



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUCIÓN: Instituto de Farmacia.
FACULTAD: Facultad de Ciencias**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dr. Humberto Dölz
INSTITUCIÓN: Instituto de Farmacia
FACULTAD: Facultad de Ciencias**

**“Desarrollo, implementación y validación de una metodología analítica por HPLC
para la identificación y cuantificación de alantoína en baba de caracol chileno
(*Helix aspersa müller*)”.**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico

CAROLINA MARCELA MANOSALVA ALTAMIRANO

VALDIVIA – CHILE

2005

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi familia por su gran apoyo, su incondicional cariño y por ser los mejores ejemplos que he podido tener.

Gracias a la profe Annemarie Nielsen, por su incondicional apoyo y dedicación, ya que a pesar de los malos y buenos momentos vividos aprendí que la amistad, el respeto y el cariño perduran por sobre todas las cosas, gracias profe Anny.

Gracias al Dr. Humberto Dölz por sus gratas y extensas conversaciones y a sus enseñanzas que sin duda me servirán durante mi vida profesional.

Gracias a la profesora Carin Akesson, por sus consejos, apoyo y gran dedicación, que permitieron sacar adelante este proyecto.

Gracias a Joel Pardo, por su apoyo, consejos y paciencia, pero sobre todo a su gran amistad, los cuales aportaron de forma importante durante la parte experimental de este trabajo.

Gracias al profe Alejandro Jerez por su apoyo y siempre importantes consejos.

Moisés, gracias por tu amor, comprensión, y paciencia, que han hecho mi vida más grata durante estos años.

Gracias a mis amigos: Mónica y Caro que durante mi vida estudiantil vivimos innumerables gratos momentos, que siempre estarán atesorados en mí.

Iván mi gran compañero y amigo, gracias a ti las horas en el laboratorio han sido más gratas y entretenidas.

Susan, gracias por haber sido siempre mi amiga, por haber estado en los malos y buenos momentos y por tu incondicional apoyo. Gracias a don Eduardo por su continua y desinteresada colaboración en el transcurso de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	
El caracol.....	3
Anatomía del caracol.....	4
Nutrición del caracol.....	6
Reproducción del caracol.....	7
El caracol y la medicina.....	8
La alantoína.....	10
Consideraciones analíticas de la alantoína.....	14
Validación de la metodología analítica.....	24
HIPOTESIS DE TRABAJO	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	
Instrumental y equipos.....	36
Reactivos.....	37
Muestras.....	37
Metodología analítica.....	37
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	79

BIBLIOGRAFÍA CITADA.....81

ANEXOS

Esquemas..... 84

Tablas..... 89

RESUMEN.

En el presente trabajo se determinó la cantidad de alantoína, contenida en la secreción de *Helix aspersa müller* (caracol chileno), utilizando para ello como técnica de determinación la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa.

Previo al análisis de las muestras de secreción (baba), se procedió a validar la técnica analítica utilizada, estableciéndose que el método propuesto cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de concentraciones de trabajo (1,00 -20,00 µg/mL), precisión y sensibilidad. En cuanto a la exactitud, se obtuvo un promedio del porcentaje de recuperación de 77,3%, el cual está por debajo de los valores establecidos por la A.O.A.C.

Una vez validada la técnica, se procedió al análisis de las muestras, encontrándose que la concentración de alantoína en éstas era de 0,548 mg/100mL de secreción. La concentración hallada es inferior al valor internacionalmente aceptado como responsable del efecto regenerador sobre la piel. Por lo que se postula que existirían en la baba otros componentes que en conjunto con la alantoína serían capaces de proporcionar los efectos benéficos sobre la piel, atribuidos a la secreción del caracol.

SUMMARY.

In the present investigation allantoin was determined in the secretion of *Helix aspersa müller* (Chilean snail), using the technique of high resolution liquid chromatography in reverse phase (HPLC). Previous to the analysis of the samples of secretion (dribble), the analytic technique was validated, determining that the proposed method fulfills the requirements of linearity in the range of working concentrations (1,00 – 20,00 µg/mL), precision and sensibility. As for the accuracy, a percentage of recovery of 77,3% was obtained, which is below the limit established by the A.O.A.C.

Once validated the technique the analysis of the samples was carried out determining a concentration of allantoin of 0,548 mg/mL of secretion. The found concentration is inferior to the internationally accepted value as responsible for the regenerating effect on skin. It is postulated therefore that the dribble contains other components that would be able to provide the beneficent effect on the skin attributed to the secretion of the snail together with allantoin.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El caracol.

El caracol de tierra chileno *Helix aspersa müller* pertenece a la clase de los gasterópodos y se distingue de las babosas por poseer una concha dorsal externa muy visible de forma y colores variados. Los gasterópodos forman la clase más diversa de todos los moluscos y es posible encontrar ejemplares tanto terrestres como marinos e incluso de agua dulce (Maceda, 2005).

El presente trabajo únicamente tratará de los terrestres.

Los caracoles son animales ligados a la humedad y por lo tanto suelen encontrarse activos de noche cuando las temperaturas son más bajas, de modo que es raro encontrarlos activos durante las horas del día, salvo en caso de lluvia que garantice una humedad ambiental elevada (Maceda, 2005).

Dependiendo de la temperatura y la humedad ambiental, los caracoles presentan tres fases fisiológicas:

- Vida activa.
- Estivación.
- Hibernación.

La estivación es un estado de letargo que se produce en las épocas secas, con escasa humedad ambiental y altas temperaturas. El caracol disminuye al mínimo su actividad metabólica.

La hibernación es un estado de letargo que se produce por las bajas temperaturas o por la escasez del alimento. En esta etapa los caracoles realizan la operculación que consiste en cerrar la boca de la concha con una sustancia espesa, blanquecina y de

extremada resistencia denominada opérculo que permite al animal mantenerse aislado del medio externo y sobrevivir con las reservas que haya adquirido durante la estación favorable. Cuando cumple los seis meses de ayuno de invierno, abre el opérculo y espera que llueva para salir, busca el alimento y realiza todas sus actividades vitales.

El caracol tiene vida activa sólo en época de lluvia o rocío, la sequía le provoca sueño (Centro de helicultores de Argentina, 1997) (Anexo N° 1, esquema N° 1).

Las condiciones climáticas óptimas para el caracol son: oscuridad, poco viento y humedad. La luz es muy importante en el comportamiento del caracol, ya que siempre busca la oscuridad para vivir. Se desplaza durante toda la noche o en días de poca luz, nunca cuando hay sol, aunque el suelo esté mojado.

La ausencia de un viento fuerte es un elemento del ambiente fundamental para el caracol porque necesita un ambiente húmedo, por lo que tolera sólo un viento muy ligero, ya que uno fuerte activa la evaporación, enfría su piel y lo deshidrata.

1.1.1 Anatomía del caracol.

En los helícidos se distinguen claramente dos partes: el caparazón y el cuerpo.

El caparazón es producido por el manto, repliegue del tegumento que recubre la masa visceral, a partir del calcio absorbido de los alimentos, siendo su composición de un 98-99% de sales minerales y 1-2% de materia orgánica.

La concha es univalva (un todo entero), globosa y enrollada en espiral. Posee un extremo superior o ápice y otro inferior u ombligo. La principal función de la concha es defender al caracol de las condiciones ambientales adversas y de los depredadores,

ocultándose de estos al retraer su cuerpo en el interior. (Centro de helicultores de Argentina, 1997).

El cuerpo se compone de tres partes: cabeza, pie y masa visceral.

Cabeza: aquí se encuentran dos tentáculos superiores de gran tamaño, dos tentáculos táctiles de menor tamaño, la boca y el orificio genital que está en el extremo derecho (Anexo N° 1, esquema N° 2).

El sentido del olfato parece estar muy desarrollado en estos moluscos y se cree que se sitúa en la base de los tentáculos. Es característico de los moluscos la presencia de rádula pese a que en algunas clases se ha perdido parcialmente durante la evolución. Esta estructura la encontramos en la boca de los caracoles y está formada por una serie de dientes que se deslizan sobre una estructura llamada odontóforo. La función de estos dientes es raspar, como si se tratase de una lima, el alimento.

Pie: El pie corporal donde reposa el cuerpo del animal es de forma alargada y representa la mitad del peso corporal. Dada la estructura de fibras lisas y su capacidad secretora de una sustancia mucosa procedente de la glándula del pie, los caracoles en forma lenta, pero potente, reptan la región media superior derecha del pie.

Seguramente muchas veces hemos observado el rastro dejado por un caracol de tierra y nunca nos hemos parado a pensar que función tiene esta baba para el animal. Pues bien, los caracoles segregan esta baba viscosa, a modo de lubricación y pegamento que les permite subir por zonas inclinadas, y además tiene una importante función protectora contra la desecación y el ataque de depredadores aumentando la secreción en estos casos. Se puede observar el rastro dejado por un caracol debido a que la baba

en contacto con el aire se seca rápidamente y este hecho también es utilizado por los depredadores para saber por donde ha pasado y darle alcance (Maceda, 2005).

El pie está unido a la concha mediante un músculo muy fuerte.

Masa visceral: Está cubierta por el manto (estructura interior del animal) y situado en el interior de la concha, en ésta se encuentran los aparatos digestivos, circulatorios, respiratorio, excretor y reproductor (Maceda, 2005) (Anexo N° 1, esquema N° 3).

1.1.2 Nutrición del caracol.

El caracol tiene una forma muy particular de comer. Al no tener una mandíbula, no mastica los alimentos si no que los ralla sobre la rádula (que etimológicamente significa rallador). La rádula es un órgano masticador característico de los moluscos. Se presenta en forma de lengua dotada de una gran cantidad de dientecillos. No es sorprendente, por lo tanto, que con semejante armamento los caracoles provoquen destrozos relativamente importantes en los huertos. En efecto, los gasterópodos de nuestras latitudes son esencialmente vegetarianos, se alimentan de hojas tiernas cuando la higrometría es considerable. Tienen costumbres más bien nocturnas y raramente operan durante el día (Centro de helicultores de Argentina, 1997).

En criadero los alimentos del caracol pueden ser proporcionados en tres formas:

- Alimento natural.
- Alimento cultivado.
- Concentrado o alimento deshidratado.

El alimento natural consiste en proveer al molusco de vegetales que aporten las vitaminas y minerales necesarios para que el caracol se desarrolle (González, 2003).

No es recomendado alimentar a los caracoles con hojas cortadas o trozos de frutas o verduras ya que su descomposición atrae insectos y acarrearía problemas sanitarios. Esto se puede hacer siempre y cuando se retiren los restos antes de que empiecen a ponerse en mal estado.

El alimento cultivado consiste en cultivar plantas en el terreno en que se introducirán posteriormente los caracoles, dicho terreno debe disponer de una cantidad suficiente de plantas. En general se pueden cultivar coles, repollo, acelga y remolachas.

Los concentrados están constituidos por diversos insumos, que pueden ser de origen vegetal, donde toman importancia los cereales como maíz, trigo, cebada, avena, soya y los subproductos de éstos, que resultan de los diferentes procesos de transformación para el consumo humano. También son utilizados productos de origen animal, pero en menor cantidad, tales como harina de pescado, harina de carne y huesos.

No se puede dejar de lado el aporte mineral, principalmente de calcio, fósforo, magnesio y potasio.

El consumo de alimento crece en concordancia con el engorde del caracol. Los valores para el consumo diario de concentrado tienen que referirse al peso o la edad del caracol y se les debe administrar la ración justa de comida de forma tal que no sobre de un día para otro. El alimento se debe mantener almacenado en un lugar bien seco para que no se desarrollen hongos (González, 2003).

1.1.3 Reproducción del caracol.

Otra característica excepcional del caracol es que es hermafrodita. Este término significa que el animal posee ambos sexos: masculino y femenino; pero contrariamente

a lo que se pudiera pensar, ello no basta para asegurar la descendencia. Esto quiere decir que requiere la presencia de otro caracol para llevar a cabo el proceso de fecundación ya que éste no se autofecunda.

La esperanza de vida de un caracol ronda los 4 a 5 años (González, 2003).

1.2 El caracol y la medicina.

La medicina popular ha utilizado, desde las épocas más remotas, sustancias naturales para curar o aliviar enfermedades. Además de las plantas, que son siempre válidas en este sentido, eran numerosas las materias animales que formaban parte de la composición de diversas pociones usadas con fines medicinales.

El caracol ha gozado de prestigio entre los magos y curanderos de antaño.

En la antigüedad, Plinio e Hipócrates lo recomendaban en ginecología para facilitar los partos. Cosa curiosa es que muchos romanos lo consideraban como un buen remedio para indigestiones.

El padre de la cirugía, Ambroise Paré (1517-1590), receta caracoles para el tratamiento de la epidermis de las mujeres (era creencia que la piel se volvía suave y satinada si se frotaba un caracol).

Hoy en día, la concha de este molusco es utilizada por su alto contenido de calcio. De los desechos del caracol son aprovechables los excrementos que poseen ácido úrico en abundancia, por lo que son utilizados como un excelente fertilizante de plantas.

Desde mucho tiempo se ha conocido el efecto curativo que tiene la baba de caracol sobre la piel. Lo consignaron médicos y naturalistas de la antigüedad y la medicina

popular, a través de un repertorio de conocimientos empíricos, que se propagaron a través de los tiempos (Garmendia, 2003).

Lo cierto es que se sabía que en los cultivadores de caracoles (que tan buscados han sido en gastronomía) curaban rápidamente los pequeños cortes y heridas que se producían en el manejo de las jaulas de estos moluscos, además la piel de sus manos mantenía un correcto tropismo e hidratación, a pesar del duro trabajo realizado. Todo ello hizo pensar que había algunas sustancias específicas en esta secreción que comunicaban a la piel su papel protector y estimulante (www.elicinachile.com).

Para este fin es necesario extraer la baba de los caracoles. El proceso de extracción de la baba es artesanal, implicando mucha mano de obra, de hecho no requiere maquinaria sofisticada ni costosa, aunque sí instalaciones bien acondicionadas para desarrollar un proceso con alta higiene y contaminación muy baja. Existen diversos métodos para la extracción, entre ellos se pueden mencionar:

- ❖ Estimulación de los caracoles con agua.
- ❖ Adición de sal para su excitación y posterior liberación de la baba.
- ❖ Raspaje del pie del molusco para su estimulación y excreción de la baba.

Hoy en día, de la baba se elaboran cremas antiarrugas, antiacné, para quemaduras, etc. Esto, porque los productores aseguran que la baba es rica en alantoína, colágeno, elastina, ácido glicólico, vitaminas y antibióticos naturales (www.bioskincare.com).

Tal como hemos dicho la baba estaría compuesta por varias sustancias las cuales en la piel producen diversas funciones.

Por ejemplo: la alantoína se describe como una sustancia queratolítica y astringente, promueve de esta manera la eliminación de células muertas y ayuda a la regeneración

de los tejidos. Ha sido recomendada para el tratamiento de patologías con hiperqueratosis como la psoriasis (Tyler, 2000.).

Con respecto al ácido glicólico, están ampliamente descritos los beneficios obtenidos en la piel después de su aplicación, como disminución del grosor del estrato córneo. Además aumenta la producción de colágeno y ácido hialurónico en la piel y promueve la proliferación de fibroblastos, por lo cual ha sido utilizado en el tratamiento del acné, fotoenvejecimiento, melasma, psoriasis, rosácea, xerosis y queratosis actínica (Kim et al, 1998).

Si bien están documentados los beneficios terapéuticos de la alantoína y el ácido glicólico, no está científicamente confirmada la presencia, ni la cantidad de ellos, en la secreción del caracol.

1.3 La alantoína.

La alantoína es una sustancia química que también recibe los nombres de: 5-ureido-hidantoína, diureido del ácido glioxílico (Anexo N° 1, esquema N° 4).

Su estructura química es: $C_4 H_6 N_4 O_3$ y su peso molecular 158.12 g/mol

Su aspecto es de placas o prismas monocíclicos incoloros y brillantes o polvo cristalino, inodoro e insípido (The Merck Index, 2001).

Solubilidad:

Disolvente	Temperatura	Solubilidad
Agua	25° C	0.6%
	40° C	1.1%
	70° C	3.6%

Etanol (96%)	25° C	0.04%
	40° C	0.05%
Etanol/Agua (1/1)	25° C	0.35%
	40° C	0.65%

La alantoína es casi insoluble en éter y cloroformo. Hasta ahora no se conocen solubilizantes útiles en el campo farmacéutico y cosméticos. Se disuelve fácilmente en álcalis descomponiéndose en ellos. El pH de la solución acuosa al 0.5% es entre 4 y 6. La alantoína tiene carácter anfótero, por lo que se pueden obtener tanto las sales metálicas como también el nitrato (www.merck.cl).

Punto de descomposición: la alantoína no tiene un punto de fusión definido que pueda ser utilizado como criterio de pureza. Sólo muestra un punto de descomposición, que oscila según el método empleado para su determinación por ej. USP XVIII, método 1ª: aprox. 230° C, fus-o-mat: aprox 244° C (www.merck.cl).

Isómeros ópticos: la forma estable de la alantoína es la racémica ópticamente inactiva, que es también la del producto comercial (www.merck.cl).

Estabilidad: la estabilidad de la alantoína en preparaciones secas es buena. Los preparados farmacéuticos y cosméticos hidratados son suficientemente estables en condiciones normales de almacenamiento en un medio ácido o neutro.

Sometiendo durante una hora una solución acuosa al 0.5% a calentamiento de 80° C, la alantoína no sufre alteración alguna. No obstante, se destruye por cocción prolongada de la solución acuosa así como por la acción de álcalis fuerte (www.merck.cl).

Almacenamiento: La sustancia ha de conservarse en recipientes bien cerrados; y las soluciones deben guardarse a temperatura ambiente y al abrigo de la luz (www.merck.cl).

Acción: La acción de la alantoína en el tratamiento de heridas tiene una naturaleza compleja. En primer lugar, ha de limpiarse la zona de la herida. La proliferación celular es favorecida por la alantoína, lo que acelera la regeneración de la piel.

En la mayoría de los casos el dolor de la herida cesa poco después de las primeras aplicaciones de alantoína. Esta sustancia carece de propiedades antisépticas (www.merck.cl).

La alantoína también produce una proliferación celular y una rápida epitelización en zonas de la piel superficialmente lesionadas o sometidas a un gran desgaste o a las inclemencias del tiempo. Así desaparecen los estados irritativos de la piel, asperezas, grietas y otras manifestaciones antiestéticas. La alantoína hace que la piel intacta de la cara y del cuerpo quede suave, tersa y sana (Dallet et al, 2000).

Los pormenores del mecanismo de acción no están todavía completamente aclarados. En determinadas condiciones, la alantoína puede descomponerse en urea por vía química o enzimática. Sin embargo, esta descomposición no se produce en el organismo humano por lo que los efectos mencionados de la alantoína se atribuyen a esta sustancia y no a la presencia de la urea, según pudo confirmarse por medio de experimentos en animales (www.merck.cl).

La tolerancia de la alantoína es excelente. En la bibliografía no se encuentra ninguna clase de datos sobre efectos secundarios tóxicos, reacciones alérgicas o estados irritativos de las zonas de la piel que han sido tratadas con ella. Según los

conocimientos actuales puede decirse que no posee efecto cancerígeno (www.merck.cl).

Aplicaciones: Según lo expuesto, la alantoína es un excelente principio activo para una serie de preparados farmacéuticos y cosméticos. En tales preparaciones puede ser la alantoína el único principio activo. Además la alantoína es compatible con un gran número de principios activos empleados en farmacia, dermatología y cosmética, lo que hace posible toda clase de combinaciones para elaborar preparados con fines específicos. Por ello, la alantoína puede incorporarse sin dificultad a productos ya terminados (www.merck.cl).

El empleo de la alantoína para dichos fines resulta económico, ya que las concentraciones necesarias son bastante pequeñas. La FDA recomienda rangos seguros y efectivos de 0.5 a 2% de alantoína (www.merck.cl).

Síntesis: Es un producto del metabolismo de purinas (The Merck Index, 2001). En casi todos los organismos, las vías primarias de degradación del GMP y AMP constan de reacciones independientes que convergen en la producción de xantina. La conversión de la guanina del GMP en xantina es directa, mientras que la formación de xantina a partir de la adenina del AMP es indirecta.

Después de una desfosforilación del AMP, la unidad de adenina de la adenosina se convierte en hipoxantina para formar inosina. Luego la inosina es hidrolizada para formar hipoxantina como base libre, la que por último es oxidada a xantina por acción de la oxidasa de la xantina.

Según el organismo los destinos subsecuentes de la xantina son diversos. En casi todos los primates (incluido el ser humano), las aves, ciertos reptiles y la mayor parte

de los insectos, la xantina se convierte por acción de la oxidasa de la xantina en ácido úrico, el cual es excretado como producto final del catabolismo de las purinas (Mathews, 1998).

En los demás animales terrestres el producto final es la alantoína, que se forma por oxidación ulterior del ácido úrico. En los anfibios y los peces, la alantoína se degrada aún más a ácido alantóico. En muchos microorganismos el ácido alantóico se convierte en glioxilato y urea. Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas y constituyen ejemplos de temas de unidad y diversidad bioquímica (Mathews, 1998) (Anexo N° 1, esquema N° 5).

La alantoína puede ser preparada sintéticamente por la oxidación de ácido úrico con permanganato de potasio (The Merck Index, 2001).

1.4 Consideraciones analíticas sobre la alantoína.

- Tratamiento de muestras biológicas.
- Bases de la separación cromatográfica.
- Validación de metodologías analíticas.

1.4.1 Tratamiento de muestras biológicas.

Muchos estudios se han realizado para la determinación de metabolitos de purina en orina de rumiantes y fluidos corporales. Estos estudios incluyen la determinación de alantoína por métodos colorimétricos basados en la cuantificación del grupo aldehído del ácido glioxílico formado por la hidrólisis de alantoína. Este método, sin embargo, carece de especificidad debido a la presencia de compuestos que interfieren en la

determinación y que son muy sensibles a las condiciones analíticas empleadas (Shingfield et al, 1999).

Hoy en día la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cromatográfica rápida y exacta. Varios métodos han sido desarrollados para la separación de alantoína por esta técnica utilizando para ello HPLC en fase reversa con una columna C-18, bajo condiciones isocráticas utilizando como fase móvil buffer fosfato de amonio, o de potasio. También se describen métodos que utilizan gradientes de elusión incluyendo éstos un buffer y metanol (Terzuoli et al, 1999) (Iris et al, 1999).

En el análisis de sustancias por HPLC normalmente se trabaja con muestras biológicas que en general no se pueden inyectar directamente en el cromatógrafo, principalmente por que las proteínas precipitan en la columna, lo que aumenta la presión y como consecuencia se produce el derrumbamiento de la fase estacionaria. Esto explica, junto a otras razones (como son el tener que concentrar la muestra, entre otras), que sea necesario realizar un acondicionamiento previo de la muestra. Dicho acondicionamiento puede ser muy variado dependiendo tanto del tejido o fluido biológico del que se trate, como de la sustancia a analizar, y puede ir desde una simple precipitación hasta una combinación de varias técnicas (Quattrochi et al, 1992).

Según la complejidad del acondicionamiento sería necesario o no el uso de un estándar interno para la cuantificación de la sustancia en el medio biológico, siendo más necesario cuanto más complejo sea el tratamiento requerido para el análisis de la muestra problema (Universidad de Salamanca, 1997).

Acondicionamiento:

- Precipitación de proteínas.
- Extracción líquido – líquido.
- Extracción por pares iónicos.
- Extracción líquido – sólido.
- Reacción de derivatización precolumna.
- Dilución (Quattrochi et al, 1992).

1.4.1.1 Precipitación de proteínas

Las proteínas presentes en las matrices biológicas deben eliminarse antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC para evitar que precipiten dentro del equipo cromatográfico. Esta operación se denomina desproteínización y es una forma particular de separación de sustancias (Quattrochi et al, 1992).

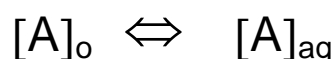
Se realiza con el agregado de varios agentes entre ellos: solventes orgánicos, sales, ácidos o cationes o bien por ultrafiltración.

Los solventes orgánicos como el metanol, acetonitrilo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y en condiciones adecuadas, inducen su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteínizar. Estos solventes orgánicos son utilizados en proporción 1/1. Tiene la ventaja que al no ser tan enérgicos no suelen degradar la muestra. El principal problema que pueden plantear es que al ser precipitantes suaves queden proteínas disueltas en el sobrenadante y que éstas sean inyectadas con el consiguiente deterioro de la columna (Quattrochi et al, 1992).

Ciertos ácidos (túngstico, tricloroacético (TCA), perclórico, metafosfórico, y una mezcla de ácido túngstico y metafosfórico) forman sales insolubles con las proteínas cargadas positivamente. El más utilizado es el ácido tricloroacético, precipitante energético que suele utilizarse al 10-20% y en una relación de volumen 1/10 - 1/5. Uno de los problemas que se plantean, es que la sustancia a analizar se degrade con él y por tanto, si bien se consigue una buena precipitación, su uso no sería adecuado por razones obvias. Otro problema que se puede plantear es que se acidifique mucho la muestra. Recordemos que las columnas de cromatografía líquida de fase reversa de sílice, que son las más comúnmente utilizadas, tiene su máxima estabilidad en un margen de pH 3 a 7, si bien se consideran estables en un margen de pH de 2 a 8, a pH mayores o menores la sílice se derrumba en el interior de la columna lo que explica el uso de fases móviles tamponadas (Quattrochi et al, 1992).

1.4.1.2 Extracción líquido - líquido.

La extracción líquido - líquido es la distribución (partición) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está representado por el equilibrio:



Donde $[A]_o$ es la concentración de analito en la fase orgánica, y $[A]_{aq}$ es la concentración de analito en la fase acuosa.

La distribución (coeficiente de distribución) está dado por la relación de concentración de analito en las dos fases, es decir:

$$K = \frac{[A]_o}{[A]_{aq}}$$

Donde K es el coeficiente de partición de actividades de A (Quattrochi et al, 1992).

En determinadas ocasiones, dada la complejidad de los medios biológicos, es necesario recurrir a la realización de una extracción de la sustancia a determinar con un solvente orgánico tipo benceno, ciclohexano o cloruro de metilo, de forma que lo primero que hacemos es añadir un tampón para llegar a un pH determinado y alcanzar un coeficiente de reparto adecuado para que la sustancia sea extraíble por el disolvente orgánico (Universidad de Salamanca, 1997).

Hay que tener cuidado de no inyectar nada que no sea miscible con la fase móvil que se utiliza, por lo cuál es necesario evaporar el disolvente orgánico a sequedad, redisolviéndose posteriormente el residuo seco en un vehículo hidroalcohólico (generalmente la misma fase móvil utilizada en la determinación con lo cuál se minimizan las posibles interferencias) (Universidad de Salamanca, 1997).

1.4.1.3 Extracción por pares iónicos.

En el caso de la determinación de una sustancia ionizada, extraerla con un disolvente orgánico es difícil. En estos casos tenemos dos opciones:

- 1) Realizar extracciones con un disolvente orgánico para extraer impurezas, y quedarnos con la fase acuosa.
- 2) Recurrir a la formación de un par iónico; para ello se utiliza un contraión (tetrabutilamonio, ácido pentanosulfónico, ácido heptanosulfónico, etc.) de manera que

se forma un complejo neutro y más apolar cuanto mayor sea la cadena hidrocarbonada del contraíón. Este complejo se puede extraer con un disolvente orgánico tipo benceno, cloruro de metileno, etc.

Al realizar este tipo de acondicionamiento es necesaria la utilización de una fase móvil de par iónico, con un contraíón igual o diferente al utilizado en la extracción, según la sustancia y las características del análisis (Universidad de Salamanca, 1997).

1.4.1.4 Reacción de derivatización precolumna.

Una de las limitaciones de la cromatografía líquida es que el detector puede no ser sensible a determinadas sustancias, lo cual ha llevado a desarrollar técnicas auxiliares entre las que se encuentran los procesos de derivatización. Esta técnica permite mediante una transformación química de los compuestos que se analizan obtener derivados con una estructura química y un comportamiento totalmente diferente, pero más fácilmente cromatografiables, modificando indirectamente la eficacia o la sensibilidad del detector y haciendo posible el análisis (Universidad de Salamanca, 1997).

1.4.1.5 Dilución.

Es una técnica muy utilizada en el análisis de sustancias en orina. En dicho tipo de muestras, si la orina es normal, no existen generalmente proteínas y el problema es que la muestra está muy concentrada, por lo que se recurre a la dilución con agua o con fase móvil.

En algunos casos, antes de la inyección, se hace pasar la muestra a través de un filtro millipore de 0,45 μm o, lo que es más común, se centrifuga para precipitar las partículas que puedan existir (Universidad de Salamanca, 1997).

1.4.2 Bases de la separación cromatográfica.

La cromatografía es una técnica de separación de sustancias que fue empleada por primera vez por el botánico Ruso Tswett en 1906 para el aislamiento de diversos pigmentos vegetales. El hizo pasar un extracto de hojas verdes en éter de petróleo a través de un tubo o columna de vidrio rellena de carbonato cálcico finamente pulverizado. Se separaron así una serie de bandas coloreadas correspondientes a los distintos pigmentos, lo que explica el nombre de cromatografía (en griego "escritura en color") dado por Tswett a este tipo de separación. El paso posterior de un disolvente a través de la columna, de manera continua, permitió que las diversas bandas fueran sacadas o eluidas de la columna en el disolvente que sale por el extremo de la misma (Universidad de Salamanca, 1997).

Los procedimientos cromatográficos pueden clasificarse según el método y según la técnica. El método se refiere al estado físico de la fase estacionaria y móvil implicada, así como los procesos fundamentales que regulan la retención de los componentes de la muestra en la fase estacionaria.

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o un líquido disperso sobre un soporte sólido inerte y la fase móvil un líquido o un gas. Surgen así los métodos cromatográficos: cromatografía gas - líquido (CGL), cromatografía líquido - líquido (CLL), cromatografía gas - sólido (CGS) y cromatografía líquido - sólido (CLS). Estos

métodos cromatográficos atendiendo a las fuerzas que retienen a la muestra en la fase estacionaria pueden clasificarse en cromatografía de partición, cromatografía de adsorción y cromatografía de intercambio iónico (Universidad de Salamanca, 1997).

En este trabajo nos referiremos a la cromatografía líquida.

1.4.2.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico alrededor del cuál se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple, el cromatógrafo líquido estará constituido por:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector (Anexo N° 1, esquema N° 6) (Quattrochi et al, 1992).

La señal del detector es siempre analógica y puede ser utilizada tal cuál por un registrador gráfico o por un integrador o digitalizador, para que pueda ser interpretado y procesado por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Un gráfico, que es el cromatograma, el cual relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elusión.

- Un eluido o eluato, que corresponde al fluido proveniente de la columna y si es recolectado ya sea, en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil e idealmente los componentes de la muestra separados (Quattrochi et al, 1992).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en sus variadas formas, encuentra aplicaciones en todas las ramas de la ciencia. Puede ser usada en una amplia variedad de muestras iónicas y muestras complejas encontradas en las ciencias biológicas (Quattrochi et al, 1992).

La técnica se basa en la habilidad de una columna cromatográfica, empacada con una fase estacionaria, para separar los componentes de una mezcla. Esta mezcla de componentes es disuelta en una fase móvil o eluente, y pasada a través de la columna. Un adecuado sistema de detección localiza los analitos presentes en el eluente, midiendo sus propiedades físicas o químicas. Un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo, o volumen de eluente, muestra una serie de picos llamados cromatograma (Quattrochi et al, 1992).

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria, así el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir (es decir, en salir de la columna) y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes (Quattrochi et al, 1992).

1.4.2.2 HPLC en Fase Reversa.

Sobre el 80% de los métodos de análisis por HPLC publicados se realizan usando columnas en fase reversa. En este método, la fase estacionaria es de polaridad menor que el eluyente y los componentes de la muestra son eluidos en orden de polaridad. El componente más polar eluye primero. La retención y la selectividad pueden ser alteradas por cambios de la polaridad de la fase estacionaria o, (más fácilmente) del eluyente (Anexo N° 1, esquema N° 7) (Puentes, 2004).

Las ventajas que presenta la cromatografía en fase reversa son variadas:

- ❖ Puede separar muestras de un amplio rango de polaridades.
- ❖ Permite la elección dentro de una amplia variedad de fases estacionarias.
- ❖ Usa fases móviles relativamente económicas.
- ❖ Hay un rápido equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria.
- ❖ Provee una separación rápida, simple y reproducible (Puentes, 2004).

Las limitaciones que presenta son:

- ❖ Muchas fases unidas a la sílica son estables sólo entre pH 3 y 8.
- ❖ La presencia de grupos silanoles no reactivos en la superficie de la sílica pueden producir colas en los picos, incrementar los tiempos de retención y causar irreproducibilidad en análisis entre columnas.
- ❖ Los mecanismos de retención de fase reversa aún no han sido completamente entendidos (Puentes, 2004).

La fase estacionaria más comúnmente usada es el octadecilsilano (ODS), la cual tiene grupos alquílicos C-18, químicamente unidos. Otras fases estacionarias tienen cadenas alquílicas más cortas, C-8, o grupos fenólicos y ciclohexílicos (Anexo N° 1, esquema N° 8).

Los tiempos de retención aumentan cuando aumenta el número de átomos de carbono unido en la fase estacionaria.

Los solventes usados generalmente en fase reversa son mezclas acuosas o soluciones buffer. Los solventes orgánicos miscibles en agua más frecuentemente usados son metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano (THF) (Puentes, 2004).

1.4.3 Validación de la metodología analítica

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse (Quattrochi et al, 1992).

1.4.3.1 Exactitud:

La exactitud de un método analítico se define como la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. Si la diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero es pequeña, la exactitud es buena. Una diferencia grande significa que la exactitud es inadecuada y revela la existencia de errores que deben corregirse.

La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto.

Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada.

Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos muy laboriosos, con varias fases, extracciones, purificaciones, etc. que se traducen, inevitablemente, en una disminución de la recuperación.

Un estudio de exactitud permite establecer el porcentaje de recuperación promedio. Si el porcentaje es bajo se pueden utilizar factores de corrección. Otra alternativa es utilizar el método de patrón interno que se añade en las primeras fases de preparación de la muestra.

La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico (Universidad de Salamanca, 1997).

Para la determinación, en el caso de la valoración de una sustancia, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de pureza conocida (como por ejemplo una sustancia de referencia) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida (Quattrochi et al, 1992).

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a las cuales se les han agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse sobre muestras (sustancia o producto farmacéutico) a las que se les han agregado cantidades conocidas de impurezas. Si es imposible obtener muestras de las impurezas y/o los productos de degradación, es aceptable comparar los resultados obtenidos por un método independiente (método farmacopeico u otro método analítico validado). En ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de impureza comparando su respuesta con la respuesta de la sustancia, en estos casos debe emplearse el factor de respuesta si se conoce (Quattrochi et al, 1992).

La exactitud debe evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado (como por ejemplo tres concentraciones/ tres repeticiones completas del método) (Quattrochi et al, 1992).

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a partir de la valoración de una cantidad agregada conocida del analito en la muestra, o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza (Quattrochi et al, 1992). Para la determinación del % de recuperación se utiliza la siguiente formula:

$$R = (X_i / X_0) \times 100$$

Donde X_i es el valor medido y X_0 el valor verdadero (Universidad de Salamanca, 1997).

Las concentraciones deberán cubrir el rango concerniente y particularmente incluir una concentración cercana al límite de cuantificación.

La recuperación esperada va a depender de la matriz de la muestra, el procedimiento de proceso de la muestra y de la concentración del analito. La AOAC (Association of Official Analytical Chemists) incluye una tabla con la recuperación estimada en función de la concentración del analito (Anexo N° 2, tabla N° 2) (Huber, 1998).

1.4.3.2 Precisión:

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones (Quattrochi et al, 1992). El estimador S de la desviación estándar se calcula como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Donde n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i y \bar{X} el estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Por su parte, la desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calcula como:

$$RSD = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}}$$

La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- ◆ *La repetibilidad* es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados, generalmente, en un corto intervalo de tiempo.
- ◆ *La precisión intermedia* expresa las variaciones intralaboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. (Quattrochi et al, 1992).
- ◆ *La reproducibilidad* es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes (diferentes analistas, aparatos, días, etc.).

La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. Un estudio de precisión requiere la repetición del análisis sobre una muestra. La precisión así obtenida se denomina “del método” puesto que incluye todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la lectura instrumental. También se puede determinar directamente la precisión del “sistema instrumental”, hallando la variabilidad de respuesta de una solución patrón (Quattrochi et al, 1992).

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (como por ejemplo, tres concentraciones /tres repeticiones de cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100% del valor declarado (Universidad de Salamanca, 1997).

Los criterios de aceptación para la precisión dependen mucho del tipo de análisis. Para análisis de control de calidad de productos farmacéuticos se acepta para el parámetro de precisión un coeficiente de variación de un 1%, para muestras biológicas se acepta un coeficiente de variación de 15%. Para muestras en alimento la precisión es dependiente de la matriz de la muestra, la concentración del analito y de la técnica de análisis, acá el coeficiente de variación puede variar entre un 2% hasta un 20%.

La AOAC incluye una tabla con la estimación de datos de precisión en función de la concentración de analito en la muestra (Anexo N° 2, tabla N° 1) (Huber, 1998).

1.4.3.3 Linealidad:

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado. En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta (Quattrochi et al, 1992).

La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ejemplo cálculo de regresión por cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión (Universidad de Salamanca, 1997).

Para establecer la linealidad se deben investigar un mínimo de cinco concentraciones y estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión $Y = bX + a$ (Quattrochi et al, 1992).

También se recomienda considerar los siguientes intervalos:

Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120% de la concentración de ensayo.

Para la determinación de una impureza: de 50 a 120% de la especificación.

Para la determinación de uniformidad de contenido: un mínimo de 70 a 130% de la concentración de ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica (Hubert, 1998).

1.4.3.4 Sensibilidad (Límite de Detección y Límite de Cuantificación):

La sensibilidad es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración.

- *El límite de detección* es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales (Quattrochi et al, 1992).

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 o 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto (Quattrochi et al, 1992).

- *El límite de cuantificación* es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleada para el analito de la muestra.

Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental (Quattrochi et al, 1992).

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal-ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación (Quattrochi et al, 1992).

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto (Quattrochi et al, 1992).

Para el límite de detección y cuantificación se aplica la siguiente fórmula en el caso de procedimientos cromatográficos, tales como HPLC y cromatografía gaseosa:

$$L(x) = \frac{Y_{bl} + K \times S_{bl}}{b}$$

$L(x)$ = Límite de Cuantificación o Detección.

K = Constante ≥ 3 .

Usualmente $K = 3$ para Límite de Detección y $K = 10$ para Límite de Cuantificación.

S_{bl} = Desviación estándar de la respuesta de los n blancos.

b = pendiente de la recta de calibración a bajas concentraciones (Quattrochi et al, 1992).

1.4.3.5 Selectividad y Especificidad.

La selectividad de un método analítico es la capacidad de medir un analito en presencia de interferencia, tales como excipientes, enantiómeros y productos de degradación que pueden estar presente en la matriz de la muestra, así como también la capacidad de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra. La selectividad de un método analítico se puede determinar comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias (Universidad de Salamanca, 1997).

En el caso de matrices complicadas como muestras naturales o fluidos biológicos donde la complejidad de la matriz dificulta la identificación de los picos cromatográficos, se deberá recurrir a otros tipos de métodos para la determinación de la selectividad (Universidad de Salamanca, 1997).

En muchos casos, la determinación de la especificidad no puede seguir modelos tan sistemáticos, como por ejemplo, evaluar las rutas de degradación y métodos de ataques para luego crear un ensayo de degradación artificial. Entonces la determinación de este parámetro dependerá del arte o ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias:

El tiempo de retención, sirve como primera base para la identificación del pico, pero esto a veces no resulta suficiente. En el caso de disponer de estándares, la coinyección de éstos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, de hombros, si es posible por la derivación de la señal, etc.) puede servir como primera aproximación (Quattrochi et al, 1992).

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La baba de caracol chileno (*Helix aspersa müller*) contiene alantoína, la que se podrá cuantificar utilizando para ello la técnica instrumental cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permite identificar y cuantificar sustancias presentes en matrices biológicas con alta precisión.

3. **OBJETIVOS.**

3.1 **Objetivo general.**

Desarrollar, implementar y validar un método analítico para la identificación y cuantificación de alantoína en la baba de caracol chileno.

3.2 **Objetivos específicos.**

- ⌘ Revisar la bibliografía científica relacionada con la determinación cuali y cuantitativa de alantoína en fluidos biológicos por medio de HPLC.

- ⌘ Desarrollar e implementar la metodología analítica para la identificación y cuantificación de alantoína en la secreción del caracol silvestre chileno, basándose para ello en la literatura revisada.

- ⌘ Determinar la confiabilidad del método analítico a través de la determinación de los parámetros de validación: linealidad, exactitud, precisión, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad.

- ⌘ Determinar cuali y cuantitativamente la presencia de alantoína en la secreción de *Helix aspersa müller*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se desarrolló un método analítico para determinar alantoína en muestras de baba de caracol chileno (*Helix aspersa mülller*). Previo a la determinación fue necesario realizar una extracción de los componentes presentes en la matriz de la muestra y que por sus características, podrían interferir en la separación cromatográfica de la alantoína y su posterior cuantificación.

4.1 Instrumental y Equipos.

- * Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Jasco.
- * Detector UV-Visible Jasco con lámpara de deuterio modelo UV- 2075 plus.
- * Bomba cuaternaria Jasco modelo PU-2089 plus.
- * Balanza analítica digital Denver Instrument Company[®] modelo AA200.
- * Medidor de pH Hanna Instrument[®] modelo HI9321.
- * Columna Phenomenex[®] C-18 4,6 x 250 mm, 5 micron.
- * Vortex Genie-2 VWR scientific.
- * Sistema filtrante para fase móvil membrana tamaño de poro 0.2µm
- * Jeringa 100 µL Hewlett Packard.
- * Jeringa de 100 mL.
- * Filtros millipore MFS[®], con tamaño de poro 0,2 µm.
- * Material de laboratorio de vidrio.

4.2 Reactivos.

- * Agua, grado HPLC Merck®.
- * Metanol, grado HPLC Merck®.
- * Fosfato de amonio dihidrogenado para análisis Merck®.
- * Diclorometano para análisis Merck®.
- * Hexano para análisis Merck®.
- * Ácido fosfórico 85% Merck®.
- * Ácido tricloroacético 10% (TCA) Merck®.
- * Estándar de alantoína Sigma®.
- * Fase móvil: buffer fosfato de amonio dihidrogenado 5mM pH3.

4.3 Muestras

Secreción de caracol chileno (*Helix aspersa müller*) obtenido de un criadero situado en la localidad de Caulín, X Región. Las muestras fueron obtenidas los primeros días de marzo (período previo a la hibernación). En este criadero los caracoles son alimentados con concentrados que contienen cereales de trigo, cebada, avena, soya y los subproductos de éstos y cal que aporta la cantidad necesaria de calcio.

4.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA.

El desarrollo del método de determinación de alantoína en baba de caracol chileno por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se realizó en las siguientes etapas:

- * Tratamiento de las muestras.
- * Condiciones cromatográficas.
- * Preparación de estándares.
- * Validación del método analítico.

4.4.1 Tratamiento de las muestras.

Las muestras de baba de caracol fueron obtenidas estimulando a estos moluscos con agua. Las muestras de secreción fueron fraccionadas en bolsas plásticas y congeladas a -4°C para su manutención.

El día del análisis, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y se tomó una cantidad exacta de 3 mL y se adicionaron 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, para la desproteización de la muestra. La muestra se dejó reposar durante 15 min. a 8°C y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm por 15 min. El sobrenadante se separó del pellet y se conservó para el paso siguiente del análisis.

Al inyectar el sobrenadante directamente en el cromatógrafo después de la desproteización, se observó una gran cantidad de picos en el cromatograma posteriores al tiempo de elusión de la alantoína, demorando de esta forma el proceso de análisis. Otro inconveniente de esto era que la columna se debía lavar con mayor frecuencia debido a la acumulación de sustancias presentes en la secreción que se retenían por mayor tiempo en la columna. Como la alantoína es una molécula polar y es casi insoluble en solventes orgánicos, extraerla sería difícil. Es por esto que se realizó una extracción con una mezcla de solventes orgánicos hexano y diclorometano en una relación de 3:1 (tras haber probado con otros solventes y otras proporciones de estos),

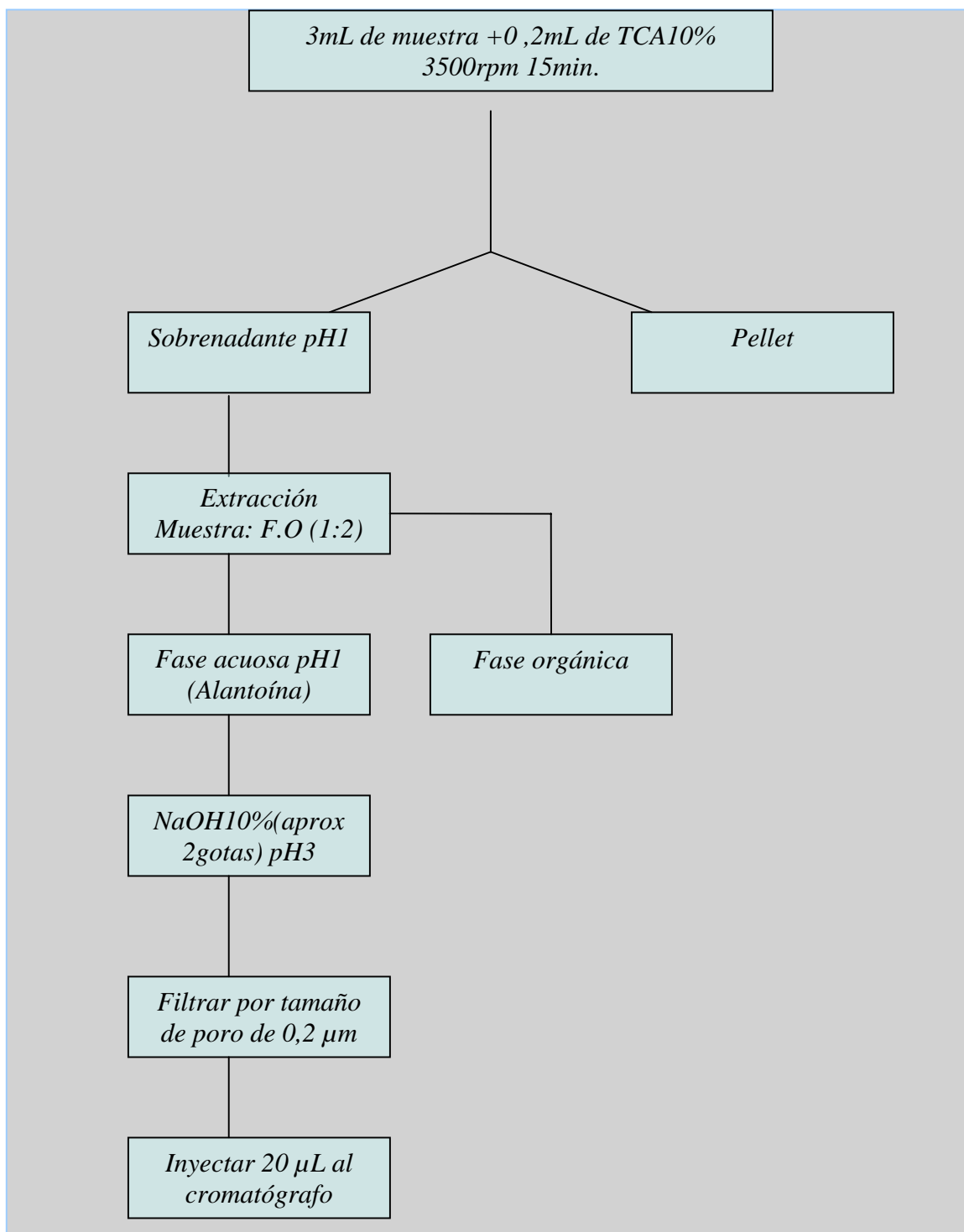
con el propósito de extraer las impurezas de la muestra que interfieren posteriormente en el análisis de la alantoína, la cual queda en la fase acuosa. Una vez realizada la extracción y luego de inyectar la fase acuosa en el cromatógrafo, se observó en el cromatograma una disminución del número de picos que eluían posteriormente a la alantoína.

Para realizar la extracción se agregó la muestra y la mezcla de solventes orgánicos en una proporción de 1:2 a un embudo de decantación de 100 mL. El embudo se agitó por 2 min. y se dejó reposar para finalmente separar la fase acuosa de la fase orgánica. La sustancia de interés (alantoína) se encontraba en la fase acuosa, por lo tanto la fase orgánica (F.O), que contiene sustancias que interfieren en la determinación de alantoína y que además presentan la característica de ser más apolares, fue descartada.

La fase acuosa (que presentó pH1 por la adición del TCA al 10% para la desproteínización) se llevó a pH3 con hidróxido de sodio al 10%, ya que de ser inyectada a pH1 la columna se dañaría tras un período largo de análisis. Además se observó que se obtenían los mismos resultados en el análisis cromatográficos al hacer la extracción a pH1 o a pH3. En el caso de trabajar a pH1, se puede hacer el ajuste de pH hasta pH3 antes de inyectar, obteniéndose igualmente el mismo resultado que si se hace a pH1, con la ventaja de no estar dañando la columna.

Luego la fase acuosa se hizo pasar por filtros cuyo tamaño de poros es de 0,2 μm para finalmente inyectar 20 μL al cromatógrafo.

El siguiente diagrama muestra el protocolo a seguir para el tratamiento previo a la inyección de la muestra.

Protocolo de tratamiento de muestra para ser inyectada al equipo de HPLC.

4.4.2 Condiciones Cromatográficas.

Para la implementación de la técnica analítica, especialmente para establecer las condiciones cromatográficas, se revisó bibliografía que contenía estudios para la determinación de alantoína y derivados de purinas en orina de rumiantes y fluidos biológicos en humanos. Se probaron diversos métodos, a los cuales se les realizaron ciertas modificaciones de manera de conseguir una separación adecuada de la sustancia en estudio, quedando las siguientes condiciones cromatográficas definidas para el análisis:

El análisis cromatográfico fue realizado bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. La separación fue llevada a cabo a temperatura ambiente aproximadamente 20°C, con un tiempo total de análisis de 10 min. La fase móvil fue monitoreada a 214 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL (Fonseca et al, 2001) (Tiemeyer et al, 1982).

Previo a la inyección de los estándares la columna se equilibra durante 30 min. con la fase móvil.

4.4.2.1 Preparación de la fase móvil.

Para la preparación de la fase móvil se disolvieron 0,575g de fosfato de amonio dihidrogenado en agua grado HPLC para 1Lt de solución final.

El pH de la solución fue ajustado a 3,2 con ácido fosfórico 8,5%. Previo a la elusión a través de la columna, la fase móvil fue filtrada a través de filtros con tamaño de poro de 0,2 µm (millipore).

4.4.3 Preparación de estándares.

La solución stock de alantoína fue preparada disolviendo 25 mg en la fase móvil para un volumen total de 25 mL (concentración de 0,1%). Seguido de la filtración por filtros con tamaño de poro de 0,2 μm , la solución stock fue almacenada a 4° C hasta realizar los análisis.

Los estándares de trabajo fueron preparados diariamente por dilución de la solución stock con fase móvil.

Para la curva de calibración se prepararon los siguientes estándares: 1,00, 5,00, 10,00, 15,00, y 20,00 $\mu\text{g/mL}$. Este rango de concentraciones se determinó mediante la inyección de una muestra de baba en el cromatógrafo para saber el rango de concentración aproximada de alantoína presente, para en base a ella elaborar la curva de calibración.

4.4.4 Validación del método analítico.

4.4.4.1 Linealidad

Para la determinación del parámetro de linealidad se usó una curva de calibración preparada en el rango de concentraciones: 1,00, 5,00, 10,00, 15,00 y 20,00 $\mu\text{g/mL}$. Dicha curva de calibración se preparó con estándar de alantoína a partir de diluciones de la solución stock.

La cuantificación fue realizada por análisis de regresión del área del pico contra la concentración del estándar. Se inyectó por triplicado cada concentración obteniéndose un total de 15 inyecciones (Quattrochi et al, 1992).

La determinación se realizó en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis (Quattrochi et al, 1992).

Se determinaron los coeficientes de correlación y el grado de significación con una tabla de prueba de coeficiente de correlación (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.2 Determinación de la precisión del sistema instrumental.

4.4.4.2.1 Repetibilidad.

Al igual que para la curva de calibración, se utilizó en la determinación de la repetibilidad estándares de alantoína.

A partir de la solución stock se prepararon soluciones de concentraciones: 5,00, 10,00 y 15,00 $\mu\text{g/mL}$.

La determinación de la precisión se llevó a cabo evaluando la dispersión de 10 inyecciones por cada nivel de concentración en condiciones de repetibilidad, es decir, único analista, mismo instrumento y reactivos, mismo día y cortos intervalos de tiempo entre cada análisis (Quattrochi et al, 1992).

Los estimadores de la precisión del sistema instrumental son la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.), que permiten evaluar la incertidumbre (error aleatorio) en la estimación de la medida (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.2.2 Reproducibilidad.

La reproducibilidad del sistema instrumental se determina por el coeficiente de variación y se considera suficiente efectuar ensayos de reproducibilidad tomando en cuenta solamente la variable tiempo. Se analizaron las inyecciones de una solución de estándar que contenían 15,00 $\mu\text{g/mL}$ en triplicado en cuatro días diferentes consecutivos, determinándose posteriormente el promedio, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.) (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.3 Determinación de la precisión del método.

4.4.4.3.1 Repetibilidad.

Para determinar la precisión del método, se realizó un estudio bajo condiciones de repetibilidad a todo el método analítico, utilizando para ello estándares de alantoína que contenían tres niveles de concentración. Estos estándares se obtuvieron de la dilución de la solución stock de alantoína y fueron sometidos a todo el procedimiento analítico. No es necesario efectuar las determinaciones inmediatamente una tras otra; pueden repartirse en varios días, sin embargo cada determinación debe efectuarse en condiciones de repetibilidad, es decir: mismo laboratorio, mismo equipo, mismo analista y corto intervalo de tiempo (Quattrochi et al, 1992).

Para la determinación de la repetibilidad del método se analizaron tres concentraciones: 5,00, 10,00 y 15,00 $\mu\text{g/mL}$. Se realizaron 6 determinaciones por concentración y se calculó el promedio de las lecturas, la S.D. y el C.V (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.3.2 Reproducibilidad.

Para la determinación de esta variable, se realizaron análisis en triplicado para tres niveles de concentración de estándares de alantoína (5,00, 10,00 y 15,00 $\mu\text{g/mL}$) obtenidos de la dilución de una solución stock de alantoína y sometidos a todo el procedimiento analítico. El análisis se realizó en cuatro días diferentes teniendo en cuenta únicamente la variable tiempo y se determinó el promedio, la S.D. y el C.V. de las lecturas (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.4 Exactitud.

Para la determinación de este parámetro se prepararon soluciones estándar de alantoína de tres niveles de concentración (5,00, 10,00 y 15,00 $\mu\text{g/mL}$), estas soluciones se obtuvieron de la dilución de una solución stock de alantoína y fueron sometidas al método analítico completo. Cada concentración fue inyectada cuatro veces. Luego se calculó el promedio, la S.D., el C.V. y el porcentaje de recuperación (Quattrochi et al, 1992).

4.4.4.5 Sensibilidad.

Para la determinación de la sensibilidad se aplicó el método de análisis repetido del blanco de la muestra (Quattrochi et al, 1992).

A partir de la solución stock de alantoína se prepararon los estándares cromatográficos que sirvieron para preparar la curva de calibración.

Primero se realizó una curva de calibración con concentraciones bajas del analito: 1,00, 3,00, 6,00, 9,00 y 12,00 $\mu\text{g/mL}$ inyectando cada estándar por triplicado. Con estos

valores se obtuvo la ecuación de una recta del tipo $y = a + bx$, de donde se determinó b que es la pendiente.

A continuación se realizó el análisis de 10 blancos de la muestra (fase móvil), calculando la media de la respuesta del blanco (**Ybl**) y la desviación estándar de las respuestas obtenidas (**Sbl**) (Quattrochi et al, 1992).

Con los datos obtenidos de la curva de calibración y el análisis de la respuesta de los blancos, se calculó el límite de detección y el límite de cuantificación de acuerdo a las respectivas ecuaciones citadas en la introducción.

4.4.4.6 Selectividad.

Para la determinación de la selectividad se analizaron los tiempos de retención de estándares de alantoína de concentración de 15,00 µg/mL. Estos fueron inyectados 10 veces y se midió la desviación estándar y el coeficiente de variación de los resultados. Además se coinyectó estándar de alantoína y se compararon cuidadosamente los cromatogramas resultantes (observando la posible aparición de ensanchamiento de bandas, de hombros etc.) (Quattrochi et al, 1992)

5. RESULTADOS.

5.1 Validación de los métodos analíticos

5.1.1 Linealidad:

Para evaluar si la técnica presentaba linealidad en el rango de concentración de trabajo, se preparó una curva de calibración con cinco puntos a partir de una solución estándar de alantoina de concentración de 0,1% según metodología analítica, las que abarcaron concentraciones altas, medias y bajas del analito. Cada una de las concentraciones fueron inyectadas por triplicado, es decir, en total se hicieron 15 inyecciones (Quattrochi et al, 1992).

En la tabla N° 1 se presentan los datos de la curva de calibración, concentración en µg/mL y área en mVxmin., además se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de dicha curva. En el gráfico N° 1 se muestra la representación gráfica de la curva de calibración.

La ecuación de la recta obtenida del análisis es:

$$Y = 0,39107X + 0$$

Donde:

a: 0

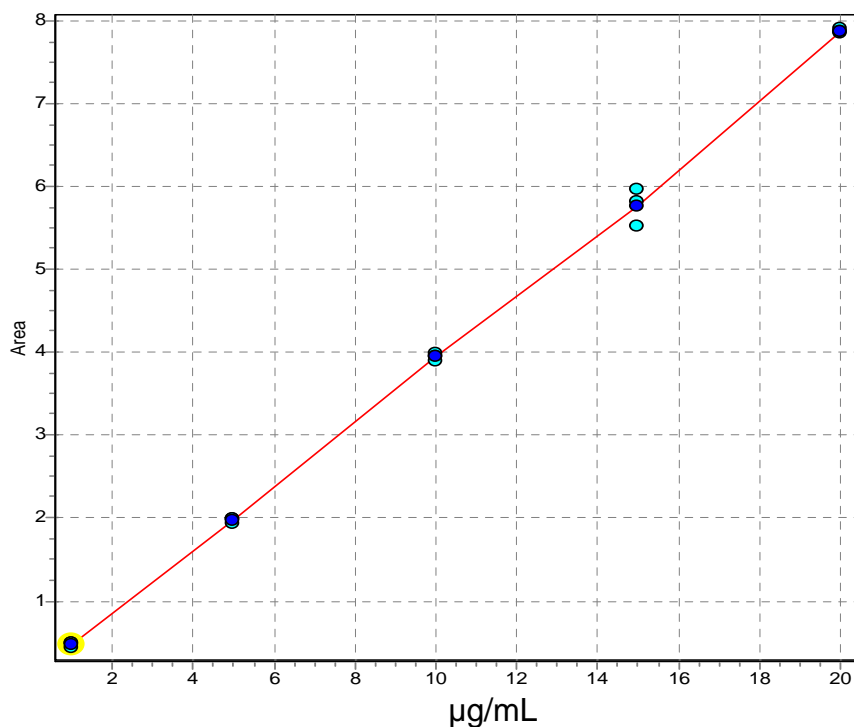
b: 0,39107

Coefficiente de correlación: 0,9994

Tabla N° 1: Curva de Calibración Concentración ($\mu\text{g/mL}$ v/s Área (mVxmin)).

Número del punto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mVxmin)	Área promedio (mVxmin)
Punto n° 1	1,00 $\mu\text{g / mL}$	0,44	
Punto n° 2	1,00 $\mu\text{g / mL}$	0,50	
Punto n° 3	1,00 $\mu\text{g / mL}$	0,48	0,47
Punto n° 4	5,00 $\mu\text{g / mL}$	1,93	
Punto n° 5	5,00 $\mu\text{g / mL}$	2,00	
Punto n° 6	5,00 $\mu\text{g / mL}$	1,99	1,97
Punto n° 7	10,00 $\mu\text{g / mL}$	3,90	
Punto n° 8	10,00 $\mu\text{g / mL}$	3,95	
Punto n° 9	10,00 $\mu\text{g / mL}$	3,98	3,94
Punto n° 10	15,00 $\mu\text{g / mL}$	5,51	
Punto n° 11	15,00 $\mu\text{g / mL}$	5,81	
Punto n° 12	15,00 $\mu\text{g / mL}$	5,96	5,76
Punto n° 13	20,00 $\mu\text{g / mL}$	7,87	
Punto n° 14	20,00 $\mu\text{g / mL}$	7,91	
Punto n° 15	20,00 $\mu\text{g / mL}$	7,85	7,88

Gráfico N° 1: Curva de Calibración Concentración ($\mu\text{g/mL}$ v/s Área (mVxmin)).



5.1.2 Precisión del sistema instrumental.

5.1.2.1 Repetibilidad del sistema instrumental:

Se presentan en la tabla N° 2 y N° 3 los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad del sistema, indicando el área promedio, la desviación estándar (S.D.) y el coeficiente de variación (C.V.).

En la figura N° 1, 2 y 3 se muestran los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones analizadas.

Tabla N° 2: Valores de áreas para el parámetro de precisión del sistema instrumental.

Concentración	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área	Área
5,00 ug/mL	2,00	2,10	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
10,00 ug/mL	3,90	3,90	3,80	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
15,00 ug/mL	5,90	5,90	5,90	5,90	6,00	5,90	5,90	5,90	5,90	5,90

Tabla N° 3: Valores de promedio de área, S.D. y C.V. para el parámetro de precisión del sistema instrumental.

Concentración	Promedio de Áreas	S.D.	C.V. %
5,00 µg/mL	2,01	0,0316	1,57
10,00 µg/mL	3,89	0,0316	0,81
15,00 µg/mL	5,91	0,0316	0,53
Promedio	3,94	0,0316	0,97

Figura N° 1: Cromatograma de un estándar de alantoína concentración 5,00 µg/mL para la determinación del parámetro de precisión.

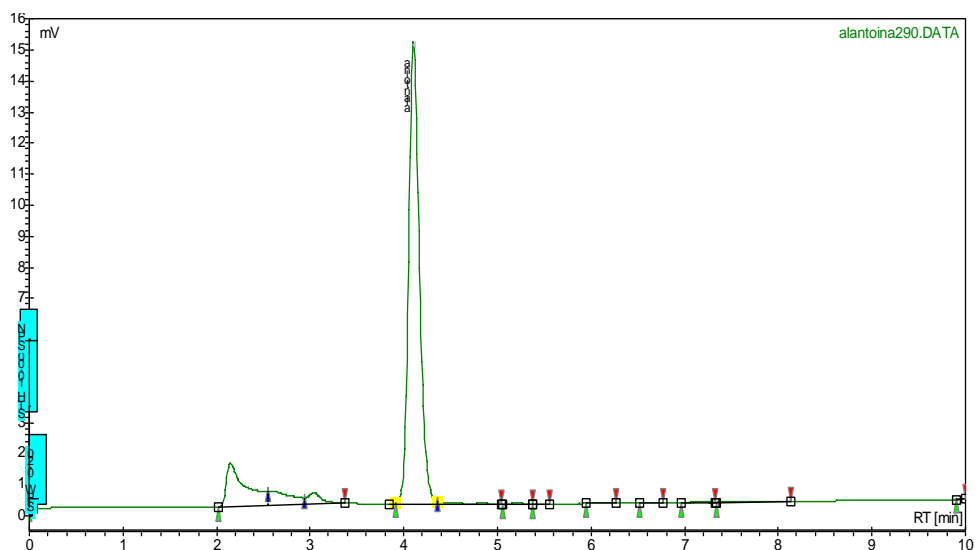


Figura N° 2: Cromatograma de un estándar de alantoína concentración 10,00 µg/mL para la determinación del parámetro de precisión.

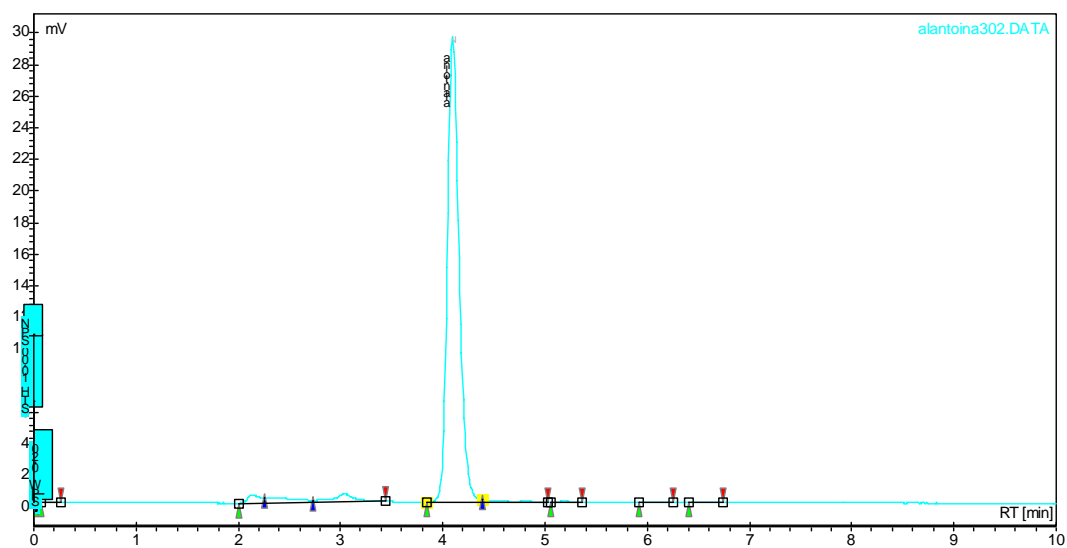
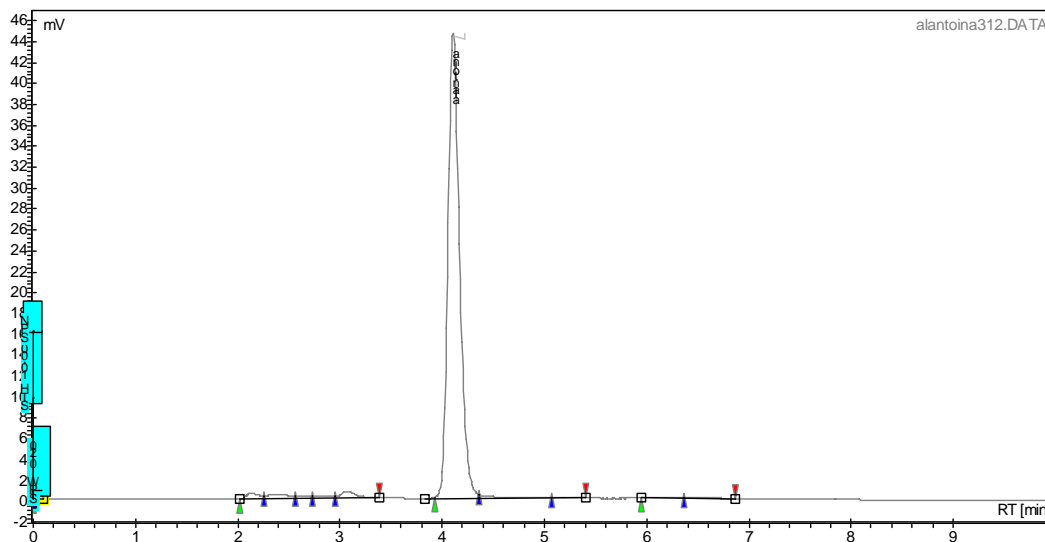


Figura N° 3: Cromatograma de un estándar de alantoína concentración 15,00 µg/mL para la determinación del parámetro de precisión.



5.1.2.2 Reproducibilidad del sistema instrumental.

En las tablas N° 4 y N° 5 se presentan los resultados para la determinación de la reproducibilidad del sistema instrumental. Además se muestran los valores promedio de las lecturas realizadas por triplicado del estándar de alantoína de concentración de 15,00 µg/mL en cuatro días diferente junto con los C.V. y S.D.

En las figuras N° 4, 5, 6 y 7 se muestran los cromatogramas correspondientes a cada uno de los cuatro días en los que se analizó el parámetro de reproducibilidad del sistema.

Tabla N° 4: Valores de las áreas realizadas en cuatro días diferentes bajo condiciones de reproducibilidad.

PERIODO	PRIMER DÍA	SEGUNDO DÍA	TERCER DÍA	CUARTO DÍA
Concentración	Área mVxmin	Área mVxmin	Área mVxmin	Área mVxmin
15,00 µg/mL	5,90	5,90	5,80	6,00
15,00 µg/mL	5,90	5,90	5,90	5,90
15,00 µg/mL	6,00	5,90	5,90	6,00

Tabla N° 5: Valores de coeficientes de variación, promedio y desviación estándar del parámetro de precisión.

PERIODO	Concentración	Promedio	S.D.	%C.V.
PRIMER DIA	15,00 µg/mL	5,90	0,081	1,38
SEGUNDO DIA	15,00 µg/mL	5,90	0,00	0,00
TERCER DIA	15,00 µg/mL	5,93	0,05	0,84
CUARTO DIA	15,00 µg/mL	5,97	0,05	0,97
Promedio	-----	5,93	0,045	0,78

Figura N° 4: Cromatograma de un estándar de alantoína concentración 15,00 µg/mL analizada el primer día para el parámetro de reproducibilidad del sistema.

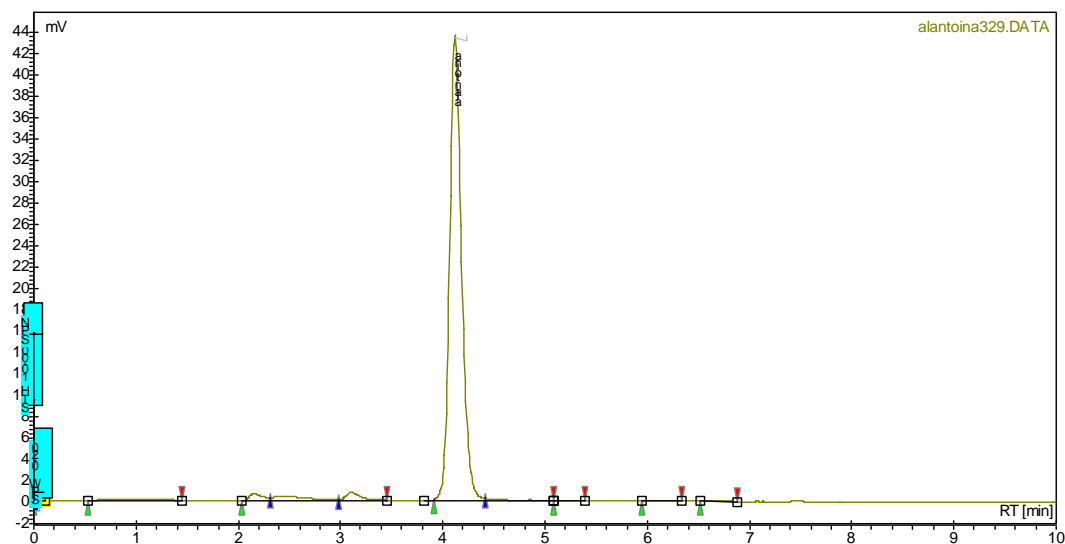


Figura N° 5: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 15,00 µg/mL analizada el segundo día para el parámetro de reproducibilidad del sistema.

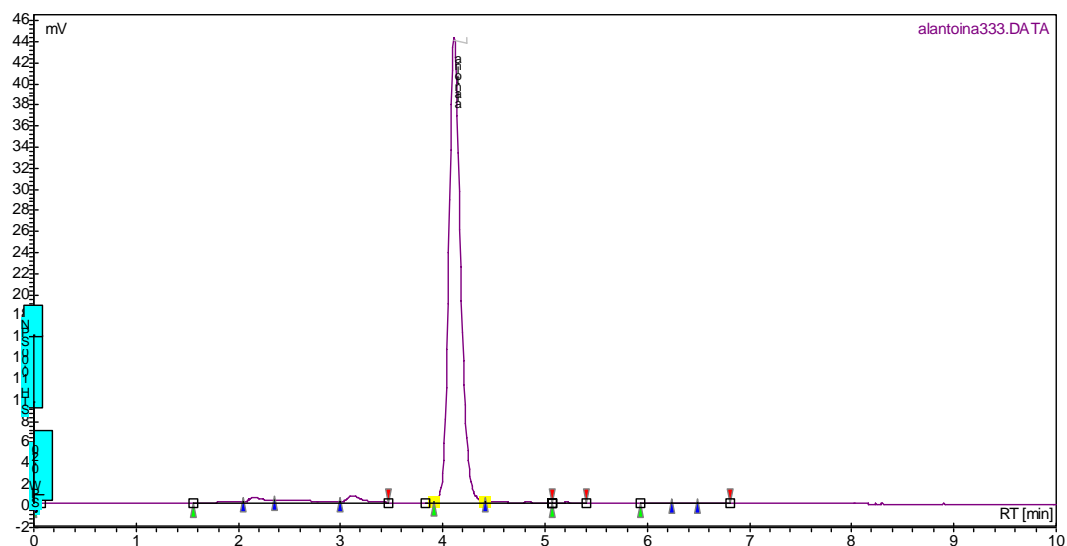


Figura N° 6: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 15,00 µg/mL analizada el tercer día para el parámetro de reproducibilidad del sistema.

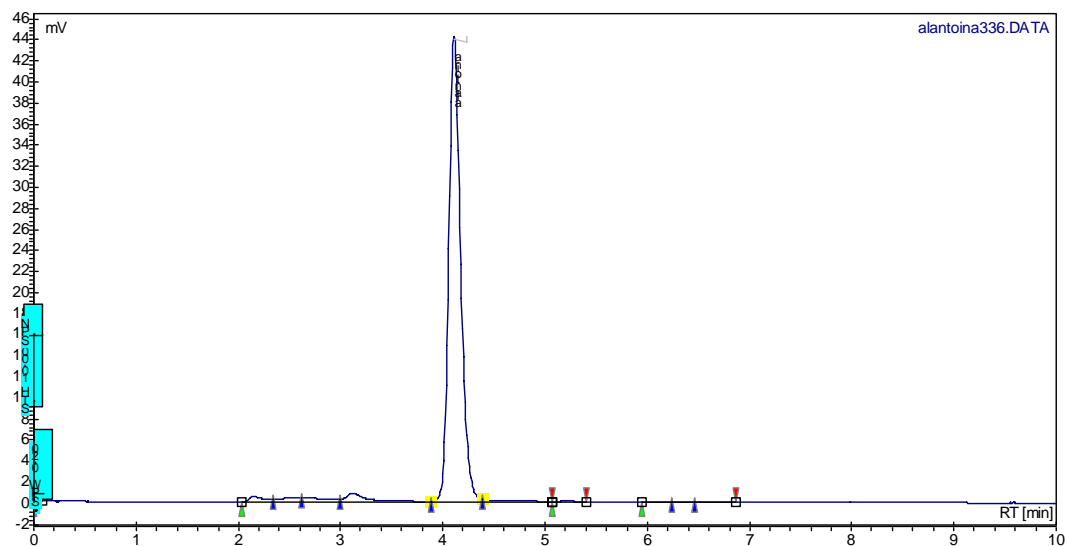
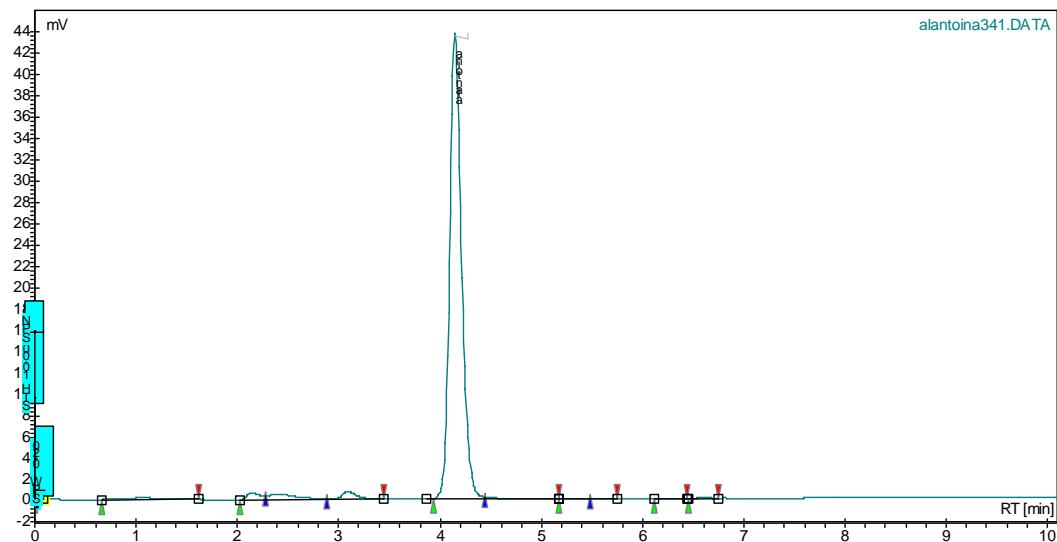


Figura N° 7: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 15,00 µg/mL analizada el cuarto día para el parámetro de reproducibilidad del sistema.



5.1.3 Precisión del método

5.1.3.1 Repetibilidad del método:

Se prepararon soluciones estándares de concentraciones de 5,00, 10,00 y 15,00 µg/mL y se trataron con la metodología analítica completa, es decir, los estándares con las concentraciones correspondientes se someten a los mismos tratamientos a los que se somete la muestra.

En las tablas N° 6 y N° 7 se observan los valores de los resultados del análisis de las muestras.

En las figuras N° 8, 9 y 10 se muestran los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones utilizadas para la determinación de la repetibilidad del método.

Tabla N° 6: Valores de áreas para el parámetro de precisión del método bajo condiciones de repetibilidad.

Concentración	Área (mVxmin)	Área (mVxmin)	Área (mVxmin)	Área (mVxmin)	Área (mVxmin)	Área (mVxmin)
5,00 µg/mL	1,50	1,60	1,60	1,60	1,50	1,60
10,00 µg/mL	2,80	2,60	2,70	2,60	2,80	2,90
15,00 µg/mL	4,50	4,40	4,40	4,50	4,30	4,50

Tabla N° 7: Valores de coeficientes de variación, desviaciones estándares y promedios para el parámetro de precisión.

Concentración	Promedio	S.D.	%C.V.
5,00 µg/mL	1,57	0,052	3,31
10,00 µg/mL	2,73	0,121	4,43
15,00 µg/mL	4,40	0,082	1,86
Promedio	2,90	0,085	3,20

Figura N° 8: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 5,00 µg/mL para la determinación del parámetro de repetibilidad del método.

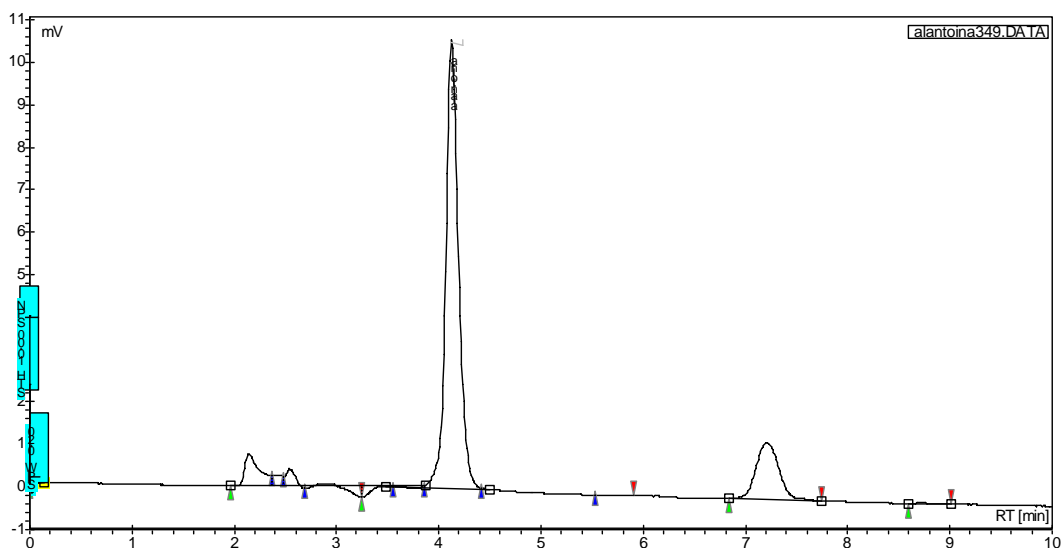


Figura N° 9: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 10,00 µg/mL para la determinación del parámetro de repetibilidad del método.

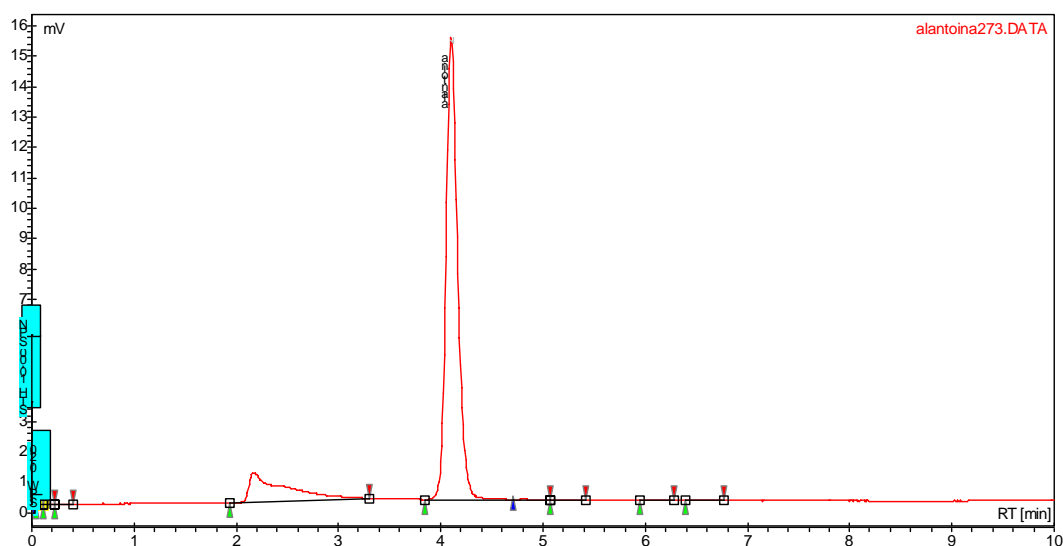
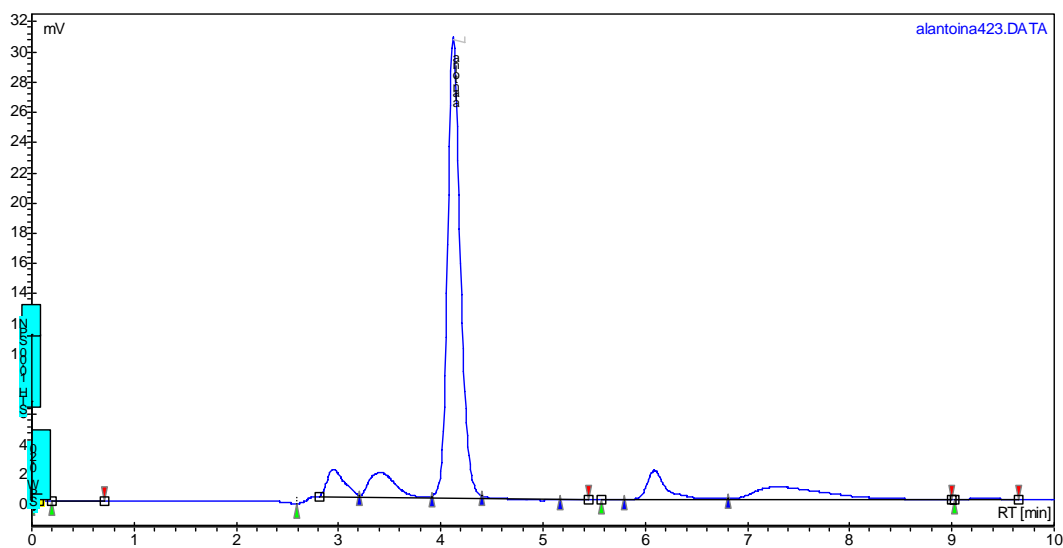


Figura N° 10: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 15,00 µg/mL para la determinación del parámetro de repetibilidad del método.



5.1.3.2 Reproducibilidad del método

Para la determinación de esta variable se realizaron análisis en duplicado para tres niveles de concentración (5,00 µg/mL, 10,00 µg/mL y 15,00 µg/mL) de alantoína en cuatro días diferentes teniendo en cuenta únicamente la variable tiempo. Posteriormente se determinaron el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las lecturas (ver tabla N° 8 y N° 9).

En las figuras N° 11, 12, 13 y 14 se muestran los cromatogramas que representan cada uno de los cuatro días de análisis.

Tabla N° 8: Valores de áreas para el parámetro de precisión del método bajo condiciones de reproducibilidad, en cuatro días diferentes sucesivos.

Periodo	Primer día	Segundo día	Tercer día	Cuarto día
Concentración	Área mVxmin	Área mVxmin	Área mVxmin	Área mVxmin
5,00 µg/mL	1,70	1,50	1,20	1,50
5,00 µg/mL	1,70	1,50	1,50	1,50
10,00 µg/mL	3,10	2,90	3,10	2,90
10,00 µg/mL	2,80	3,00	2,90	3,00
15,00 µg/mL	4,50	4,50	4,50	4,30
15,00 µg/mL	4,60	4,50	4,50	4,50

Tabla N° 9: Valores de coeficiente de variación, desviaciones estándares y promedios para el parámetro de precisión.

Concentración	Promedio de Área	S.D.	%C.V.
5,00 µg/mL	1,47	0,20	13,61
5,00 µg/mL	1,55	0,10	6,45
10,00 µg/mL	3,00	0,11	3,67
10,00 µg/mL	2,93	0,09	3,07
15,00 µg/mL	4,45	0,10	2,25
15,00 µg/mL	4,50	0,05	1,10
Promedio	2,98	0,11	5,03

Figura N° 11: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 10,00 µg/mL analizada el primer día para el parámetro de reproducibilidad del método.

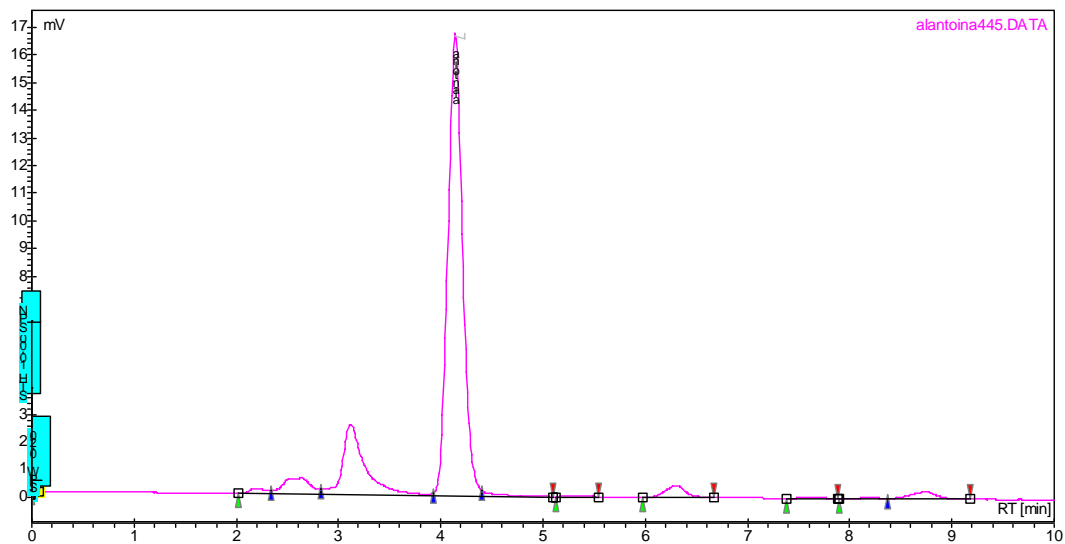


Figura N° 12: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 5,00 µg/mL analizada el segundo día para el parámetro de reproducibilidad del método.

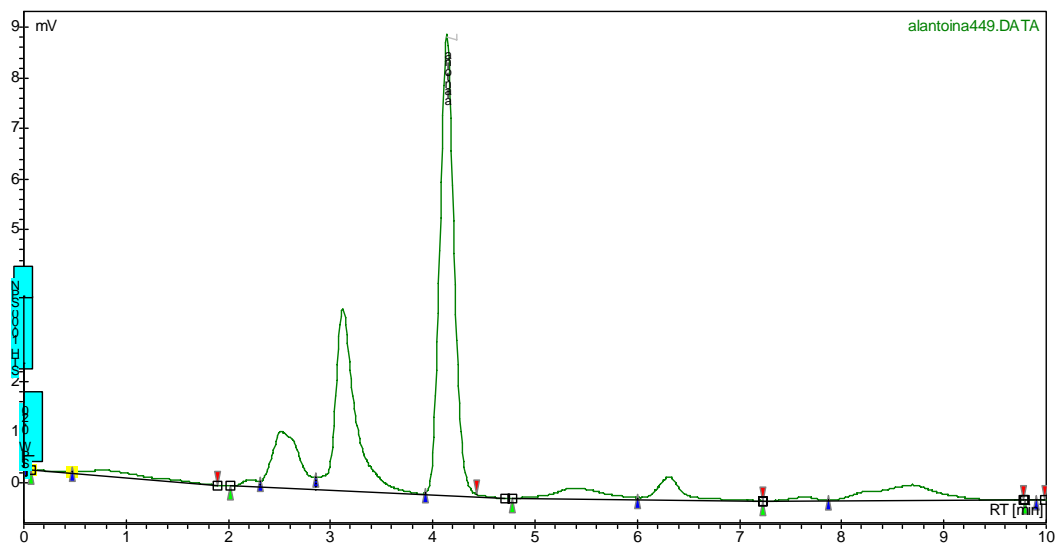


Figura N° 13: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 10,00 µg/mL analizada el tercer día para el parámetro de reproducibilidad del método.

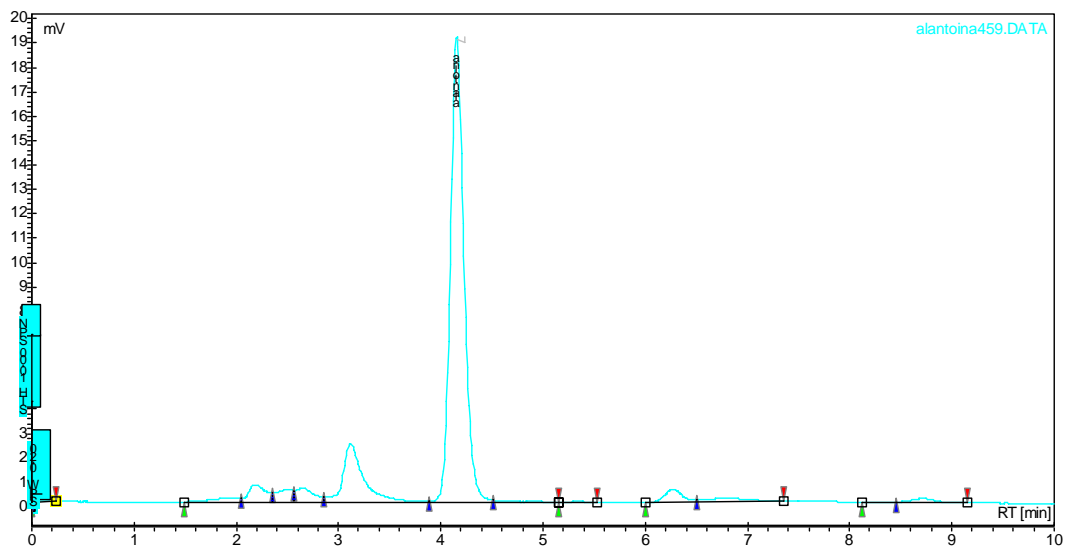
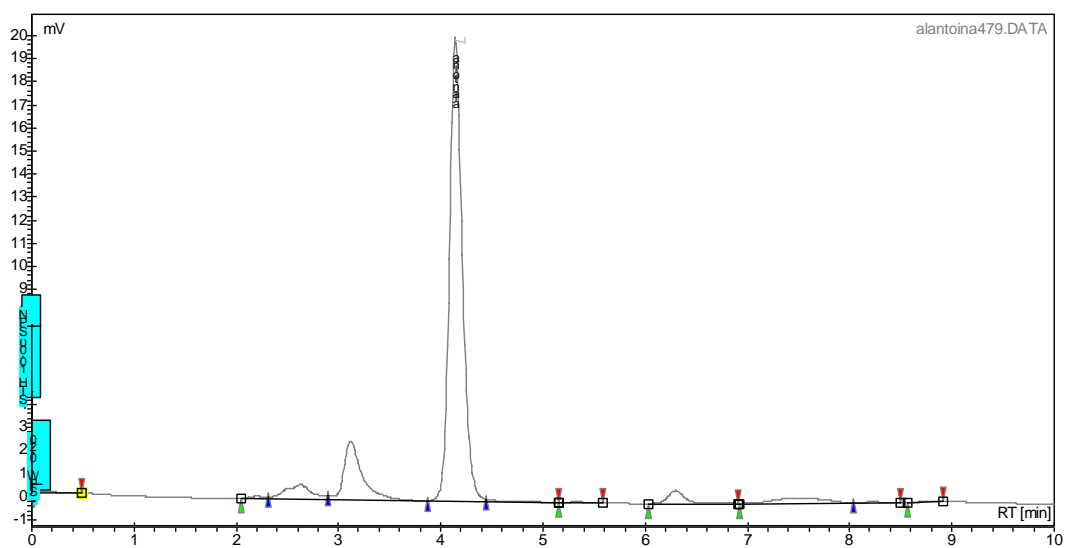


Figura N° 14: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 10,00 µg/mL analizada el cuarto día para el parámetro de reproducibilidad del método.



5.1.4 Exactitud/ Recuperación.

Las concentraciones de los estándares de alantoína sometidas a la metodología analítica completa para analizar la recuperación del analito en cuestión fueron de: 5,00 µg/mL, 10,00 µg/mL y 15,00 µg/mL, cada una de las concentraciones fue inyectada 4 veces en el cromatógrafo, con un total de 12 inyecciones, cada una de ellas tratadas de la misma forma que será tratada la muestra es decir, precipitación de proteínas, extracción de impurezas, filtración etc. (Quattrochi et al, 1992).

Los resultados se adjuntan en la tabla N° 11 donde se calcularon las concentraciones a partir de las áreas bajo la curva entregadas por el equipo y el porcentaje de recuperación del analito en cada una de las muestras.

En las figuras N° 15, 16, y 17 se muestran los cromatogramas representantes de cada una de las concentraciones analizadas.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación de cada una de las inyecciones se usó la siguiente formula:

$$R = (X_i / X_0) \times 100$$

Donde X_i corresponde al valor de concentración entregado por el equipo y X_0 al valor verdadero.

$$\% \text{Recuperacion: } \frac{3,29 \times 100}{5}$$

$$: 65,8\%$$

Además se aplicó el método de t de student para comprobar lo anterior. El t tabulado para $p = 0,05$ y $n-1$ grados de libertad es de 1,796 (ver anexo N° 2 tabla N° 4).

Según la siguiente formula:

$$t_{exp} = \frac{(100-R) \sqrt{n}}{C.V.}$$

Donde R es el porcentaje de recuperación obtenido, n el total de inyecciones realizadas y C.V. el coeficiente de variación.

$$t_{exp} = \frac{(100-77,3) \sqrt{12}}{2,57}$$

$$t_{exp} = 30,59$$

El t tabulado es de 1,796 y el t experimental arrojó un valor de 30,59, como se puede ver el valor experimental es un valor considerablemente alto si lo comparamos con el t tabulado, por lo que el método no es exacto.

Tabla Nº11: Valores de los porcentajes de recuperación y concentraciones interpoladas para el parámetro de exactitud.

Concentración	Área mVxmin	Conc. interpolada	Prom.	S.D.	% C.V.	% de rec.	Prom. % de rec.
5,00 µg/mL	1,30	3,29 µg/mL				65,8	
5,00 µg/mL	1,50	3,68 µg/mL				73,6	
5,00 µg/mL	1,50	3,70 µg/mL				74,0	
5,00 µg/mL	1,50	3,75 µg/mL	3,61	0,212	5,87%	75,0	72,1
10,00 µg/mL	3,10	7,83 µg/mL				78,3	
10,00 µg/mL	3,10	7,85 µg/mL				78,5	
10,00 µg/mL	3,10	7,82 µg/mL				78,2	
10,00 µg/mL	3,10	8,02 µg/mL	7,88	0,094	1,19%	80,2	78,8
15,00 µg/mL	4,80	12,19 µg/mL				81,3	
15,00 µg/mL	4,70	12,01 µg/mL				80,1	
15,00 µg/mL	4,70	12,14 µg/mL				80,9	
15,00 µg/mL	4,80	12,16 µg/mL	12,13	0,079	0,65%	81,1	80,9
Promedio				0,13	2,57	77,3	77,3

Figura N° 15: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 5,00 µg/mL analizada para el parámetro de exactitud.

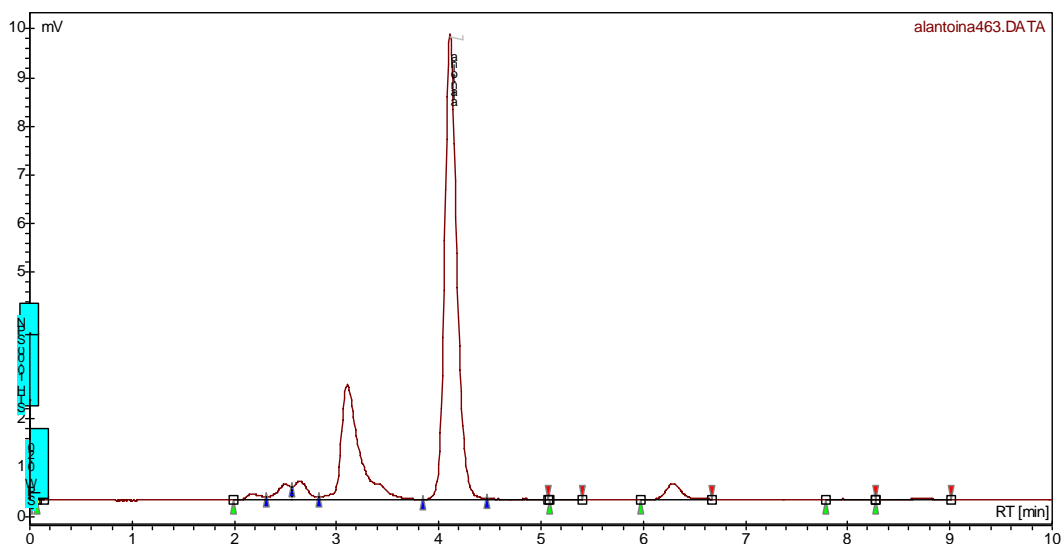


Figura N° 16: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 10,00 µg/mL analizada para el parámetro de exactitud.

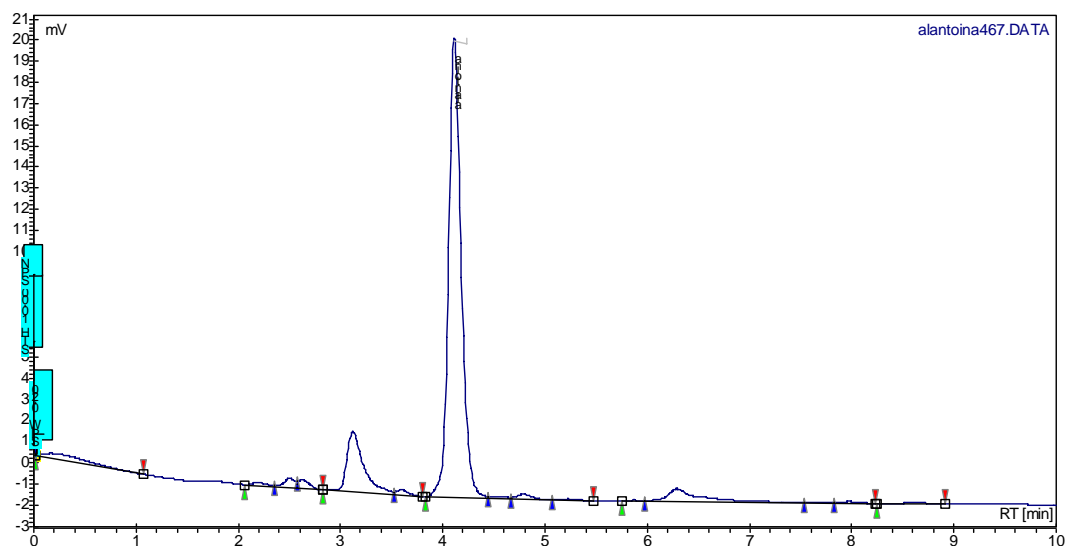
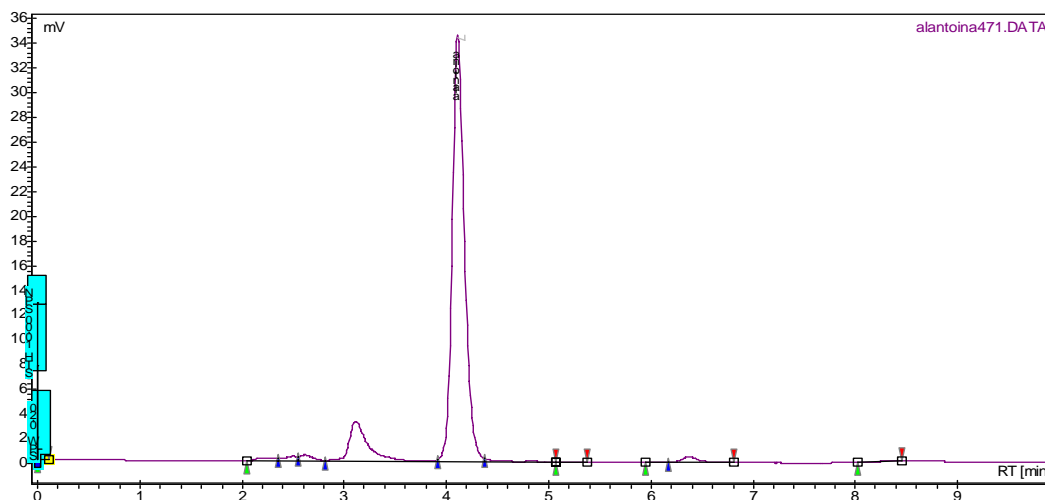


Figura N° 17: Cromatograma de un estándar de alantoína de concentración 15,00 µg/mL analizada para el parámetro de exactitud.



5.1.5 Especificidad y selectividad.

En la tabla N° 13 se muestran las diez inyecciones de concentración de 15 µg/mL con sus respectivas áreas y tiempos de retención.

Se muestra además el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los tiempos de retención de las diez inyecciones.

Tabla N° 13: Parámetro de especificidad, tiempos de retención para 10 inyecciones.

Estándar N°	Área (mVxmin)	Tiempo de retención (Minutos)
1	5,90	4,117
2	5,90	4,117
3	5,90	4,108
4	5,90	4,108
5	5,90	4,125
6	5,90	4,108
7	5,80	4.125
8	5,90	4.117
9	5,90	4.108
10	5,90	4.150
Promedio		4.118 minutos
Desviación estándar		0.0130
Coeficiente de variación		0.316%.

Además se confirmó la selectividad coinyectando estándar de alantoína a la muestra observándose el aumento del pico que eluía a los 4.1 minutos. Se observó un peak sin hombros y sin ensanchamiento.

5.1.6 Sensibilidad (límite de detección y límite de cuantificación)

Se determinó la sensibilidad mediante el método de análisis repetido del blanco de la muestra. En la tabla N° 14 se muestran los resultados de la curva de calibración con concentraciones bajas: 1,00, 3,00, 6,00, 9,00 y 12,00 µg/mL junto con mostrar la ecuación de la recta, su pendiente e intercepto.

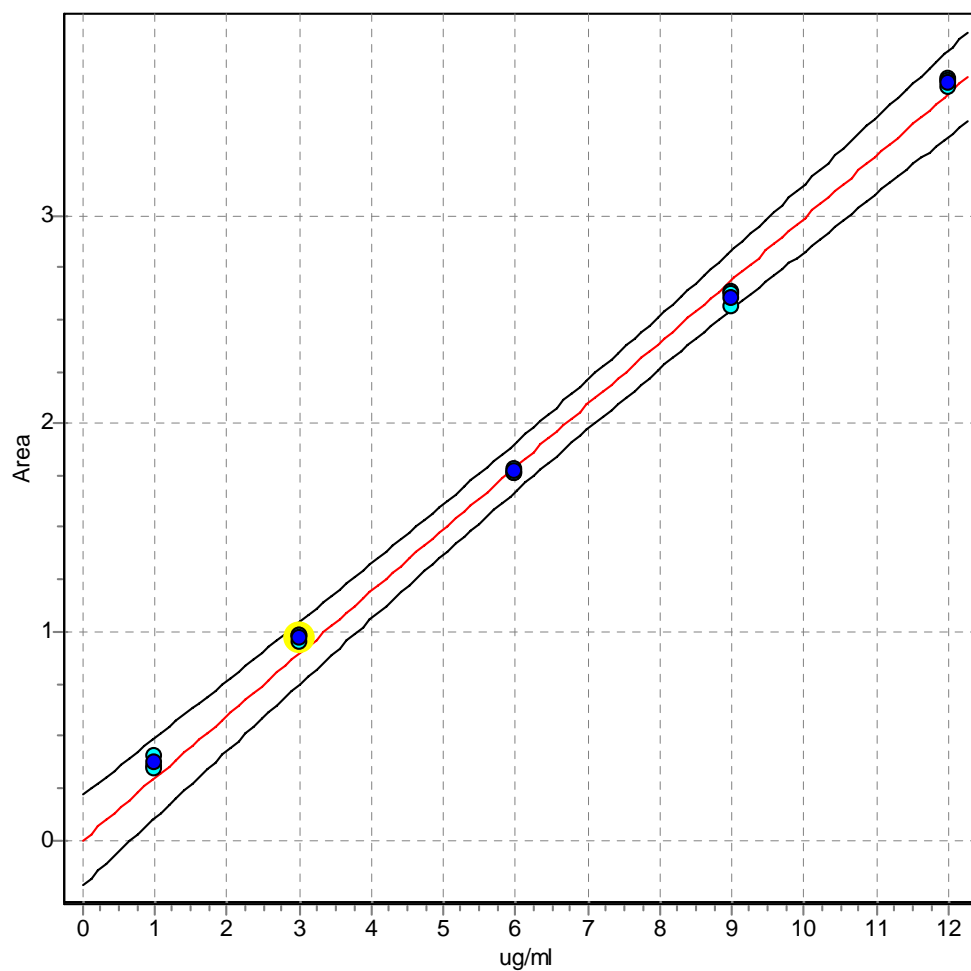
En la tabla N° 15 se indican los resultados de la inyección de 10 blancos (fase móvil) con el promedio (Y_{bl}) y la desviación estándar (S_{bl}).

También se indican los cálculos para la obtención del límite de cuantificación y el límite de detección.

Tabla N° 14: Valores de concentración (µg/mL) y área (mVxmin) para obtener el parámetro de sensibilidad.

Número del punto	Concentración	Área (mVxmin)
Punto n° 1	1,00 µg/mL	0,56
Punto n° 2	1,00 µg/mL	0,55
Punto n° 3	1,00 µg/mL	0,46
Punto n° 4	3,00 µg/mL	0,98
Punto n° 5	3,00 µg/mL	0,94
Punto n° 6	3,00 µg/mL	0,98
Punto n° 7	6,00 µg/mL	1,39
Punto n° 8	6,00 µg/mL	1,39
Punto n° 9	6,00 µg/mL	1,45
Punto n° 10	9,00 µg/mL	2,56
Punto n° 11	9,00 µg/mL	2,62
Punto n° 12	9,00 µg/mL	2,64
Punto n° 13	12,00 µg/mL	3,76
Punto n° 14	12,00 µg/mL	3,77
Punto n° 15	12,00 µg/mL	3,77

Gráfico N° 2: Concentración ($\mu\text{g/mL}$) y Área ($\text{mV}\cdot\text{min}$) para obtener el parámetro de sensibilidad.



Ecuación de la recta: $Y = 0,29875X + 0$

a: 0

b: 0,29875

Coefficiente de correlación: 0,9972

Tabla Nº 15: Valores de áreas de diez inyecciones de soluciones blancos para la determinación del parámetro de sensibilidad.

Blanco	Área (mVxmin)
Punto nº 1	0,30
Punto nº 2	0,20
Punto nº 3	0,20
Punto nº 4	0,30
Punto nº 5	0,20
Punto nº 6	0,20
Punto nº 7	0,20
Punto nº 8	0,30
Punto nº 9	0,20
Punto nº 10	0,30
Promedio (Ybl)	0,24
Desviación estándar (Sbl)	0,0516

$$\text{Límite de Detección: } \frac{0,24 \times 3 \times 0,0516}{0,29875} = 0,12 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Límite de Cuantificación: } \frac{0,24 \times 10 \times 0,0516}{0,29875} = 0,41 \mu\text{g/ml.}$$

5.2 Análisis de las muestras de baba de caracol.

La figura N° 19 muestra el cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracol bajo condiciones analíticas. En la tabla N° 16 se muestran los valores de la concentración de alantoína presente en la baba, junto con el tiempo de retención y los valores de área de tres muestras inyectadas en el cromatógrafo. Los análisis de las muestras fueron realizados bajo las condiciones cromatográficas definidas en la metodología (fase móvil pH 3.2).

En la figura N° 20 se muestra un cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba analizada con fase móvil a pH 5, junto con mostrar en la tabla N° 17 los resultados de área, tiempo de retención y concentración de dicho análisis.

En la figura N° 21 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar la muestra de baba de caracol con fase móvil a pH 6. En la tabla N° 18 se muestran los resultados del área, tiempo de retención y concentración.

Para determinar la calidad de separación de la alantoína se determinó el factor de retención (K') el cual fue calculado de la relación $K' = (t_r - t_0) / t_0$ (Puentes, 2004).

El tiempo de retención de la alantoína es de 4,1 min. (t_r) y la señal emitida por la fase móvil al inicio del cromatograma es de 2,3 min. (t_0). Por lo tanto el valor obtenido a partir de esta relación es de 0,74.

Figura N° 19: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracol bajo condiciones cromatográficas ideales.

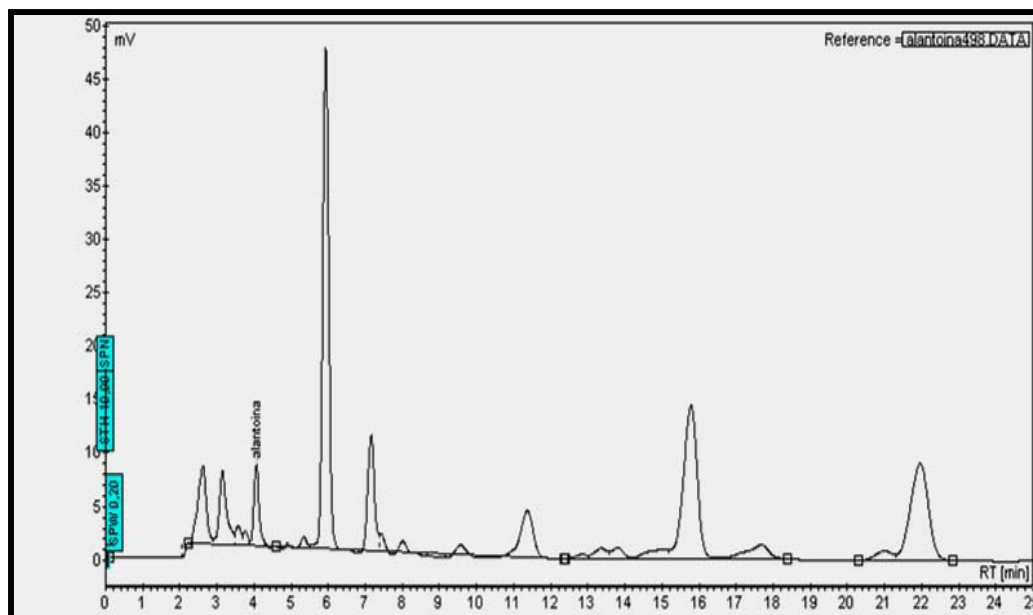


Tabla N° 16: Valores de área, concentración y tiempo de retención de alantoína en una muestra de baba de caracol.

Área (mVxmin)	Concentración (µg/mL)	Tiempo de retención (min.)
1,70	4,22	4,075
1,20	4,02	4,058
1,80	4,48	4,075

Promedio concentración: 4,24 µg/mL equivalente al 77,3% del total de alantoína presente en la secreción de caracol. La concentración total presente es de 5,48 µg/mL, equivalente al 100%.

Figura N° 20: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de baba de caracol utilizando fase móvil a pH5.

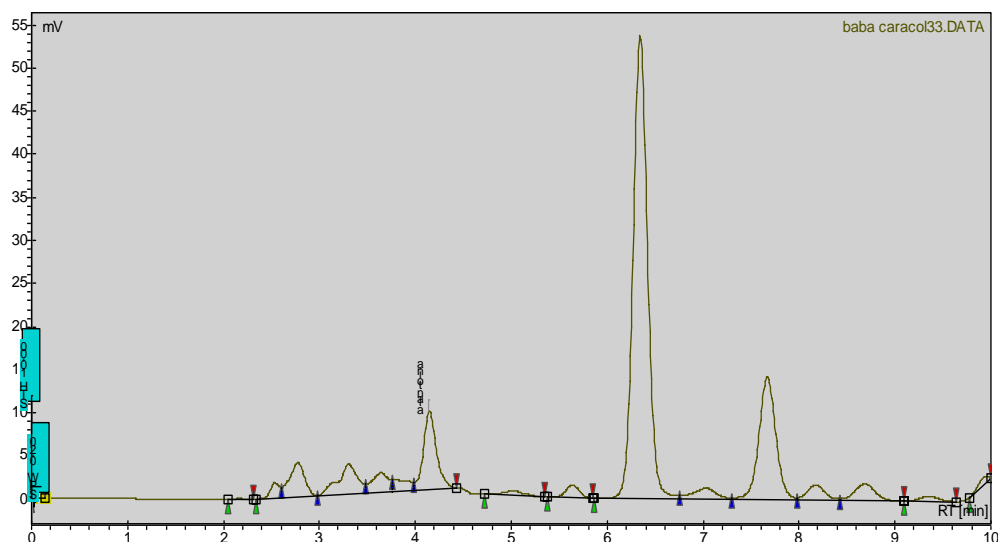


Tabla N° 17: Valores de área, concentración y tiempo de retención de alantoína en una muestra de baba de caracol.

Área (mVxmin)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min.)
1,60	4,83	4,140
1,30	4,51	4,033
1,40	4,69	4,100

Promedio concentración: 4,68 $\mu\text{g/mL}$ equivalente al 77,3% del total de alantoína presente en la secreción de caracol. La concentración total presente es de 6,1 $\mu\text{g/mL}$, equivalente al 100%.

Figura N° 21: Cromatograma obtenido al inyectar la muestra de baba de caracol con fase móvil a pH6.

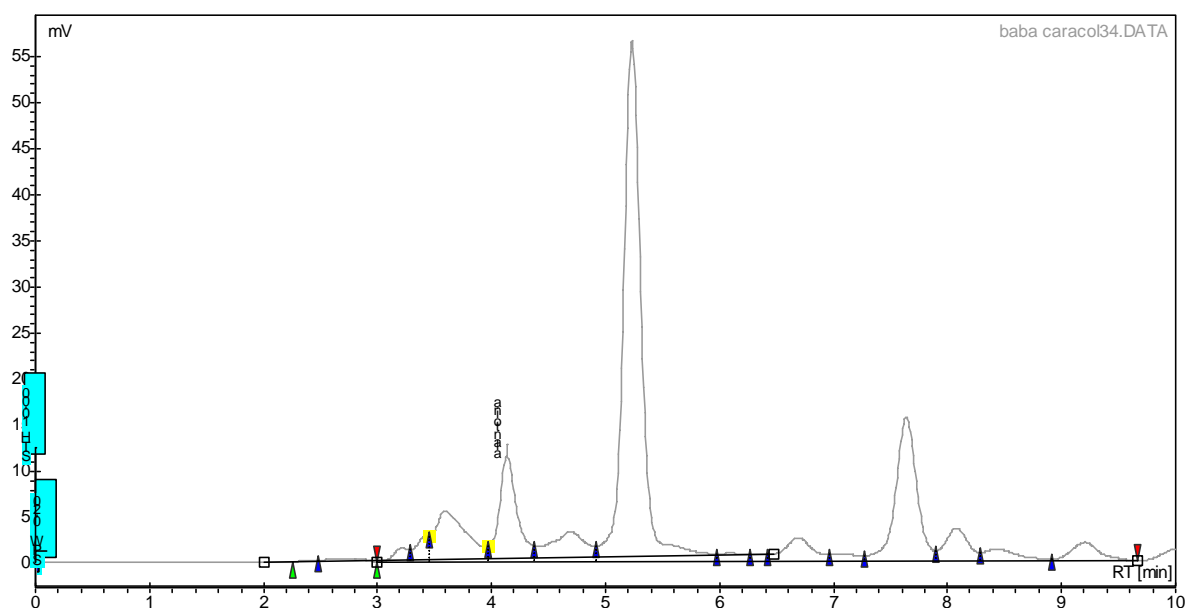


Tabla N° 18: Valores de área, concentración y tiempo de retención de alantoína en una muestra de baba de caracol.

Área (mVxmin)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo de retención (min.)
1,50	4,62	4,13
1,40	4,51	4,142
1,60	4,97	4,033

Promedio concentración: 4,7 $\mu\text{g/mL}$ equivalente al 77,3% del total de alantoína presente en la secreción de caracol. La concentración total presente es de 6,1 $\mu\text{g/mL}$, equivalente al 100%.

6. DISCUSIÓN.

6.1 Linealidad.

La curva usada para la calibración fue preparada sobre rangos de concentraciones 1,00 – 20,00 µg/mL para alantoína. La cuantificación de este compuesto fue realizado por análisis de regresión de área de pico contra concentración del analito.

El coeficiente de correlación r y r^2 es de 0,9994 y 0,9988 respectivamente. Muchos autores plantean que para que el método se considere lineal, el coeficiente de correlación debe ser mayor que 0,999. Como el valor de r obtenido es mayor a esta cifra (0,9994) se dice que el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo, esto quiere decir que existe una proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta (Díaz y Fernández, 2002).

Al elevar al cuadrado r se obtiene r^2 que es el coeficiente de determinación el cual nos muestra el porcentaje de la variabilidad de los datos que se explica por la asociación entre las dos variables. Por lo tanto, se puede decir que el 99,88% de la variabilidad del área se explica por la variable independiente (concentración µg/mL) (Díaz, Fernández, 2002).

Para obtener el grado de significación se revisó una tabla de prueba de coeficiente de correlación, en la cual para $n-2$ grados de libertad, en este caso $15-2 = 13$ suponiendo una correlación positiva con una probabilidad superior al 95% ($\alpha = 0,05$ que equivale a un 5%) la correlación debe ser mayor que 0,441, valor obtenido de la tabla de prueba de coeficiente de correlación (anexo N° 2, tabla N° 3). Por lo tanto el r experimental (0,9994) es mayor al r tabla (0,441) lo que nos indica que los datos obtenidos en la

curva de calibración de rangos 1,00 – 20,00µg/mL presenta una linealidad aceptable y se considera estadísticamente significativa.

6.2 Repetibilidad del sistema instrumental.

La A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists), en el manual de verificación de rangos para métodos analíticos incluye una tabla con datos de precisión en función de la concentración del analito (anexo N° 2, tabla N° 2). Basado en esta tabla, se puede decir que los valores promedios de los coeficientes de variación se encuentran dentro de los rangos aceptados, puesto que para concentraciones que van de 1 a 15 ppm el coeficiente de variación tiene que ser inferior a un 7,3 o 11%. Por lo tanto, el sistema es preciso bajo condiciones de repetibilidad ya que los coeficientes de variación para las tres concentraciones analizadas fueron menores a 1,6%.

6.3 Reproducibilidad del instrumento.

En la determinación de la reproducibilidad del sistema instrumental el valor promedio de las lecturas realizadas por triplicado del estándar de alantoína de concentración de 15,00 ug/mL en cuatro días diferentes dió como resultado que el C.V. está dentro del rango aceptado por la A.O.A.C. (7,3 a 11% en concentraciones de 1 a 15 ppm) ya que arrojó valores de C.V. menores al 1,5%, por lo tanto el sistema instrumental es preciso bajo condiciones de reproducibilidad (anexo N° 2, tabla N° 2).

6.4 Repetibilidad del método.

En la determinación del parámetro de repetibilidad del método, el promedio de los coeficientes de variación de las tres concentraciones de los estándares de alantoína analizadas dio un valor de 3,2 %, por lo tanto está dentro de lo aceptado por la A.O.A.C. por lo que el método es preciso bajo condiciones de repetibilidad (anexo N° 2, tabla N° 2).

6.5 Reproducibilidad del método.

Según los resultados obtenidos, el coeficiente de variación promedio del análisis de los cuatro días con estándares de alantoína arrojó como resultado un porcentaje de 5,03% por lo tanto se dice que el método es preciso bajo condiciones de reproducibilidad, ya que el valor arrojado se encuentra en el rango establecido por la A.O.A.C. (anexo N° 2, tabla N° 2).

6.6 Exactitud.

La A.O.A.C. también creó una tabla de criterios de aceptación que relaciona la concentración del analito con el % de recuperación (anexo N° 2, tabla N° 3). Según esto podemos decir que el método analítico implementado no es exacto ya que el promedio del porcentaje de recuperación de todas las lecturas realizadas dió como resultado final 77,3% y la A.O.A.C. establece que para este rango de concentraciones (1 a 15 ppm) el porcentaje de recuperación aceptado debe ser de 80 a 110 %.

Se puede observar que a medida que la concentración de los estándares aumenta el porcentaje de recuperación también lo hace, por lo que se puede decir que el método se hace exacto cuando se trabaja a concentraciones altas ($> 15\mu\text{g/mL}$).

Para determinar el parámetro de exactitud, también se puede aplicar el método de la *t de student*. Con este método se obtuvo un valor de *t* experimental de 30,59, valor que se aleja mucho del *t* tabulado para $p=0,05$ y $n-1$ grado de libertad que es de 1,796 (anexo N° 2, tabla N° 4). La diferencia entre el valor hallado y el valor verdadero se puede deber a que la técnica en el análisis es laboriosa, ya que dentro de los pasos previos de tratamiento de la muestra se debió realizar una desproteínización y una extracción líquido-líquido, procesos en los cuales se pierde analito, lo que queda evidenciado al observar los % de recuperación. Esto se puede corregir analizando los errores que se puedan cometer en la elaboración de los estándares o el tratamiento de la muestra.

6.7 Selectividad.

Se analizaron estándares de alantoína inyectándose 10 veces, obteniéndose un tiempo de retención de 4,118 minuto ± 0.013 (ver tabla N° 13). Además la identidad de la alantoína se confirmó coinyectando estándar de alantoína a la muestra y se observó el aumento del pico sin la aparición de ensanchamiento de bandas, tampoco se observó la formación de hombros.

Cuando se inyectó fase móvil se observó una señal a los 2,5 minutos aproximadamente lo que indica que no interviene con la cuantificación del analito.

6.8 Sensibilidad.

Se determinó la sensibilidad mediante el método de análisis repetido del blanco de la muestra. A partir de una curva de calibración de bajas concentraciones y la inyección de 10 blancos (fase móvil) obtuvimos el límite de detección cuyo valor es de 0,12 µg/mL y el límite de cuantificación es de 0,41µg/mL. Estos valores nos indican que la sensibilidad del método es adecuada para la determinación de la alantoína en la baba de caracol, es decir, se puede cuantificar y detectar la alantoína sin ningún problema.

6.9 Análisis de la muestra de baba de caracol chileno.

La alantoína es el producto final del catabolismo de las purinas, además es considerado un compuesto farmacológicamente activo presente en un gran número de cremas y lociones.

Muchos métodos han sido publicados para la determinación de la alantoína basados en la aplicación de la reacción colorimétrica de Rimini-Schryver (Hicks et al, 1993). Estos métodos, sin embargo, carecen de especificidad debido a la posible presencia de compuestos interferentes que son muy sensibles a las condiciones analíticas empleadas.

Hoy en día varios métodos por HPLC han sido desarrollados para la determinación de derivados de purinas, siendo ésta una técnica cromatográfica más rápida y exacta. Es por esto que se desarrolló e implementó una técnica por HPLC en fase reversa con una columna C-18 y con un detector UV con monitoreo a 214nm.

El principal problema analítico en el presente estudio fue obtener una adecuada separación de la alantoína de los demás componentes de la muestra.

Muchos de los componentes de la baba presentan una alta polaridad y absorben a una longitud de onda que está entre 195nm-215nm, lo cual es coincidente con la absorbancia al UV del compuesto que se desea analizar.

La conducta cromatográfica de la alantoína no se pudo cambiar variando las condiciones cromatográficas como pH o concentración del eluente (ver figura N° 20 y N° 21). Al variar el pH de la fase móvil o la concentración de ésta no se observó ningún cambio en el tiempo de retención de la alantoína, pero si de los demás componentes de la baba, de esa forma se comprobó que a pH3 (fase móvil) la resolución era un poco mejor que a los otros pH.

Finalmente se consideraron cuatro procedimientos para obtener una adecuada separación de alantoína de los demás componentes de la muestra.

Primero, se debió trabajar con una columna larga (4,6 x 250 mm) para incrementar así los platos teóricos. Segundo, se debió variar las condiciones del eluente (pH y molaridad) de tal forma que los tiempos de retención de los otros componentes fueran incrementados. Tercero, se debió encontrar una longitud de onda óptima para la detección. Finalmente, se debió extraer los componentes más apolares de la muestra, para disminuir el tiempo de muestreo. La presencia de estos compuestos apolares en la muestra hacía el tiempo de corrida más largo ya que estos tardaban más en eluir de la columna al tener más afinidad por ésta. Una vez que se realizaba la extracción estos compuestos quedaban retenidos en la fase orgánica y en la parte acuosa quedaba la alantoína mas "limpia" para ser inyectada posteriormente al cromatógrafo.

La alantoína es muy polar, y por esto no se puede esperar una interacción significativa con las cadenas alquílicas de la fase estacionaria. Los grupos silanoles residuales

remanentes después del proceso de unión de las cadenas alquílicas a la fase estacionaria, son probablemente las responsables de la cromatografía. Esto sugiere que la presencia de un número significativo de grupos silanoles libres en la fase estacionaria es crítico para la resolución de este compuesto (Tiemeyer y Giesecke, 1982). Es por todo esto que el tiempo de retención para alantoína es corto (4 minutos aprox.). La poca retención de la alantoína en la columna se puede observar con el valor obtenido de K' el cual es de 0,74 un valor bajo ya que idealmente K' debe estar entre 2 y 10. Cuando K' es pequeña, la resolución es pobre y si K' es grande, el tiempo de análisis puede ser demasiado largo. Con esto se demuestran las dificultades descritas en la determinación de este compuesto de alta polaridad.

La concentración de alantoína observada en la muestra de baba de caracol analizada se indica en las tablas N° 16,17 y 18. Si consideramos que la cantidad es de 5,48 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente, podemos decir que en 100ml de baba tenemos 0,548 mg de alantoína. La concentración establecida por la FDA para el efecto regenerador de la alantoína sobre la piel es mayor a estas cantidades obtenidas en la baba de caracol, sin embargo es necesario considerar que el método de extracción de la baba se realiza con agua por lo que los componentes presentes en la baba no se encontrarían en su concentración real, sino que diluidos. Con esto podemos decir que el proceso de extracción de la baba influye en la cantidad presente de alantoína en ella y también de los demás componentes que se determinen.

Otro punto importante de considerar, es la época del año en que se recolecta la baba. Se sabe que los caracoles pasan por etapas de hibernación y estivación, donde su actividad metabólica se reduce al mínimo, por lo que las cantidades de alantoína y

demás constituyentes de la baba pueden variar según la actividad metabólica que estos presenten en el momento de la extracción de dicha secreción. Las muestras con las que se trabajaron fueron recolectadas en las primeras semanas de marzo. En este periodo los caracoles se encuentran en una etapa de actividad metabólica mediana, por lo que la cantidad de alantoína presente en la baba podría ser mayor si se extrajera la baba en la época de primavera, ya que en este período los caracoles se encuentran con su actividad metabólica alta. Los periodos de hibernación y estivación dependerán tanto de la temperatura como de la humedad ambiental.

7. CONCLUSIONES.

- ⌘ Se desarrolló, implementó y validó un método para la determinación cuali y cuantitativa de alantoína en baba de *Helix aspersa müller* por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

- ⌘ Se determinó que el método es lineal en los rangos de concentraciones trabajadas, además de ser preciso bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, pudiéndose obtener resultados confiables y reproducibles.

- ⌘ En cuanto a la sensibilidad del método analítico, se determinó que ésta es adecuada para la determinación de alantoína en baba de caracol ya que los límites, tanto de cuantificación como de detección, están por debajo de las concentraciones de alantoína encontradas en las muestras de baba de *Helix aspersa müller*.

- ⌘ Se logró detectar y cuantificar alantoína por medio de la técnica instrumental empleada, por lo que la hipótesis propuesta se acepta. La concentración de alantoína encontrada en la baba de caracol Chileno estudiada y proveniente de un criadero en Caulin (X región), es de 0,548 mg por cada 100 mL de baba. Esta concentración se considera baja en relación con las concentraciones establecidas por la FDA para uso regenerativo.

- ⌘ Como las muestras de baba provenientes del criadero fueron tomadas en el mes de marzo, la concentración encontrada de alantoína puede ser menor a la encontrada en la época de primavera, donde el caracol presenta su máxima actividad metabólica.

- ⌘ Por ultimo, dada la gran cantidad de sustancias que estarían presentes en la baba del caracol, el efecto positivo observado sobre la piel con cremas hechas en base a ella, podría atribuirse a la mezcla de estos compuestos, más que a uno en particular, como la alantoína, ya que a pesar de estar ella presente en la baba, no se encuentra en cantidad suficiente como para por sí sola producir un efecto regenerador y restaurador sobre la piel.

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA.

- Bohinski, R. (1991) Bioquímica. 5ª. Ed. Wilmington, Delaware, E.U.A. pág: 739.
- Cajkovac, M., Oremovic, L. y Cajcova, V.L. (1992) influence of vehicle emulsoid on the release and activity of allantoin. *Pharmazie*. 47,39.
- Centro de helicicultores de Argentina (1997).El caracol en www.cedeha.com.
- Czauderna, M., Kowlczyk, J. (2000) Quantification of allantoin, uric acid, xanthine and hypoxanthine in ovine urine by high-performance liquid cromatography and photodiode array detection. *J. Chromatogr. B*. 744, 129-138.
- Dallet, Ph., Labat, L., Kummer, E., Dubost, J.P. (2000) Determination of urea, allantoin and lysinepyroglutamate in cosmetic samples by hydrophilic interaction chromatography. *J. Chromatogr. B*. 742, 447-452.
- Díaz, P., Fernández, P. (2002) Determinación del tamaño muestral para calcular la significación del coeficiente de correlación lineal. *Cad. Aten. Primaria* 9, 209-211.
- Díaz, P., Fernández, P. (2002) Métodos paramétricos para la comparación de dos medias. t de Student. *Cad. Aten. Primaria* 8, 37-41.
- Fonseca, A., Young, M., Alvarengo, A. (2001) Influence of photoperiod on the accumulation of allantoin in comfrey plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 13 (1).
- Garmendia, A. (2003) el caracol en www.tingloop.com

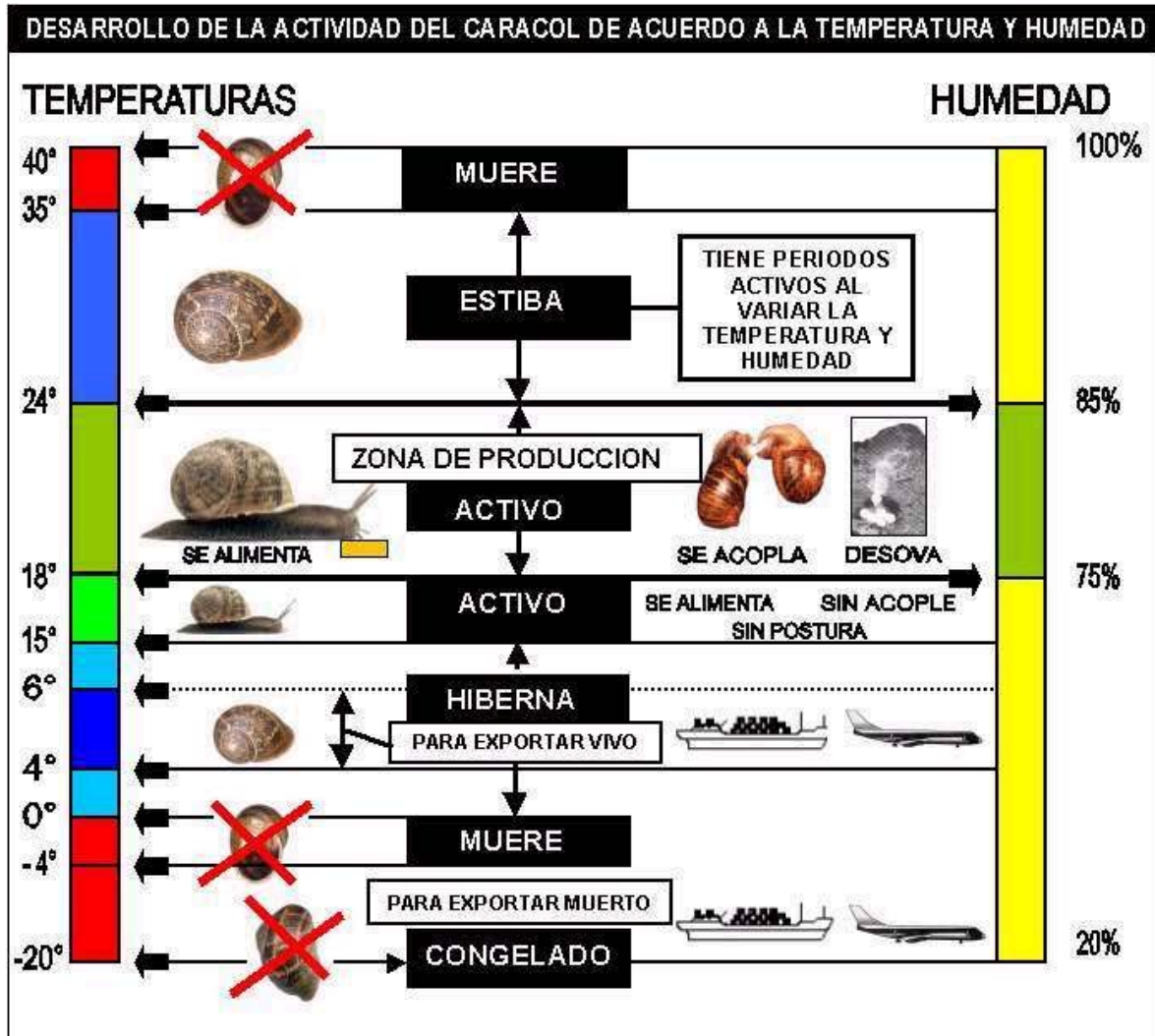
- González, R.(2003) Helicicultura en ar.geocities.com
- Hicks, M., Wong, L., Day, R. (1993) Suitability of reverse-phase columns from different sources by separation of uric acid from its oxidation products. *Anal. Biochem.* 210, 428-430.
- Huber, L. (1998). Validation of analytical methods en www.labcompliance.com.
- Iris, F.F., Benzie, Chung, W., Tomlinson, B. (1999) Simultaneous measurement of allantoin and urate in plasma: analytical evaluation and potencial clinical application in oxidant: antioxidant balance studies. *Clin. Chem.* 45, 901- 904.
- Kim, S.J., Park, J.H., Kim, D.H., Won, Y.H., Maribach, H.I. (1998) Increased in vivo collagen synthesis and in vitro cell proliferative effect of glycolic acid. *Dermatol. Surg.* 24(10) 1054-8
- Maceda, A., Gonzáles. I. (2005). Caracol de tierra en www.alaquairum.com
- Mathews, C. (1998) Bioquímica. 2^a. Ed. McGraw-Hill, Madrid, pag: 1283.
- Puentes, P., Ivens S.A. (2004) Introducción a la cromatografía de líquidos de alto performance. pág: 77.
- Quattrochi, O. A., Abelaira de Andrizzi, S.I., Laba, R. F. (1992). Introducción a HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires, Argentina. Pag: 381.

- Shingfield, K. J., Offer, N.W. (1999) Simultaneous determination of purine metabolites, creatinine and pseudouridine in ruminant urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 723, 81-94.
- Skoog, D., Leary (1994) Análisis instrumental. 5^a. Ed. McGraw-Hill, Madrid. pág: 1024.
- Terzuoli, L., Porcelli, B., Setacci, C., Giubbolini, M., Cinci, G., Carlucci, F., Pagani, R., Marinilla, E., (1999) Comparative determination of purine compounds in carotid plaque by capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 728, 185-192.
- The Merck Index (2001) Thirteenth edition. Editorial Staff. USA. Merck & Co, inc.
- Tiemeyer, W., Giesecke, A. (1982) Quantitative determination of allantoin in biological fluids by reversed-phase high pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 123, 11-13.
- Tyler, V.E. (2000) Herbal healing - as close as your garden. *Prevention*, 52, 117.
- Universidad de Salamanca (1997). Curso de determinación de fármacos por HPLC en fluidos biológicos. Salamanca. Pág.: 107.
- <http://www.bioskincare.com>.
- <http://www.merck.cl>.
- <http://www.elicinachile.com>.

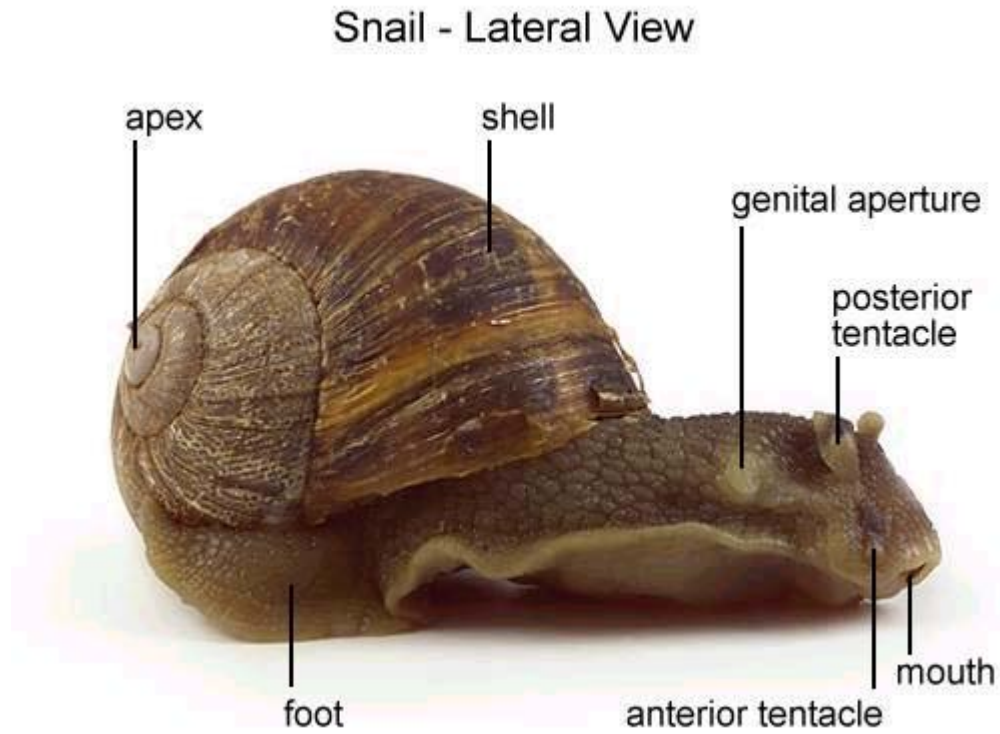
ANEXOS

Anexo N° 1: Esquemas.

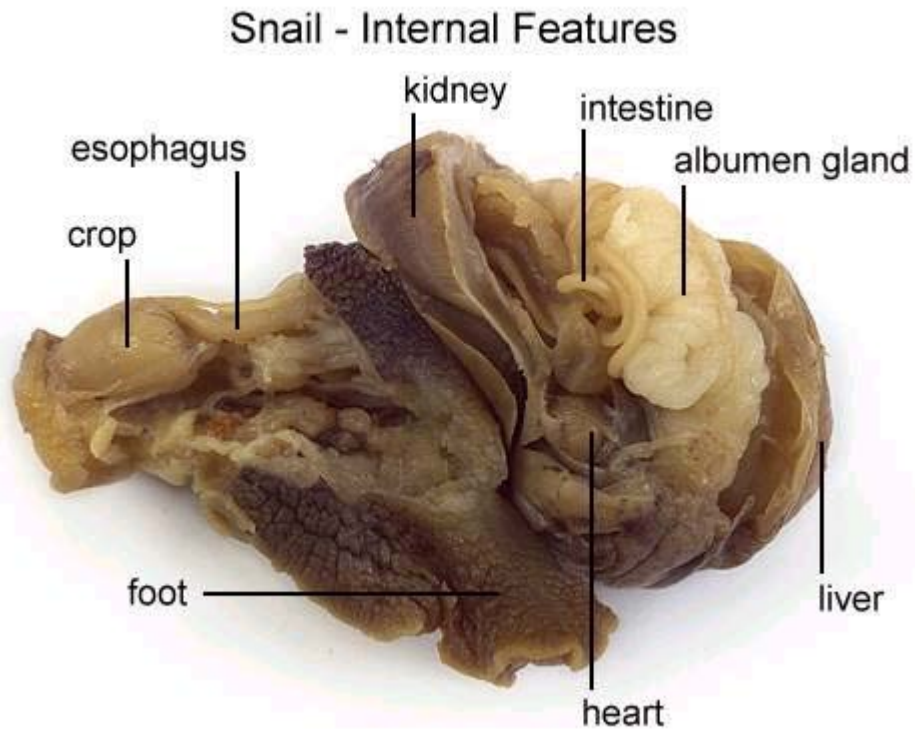
Esquema N° 1: Desarrollo de la actividad del caracol de acuerdo a la temperatura y humedad.



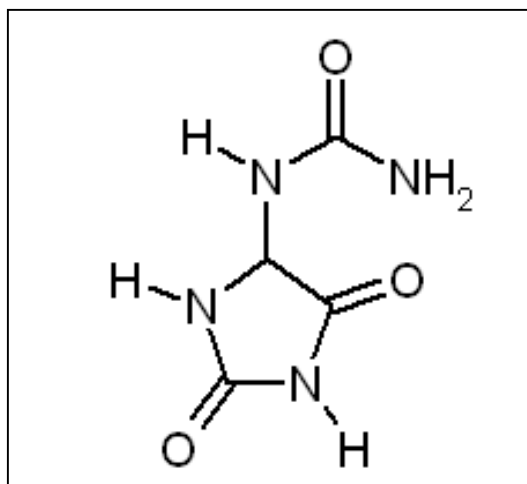
Esquema Nº 2: Anatomía del caracol, caparazón y cuerpo.



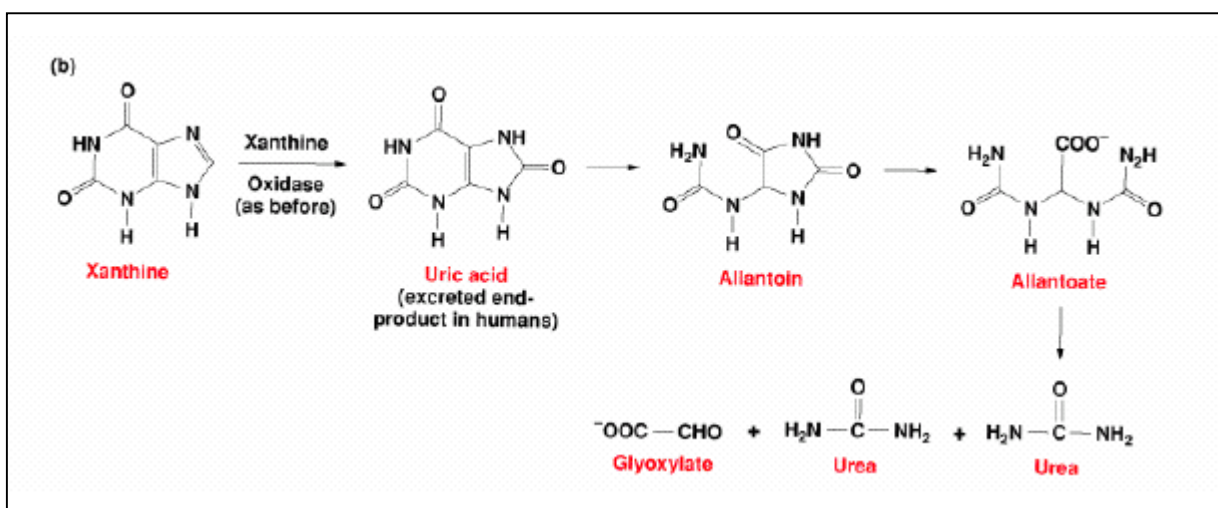
Esquema Nº 3: Masa visceral correspondiente al cuerpo del caracol chileno.



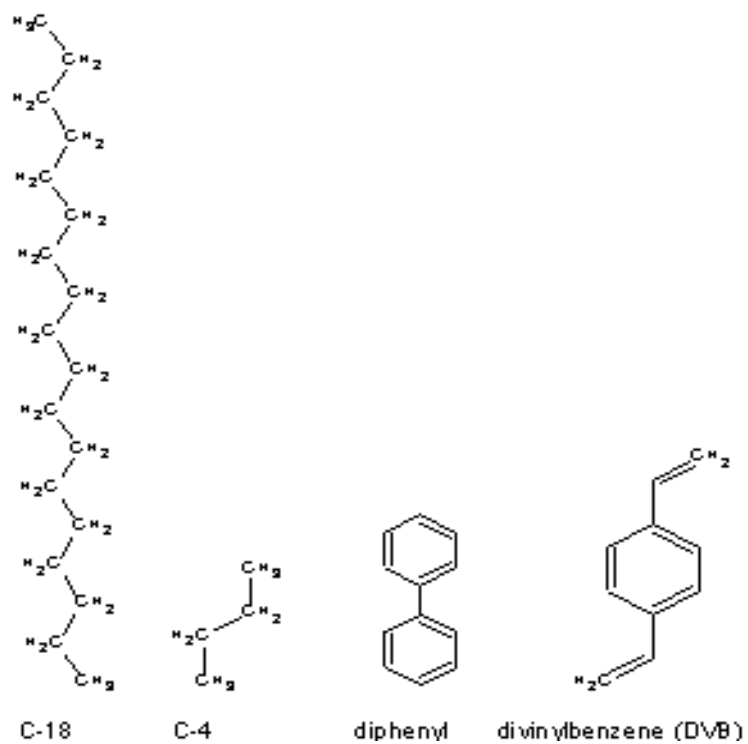
Esquema N° 4: Estructura de la molécula de alantoína.



Esquema N° 5: Ruta metabólica de las purinas y la formación de alantoína.



Esquema N° 8: Los compuestos más comunes encontrados en columnas de fase reversa.



Anexo Nº 2: Tablas.

Tabla Nº 1: criterios de aceptación para el parámetro de precisión en función de la concentración del analito de la AOAC.

Analito %	Radio analito	Unidad	C.V. (%)
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

Tabla Nº 2: Criterio de aceptación del parámetro de exactitud, relacionando el % de recuperación en función de la concentración del analito.

Analito %	Radio analito	Unidad	Porcentaje de recuperación
100	1	100%	98-102
>=10	10-1	10%	98-102
>=1	10-2	1%	97-103
>=0.1	10-3	0.1%	95-105
0.01	10-4	100ppm	90-107
0.001	10-5	10ppm	80-110
0.0001	10-6	1ppm	80-110
0.00001	10-7	100ppb	80-110
0.000001	10-8	10ppb	60-115
0.0000001	10-9	1ppb	40-120

Tabla Nº 3: Valores críticos de la r de Pearson para una prueba unilateral según grados de libertad (N-2).

N - 2	0.05	0.025	0.01	0.005
1	0.988	0.997	0.9995	0.9999
2	0.900	0.950	0.980	0.990
3	0.805	0.878	0.934	0.959
4	0.729	0.811	0.882	0.917
5	0.669	0.754	0.833	0.874
6	0.622	0.707	0.789	0.834
7	0.582	0.666	0.750	0.798
8	0.549	0.632	0.716	0.765
9	0.521	0.602	0.685	0.735
10	0.497	0.576	0.658	0.708
11	0.476	0.553	0.634	0.684
12	0.458	0.532	0.612	0.661
13	0.441	0.514	0.592	0.641
14	0.426	0.497	0.574	0.623
15	0.412	0.482	0.558	0.606
16	0.400	0.468	0.542	0.590
17	0.389	0.456	0.528	0.575
18	0.378	0.444	0.516	0.561
19	0.369	0.433	0.503	0.549
20	0.360	0.423	0.492	0.537
21	0.352	0.413	0.482	0.526
22	0.344	0.404	0.472	0.515
23	0.337	0.396	0.462	0.505
24	0.330	0.388	0.453	0.496
25	0.323	0.381	0.445	0.487
26	0.317	0.374	0.437	0.479
27	0.311	0.367	0.430	0.471
28	0.306	0.361	0.423	0.463
29	0.301	0.355	0.416	0.456
30	0.296	0.349	0.409	0.449
35	0.275	0.325	0.381	0.418
40	0.257	0.304	0.358	0.393
45	0.243	0.288	0.338	0.372
50	0.231	0.273	0.322	0.354
60	0.211	0.250	0.295	0.325
70	0.195	0.232	0.274	0.302
80	0.183	0.217	0.256	0.283
90	0.173	0.205	0.242	0.267
100	0.164	0.195	0.230	0.254

Tabla N° 4: Valores t de Student y probabilidad P asociada en función de los grados de libertad (gl)

gl	P (de una cola)									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.596
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.215	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.706
27	0.256	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.256	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.256	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.255	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
Infinito	0.253	0.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291

**Valores *t* de Student y probabilidad *P* asociada
en función de los grados de libertad *gl*.**

<i>gl</i>	P (de una cola)									
	0.4	0.25	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005	0.0025	0.001	0.0005
2	0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.089	22.326	31.596
3	0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.215	12.924
4	0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587
11	0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	3.497	4.025	4.437
12	0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.428	3.930	4.318
13	0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.372	3.852	4.221
14	0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.326	3.787	4.140
15	0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.286	3.733	4.073
16	0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.252	3.686	4.015
17	0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.222	3.646	3.965
18	0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.197	3.610	3.922
19	0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.174	3.579	3.883
20	0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.153	3.552	3.850
21	0.257	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.135	3.527	3.819
22	0.256	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.119	3.505	3.792
23	0.256	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.104	3.485	3.768
24	0.256	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.091	3.467	3.745
25	0.256	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.078	3.450	3.725
26	0.256	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.067	3.435	3.706
27	0.256	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421	3.690
28	0.256	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.047	3.408	3.674
29	0.256	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.038	3.396	3.659
30	0.256	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.030	3.385	3.646
40	0.255	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	2.971	3.307	3.551
60	0.254	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	2.915	3.232	3.460
120	0.254	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	2.860	3.160	3.373
infinito	0.253	0.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	2.807	3.090	3.291