuevo método, se altera uno ya existente, o se emplea en una nueva aplicación o matriz. La FDA, la ICH y otras guías internacionales de buenas prácticas especifican los casos donde es necesario validar métodos analíticos.

1.5.1.1. Desarrollo de un Nuevo Método

Es imprescindible la validación al aplicar un método analítico que no se haya empleado anteriormente. Esto garantiza que el método es apropiado para su objetivo particular y satisface las exigencias de precisión y exactitud. (51)

1.5.1.2. **Cambio en la Composición o en la Matriz de la Muestra**

Si se utilizará el método en una matriz distinta o en muestras con una composición modificada, es necesario verificar para asegurar que las variaciones en la matriz no obstaculizan el análisis. (52)

1.5.1.3. **Modificación de las Condiciones Analíticas**

Cualquier modificación en los parámetros del método, tales como la variación en el tipo de columna, la fase móvil, la temperatura o el detector, necesita una nueva validación a mitad o a fondo para garantizar que el método continúe siendo fiable. (49)

1.5.1.4. **Requerimientos Regulatorios y Control de Calidad**

En aplicaciones de control de calidad y regulación, se requiere verificar los procedimientos para garantizar el acatamiento de las regulaciones actuales. Por ejemplo, en el sector farmacéutico, es imprescindible verificar los procedimientos empleados para la cuantificación de principios activos e impurezas. (53)

1.5.1.5. **Revalidación por Cambios en las Condiciones del Laboratorio o el Equipo**

Cuando se efectúa una calibración del equipo o se produce una modificación importante en el laboratorio, es imprescindible realizar una validación adicional para asegurar que el método conserve su rendimiento previsto. (54)

La validación de métodos analíticos garantiza que los resultados obtenidos sean confiables y repetibles, fundamentales para la toma de decisiones informadas en control de calidad, investigación clínica, y regulaciones.

1.5.2. **Parámetros para validar un método analítico**

1.5.2.1. **Selectividad**

La selectividad se refiere al nivel al que un procedimiento puede medir o calificar al analito cuando hay interferentes presentes. Estos interferentes suelen aparecer en la matriz de interés de manera habitual o regular. (50)

Para poder ver este parámetro nos tenemos que basar en los tiempos de retención (t_R) que se observaran en los cromatogramas. El tiempo de retención (t_R) se refiere al periodo que toma un analito para eludir desde el instante de la administración hasta su máxima detección. Es un indicador que evalúa la interacción del analito con la fase estacionaria frente a la fase móvil, y es un factor crucial en la especificidad de un procedimiento cromatográfico. Para que un procedimiento sea repetible, la duración de la retención de los analitos debe mantenerse estable. El cambio en el tiempo de retención puede señalar dificultades en la estabilidad de la fase móvil o en la uniformidad de la columna. (55)

La evaluación de selectividad puede diseñarse en función del método, en el caso de cromatografía, la resolución proporciona datos acerca de la selectividad del método. (50)

1.5.2.1.1. Resolución (R_s)

La resolución evalúa la capacidad de un procedimiento cromatográfico de distinguir dos picos próximos. En la validación, es crucial verificar que el procedimiento tiene la habilidad de separar el analito de interés de otros compuestos que podrían interferir (como impurezas, metabolitos o excipientes). Una resolución adecuada garantiza que el procedimiento pueda diferenciar entre el analito y otros elementos en la muestra. (51)

1.5.2.2. Linealidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, en un rango determinado, de dar resultados que son proporcionales a la cantidad del analito que se quiere detectar en la muestra. (50)

Se refiere al rango en el que el método da resultados con una incertidumbre que se puede aceptar. El límite inferior se establece por el límite de cuantificación, llamado LOQ, y el límite superior se determina por las concentraciones donde se encuentran irregularidades en los resultados. Para evaluar el período de trabajo, debemos tener en cuenta la linealidad del método. (49)

Para establecer el rango lineal, se puede hacer un diagrama de concentración frente a respuesta, también llamado Función Respuesta (normalmente se le llama gráfico de calibración). Esto se determina cada día con un número específico de valores que incluyen un blanco y los patrones de trabajos limpios con un valor teórico claro, que cubren el intervalo de trabajo. El analista tendrá que decidir cuántos puntos examinar. (50)

Para determinarlo, es necesario hacer de 5 a 10 patrones de un estándar en diferentes concentraciones, medir cada uno al menos dos veces (en duplicado) y usar estos datos para crear estadísticas de regresión lineal. Con esta información se pueden crear estadísticas de regresión lineal. (49) (50)

El objetivo de este parámetro es obtener los valores necesarios para entender los resultados logrados. Una de ellas es la ecuación lineal " $y = bx + a$ ", que es esencial para interpolar los resultados. En este contexto, y representa el valor del área bajo la curva, b es el valor de la intersección, x se refiere al valor de la concentración y a representa la pendiente. (50)

El coeficiente de correlación (R) indica cuánto se relacionan dos variables numéricas. Cuanto más cerca esté de 1, más relacionada está una variable con la otra.
(49)

1.5.2.3. Límite de Detección y Limite de Cuantificación

Parámetro que indica la menor cantidad de analito que puede dar un resultado significativo. Es fundamental encontrar la menor cantidad que el método puede detectar, llamada "Límite de Detección" (LOD). También es importante reconocer el nivel más bajo donde se obtiene un buen rendimiento, conocido como "Límite de Cuantificación" (LOQ). Los límites de detección y cuantificación se pueden determinar usando el gráfico de calibración.(49) (50)

1.5.2.3.1. Límite de Detección

El LOD es la cantidad más baja de un analito que se puede identificar con un método analítico, aunque no se pueda medir con precisión. En resumen, se habla del nivel mínimo donde el analito puede ser visto o reconocido en el sistema, aunque no tenga robustez suficiente para dar un valor exacto. (49)

1.5.2.3.2. Límite de Cuantificación

El LOQ es la cantidad o concentración más baja de un analito que se puede medir con precisión y en forma correcta. Es el nivel más básico donde el método puede ofrecer datos confiables. (49)

1.5.2.4. Precisión

La precisión se refiere a cuán cerca están entre sí los resultados. Normalmente, se muestra mediante cifras estadísticas que describen cómo varían los resultados. Usualmente, se usa la desviación estándar (o desviación estándar relativa), que se

calcula de los resultados obtenidos al hacer mediciones repetidas en un material adecuado bajo ciertas condiciones. (49) Este parámetro se relaciona con la variabilidad de las medidas alrededor de su valor promedio y tiene que ver con el grado de coincidencia entre ensayos individuales cuando se realiza el procedimiento varias veces en diferentes partes de una muestra igual.

Se puede establecer en términos de repetibilidad, ya que repetir es clave para obtener estimaciones confiables sobre el rendimiento del método. Esta condición significa que debe haber poca variación en los resultados. Es un signo de la consistencia en los resultados cuando un solo analista realiza una evaluación usando el mismo equipo en un corto periodo de tiempo (el mismo día). (49)

1.5.2.5. **Exactitud**

La exactitud en la medición revela cuán cercano es un resultado singular a un valor predeterminado. La validación de métodos busca verificar la exactitud de los hallazgos, analizando cómo los efectos tanto sistemáticos como aleatorios influyen en los resultados únicos. (49)

Este parámetro se evalúa mediante la recuperación, la cual permite observar el desempeño de un método analítico respecto al procedimiento de extracción y la cantidad de analito presente en la muestra inicial. Así pues, la recuperación tiene una relación intrínseca con las propiedades de la matriz de la muestra. (50)



CAPITULO II

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Equipos

- **Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Performance**

Marca: Hitachi
Modelo: Chromaster
Detector: Fluorescencia (5440)
Columna: LiChroCART RP-18 250 mm x 4.6 mm x 5 μ m
Software: OpenLAB CDS EZChrom Edition

- **Balanza Analítica**

Marca: Sartorius
Modelo: Entris-1505
Sensibilidad: 0.1 mg

- **Purificador de agua**

Marca: Merck
Modelo: Millipore Simplicity UV
Resistividad a 25 °C 18,2 M Ω •cm

- **Potenciómetro**

Marca: Orion
Modelo: 525A

- **Agitador tipo vortex**

Marca: VWR

Modelo: Analog Vortex Mixer

- **Bomba de vacío**

Marca: Millipore

Modelo: WP6122050

- **Sonicador**

Marca: Branson

Modelo: CPX 3800H-E

- **Agitador magnético con calentador**

Marca: Velp

Modelo: Arc-X

- **Rotavapor**

Marca: Buchi

Modelo: R-114

2.1.2. Materiales

- Fiolas de 25, 100, 250 mL
- Pipetas volumétricas de 10 mL
- Vasos de precipitado de 50, 250, 500 mL
- Probetas de 50, 100, 500 mL
- Pipetas Pasteur
- Baguetas
- Espátulas
- Soportes universales
- Pinzas para soportes

- Matraz Schlenk modificado, 19/22 de 100 mL
- Adaptador Vac TFE STPK, 19/22
- Globos
- Manguera de látex
- Jeringas de 3 mL
- Agujas 21G
- Parafilm
- Pastillas magnéticas
- Termómetros
- Matraz esférico, 14/20 de 25 mL
- Tapa de vidrio, 14/20
- Adaptador 24/40 – 14/20
- Filtros de membrana de nylon 66 0.45 μm (Supelco)
- Tubos Eppendorf 2 mL
- Jeringas de 1 mL
- Filtro de jeringa 0.20 μm (Millipore Millex-GN)
- Viales color ámbar

2.1.3. **Reactivos**

- Estándar de 4-Hidroxi-L-prolina $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich)
- Ácido Clorhídrico 6 N (Supelco)
- Buffer Borato 0.1 M pH 8
- FMOC-Cl 97% (Sigma Aldrich) 4mM en Acetona Seca
- n-Pentano P.A. (Supelco)

- Acetato de Etilo P.A. (Supelco)
- Ácido Orto fosfórico 99% (Supelco)
- Buffer Citrato de Sodio 20 mM con Cloruro de Tetrametilamonio 5 mM, pH 2.85
- Acetonitrilo grado HPLC (Supelco)
- Metanol grado HPLC (Supelco)
- Agua Ultrapura

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de Muestras

Para el presente estudio, se recolectaron un total de 10 muestras de suplementos alimenticios de contienen colágeno de origen bovino, con el objetivo de evaluar su contenido de hidroxiprolina. Las muestras fueron adquiridas de diferentes fuentes, con el fin de abarcar una representación amplia de los productos disponibles en el mercado. Las características y procedencia de las muestras son las siguientes:

- **Muestras de control:** Dos (2) muestras (C1-C2) fueron importadas de los Estados Unidos y seleccionadas como control, debido a su reputación en el mercado internacional.
- **Muestras locales de farmacias:** Cuatro (4) muestras (A-B-C-D) se obtuvieron de farmacias comerciales en la ciudad de Arequipa.
- **Muestras locales de mercados y tiendas:** Cuatro (4) muestras (E-F-G-H) se adquirieron de manera aleatoria en mercados y tiendas locales, con el fin de evaluar productos disponibles en establecimientos no especializados.

Todas las muestras fueron etiquetadas y almacenadas adecuadamente para asegurar su trazabilidad y evitar cualquier tipo de contaminación antes de su análisis

cromatográfico. La selección al azar de algunas muestras garantiza la representatividad de los productos de colágeno más comúnmente consumidos por la población.

Tabla 2. Descripción de las Muestras

Origen	Adquisición	Muestra	Marca	Perfil	Lote	FV	RS
				Aminoacídico			
B O V I N O	Importado	C1	VP	Si	31935993LA	12/2028	Si
		C2	SR	Si	T23I137	02/2027	Si
	Farmacias	A	V	Si	8522106V	11/2027	Si
		B	F	No	211313	11/2026	Si
	Locales	C	MA	No	EF29082023	08/2025	Si
		D	CF	No	254623	10/26	Si
	E	MV	No	FH-1053	09/2025	No	
	Mercados/Tiendas	F	PI1	No	-	-	No
Locales		G	PI2	No	-	-	No
	H	DQ	No	24300009	09/29	No	

Nota. Elaboración Propia

2.2.2. Tratamiento de Aminoácidos

Para poder determinar los aminoácidos mediante HPLC/FLD se usó parte de los métodos realizados por Edward Miller y Ruud Bank donde se realizan una hidrólisis, derivatización y se presentan los parámetros cromatográficos (5) (47), los cuales fueron modificados según la experimentación que se realizó en este trabajo.

En la Figura 6 se puede observar el paso a paso de la metodología que se siguió para poder cuantificar Hidroxiprolina en Suplementos Alimenticios de contienen Colágeno.

Para poder cuantificar e identificar aminoácidos especialmente por métodos cromatográficos como HPLC/FLD, la hidrolisis y la derivatización son pasos críticos en este análisis.

2.2.2.1. **Hidrolisis**

Para realizar la hidrolisis se añadió cierta cantidad de estándar o muestra a un matraz (Schlenk modificado, 100 mL) y se agregó 5 mL de HCl 6N para disolver el polvo, luego se colocó una pastilla magnética dentro del matraz y este se tapó con el Adaptador (Vac TFE STP). Se llevo el matraz tapado por 1 min al sonicador (para que se de una buena mezcla). Posteriormente se generó vacío purgando el oxígeno con una bomba de vacío (Vacuubrand) de la siguiente manera para generar una atmosfera inerte:

- Se conecto la bomba al Adaptador y se purgo el oxígeno por 1 minuto, luego se volvió a purgar por 10 segundos (Se repite dos veces)
- Se conecto un globo con nitrógeno al costado matraz y se absorbió el nitrógeno del globo con la bomba por 1 min para que el matraz se llene con nitrógeno.
- Se desconecto la bomba, se cerró la llave del adaptador y se tapó con Parafilm, por otro lado, se dejó abierta la llave del matraz por donde está conectado el globo con nitrógeno y se selló los alrededores del globo para evitar fugas.

Luego se colocó el matraz totalmente sellado en un baño de aceite a 120°C y 450 rpm de agitación por X horas. Pasado el tiempo de hidrolisis, se llevó el hidrolizado a otro matraz (Esférico, 25 mL) para poder llevarlo al rotavapor (Buchi), se rotavaporeo a 60°C por 10 min.

Para determinar el tiempo óptimo de hidrolisis se probó a las 3 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas. Y se escogió el tiempo en donde el área del pico del estándar de Hidroxiproolina a concentración 5.5 mg/mL dio la mejor señal. Para esto se realizó un

análisis ANOVA de una vía y la prueba de Tukey HSD con el programa de Excel para poder comparar los tiempos de hidrolisis.

2.2.2.2. **Derivatización**

Luego de rotavaporear en el balón quedaron los aminoácidos hidrolizados. Esto se reconstituyó con 5 mL de Buffer Borato 0.1 M, pH 8; se mezcló bien hasta que se disuelva todo el hidrolizado. A partir de esta solución se realizan las diluciones necesarias para hacer el gráfico de calibración o tratar las muestras, todo esto se realizó en tubos Eppendorf de 2 mL.

Para realizar la derivatización con FMOC-Cl 4 mM (Solución con acetona seca), se agregó 500 μ L de este reactivo a cada muestra o estándar, se llevó al vortex (VWR) por 15 segundos para que se realice una buena mezcla, ya que es necesaria. Luego para que se dé la reacción se dejó a temperatura ambiente (22 – 25 °C) por X minutos. Para detener la reacción y quitar el exceso de derivatizante se añadió un 1 mL de Pentano/Acetato de etilo (9:1), se llevó al vortex por 10 segundos para que se mezcle bien y se abre la tapa para quitar la presión (Se realizó tres veces), luego se dejó reposar por 30 segundos con la tapa abierta para esperar que se separen las dos fases. Se eliminó la fase orgánica (arriba) con una jeringa. Se volvió a agregar 1 mL de Pentano:Acetato de Etilo y se repitió el proceso anterior.

Para finalizar, con otra jeringa y un filtro de membrana 0.20 μ m (Millipore Millex-GN) se extrajo la fase acuosa (abajo) y se llevó a los viales para colocarlos en el equipo HPLC.

Para determinar el tiempo óptimo de derivatización se probó a los 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos y 25 minutos. Y se escogió el tiempo en donde el área del pico del estándar de Hidroxiprolina a concentración 5.5 mg/mL dio la mejor señal. Para esto se

realizó un análisis ANOVA de una vía y la prueba de Tukey HSD con el programa de Excel para poder comparar los tiempos de derivatización.

2.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Performance

2.2.3.1. Sistema Cromatográfico

- Equipo: HPLC Hitachi
- Sistema: Gradiente Ternario
 - Fase móvil A: Buffer Citrato de Sodio 20 mM con Cloruro de Tetrametilamonio 5 mM, pH 2.85 corregido con Ácido Ortofosforico
 - Fase móvil B: 80% Fase Móvil A, pH 4.5 corregido con Ácido Ortofosforico: 20% Metanol
 - Fase móvil C: Acetonitrilo

Tabla 3. Condiciones del Gradiente Ternario de Fases Móviles

Tiempo	Fase Móvil	Fase Móvil	Fase Móvil
(min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	72.5	-	27.5
4.1	72.5	-	27.5
15.6	60	-	40
15.7	-	64	36
22.0	-	62	38
22.5	72.5	-	27.5
25.0	72.5	-	27.5

Nota. Elaboración Propia.

- Detector: Fluorescencia
- Longitud de onda: Ex: 254 nm y Em: 350 nm
- Columna: LiChroCART RP-18 250 mm x 4.6 mm (5 μ m)
- Temperatura: 30.0 °C
- Velocidad de Flujo: 1 mL/minuto
- Volumen de inyección: 10 μ L
- Tiempo de corrida: 25 minutos

Se debe acondicionar la columna por 30 minutos.

2.2.3.2. Preparación de la fase móvil

Para la preparación de la fase móvil A (Buffer Citrato de Sodio 20 mM con Cloruro de Tetrametilamonio 5 mM, pH 2.85); se necesitó cierta cantidad de Citrato de sodio Tribásico Dihidratado y Cloruro de Tetrametilamonio para llegar a la concentración requerida, los cuales fueron disueltos en agua ultrapura para llegar a la concentración que se requiere; posteriormente se ajustó el pH con Acido Orto fosfórico.

Para la preparación de la fase móvil B (80% Buffer Citrato de Sodio 20 mM con Cloruro de Tetrametilamonio 5 mM, pH 4.5 con 20% Metanol); se necesitó cierta cantidad de Citrato de sodio Tribásico Dihidratado y Cloruro de Tetrametilamonio para llegar a la concentración requerida, los cuales fueron disueltos en agua ultrapura para llegar a la concentración que se requiere; posteriormente se ajustó el pH con Acido Orto fosfórico, y esto se mezcla con Metanol.

La fase móvil C (Acetonitrilo), se obtuvo directamente del envase, midiendo la cantidad necesaria para cada análisis

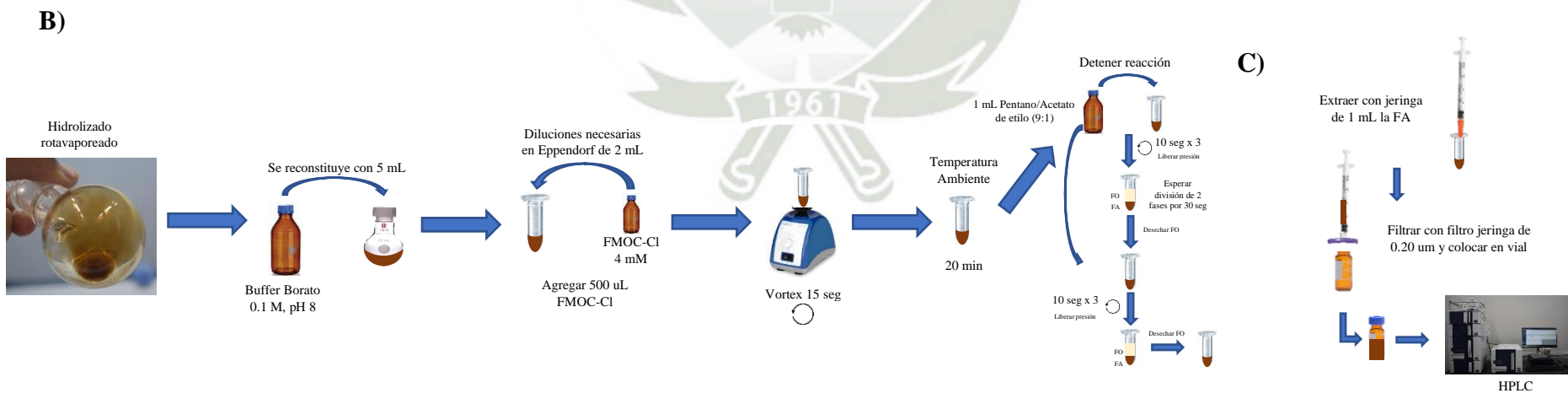
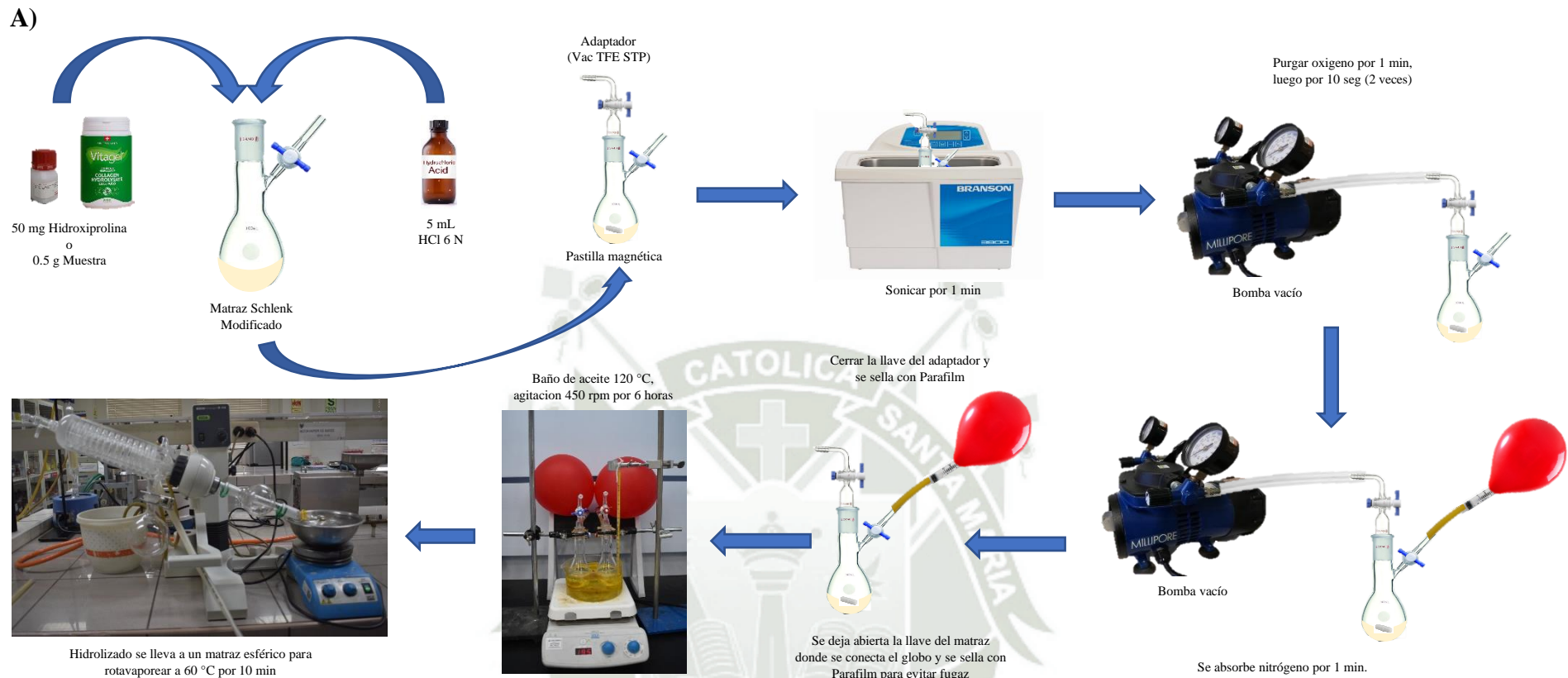


Figura 6. Metodología para tratar aminoácidos. A) Hidrolisis, B) Derivatización y C) Pretratamiento HPLC. Elaboración Propia

Las fases móviles fueron transportadas a un equipo de filtración HPLC equipado con un filtro de membrana de 0.45 μm , y luego se depositaron en frascos para impedir la entrada de partículas al aparato. Finalmente, estos contenedores de fase móvil fueron sumergido en el sonicador durante cinco minutos, con el fin de eliminar cualquier vestigio de oxígeno disperso.

2.2.3.3. **Preparación de la solución Stock y diluciones del estándar de Hidroxiprolina**

Se pesó 50 mg del estándar de 4-hidroxiprolina, se disolvió en 5 mL de HCl 6 N en matraz Schlenk modificado, y se llevó a hidrólisis en atmósfera inerte en baño de aceite a 120°C con constante agitación de 450 rpm por 6 horas. Se rotavaporo a 60°C por 10 minutos. El estándar rotavaporado se reconstituyó con 5 mL de Buffer Borato 0.1 M pH 8 llegando a una concentración de 10 mg/ml, a esta solución se le conocerá como solución stock. A partir de esta se prepararon cinco soluciones estándar a distintas concentraciones. De la solución stock se tomaron para las soluciones 75, 175, 275, 375 y 475 μL , se completó a 500 μL con Buffer Borato 0.1 M pH en un Eppendorf de 2 mL, lo cual generó soluciones con concentraciones de 1.5, 3.5, 5.5, 7.5 y 9.5 mg/mL respectivamente. La derivatización de cada solución estándar se logró mediante la adición de 500 μL de 4 mM de FMOC-Cl en acetona seca. La mezcla se agitó en un vortex por 15 segundos y se dejó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo y el exceso de reactivo se eliminó mediante extracción con 1 mL de Pentano/Acetato de Etilo (90:10). Se repitió la extracción con Pentano/Acetato de Etilo y se descartó la fase orgánica de ambas extracciones. Finalmente, se llevó la fase acuosa a un vial para llevarlo al equipo HPLC.

2.2.3.4. Preparación de la muestra

Se pesó 0.5 g de cada Suplemento Alimenticio que contiene Colágeno que se analizó, se disolvió en 5 mL de HCl 6 N en matraz Schlenk modificado, y se llevó a hidrolisis en atmosfera inerte en baño de aceite a 120°C con constante agitación de 450 rpm por 6 horas. Se rotavaporeo a 60° C por 10 minutos. La muestra rotavaporeada se reconstituyo con 5 mL de Buffer Borato 0.1 M pH 8. A partir de esta solución se tomó 275 μ L y se completó a 500 μ L con Buffer Borato 0.1 M pH en un Eppendorf de 2 mL, lo cual hace que se lleve a una concentración de 5.5 mg/mL teóricamente para que se pueda dar un correcto análisis, el cual es el punto medio del gráfico de calibración. La derivatización se logró mediante la adición de 500 μ L de 4 mM de FMOC-Cl en acetona seca. La mezcla se agito en un vortex por 15 segundos y se dejó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo y el exceso de reactivo se eliminó mediante extracción con 1 mL de Pentano/Acetato de Etilo (90:10). Se repitió la extracción con Pentano/Acetato de Etilo y se descartó la fase orgánica de ambas extracciones. Finalmente, se llevó la fase acuosa a un vial para llevarlo al equipo HPLC.

2.2.3.5. Validación del Método

2.2.3.5.1. Selectividad

Para determinar los tiempos de retencion, se examinaron tres blancos reactivo y tres estándares de concentración conocida del analito de interes. Es crucial analizar los picos obtenidos y verificar si hay divergencias entre los blancos reactivo y los estándares con analito. Si se descubren divergencias significativas, es imperativo identificarlas y erradicarlas lo antes posible.(50)

Un tiempo de retención determinado facilita la identificación del analito en presencia de otros compuestos, dado que cada compuesto poseerá un periodo de retención distintivo bajo condiciones determinadas. Las guías proponen una variación en el tiempo de retención que no exceda el ± 2 % para asegurar la uniformidad del método. (55)

2.2.3.5.1.1. Resolución

Para determinar la resolución entre los picos se tomaron los datos del análisis del cromatograma del estándar.

Es fundamental una correcta resolución para asegurar que el área y la altura de los picos representen únicamente la concentración del analito y no sean perjudicados por posibles solapamientos con otros compuestos. Una R_s de 1.5 o mayor generalmente se considera apropiada para la separación total, aunque algunos procedimientos exigen un valor más elevado si los compuestos son muy parecidos. (51)

Para lo cual es necesario utilizar la siguiente formula:

$$R_s = \frac{2(t_{R_B} - t_{R_A})}{\omega_A + \omega_B}$$

Donde:

$$R_s = \text{Resolucion}$$

$$t_{R_B} = \text{Tiempo de retencion del pico B}$$

$$t_{R_A} = \text{Tiempo de retencion del pico A}$$

$$\omega_A = \text{Ancho del pico A}$$

$$\omega_B = \text{Ancho del pico B}$$

2.2.3.5.2. Linealidad

Para determinar la linealidad, se llevaron a cabo cinco mediciones a diversas concentraciones por triplicado. Posteriormente, se plasmó la respuesta en un diagrama donde el eje Y represente el área bajo la curva, mientras que el eje X representa la concentración de las soluciones estándar. (49) (50)

Los criterios de aceptabilidad se fundamentan mayormente en una exploración visual, donde analizaremos los valores inusuales que no se encuentren en la línea central delineada. A continuación, se examinó el coeficiente de correlación, también conocido como R, que debería estar más cercano a la unidad para asegurar que existe una conexión entre las variables que en este contexto son el área bajo la curva y las concentraciones. (49)

Finalmente, se evaluaron las estadísticas necesarias para evaluar la información recolectada. (49) En esta ocasión, se analizó la correlación significativa mediante la prueba estadística de T-Student, obteniendo dos valores: t_r y $t_{critico}$. El valor t_r revela el valor del estimador T-Student para el coeficiente de correlación, mientras que el $t_{critico}$ revela el valor encontrado a partir de tablas de T-Student a dos colas, con una confianza del 95% y con $n-2$ grados de libertad. (50)

Para determinar el valor t_r se utilizó la siguiente fórmula:

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde:

t_r = Valor del estimador t Student obtenido para el coeficiente de correlacion

$|r|$ = Valor absoluto del coeficiente de correlacion

$n - 2$ = Número de grados de libertad

$$r^2 = \text{Valor del coeficiente de determinacion}$$

Para verificar si hay una correlación significativa, es necesario esperar que se manifieste:

$$t_r > t_{\text{critico}}$$

Finalmente, debido a que siempre se presentan errores en la ecuación de la regresión, se calcularon los límites de confianza del intercepto y de la pendiente, teniendo en cuenta el error típico de estos parámetros y el t_{critico} .

Para determinar el valor de los Límites de confianza se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Limite de confianza del intercepto} = t_{\text{critico}} \times S_{\text{intercepto}}$$

$$\text{Limite de confianza de la pendiente} = t_{\text{critico}} \times S_{\text{pendiente}}$$

Donde:

$$t_{\text{critico}} = \text{Valor de } t \text{ de tablas con } (n - 2) \text{ gl a } 95\% \text{ de intervalo de confianza}$$

$$S_{\text{intercepto}} = \text{Error tipico del intercepto}$$

$$S_{\text{pendiente}} = \text{Error tipico de la pendiente}$$

Luego se determinaron los valores mínimos y máximos tanto para el intercepto como para la pendiente. Con estos datos se lograron hallar las concentraciones precisas de cada muestra analizada.

2.2.3.5.3. Límites de Determinación y Cuantificación

Para la determinación de los límites de determinación y cuantificación se realizaron ocho mediciones del blanco reactivo y el cálculo de la concentración de las señales que se dieron se pudieron realizar a partir del gráfico de calibración. A partir de las mediciones se usó el valor de la desviación estándar (S_o) de las señales

de los blancos analizados. (49) Para hallar la desviación estándar (S'_o) usada para calcular LOD y LOQ se usó la siguiente fórmula:

$$S'_o = \frac{S_o}{\sqrt{n}}$$

Donde:

S_o = Desviación estándar estimada de m resultados individuales

S'_o = Desviación estándar usada para calcular LOD y LOQ

n = Número de observaciones de blanco promediadas

Para calcular el Límite de Detección, se empleó la siguiente ecuación:

$$LOD = \frac{3 \times S'_o}{b}$$

Para determinar el Límite de Cuantificación, se empleó la siguiente ecuación:

$$LOQ = \frac{10 \times S'_o}{b}$$

2.2.3.5.4. Precisión

La precisión se verificó mediante la repetibilidad. Se logró registrar diez mediciones bajo las mismas circunstancias (mismo operador, mismo aparato y en un lapso breve) de un analito con una concentración previamente determinada, habitualmente en el rango del gráfico de calibración. La desviación estándar (S_o) y el coeficiente de variación (CV%) fueron determinados. (49)

Para calcular el Coeficiente de Variación, se empleó la siguiente ecuación:

$$CV\% = \frac{S_o \times 100}{\bar{x}}$$

Donde:

$S_o = \text{Desviación estándar}$

$\bar{x} = \text{Promedio de las mediciones}$

Para asegurar la exactitud de los valores, se analizaron con el coeficiente de variación de Horwitz. Este valor debe ser inferior a la mitad del valor del coeficiente de Horwitz. (50)

Para calcular el Coeficiente de Horwitz, se empleó la siguiente ecuación:

$$CV_H\% = 2^{(1-0.5) \times \log C}$$

Donde:

$C = \text{Concentración conocida del analito} \times 10^{-6}$

En este sentido se estableció para la repetibilidad:

$$CV\% < CV_H\%/2$$

2.2.3.5.5. Exactitud

La exactitud se determinó a través de la recuperación. Para evaluar la recuperación, se realizaron seis mediciones en cada uno de los tres niveles (Muestra enriquecida con estándar, muestra sin adición y estándar). (50)

El porcentaje de recuperación (%R) se calculó con la siguiente formula:

$$\%R = \frac{ME - M}{St} \times 100$$

Donde:

$ME = \text{Área bajo la curva del analito de muestra enriquecida}$

$M = \text{Área bajo la curva de analito en muestra sin enriquecer}$

$St = \text{Área bajo la curva de analito adicionado a la muestra enriquecida}$

Para verificar que no hay diferencia significativa, se empleó la prueba T-Student. Para obtener este valor, se necesitó calcular tanto el $t_{calculado}$ como el $t_{critico}$. El $t_{critico}$ detalla el uso de las tablas T-Student al 95% de confianza, en dos filas y con $n-1$ grados de libertad. Además, el $t_{calculado}$ detalla el valor obtenido a partir de nuestros resultados utilizando la siguiente fórmula:

$$t_{calculado} = \frac{100 - \%R}{So \times \sqrt{n}}$$

Donde:

$\%R =$ Promedio del porcentaje de recuperación

$So =$ Desviación estandar de las recuperaciones

$n =$ Número de ensayos realizados

El estándar de aceptabilidad es que:

$$t_{calculado} \leq t_{critico}$$

Lo que implica que no hay diferencia estadísticamente significativa, lo que sugiere que el método es exacto y no requiere corrección alguna.

2.2.3.6. Muestras

Todas las muestras fueron tratadas con la metodología que se puede ver en la Figura 6, se le dio el tratamiento que se la da al punto medio del rango lineal, para que dichas muestras no se salgan del rango lineal analizado. Cada muestra fue analizada por duplicado.

Las señales emitidas de Hidroxiprolina por cada muestra sirven para poder hallar la concentración, la cual es calculada con la ecuación de la regresión corregida teniendo en cuenta los límites de confianza.

Luego se halla el porcentaje de Hidroxiprolina presente en cada muestra. Tener 10% a más de Hidroxiprolina presente en el Suplemento alimenticio que contiene Colágeno, nos indica que este suplemento es de calidad.





CAPITULO III

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Cada investigación con metas analíticas debe abarcar resultados, interpretación y discusión, con el propósito de aclarar los fundamentos de un método científico. Se calcularon los tiempos de hidrolisis y derivatización para analizar aminoácidos. Tras ajustar los parámetros esenciales en un procedimiento de validación mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se procesaron los datos recolectados, lo que permite presentar los hallazgos de cada ensayo de manera más clara a continuación.

3.1. Tratamiento de Aminoácidos

3.1.1. Tiempo de Hidrolisis

Determinar el tiempo óptimo de hidrólisis para obtener la mayor área y detección de hidroxiprolina mediante análisis en HPLC/FLD. Se evaluaron cuatro tiempos de hidrólisis (3, 6, 12 y 24 horas) y se compararon las áreas obtenidas por triplicado para cada uno.

En la Tabla 4 se puede observar las áreas obtenidas para cada tiempo de hidrolisis.

Tabla 4. Áreas de Tiempos de Hidrolisis

Tiempo (horas)	3	6	12	24
	1923566	4913256	1696800	2232565
Área	2025652	4901266	1845622	2285651
	1985652	4900220	1756523	2195652
Promedio	1978290	4904914	1766315	2237956

Nota. Elaboración Propia.

Para determinar si las áreas obtenidas en diversos tiempos de hidrólisis presentan diferencias estadísticamente significativas, se llevó a cabo un análisis ANOVA de una

vía. Este análisis permite comparar las medias de diversos grupos (en este caso, las áreas de los tiempos de hidrólisis) con el fin de detectar si al menos uno se distingue notablemente de los demás.

Para esto se planteó las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H0): No hay diferencias significativas entre los tiempos de hidrólisis en términos de área obtenida, con un nivel de confianza al 95%.
- Hipótesis alternativa (H1): Hay al menos una diferencia significativa entre los tiempos de hidrólisis en términos de área obtenida, con un nivel de confianza al 95%.

En la Tabla 5 se observa la tabla de ANOVA en donde se observa que el valor p (3.18×10^{-12}) es mucho menor que 0.05, por lo cual, se acepta la H1 lo que indica que existen diferencias significativas entre los tiempos de hidrolisis en términos de las áreas obtenidas. Esto sugiere que el tiempo de hidrólisis influye significativamente en la señal de detección de hidroxiprolina en el HPLC/FLD.

Tabla 5. ANOVA de los Tiempos de Hidrolisis

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F	Valor p
Tiempo	1.94×10^{13}	3	6.47×10^{12}	2497.87	3.18×10^{-12}
Residual	2.07×10^{10}	8	2.59×10^9		

Nota. Elaboración Propia.

Debido a que el ANOVA indico diferencias significativas, se llevó a cabo la prueba de Tukey HSD para identificar entre que tiempos de hidrolisis existen esas diferencias significativas. En la Tabla 6 se observan los resultados de la prueba de Tukey HSD, muestra que el tiempo de 6 horas tiene áreas significativamente mayores que los otros

tiempos evaluados (3, 12 y 24 horas), lo cual respalda la elección de 6 horas como el tiempo óptimo de hidrolisis.

Tabla 6. Tukey HSD de Tiempos de Hidrolisis

Comparación de tiempos (horas)	Diferencias de Medias	Valor p	Diferencia
3 vs 6	2926624	5.17×10^{-12}	Significativa
3 vs 12	211975	0.0041	Significativa
3 vs 24	259666	0.0011	Significativa
6 vs 12	3138599	2.81×10^{-12}	Significativa
6 vs 24	2666958	1.65×10^{-11}	Significativa
12 vs 24	471641	1.53×10^{-5}	Significativa

Nota. Elaboración Propia.

Los resultados de este análisis mostraron que todos los tiempos evaluados (3, 6, 12 y 24 horas) son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Sin embargo, el tiempo de 6 horas presentó el área cromatográfica promedio más alta (4904914), indicando un mayor rendimiento en la detección de hidroxiprolina. Además, este tiempo representa un balance óptimo entre eficiencia analítica y practicidad, ya que tiempos más largos no mostraron incrementos proporcionales en el rendimiento y aumentarían los costos operativos. Por lo tanto, el tiempo de 6 horas se seleccionó como el óptimo para la hidrolisis.

3.1.2. Tiempo de Derivatización

Determinar el tiempo óptimo de derivatización para obtener la mayor área y detección de hidroxiprolina mediante análisis en HPLC/FLD. Se evaluaron cuatro tiempos de reacción para la derivatización (10, 15, 20 y 25 minutos) y se compararon las áreas obtenidas por triplicado para cada uno.

En la Tabla 7 se puede observar las áreas obtenidas para cada tiempo de derivatización.

Tabla 7. Áreas de Tiempos de Derivatización

Tiempo (minutos)	10	15	20	25
	2703553	3520356	4902165	4002331
Área	2756433	3562323	4909234	4013323
	2712326	3495624	4905665	4052314
Promedio	2724104	3526101	4905688	4022656

Nota. Elaboración Propia.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las áreas obtenidas en los distintos tiempos de derivatización, se realizó un ANOVA de una vía. Este análisis permite comparar las medias de varios grupos (en este caso, las áreas de los tiempos de derivatización) para evaluar si al menos un grupo es significativamente diferente de los demás.

Para esto se planteó las siguientes hipótesis:

- Hipótesis nula (H0): No hay diferencias significativas entre los tiempos de derivatización en términos de área obtenida, con un nivel de confianza al 95%.
- Hipótesis alternativa (H1): Hay al menos una diferencia significativa entre los tiempos de derivatización en términos de área obtenida, con un nivel de confianza al 95%.

En la Tabla 8 se observa la tabla de ANOVA en donde se observa que el valor p (6.00×10^{-13}) es mucho menor que 0.05, por lo cual, se acepta la H1 lo que indica que existen diferencias significativas entre los tiempos de derivatización en términos de las áreas obtenidas. Esto sugiere que el tiempo de derivatización influye significativamente en la señal de detección de hidroxiprolina en el HPLC/FLD.

Tabla 8. ANOVA de los Tiempos de Derivatización

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	Estadístico F	Valor p
Tiempo	7.51×10^{12}	3	2.50×10^{12}	3791.29	6.00×10^{-13}
Residual	5.28×10^9	8	6.60×10^8		

Nota. Elaboración Propia.

Debido a que el ANOVA indico diferencias significativas, se llevó a cabo la prueba de Tukey HSD para identificar entre que tiempos de derivatización existen esas diferencias significativas. En la Tabla 9 se observan los resultados de la prueba de Tukey HSD, muestra que el tiempo de 20 minutos tiene áreas significativamente mayores que los otros tiempos evaluados (10, 15 y 25 minutos), lo cual respalda la elección de 20 minutos como el tiempo óptimo de derivatización.

Tabla 9. Tukey HSD de Tiempos de Derivatización

Comparación de tiempos (minutos)	Diferencias de Medias	Valor p	Diferencia
10 vs 15	801997	1.70×10^{-9}	Significativa
10 vs 20	2181584	1.97×10^{-12}	Significativa
10 vs 25	1298552	2.65×10^{-11}	Significativa
15 vs 20	1379587	1.21×10^{-11}	Significativa
15 vs 25	496555	4.64×10^{-8}	Significativa
20 vs 25	883032	9.84×10^{-10}	Significativa

Nota. Elaboración Propia.

Los resultados de este análisis mostraron que todos los tiempos de reacción evaluados (10, 15, 20 y 25 minutos) son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Sin embargo, el tiempo de reacción de 20 minutos presentó el área cromatográfica promedio más alta (4905688), indicando un mayor rendimiento en la detección de hidroxiprolina. Además,

este tiempo representa un balance óptimo entre eficiencia analítica y practicidad, ya que tiempos más largos no mostraron incrementos proporcionales en el rendimiento y aumentarían los costos operativos. Por lo tanto, el tiempo de reacción de 20 minutos se seleccionó como el óptimo para la reacción de derivatización.

3.2. Validación del Método

3.2.1. Selectividad

Para identificar un compuesto a través de HPLC, es necesario establecer el tiempo de retención del analito únicamente. Por lo tanto, se puede establecer que este intervalo será el que en próximos análisis nos garantizará que el compuesto que buscamos será el que tenemos presente.

En la Tabla 10 se puede observar los tiempos de retención de los cuatro picos.

Tabla 10. Tiempos de Retención de los compuestos

Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)
1	Reactivo	3.88 ± 0.4
2	Hidroxirolina	11.82 ± 0.4
3	FMOC-Cl	19.60 ± 0.4
4	FMOC-OH	20.60 ± 0.4

Nota. Elaboración Propia.

En la Figura 7 se observa el cromatograma del análisis del blanco reactivo, para lo cual, se realizó todo el tratamiento que se le da a los estándares y muestras.

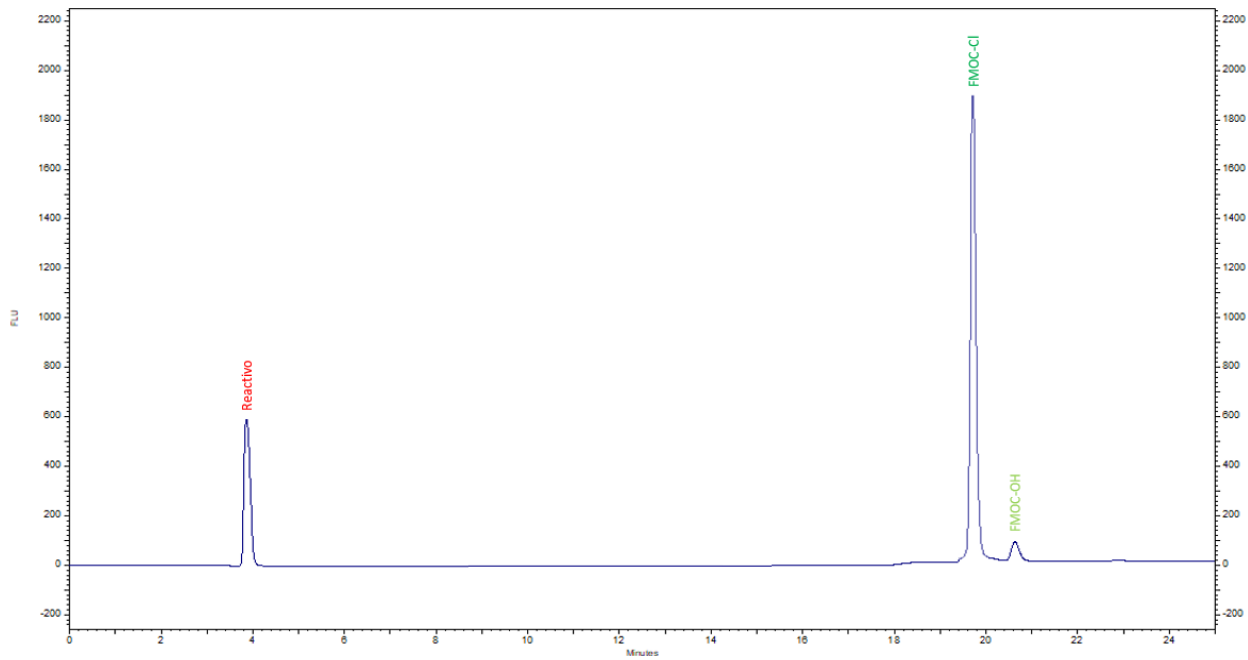


Figura 7. Cromatograma de Blanco Reactivo

En la Figura 8 se observa el cromatograma del análisis del estándar, para lo cual, se utilizó la concentración de 5.5 mg/mL del estándar de Hidroxiprolina. Es importante recalcar que los picos están claramente delimitados y los intervalos de separación son superiores a 1 minuto entre los picos, para prevenir que se sobrepongan entre sí y resulte en una respuesta errónea.

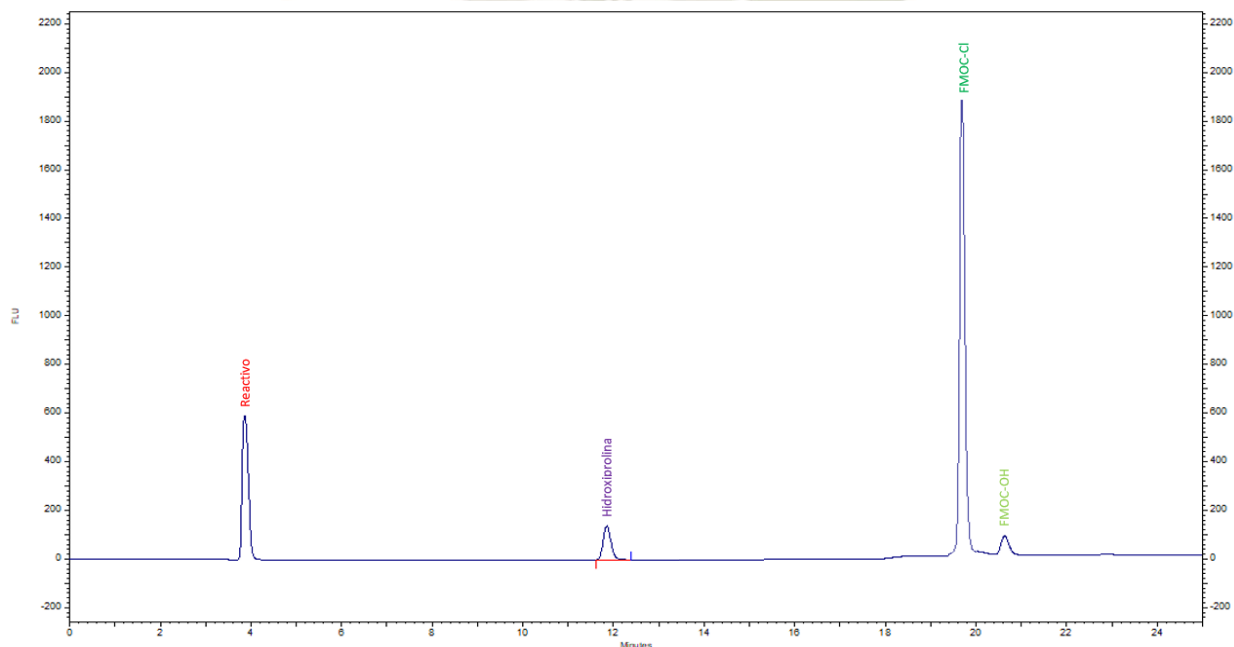


Figura 8. Cromatograma de Estándar

3.2.1.1. Resolución

El término resolución se emplea para describir el nivel de separación entre picos cromatográficos que se encuentran unidos en relación a sus anchos. El valor obtenido es adimensional, pero se considera adecuado cuando supera o se acerca a 1.5.

Obteniéndose los siguientes resultados:

$$R_S(1 - 2) = \frac{2(11.82 - 3.88)}{0.306 + 0.288} = 29.73$$

$$R_S(2 - 3) = \frac{2(19.60 - 11.82)}{0.288 + 0.300} = 26.46$$

$$R_S(3 - 4) = \frac{2(20.60 - 19.60)}{0.300 + 0.358} = 3.04$$

Los resultados obtenidos para la ecuación R_S (1-2), son cálculos para los picos Reactivo (1) y para la Hidroxiprolina (2) dando como resultado 29.73.

En la ecuación R_S (2-3), se calculó la resolución para los picos de Hidroxiprolina (2) y FMOC-Cl (3) dando como resultado 26.46.

Para la ecuación R_S (3-4), se calculó la resolución para los picos de FMOC-Cl (3) y FMOC-OH (4) dando como resultado 3.04.

Para los cuatro picos cromatográficos, se determinó la resolución, obteniendo valores que superan el 1.5, lo que revela que el área de un pico no se sobrelapa con la del otro, lo que garantiza resultados fiables.

A primera vista, en la Figura 8, se puede apreciar que los picos cromatográficos se separan por más de un minuto, lo que indicaría una separación adecuada. Sin embargo, para confirmar lo observado, se determinó el valor de resolución, el cual reveló ser apto para los cuatro picos, confirmando así una separación adecuada.

3.2.2. Linealidad

Para identificar cualquier compuesto, es vital verificar si el método sigue una trayectoria lineal. Así, se utilizan diversas concentraciones de estándar, desde la más baja hasta la más elevada, que, basándose en la literatura o un ensayo piloto, forman un gráfico de calibración que señala las concentraciones de las muestras.

Para realizar este parámetro se midió el estándar de Hidroxiprolina por triplicado. Las concentraciones usadas fueron 1.5, 3.5, 5.5, 7.5 y 9.5 mg/mL.

Tabla 11. Datos de Gráfico de Calibración de Hidroxiprolina

Concentración (mg/mL)	Área Bajo la Curva			Promedio	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación %
	I	II	III			
1.5	2359713	2387652	2361909	2369758	15535.5087	0.6556
3.5	3649608	3693226	3644576	3662470	26754.0447	0.7305
5.5	4903180	4946758	4920934	4923624	21913.1832	0.4451
7.5	5985910	5928648	5907764	5940774	40459.6000	0.6810
9.5	6780954	6754986	6796350	6777430	20905.9574	0.3085

Nota. Elaboración Propia.

En la Tabla 11 se detallan las concentraciones de trabajo seleccionadas para el gráfico de calibración, así como la respuesta del equipo, reflejada en el área bajo la curva de cada concentración. Este estudio se llevó a cabo por triplicado para garantizar los hallazgos. Posteriormente, se calculó el promedio indispensable para llevar a cabo la segunda etapa del ensayo. La desviación estándar y el coeficiente de variación reflejan la variabilidad de los resultados; al triplicar las concentraciones, se observa que los valores alcanzaron valores inferiores a la unidad, lo que indica que no se presentaron resultados inusuales.

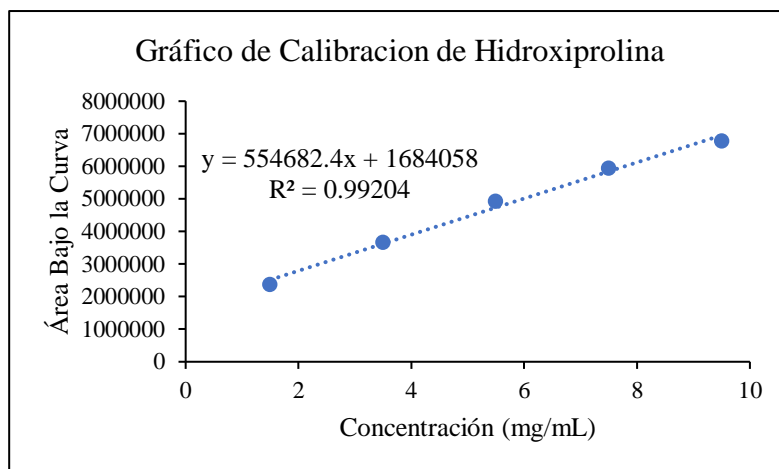


Figura 9. Gráfico de Calibración de Hidroxiprolina. Elaboración Excel

En la Figura 9, se observa el diagrama de calibración de Hidroxiprolina, donde el eje Y representa el área bajo la curva, mientras que el eje X representa las concentraciones correspondientes en miligramos por mililitro (mg/mL). En esta ilustración se representaron cinco puntos que simbolizan las concentraciones de Hidroxiprolina tomadas para elaborar el gráfico de calibración; luego se trazó una línea recta a lo largo de los puntos y se observó que la mayoría transitan por esta línea, lo que implica que hay linealidad.

Además, se determinó el valor R^2 (0.99204), conocido también como Coeficiente de Determinación, cuya cercanía a la unidad nos asegura que el método sigue una línea recta. Además, la ecuación de la recta nos permitirá identificar concentraciones a través de sus áreas bajo la curva y la pendiente, permitiéndonos establecer los límites de cuantificación y detección. Para evaluar el ensayo de linealidad, se empleó la prueba T de Student, calculando tanto el t_r como el $t_{crítico}$, resultando en:

$$t_r = \frac{|0.99601| \sqrt{(5-2)}}{\sqrt{1-0.99204}} = 19.33$$

A continuación, se determinó el valor crítico empleando la tabla t de dos colas, con un intervalo de confianza del 95% y tres grados de libertad, resultando en un valor de 3.182. Observando que el valor supera el valor crítico, se confirma que $t_r > t_{crítico}$, revelando así una correlación lineal significativa.

Podemos concluir que la técnica empleada para identificar este aminoácido fue adecuada, ya que se demostró que el coeficiente de determinación R^2 cumple con el requerimiento establecido y la linealidad se mantuvo estable y estadísticamente se demostró una correlación lineal significativa. Por lo tanto, podemos utilizarlo para calcular las concentraciones del analito.

Tabla 12. Resultado Estadístico de Regresión para Hidroxiprolina

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple (R)	0.99601
Coeficiente de determinación (R^2)	0.99204
Error típico	181455.05
Número de concentraciones	5

Nota. Elaboración Propia.

En la Tabla 12, se despliega el análisis estadístico de regresión lineal de Excel, ofreciendo cifras cruciales para corroborar la linealidad. Primero, se observa la magnitud del coeficiente de correlación o R (0.99601), este valor revela tres matices esenciales: Primero, la relación es positiva, lo que sugiere que la curva tiene un sentido ascendente; luego, la relación es directa, pues a mayor concentración, mayor será el área bajo la curva; y, finalmente, el valor se aproxima a la unidad, demostrando una fuerte conexión entre las variables. En segundo lugar, se observa el coeficiente de determinación, también conocido como R^2 (0.99204), el cual revela la variabilidad entre el área bajo la curva y, cuando se encuentra cerca de la unidad, indica que la

curva sigue una línea recta. Además, se aprecia el error típico, que nos permite valorar la ambigüedad de una predicción. En última instancia, el número de concentraciones indica la cantidad de patrones empleados.

En la Tabla 13 se presentan los datos con los que se pueden calcular los límites de confianza del intercepto y la pendiente. Como $t_{\text{crítico}}$ para 95% de confianza con tres grados de libertad tenemos como valor 3.18.

Tabla 13. Datos para calcular Límites de confianza

	Coficiente	Error típico
Intercepto	1684058	177441.33
Pendiente	554682.4	28690.60

Nota. Elaboración Propia.

$$\text{Limite de confianza del intercepto} = 3.18 \times 177441.33 = 564697.50$$

$$\text{Limite de confianza de la pendiente} = 3.18 \times 28690.60 = 91306.17$$

Dando como resultados para el límite de confianza del intercepto 564697.50 y para el límite de confianza de la pendiente 91306.17. Con estos valores se hallaron los valores mínimos y máximos tanto del intercepto y la pendiente.

Intercepto: 1684058 ± 564697.50 , lo que implica:

$$\text{Intercepto}_{\text{min}} = 1684058 - 564697.50 = 1119360.50$$

$$\text{Intercepto}_{\text{máx}} = 1684058 + 564697.50 = 2248755.50$$

Pendiente: 554682.4 ± 91306.17 , lo que implica:

$$\text{Pendiente}_{\text{min}} = 554682.40 - 91306.17 = 463376.23$$

$$\text{Pendiente}_{\text{máx}} = 554682.40 + 91306.17 = 645988.57$$

Con estos datos corregidos se calcularon las concentraciones de las muestras analizadas.

3.2.3. Límite de Detección y Cuantificación

Nos basamos en los límites de cuantificación (LOQ) y los límites de detección (LOD). Para asegurarnos de que nuestra metodología es la adecuada. Con la pendiente de la ecuación de la regresión lineal se determinaron estos límites.

En la Tabla 14 se observan las áreas bajo la curva de las 8 mediciones del blanco reactivo, con las cuales se realizó el cálculo de la desviación estándar (S_o) con el programa Excel para luego proceder a realizar el cálculo de la desviación estándar (S'_o) usada para los cálculos de LOD y LOQ.

Tabla 14. Datos para calcular Limite de Deteccion y Cuantificación

Medición	Área bajo la curva
1	291425
2	270546
3	268652
4	312568
5	269582
6	301589
7	269456
8	328965
Promedio	289097.88
Desviación Estándar (S_o)	23392.78

Nota. Elaboración Propia.

Para poder evaluar los Límites de detección y cuantificación se utilizará la desviación estándar (S'_o) usada para los cálculos, obteniéndose así:

$$S'_o = \frac{23392.78}{\sqrt{8}} = 8270.60$$

Esta desviación estándar (S'_o) usada para los cálculos, nos permitirá determinar los Límites de detección y cuantificación, obteniéndose así:

$$LOD = \frac{3 \times 8270.60}{554682.4} = 0.045$$

$$LOQ = \frac{10 \times 8270.60}{554682.4} = 0.149$$

Dando como resultado 0.045 mg/mL para LOD y 0.149 mg/mL para LOQ.

Los números de referencia para los límites de detección revelan la concentración mínima que el equipo HPLC puede detectar. No obstante, este indicador no se emplea, pues si es el valor más bajo que el equipo puede detectar, podría desencadenar resultados equivocados. Así, se determinan los límites de cuantificación, ese valor que se distingue claramente del sonido o cualquier otro interferente presente. En consecuencia, para la Hidroxiprolina, el valor de 0.149 mg/mL es la cifra mínima que podemos medir con nuestro gráfico de calibración; valores inferiores a este no son confiables.

3.2.4. Precisión

Para evaluar la repetibilidad, se llevó a cabo la medición de un punto específico, generalmente el medio del rango lineal del gráfico de calibración, utilizando una concentración de 5.5 mg/mL.

En la Tabla 15 se observan los datos para determinar la repetibilidad, para lo cual se realizaron 10 repeticiones. Se determinó el CV% el cual es 0.27.

Después se calculó el coeficiente de variación de Horwitz, dando el siguiente resultado:

$$CV_H\% = \frac{2^{(1-0.5) \times \log 0.0000055}}{2} \times 100 = 8.08\%$$

Para la Hidroxiprolina, el coeficiente de variación (CV%) de las repeticiones alcanza un 0.27, lo que representa menos de la mitad del coeficiente de Horwitz, que se sitúa en un 8.08%. Esto revela la confiabilidad de los hallazgos obtenidos.

Tabla 15. Datos para hallar Repetibilidad

Mediciones	Área bajo la curva
1	4903180
2	4946758
3	4920934
4	4923624
5	4932655
6	4915652
7	4902355
8	4915565
9	4918952
10	4926563
Promedio	4920623.8
Desviación Estándar (So)	13179.35
Coefficiente de variación (CV%)	0.27

Nota. Elaboración Propia.

3.2.5. Exactitud

Elemento vital para determinar la disparidad entre el valor adquirido y el real; en otras palabras, revela cómo un solo resultado se asemeja a un valor predeterminado, además de asegurar que no haya fallos graves o equivocaciones al llevar a cabo los ensayos. Para llevar a cabo esta técnica, se seleccionó una muestra, una solución de aproximadamente 5.5 mg/mL del estándar y una mezcla con la muestra y el estándar preparado de concentración conocida.

En la Tabla 16 se observan los datos de las mediciones utilizados para poder calcular el porcentaje de recuperación (%R).

Después de realizado los ensayos se pudo obtener que el porcentaje de recuperación (%R) del método fue de 95.71%.

Tabla 16. Datos para hallar porcentaje de recuperación

Mediciones	Muestra (M)	Estándar (St)	Muestra + Estándar (ME)	R	%R
1	3227831	4923562	7923565	0.9537	95.37
2	3345623	4925652	8095653	0.9643	96.43
3	3257895	4935654	8022527	0.9653	96.53
4	3256548	4915986	8023565	0.9697	96.97
5	3156465	4935657	7911523	0.9634	96.34
6	3356552	4913252	7905652	0.9259	92.59
Promedio					95.71
Desviación Estándar (So)					1.62

Nota. Elaboración Propia.

Para corroborar la validez del ensayo de recuperación, se empleó la prueba T-Student, donde se calcularon tanto el valor $t_{calculado}$ como el valor $t_{critico}$.

$$t_{calculado} = \frac{100 - 95.71}{1.62 \times \sqrt{6}} = 1.08$$

Para calcular el valor del $t_{critico}$, se empleó la tabla T-Student de dos colas con una confianza del 95% y cinco grados de libertad, resultando en un 2.57.

En vista de que el valor calculado es inferior al valor crítico, se confirma que $t_{calculado} \leq t_{critico}$, lo que indica que no hay divergencias notables, por lo que no se requiere una corrección.

3.3. Aplicación Analítica

Se tomaron muestras de suplementos alimenticios que contienen colágeno de origen bovino que son vendidos en la ciudad de Arequipa, se escogieron estos por la gran cantidad que hay a la venta. En total se analizaron 10 muestras, de las cuales 2 fueron controles extranjeros nombrados como C1 y C2, 4 fueron adquiridos de farmacias de la ciudad de Arequipa nombrados como A, B, C y D; y 4 fueron adquiridos de mercados y tiendas nombrados como E, F, G y H.

En la Tabla 17 se detallan los tiempos de retención de cada muestra, examinada por duplicado, y luego se detallan las áreas bajo la curva de cada repetición, a partir de las cuales se calculó la concentración en mg/mL, utilizando la ecuación de regresión lineal correcta del gráfico de calibración de Hidroxiprolina, obtenida en el ensayo de linealidad. Luego se realizó el cálculo del % de Hidroxiprolina, teniendo en cuenta la concentración real con el factor de dilución (1.82) y la cantidad en miligramos de Hidroxiprolina en los 5 mL de Buffer Borato. Por otro lado, se puede observar que 3 de 10 muestras cumplen con el parámetro estándar (>10%).

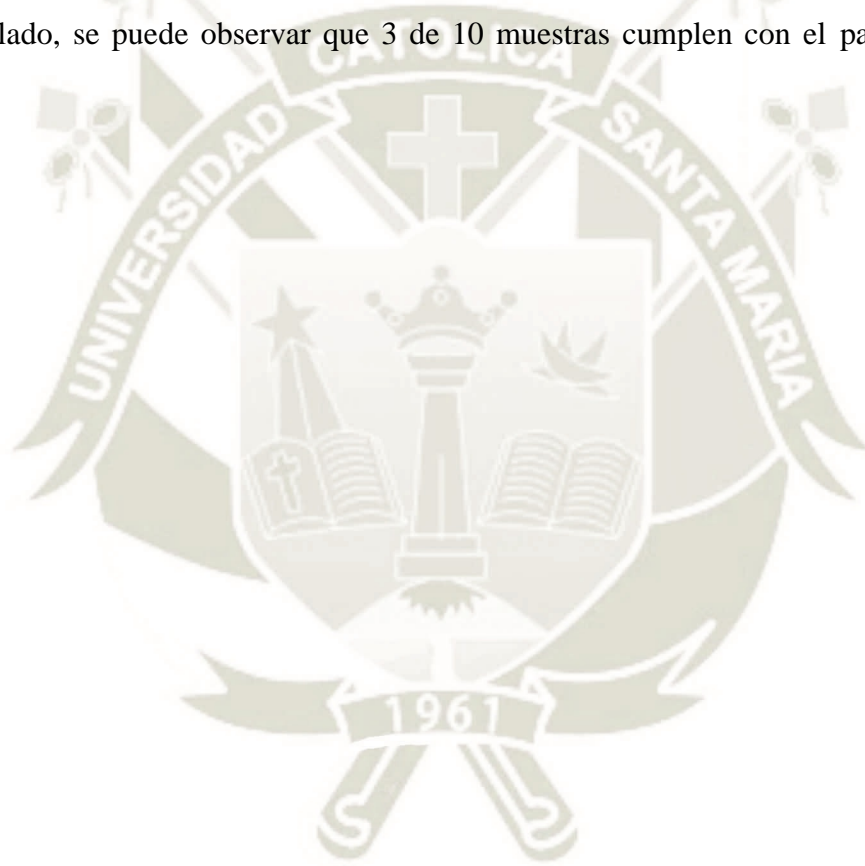


Tabla 17. Análisis de muestras de Suplementos Alimenticios que contienen Colágeno

Adquisición	Muestra	Tiempo de Retención (min)	Área bajo la curva	Concentración (mg/mL)	Factor de dilución	Concentración real (mg/mL)	Cantidad Total en 5 mL de Buffer Borato (mg)	%Hidroxirolina	
Importado	C1	12.047	4809754	5.65	1.82	10.29	51.44	10.29	
	C1	12.012	4845623						
	C2	12.047	4835695	5.69		10.35	51.75	10.35	
	C2	12.023	4856568						
Farmacias	A	12.000	5907279	7.64		1.82	13.91	69.56	13.91
	A	12.019	5896563						
	B	11.813	1830637	0.12			0.21	1.07	0.21
	B	11.956	1850326						
	C	12.02	3495438	3.15	5.74		28.68	5.74	
	C	12.014	3459682						
	D	12.007	3370055	2.94	5.35		26.75	5.35	
	D	11.995	3356899						
Mercados/ Tiendas	E	12.047	3227831	2.67	1.82	4.86	24.28	4.86	
	E	12.032	3205625						
	F	12.047	2559717	1.41		2.57	12.83	2.57	
	F	12.018	2515652						
	G	11.833	2216610	0.87		1.59	7.95	1.59	
	G	11.923	2280498						
	H	12.027	2393615	1.12		2.03	10.16	2.03	
	H	12.015	2365689						

Nota. Elaboración Propia.

Tabla 18. Comparación según la adquisición de muestras

Adquisición	Mínimo (%Hidroxirolina)	Máximo (%Hidroxirolina)
Importado	10.29	10.35
Farmacia	0.21	13.91
Mercado/ Tienda	1.59	4.86

Nota. Elaboración Propia.

En la Tabla 18 podemos observar una comparación entre la forma de adquisición de las muestras analizadas. En general, las muestras analizadas presentan una alta variabilidad en el contenido de hidroxiprolina. Las muestras importadas destacan por su calidad y consistencia, con un promedio de 10.32% y una variabilidad mínima, lo que las posiciona como controles confiables. Las muestras de farmacia muestran una calidad heterogénea, con valores que oscilan entre 0.21% y 13.91%, reflejando diferencias significativas en la composición de los productos comercializados. Por otro lado, las muestras provenientes de mercados y tiendas al azar presentan los porcentajes más bajos (promedio de 2.76%) y no cumplen con el parámetro estándar de calidad esperado ($>10\%$), lo que podría indicar que son productos de menor calidad.

Aunque no existe una norma específica que establezca un valor mínimo aceptable de hidroxiprolina en suplementos alimenticios de colágeno, la literatura ofrece información relevante que puede servir como referencia. Estudios previos han destacado que la hidroxiprolina constituye aproximadamente el 10-14% del peso seco del colágeno puro. (56) Este rango es consistente con la estructura molecular del colágeno, que contiene una alta proporción de prolina e hidroxiprolina en sus cadenas peptídicas. En el contexto de los suplementos alimenticios, un contenido de hidroxiprolina inferior a este rango podría indicar la presencia de materiales no colagénicos, adulteración o una baja calidad del producto.

Aunque no se cuenta con una referencia normativa que respalde directamente el umbral del 10%, este valor puede considerarse una meta razonable basada en la proporción natural de hidroxiprolina en el colágeno. Este criterio puede servir como punto de partida para futuros estudios y para la eventual creación de regulaciones específicas para suplementos alimenticios de colágeno.

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que las muestras importadas de suplementos alimenticios que contienen colágeno presentaron mayores concentraciones de hidroxiprolina en comparación con las muestras adquiridas en farmacias y mercados de la ciudad de Arequipa. Este hallazgo puede explicarse por varios factores relacionados con la regulación, el control de calidad y los procesos de fabricación.

En primer lugar, los países exportadores de los suplementos importados, como Estados Unidos, suelen contar con normativas más estrictas en cuanto a la producción y comercialización de suplementos alimenticios. Por ejemplo, en Estados Unidos, la Food and Drug Administration (FDA) regula los suplementos dietéticos bajo la Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA), exigiendo estándares de calidad, pureza y etiquetado que aseguren la consistencia del producto final para garantizar que los suplementos importados cumplan con los niveles de hidroxiprolina adecuados para ser considerados de alta calidad.

Por otro lado, las muestras locales adquiridas en farmacias y mercados presentaron una alta variabilidad en sus niveles de hidroxiprolina, lo cual podría atribuirse a la falta de regulación específica en Perú para estos productos. Actualmente, el mercado peruano de suplementos alimenticios es regulado por la Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria (DIGESA), pero no cuenta con un marco normativo robusto que exija controles de calidad

rigurosos antes de la comercialización. (2) Esto permite la presencia de productos de menor calidad o con composiciones que no coinciden con lo declarado en sus etiquetas.

Adicionalmente en los procesos de fabricación podrían influir en los niveles de hidroxiprolina. Las empresas internacionales suelen invertir en tecnologías avanzadas y procesos estandarizados que garantizan la extracción y preservación de los componentes clave, como el colágeno y la hidroxiprolina, mientras que los fabricantes locales o informales podrían recurrir a métodos menos eficientes o no estandarizados, afectando la calidad del producto final.

Por último, es posible que los suplementos locales incluyan ingredientes adicionales o rellenos que diluyan la concentración de hidroxiprolina, disminuyendo su calidad percibida. Esto se suma al hecho de que, en ausencia de regulación, no existe una garantía de que estos productos contengan las proporciones esperadas de colágeno.

En conclusión, las diferencias observadas entre las muestras importadas y las locales subrayan la importancia de implementar normativas nacionales que regulen la calidad de los suplementos alimenticios. Este tipo de regulación no solo beneficiaría a los consumidores al garantizar productos seguros y eficaces, sino que también fortalecería la competitividad de los productos locales en mercados internacionales.

La metodología planteada en este estudio representa un avance significativo hacia el establecimiento de un marco regulatorio para los suplementos alimenticios que contienen colágeno en el Perú. En la actualidad, la ausencia de normativas específicas en el país ha permitido la producción excesiva de productos de calidad variable, lo que plantea riesgos tanto para la salud de los consumidores como para la confianza en el mercado. Este trabajo, al proponer y validar una metodología analítica para la cuantificación de hidroxiprolina, aporta una herramienta clave para abordar este vacío regulatorio.

La validación del método mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD) incluyó parámetros esenciales como selectividad, linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), precisión y exactitud. Estos parámetros cumplieron con los estándares aceptados, lo que respalda la confiabilidad y reproducibilidad del método.

El proceso de derivatización; esencial para la detección y cuantificación de aminoácidos como la hidroxiprolina mediante HPLC/FLD; presenta desafíos significativos. La derivatización implica una reacción química previa que debe ser altamente específica, reproducible y eficiente para garantizar resultados confiables. En este estudio, se utilizó FMOC-Cl debido a sus ventajas, como la formación de derivados estables y fluorescentes. Sin embargo, este paso agrega una capa de complejidad al análisis, ya que factores como el tiempo de reacción, el pH y la concentración del derivatizante deben controlarse estrictamente para evitar reacciones incompletas o productos secundarios que interfieran con la separación cromatográfica.

Además, trabajar con reactivos sensibles como FMOC-Cl requiere condiciones precisas de almacenamiento y manipulación para evitar su degradación. Estos desafíos subrayan la necesidad de experiencia técnica y optimización metódica del método, lo cual se logró en este estudio al validar parámetros clave como la selectividad, precisión y exactitud. Pese a estas dificultades, el uso de derivatización es indispensable en este tipo de análisis, ya que mejora significativamente la sensibilidad y especificidad del método, especialmente para aminoácidos con estructuras complejas como la hidroxiprolina.

En investigaciones futuras, podría explorarse la automatización del proceso de derivatización para reducir errores humanos y mejorar la reproducibilidad, así como la

comparación con métodos alternativos que no requieran derivatización para evaluar su aplicabilidad en el análisis de suplementos alimenticios que contienen colágeno.

El uso de Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) como derivatizante en este estudio resultó ser una elección acertada debido a sus múltiples ventajas en comparación con otros reactivos comúnmente empleados en la derivatización de aminoácidos. A diferencia de reactivos como el orto-ftalaldehído (OPA), que no es compatible con aminoácidos secundarios como la hidroxiprolina (57), el FMOC-Cl permite una derivatización eficiente y específica de estos compuestos. Esto es especialmente relevante para la cuantificación de hidroxiprolina, que constituye un marcador crucial en la evaluación de la calidad del colágeno en suplementos alimenticios.

Además, los derivados de FMOC-Cl presentan una alta estabilidad química, lo que minimiza la degradación de los compuestos durante el análisis y asegura una cuantificación precisa (46). Esto contrasta con otros derivatizantes, como el OPA, cuyos derivados son más susceptibles a la degradación y tienen una vida media más corta. Por otro lado, el FMOC-Cl también destaca por su alta sensibilidad fluorescente, lo que permite detectar concentraciones bajas de hidroxiprolina con gran precisión, una característica crítica para la evaluación de productos de calidad variable (47)

Otra ventaja significativa es que el FMOC-Cl genera picos más definidos y con menos interferencias en el cromatograma, facilitando la separación y cuantificación en mezclas complejas como los suplementos alimenticios. Esto es particularmente importante en estudios como el presente, donde la matriz de la muestra puede contener una variedad de compuestos que potencialmente interfieran en el análisis. (5)

En resumen, el uso de FMOC-Cl no solo mejora la sensibilidad y precisión del método, sino que también incrementa la confiabilidad de los resultados, lo que refuerza su idoneidad para estudios analíticos y de control de calidad en productos que contienen colágeno. Estas ventajas lo eligen como un derivatizante indicado para futuros estudios orientados a la regulación de suplementos alimenticios.

Además, la optimización de condiciones clave, como el tiempo de hidrólisis (6 horas) y el tiempo de derivatización (20 minutos), permitió garantizar una cuantificación precisa y eficiente del aminoácido. Este nivel de detalle técnico no solo refuerza la validez del método, sino que también establece un protocolo replicable que puede ser adoptado por otras instituciones o laboratorios interesados en evaluar la calidad de suplementos alimenticios.

Si bien existen varias técnicas analíticas disponibles para la cuantificación de aminoácidos como la hidroxiprolina, se optó por utilizar Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Fluorescencia (HPLC/FLD) debido a sus ventajas sobre otros métodos, como la cromatografía iónica, que también podría haber sido utilizada.

La cromatografía iónica es una técnica ampliamente utilizada para la separación y detección de compuestos cargados, como los aminoácidos, debido a su alta sensibilidad y especificidad en la separación de especies iónicas.(58) Sin embargo, su aplicación en la cuantificación de hidroxiprolina en matrices complejas como los suplementos alimenticios puede ser limitada por la necesidad de pretratamientos extensos y la interferencia de otros aminoácidos presentes en la muestra, dado que el colágeno contiene una amplia gama de aminoácidos con diferentes cargas.

Por otro lado, el uso de HPLC/FLD con derivatización previa con FMOC-Cl ofreció ventajas significativas. La derivatización permitió mejorar la sensibilidad y selectividad para la

hidroxiprolina, facilitando su detección en niveles bajos y en matrices complejas. Además, esta técnica permitió trabajar con un método validado que incluyó parámetros como linealidad, precisión y exactitud, asegurando resultados reproducibles y confiables.

Aunque la cromatografía iónica podría ser una alternativa válida, el enfoque basado en HPLC/FLD demostró ser más adecuado para este estudio, ya que proporcionó un equilibrio óptimo entre sensibilidad, selectividad y facilidad de implementación en un laboratorio con recursos limitados. Esta elección también refuerza la versatilidad de HPLC/FLD como una herramienta robusta para estudios de calidad en suplementos alimenticios, destacando su potencial para futuras investigaciones y regulaciones en este ámbito.

La aplicación de esta metodología en el análisis de diferentes muestras comercializadas en Arequipa demostró su utilidad práctica para identificar variaciones significativas en los niveles de hidroxiprolina entre productos. Estos resultados no solo evidencian la necesidad de una regulación más estricta, sino que también proporcionan datos concretos que podrían servir como base para establecer estándares mínimos de calidad para estos productos.

La implementación de un método validado como el desarrollado en este estudio podría ser el primer paso hacia la creación de un marco normativo nacional. Esto permitiría a las autoridades sanitarias realizar controles de calidad sistemáticos y exigir a los fabricantes el cumplimiento de estándares específicos antes de comercializar sus productos. Asimismo, un método estándar facilitaría la comparación entre productos nacionales e importados, promoviendo la transparencia y la confianza del consumidor.

Por lo expuesto, la metodología planteada no solo constituye una herramienta analítica, sino que también brinda las bases para el desarrollo de una regulación necesaria y urgente en el mercado peruano de suplementos alimenticios que contienen colágeno. Este esfuerzo

contribuiría a garantizar la calidad, seguridad y eficacia de estos productos, beneficiando tanto a los consumidores como al sector industrial.



CONCLUSIONES

Primero:

Se desarrolló y validó la técnica de HPLC/FLD; a través de los parámetros: Selectividad, Linealidad, Limite de Detección, Limite de Cuantificación, Precisión y Exactitud, para determinar Hidroxiprolina en Suplementos que contienen Colágeno que están disponibles en el mercado arequipeño.

Segundo:

Se determinó la cantidad de Hidroxiprolina utilizando el método validado de HPLC/FLD en diez muestras de suplementos alimenticios. Los niveles de Hidroxiprolina determinados en dichos suplementos presentan una amplia variabilidad dependiendo de la adquisición. Obteniéndose rangos de 10.29 – 10.35% H para muestras Importadas, 0.21 – 13.91% H para muestras de Farmacias y 1.59 – 4.86% H para muestras de Mercados/Tiendas.

Tercero:

Se analizaron las concentraciones obtenidas de las muestras que son comercializadas en la ciudad de Arequipa y se las comparó con las muestras Importadas de EEUU. La comparación de los niveles de Hidroxiprolina entre diferentes marcas de suplementos alimenticios que contienen colágeno comercializados en Arequipa evidencia diferencias significativas según su adquisición. Las muestras importadas mostraron los niveles más consistentes y altos de hidroxiprolina (promedio de 10.32%), cumpliendo con el parámetro estándar de calidad. En contraste, las muestras adquiridas en farmacias presentaron una mayor variabilidad, con valores que oscilaron entre 0.21% y 13.91%, indicando diferencias significativas entre marcas. Finalmente, las muestras provenientes de mercados y tiendas al azar tuvieron los niveles más bajos (promedio de 2.76%), posicionándose como las de menor calidad. Estos resultados reflejan una marcada disparidad en la

composición de los suplementos alimenticios que contienen colágeno comercializados en la ciudad, resaltando la necesidad de implementar controles de calidad más rigurosos para garantizar la eficacia y confiabilidad de estos productos.



REFERENCIAS

1. Zapata Linares J. Contaminantes en suplementos alimenticios: efectos adversos y riesgo de dopaje [Internet] [bachelorThesis]. 2021 [citado 22 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://dehesa.unex.es:8443/handle/10662/12505>
2. Decision_9Suplementos_Alimenticios.pdf [Internet]. [citado 22 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.mincetur.gob.pe/reglamentostecnicos/inventario_reglamentos_tecnicos/pdf/Decision_9Suplementos_Alimenticios.pdf
3. ESTUDIO_DE_CALIDAD_COLAGENO.pdf [Internet]. [citado 22 de octubre de 2024]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/723890/ESTUDIO_DE_CALIDAD_COLAGENO.pdf
4. Gameil AHM, Yusof F, Azmi AS, Puad NIM. Progress in the detection and quantification of collagens: a review. IOP Conf Ser: Mater Sci Eng. noviembre de 2021;1192(1):012005.
5. Miller EJ, Narkates AJ, Niemann MA. Amino acid analysis of collagen hydrolysates by reverse-phase high-performance liquid chromatography of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. Anal Biochem. octubre de 1990;190(1):92-7.
6. Office of Dietary Supplements - Dietary Supplements: What You Need to Know [Internet]. [citado 29 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/WYNTK-Consumer/>

7. Commissioner O of the. Introducción básica a los suplementos dietéticos. FDA [Internet]. 6 de octubre de 2022 [citado 29 de octubre de 2024]; Disponible en: <https://www.fda.gov/consumers/articulos-para-el-consumidor-en-espanol/introduccion-basica-los-suplementos-dieteticos>
8. Molinero O, Márquez S. Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-related factors. *Nutr Hosp.* 2009;24(2):128-34.
9. Dwyer JT, Coates PM, Smith MJ. Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. *Nutrients.* 4 de enero de 2018;10(1):41.
10. Velez M. PROCESO DE CURTIMBRE E INDUTRALIZACION DE LA PIEL DE TILAPIA Y SU VIABILIDAD PARA SU COMERCIALIZACION. [Antioquia]: Corporacion Universitaria Lasallista; 2012.
11. Gelse K. Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 28 de noviembre de 2003;55(12):1531-46.
12. Javorski S, Lubi N. O USO DO COLAGENO COMO SUPLEMENTO EM NUTRICOSMETICOS - *Bioquímica.* 2018;11.
13. Mamani Charca MD, Salcedo Ortiz L (tutor). Estudio comparativo de la obtención de colágeno hidrolizado de bovino a través de procesos enzimáticos [Internet] [Tesis]. [La Paz]: Universidad Mayor de San Andres; 2018 [citado 29 de octubre de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/19062>

14. Eluk D. Modelado reocinético de la maduración de soluciones de gelatina en flujo de corte [Internet]. [Santa Fe]: Universidad Nacional del Litoral; 2006 [citado 29 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/handle/11185/508>
15. PubChem. 4-Hydroxyproline [Internet]. [citado 29 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/825>
16. Gavilanes APS, Mesa ALV. INGENIERAS EN INDUSTRIAS PECUARIAS.
17. ISO [Internet]. [citado 31 de diciembre de 2024]. ISO 3496:1994. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/8848.html>
18. Song H, Zhang S, Zhang L, Li B. Effect of Orally Administered Collagen Peptides from Bovine Bone on Skin Aging in Chronologically Aged Mice. *Nutrients*. 3 de noviembre de 2017;9(11):1209.
19. Wakeman M. A Review of the Literature Relating to Collagen Hydrolysate and Its Potential Clinical Applications. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*. 1 de julio de 2021;33(15):6-20.
20. Abad Expósito C. Suplementos de colágeno y efecto en el tratamiento de lesiones articulares [Internet]. Elche: Universidad Miguel Hernandez; 2015 [citado 29 de octubre de 2024]. Disponible en: <http://dspace.umh.es/handle/11000/1993>
21. Sato K. A simplified method for determining collagen in fish muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1986;52(5):889-93.
22. Meissenberg G. Principios de Bioquímica Médica. 4ta ed. Elsevier; 2018. 632 p.

23. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. Food Research International. 1 de enero de 1992;25(4):289-307.
24. Bernaldes D. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2004;2(23):65-74.
25. McMahon G. Analytical Instrumentation: A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments | Wiley. 1st ed. Wiley; 2008. 320 p.
26. Meyer V. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 1 st. Alemania: John Wiley & Sons, Ltd; 2010. 412 p.
27. Kar A. Pharmaceutical Drug Analysis. New Age International; 2005. 558 p.
28. Farmacopea de los Estados Unidos de America; USP 40. <621> Cromatografía. EEUU; 2017.
29. Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. Introduccion a la HPLC, Aplicacion y Practica. Buenos Aires. 1992.
30. Reversed Phase Chromatography [Internet]. [citado 31 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ReversePhase/AmershamRPCManual.pdf>
31. European pharmacopeia. Liquid Chromatography - 2. 2. 29. 2016.
32. Adamovics J. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. 2nd Edition. Vol. 74. 1997.

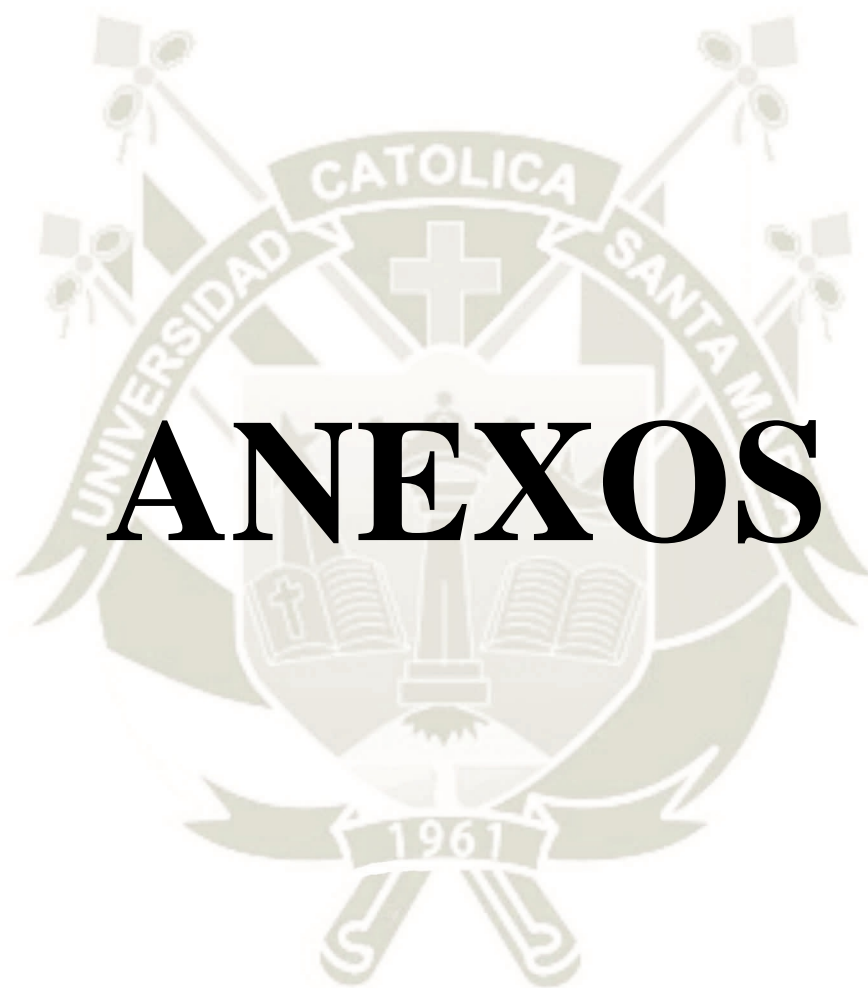
33. Kromidas S, Neue UD, Cheng YF, Lu Z. HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
34. Snyder L, Kirkland J, Dolan J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons, Ltd; 2009.
35. Dong M. Modern HPLC for Practicing Scientists. John Wiley & Sons, Ltd; 2006.
36. Lingeman H, Underberg WJM, Takadate A, Hulshoff A. Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 1 de abril de 1985;8(5):789-874.
37. Lawrence J. Prechromatographic Chemical Derivatization in Liquid Chromatography | SpringerLink. Springer. 1982;2:191-242.
38. Knapp D. Handbook of Analytical Derivatization Reactions | Wiley. Wiley; 1979. 768 p.
39. Lawrence JF, Frei RW. Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Elsevier; 2000. 223 p.
40. Einarsson S. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 30 de diciembre de 1983;282:609-18.
41. Lindroth Peter, Mopper Kenneth. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal Chem*. 1 de septiembre de 1979;51(11):1667-74.

42. Comparison of amino acid derivatization reagents for liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric analysis of seven amino acids in tea extract. *International Journal of Mass Spectrometry*. 1 de octubre de 2017;421:189-95.
43. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. 27 de octubre de 1995;715(1):67-79.
44. Ho P. HPLC of Amines as 9-Fluorenylmethyl Chloroformate Derivatives. En: *Journal of Chromatography Library* [Internet]. Elsevier; 2005 [citado 4 de noviembre de 2024]. p. 471-501. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301477005800193>
45. High-Speed Amino Acid Analysis (AAA) on 1.8 μm Reversed-Phase (RP) Columns [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.agilent.com/Library/applications/5989-6297EN.pdf>
46. Jámbor A. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride: Literature overview and further study. *Journal of Chromatography A*. 10 de abril de 2009;1216(15):3064-77.
47. Bank RA, Jansen EJ, Beekman B, te Koppele JM. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal Biochem*. 5 de septiembre de 1996;240(2):167-76.
48. Waters [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2024]. Guía completa sobre la hidrólisis y el análisis de aminoácidos | Waters. Disponible en:

<https://www.waters.com/nextgen/xg/es/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids.html>

49. Morillas P. Guia Eurachem: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos - Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados [Internet]. 1ra ed. Eurolab España; 2016 [citado 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.eurachem.org>
50. Duffau B. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos” [Internet]. Chile; 2010. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
51. Abraham J. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) ICH Harmonised Tripartite Guideline. En: Tietje C, Brouder A, editores. Handbook of Transnational Economic Governance Regimes [Internet]. Brill | Nijhoff; 2010 [citado 4 de noviembre de 2024]. p. 1041-53. Disponible en: https://brill.com/view/book/edcoll/9789004181564/Bej.9789004163300.i-1081_085.xml
52. FDA/CDER. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015;18.
53. WHO. GUIDELINES ON VALIDATION – APPENDIX 4 ANALYTICAL METHOD VALIDATION [Internet]. 2016 [citado 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: https://dcvnmn.org/wp-content/uploads/2017/01/who_guideline_validation_analyticalmethodvalidationqas16-671.pdf

54. AOAC INTERNATIONAL [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2024]. Official Methods of Analysis, 22nd Edition (2023). Disponible en: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>
55. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [Internet]. [citado 5 de noviembre de 2024]. General chapter 2.2.46. Chromatographic separation techniques: comparison of requirements in the Ph. Eur. 10th and 11th Editions - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. Disponible en: <https://www.edqm.eu/en/-/general-chapter-2.2.46.-chromatographic-separation-techniques-comparison-of-requirements-in-the-ph.-eur.-10th-and-11th-editions>
56. ResearchGate [Internet]. [citado 31 de diciembre de 2024]. Propuesta para extracción de colágeno soluble en ácido (CSA) de escamas de tilapia del Nilo. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/326066766_Propuesta_para_extraccion_de_colageno_soluble_en_acido_CSA_de_escamas_de_tilapia_del_Nilo
57. Agilent ZORBAX Eclipse AAA Instructions for Use [Internet]. Agilent Technologies; Disponible en: https://www.labicom.cz/cogwspogd/uploads/2016/07/5980-3088_AAA_Datasheet.pdf
58. News-Medical [Internet]. 2016 [citado 29 de diciembre de 2024]. Content Determination of Amino Acids Using Ion Chromatography. Disponible en: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20160608/Content-Determination-of-Amino-Acids-Using-Ion-Chromatography.aspx>

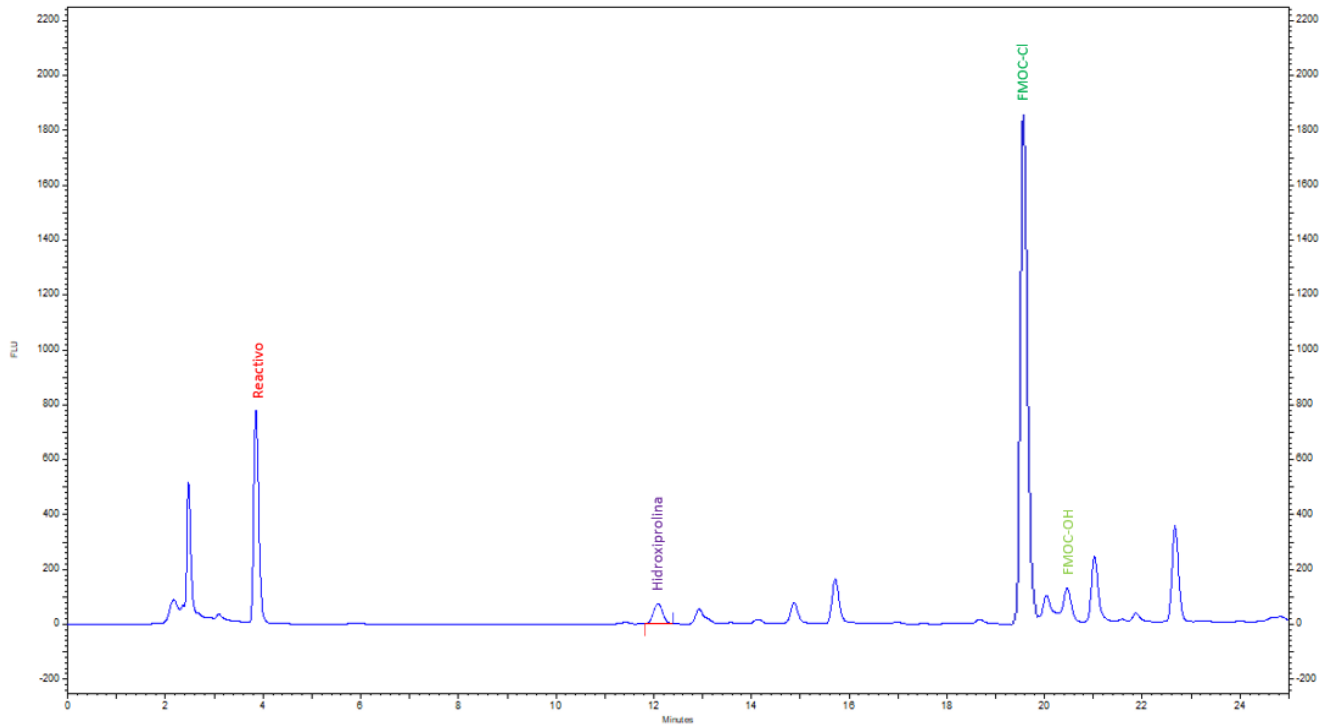


ANEXOS

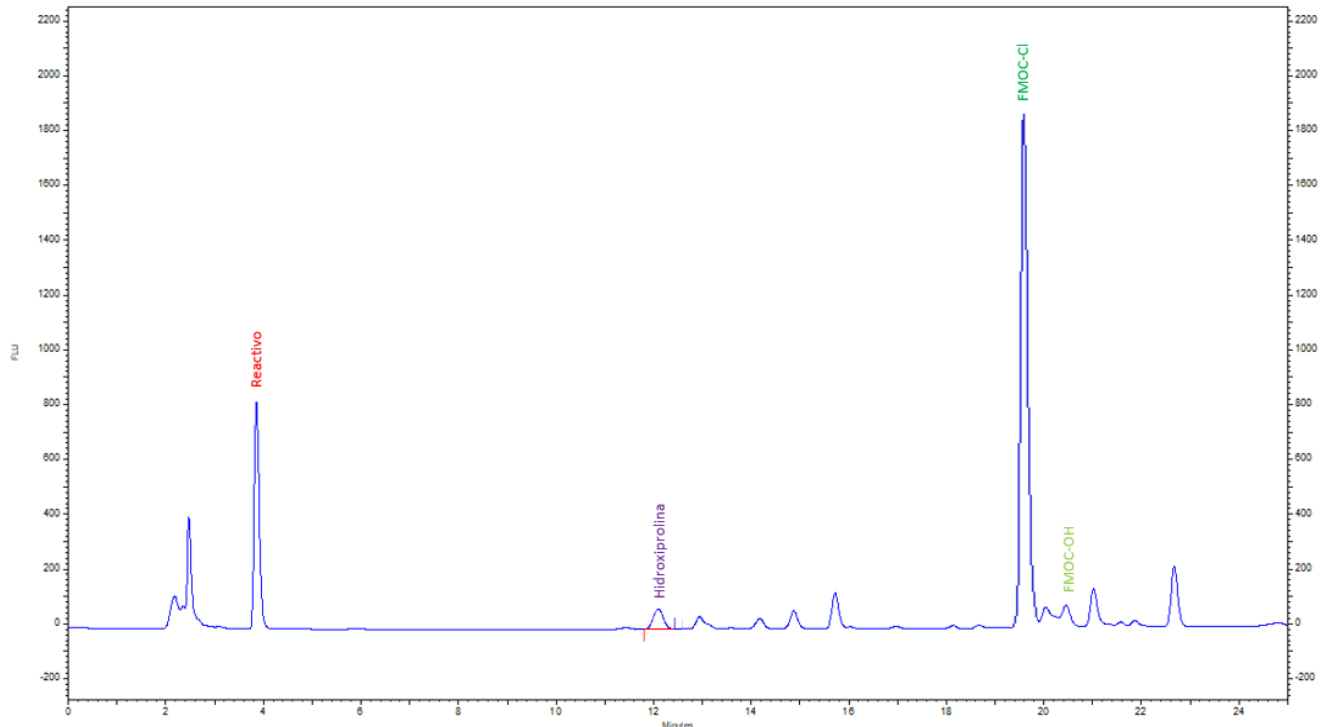
Tabla de valores críticos de la distribución t de Student

Grados de Libertad	Niveles de significancia DOS COLAS				
	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	6.314	12.706	25.452	63.657	127.321
2	2.920	4.303	6.205	9.925	14.089
3	2.353	3.182	4.177	5.841	7.453
4	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598
5	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773
6	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317
7	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029
8	1.860	2.306	2.752	3.355	3.833
9	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690
10	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581
11	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497
12	1.782	2.179	2.560	3.055	3.428
13	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372
14	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326
15	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286
16	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252
17	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222
18	1.734	2.101	2.445	2.878	3.197
19	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174
20	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153
21	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135
22	1.717	2.074	2.405	2.819	3.119
23	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104
24	1.711	2.064	2.391	2.797	3.091
25	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078
26	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067
27	1.703	2.052	2.373	2.771	3.057
28	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047
29	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038
30	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030

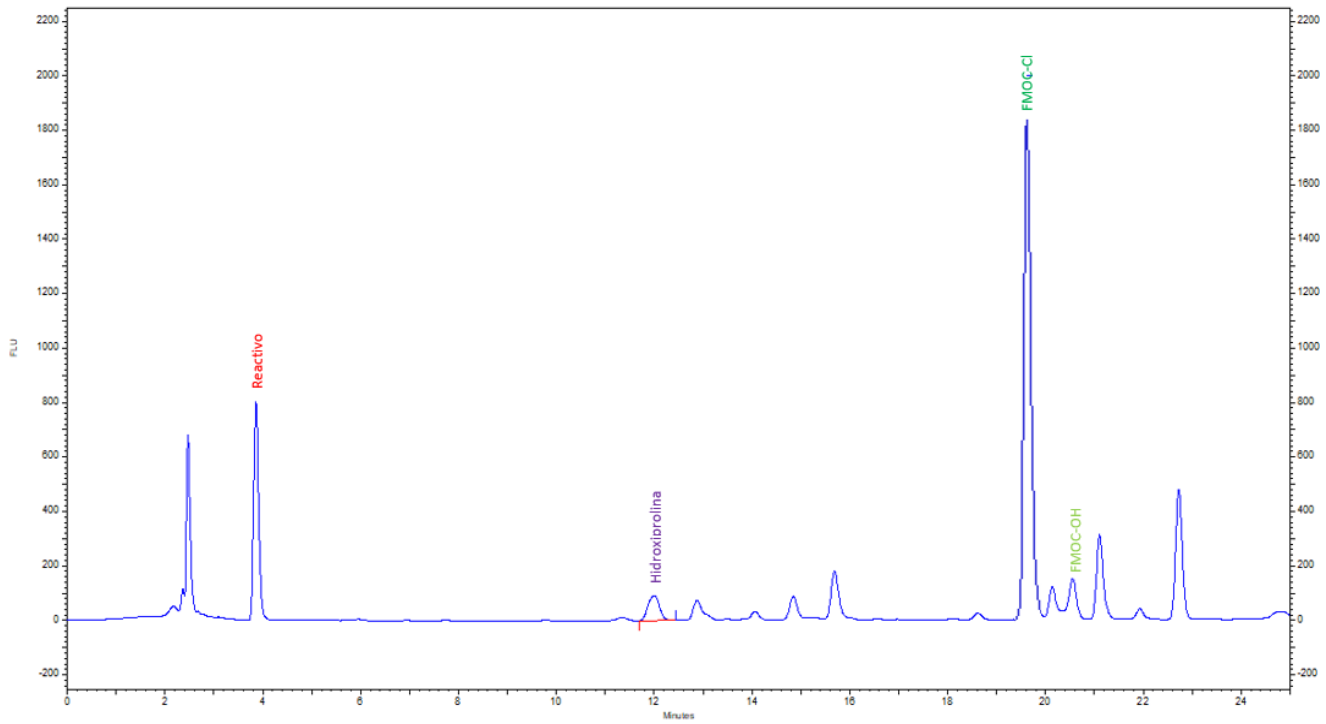
Cromatograma Muestra C1



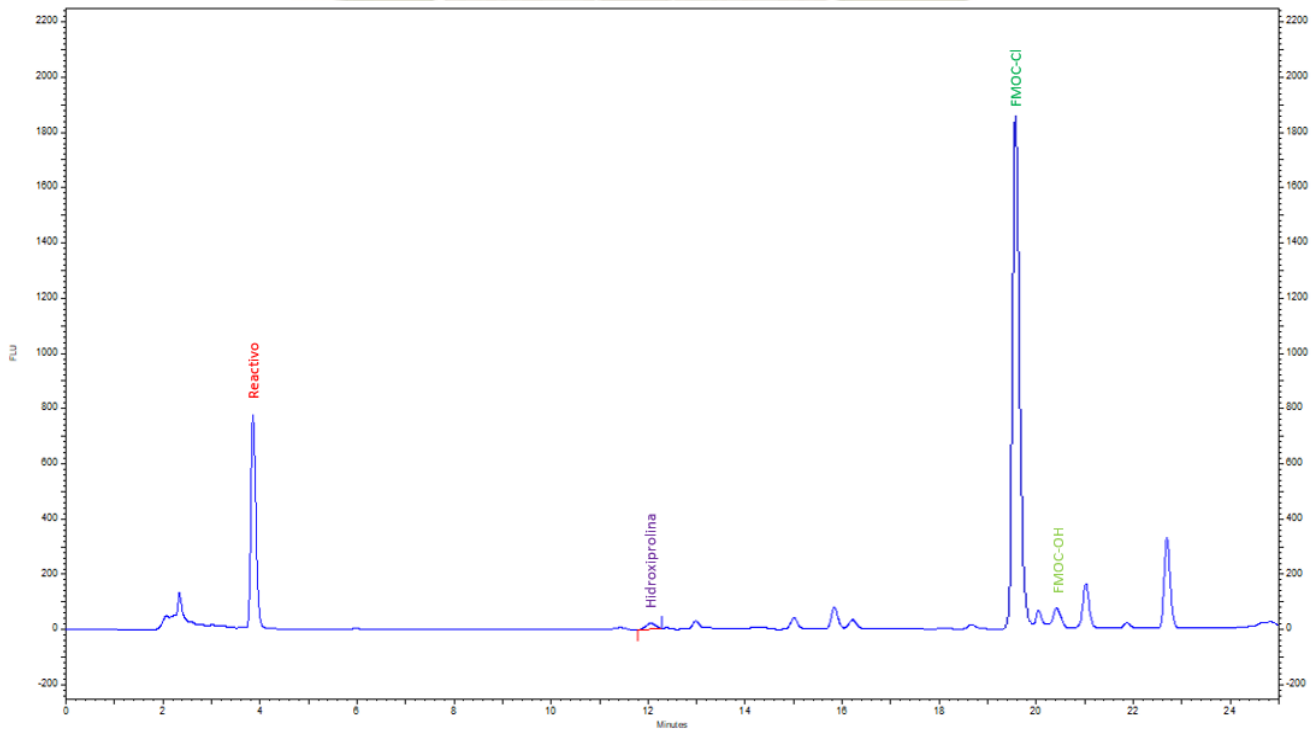
Cromatograma Muestra C2



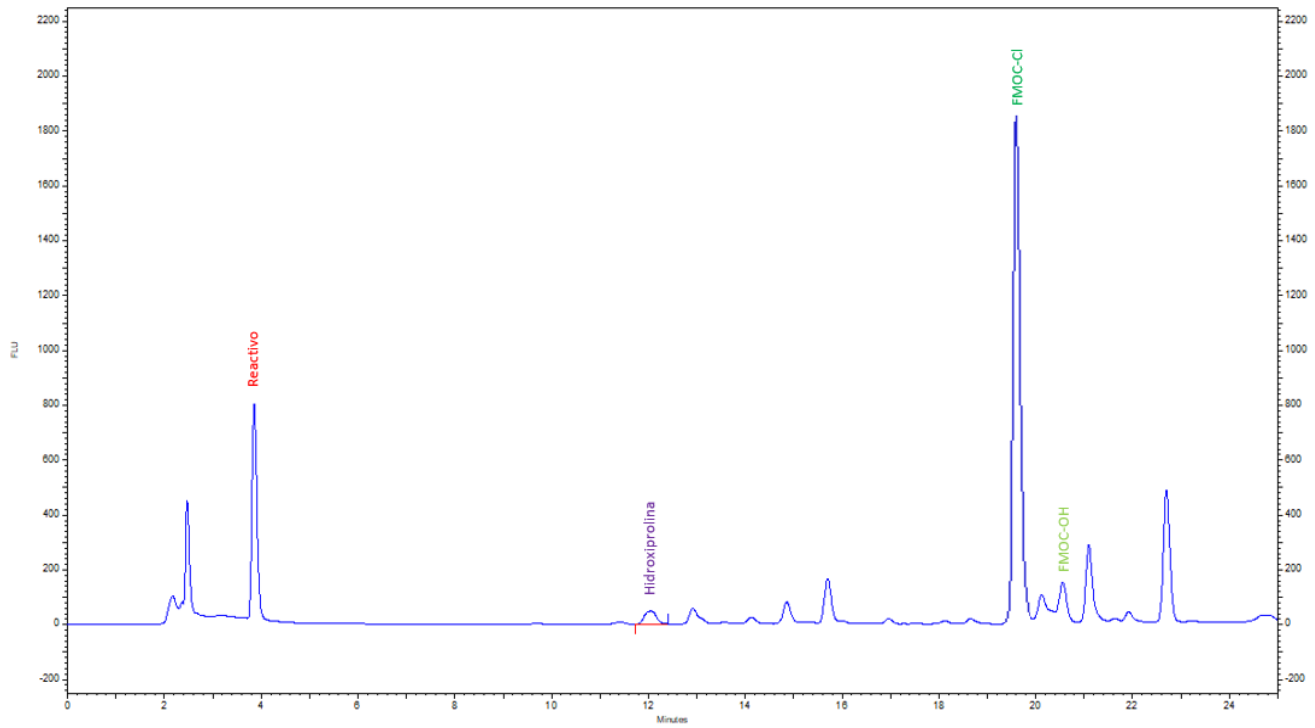
Cromatograma Muestra A



Cromatograma Muestra B



Cromatograma Muestra E



Cromatograma Muestra G

