



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia.**

PROFESOR PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Alejandro Jerez M.
INSTITUTO: Farmacia
FACULTAD: Ciencias

**"IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA POR
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA PARA DETERMINAR Y
CUANTIFICAR ÁCIDO GLICÓLICO EN SECRECIÓN DE CARACOL
(*Helix aspersa* Müller). ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA ALIMENTACIÓN
Y PERÍODO ESTACIONAL EN SU CONCENTRACIÓN"**

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

PAULINA DEL PILAR LAGOS MEDIAVILLA

VALDIVIA – CHILE

2008

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personitas que de alguna u otra manera participaron en mi formación y han hecho que hoy sea la persona que soy.

A mi mamá, mujer a quien admiro y respeto mucho por su honestidad y responsabilidad frente a la vida; a mi papá, hombre de esfuerzo y perseverancia al que admiro por el sacrificio que hace día a día por la familia y a mi hermano, a quién admiro por su gran sentido del humor, lealtad, sinceridad y autenticidad.

De manera especial, agradezco a todos mis amigos, a los que marcaron mi infancia, mi adolescencia y a cada uno de mis queridos hermanos de la gran Familia EJE Corral, personitas que, sin duda, me enseñaron el valor de la amistad. Con ellos aprendí que después de una derrota vienen dos conquistas a favor y que las cosas pasan porque nuestro gran amigo “El Flaco” así las quiere. A mis fieles amigos, cosacos; Siempre estarán en mí, esos buenos momentos que pasamos sin saber que un amigo es una luz brillando en la oscuridad...Gracias y jamás olvidaré que fue ahí donde descubrí mi espíritu de servicio.

A las personitas con las que compartí durante mi estadía en la Universidad...a mis amiguis, con las que pasé gratos momentos y compartí largas jornadas de estudio: Marce, Palo, Mary, gracias por haberme dado la posibilidad de conocerlas y de haber formado tan linda amistad.

A la personita que iluminó mi corazón en el momento menos esperado. A quien compartió conmigo, día a día, durante el desarrollo de este trabajo e hizo que las largas jornadas en el laboratorio sean no sólo una muestra de compañerismo sino también de amor. Fito, te amo con todo mi corazón y gracias por compartir tu vida conmigo.

Además, quiero agradecer a los profesores que participaron en este proyecto, sobre todo porque la relación formada fue más allá de las aulas...

A la profe Carin Akkeson Q.E.P.D, quien iba a patrocinar este trabajo y que lamentablemente, el destino quiso que no fuera así, pero sé que en el lugar donde esté, me dio una manito en esos momentos en que todo parecía no resultar.

Profe Anny, gracias por entregarme su confianza y haberme dado la posibilidad de conocerla; de descubrir el gran corazón que hay detrás de esa mujer de carácter fuerte y que pocos alumnos hemos tenido la dicha de conocer, de entender sus mañas y de aprender de sus fortalezas. Gracias por todo el cariño entregado.

Profe Alejandro, gracias por la confianza entregada, por dedicar tiempo a este trabajo y por su sentido del humor que alegró innumerables momentos. Siempre lo recordaré por su disposición y humildad. Gracias, de verdad.

Caro, por haberme dado la posibilidad de compartir muchos momentos en donde descubrí lo parecidas que somos y por confiar en mi, de verdad, gracias.

A Joel Pardo, persona que desinteresadamente ayudó en este proyecto, no sólo con sus conocimientos sino que también con su alegría diaria que indudablemente hizo que mi estadía en el laboratorio sea una jornada menos pesada. Gracias por tu apoyo y la amistad que nació durante este período.

Al profe Guido, quién colaboró en un momento que jamás imaginé, gracias por su disposición porque sin su ayuda, todo habría sido más difícil.

Al Doctor Dölz, por sus innumerables conversaciones que indudablemente sirvieron para mi formación personal y profesional.

A don Eduardo, gracias por su disposición y por sus palabras de aliento.

INDICE

1	<u>ABREVIATURAS</u>	<u>9</u>
2	<u>RESUMEN</u>	<u>11</u>
	<u>ABSTRACT</u>	<u>12</u>
3	<u>INTRODUCCION</u>	<u>13</u>
3.1	CARACOL	13
3.1.1	ANATOMÍA EXTERNA	13
3.1.2	ANATOMÍA INTERNA	15
3.1.3	RITMO BIOLÓGICO	17
3.1.4	NUTRICIÓN	18
3.1.5	SECRECIÓN	20
3.1.6	HISTORIA Y ACTUALIDAD	23
3.2	ÁCIDO GLICÓLICO	25
3.2.1	QUÍMICA DEL ÁCIDO GLICÓLICO	25
3.2.2	SÍNTESIS DEL ÁCIDO GLICÓLICO EN LA NATURALEZA	26
3.2.3	ÁCIDO GLICÓLICO Y COSMÉTICA	26
3.3	CROMATOGRAFÍA	27
3.4	VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO	28
3.4.1	LINEALIDAD	28
3.4.2	PRECISIÓN	30
3.4.3	EXACTITUD	31
3.4.4	SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD	32
3.4.5	SENSIBILIDAD	33
4	<u>HIPÓTESIS DE TRABAJO</u>	<u>35</u>

5	OBJETIVOS	35
5.1	OBJETIVOS GENERALES	35
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
6	MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1	MUESTRAS	37
6.2	REACTIVOS UTILIZADOS	38
6.3	INSTRUMENTAL Y EQUIPOS	38
6.4	METODOLOGÍA ANALÍTICA	39
6.4.1	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	39
6.4.1.1	Preparación de la fase móvil	40
6.4.2	TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL	40
6.4.3	VALIDACIÓN	41
6.4.3.1	Preparación de estándares	41
6.4.3.2	Linealidad	42
6.4.3.3	Precisión del sistema instrumental	42
6.4.3.3.1	Repetibilidad	42
6.4.3.3.2	Precisión Intermedia	42
6.4.3.4	Precisión del método	43
6.4.3.4.1	Repetibilidad	43
6.4.3.4.2	Precisión Intermedia	43
6.4.3.5	Exactitud	43
6.4.3.6	Selectividad	44
6.4.3.7	Sensibilidad	44

7	RESULTADOS	46
7.1	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	46
7.1.1	LINEALIDAD	46
7.1.2	PRECISIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	47
7.1.2.1	Repetibilidad de sistema instrumental	47
7.1.3	PRECISIÓN DEL MÉTODO	51
7.1.3.1	Repetibilidad del método	51
7.1.3.2	Precisión Intermedia del método	52
7.1.4	EXACTITUD / PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN	55
7.1.5	SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD	58
7.1.6	SENSIBILIDAD (LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN)	59
7.1.6.1	Cálculo de los límites de detección y cuantificación.	61
7.2	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL	62
8	DISCUSIÓN	79
8.1	MÉTODO ANALÍTICO	79
8.2	LINEALIDAD	81
8.3	PRECISIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL	82
8.3.1	REPETIBILIDAD	82
8.3.2	PRECISIÓN INTERMEDIA	82
8.4	PRECISIÓN DEL MÉTODO	83
8.4.1	REPETIBILIDAD	83
8.4.2	PRECISIÓN INTERMEDIA	83
8.5	EXACTITUD	84
8.6	SELECTIVIDAD	84
8.7	SENSIBILIDAD	85
8.8	ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL	86
8.8.1	DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ÁCIDO GLICÓLICO EN SECRECIÓN DE CARACOL <i>HELIX ASPERSA MÜLLER.</i>	86

8.8.2 DETERMINACIÓN DEL FACTOR K´	87
8.8.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER SOMETIDOS A DIFERENTES DIETAS Y PERÍODOS DE OBTENCIÓN DE LA SECRECIÓN.	87
8.8.4 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO EN SECRECIÓN DE CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER SEGÚN PERÍODO DE OBTENCIÓN DE LA SECRECIÓN.	88
8.8.5 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO EN SECRECIÓN DE CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER SEGÚN ALIMENTACIÓN.	89
8.8.6 ANÁLISIS GENERAL	91
9 CONCLUSIONES	92
10 PROYECCIONES	94
11 REFERENCIAS	95
12 ANEXOS	103
12.1 ANEXO N° 1: FIGURAS	103
12.1.1 FIGURA N° 1: ANATOMÍA EXTERNA DEL CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER.	103
12.1.2 FIGURA N° 2: ANATOMÍA INTERNA DEL CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER.	103
12.1.3 FIGURA N° 3: DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD DEL CARACOL DE ACUERDO A LA TEMPERATURA Y HUMEDAD.	104
12.1.4 FIGURA N° 4: EPIFRAGMA. MEMBRANA MUCOSA, CALCIFICADA SECRETADA POR EL CARACOL DURANTE EL PERÍODO DE INACTIVIDAD.	104
12.1.5 FIGURA N° 5: ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO GLICÓLICO.	105
12.1.6 FIGURA N° 6: ESQUEMA DEL PROCESO DE FOTOSÍNTESIS. A LA IZQUIERDA, LAS REACCIONES LUMINOSAS DONDE SE PRODUCEN ATP Y NADPH. A LA DERECHA, LAS REACCIONES DE FIJACIÓN DEL CARBONO QUE DARÁN ORIGEN A LOS CARBOHIDRATOS.	105
12.1.7 FIGURA N° 7: PROCESO DE FOTORRESPIRACIÓN Y FORMACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO.	106

12.2 ANEXO N° 2: TABLAS	107
12.2.1 TABLA N° 1: EQUIVALENCIA DE SECRECIÓN DE CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER, ANTES Y DESPUÉS DE LIOFILIZAR.	107
12.2.2 TABLA N° 2: TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL <i>HELIX ASPERSA</i> MÜLLER.	108
12.2.3 TABLA N° 3: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE MAÍZ Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE OCTUBRE.	109
12.2.4 TABLA N° 4: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE MAÍZ Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE DICIEMBRE.	109
12.2.5 TABLA N° 5: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE MAÍZ Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE MARZO.	110
12.2.6 TABLA N° 6: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE SOYA Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE OCTUBRE.	110
12.2.7 TABLA N° 7: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE SOYA Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE DICIEMBRE.	111
12.2.8 TABLA N° 8: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON HARINA DE SOYA Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE MARZO.	111
12.2.9 TABLA N° 9: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON VEGETALES Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE OCTUBRE.	112
12.2.10 TABLA N° 10: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOLES ALIMENTADOS CON VEGETALES Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE DICIEMBRE.	112

12.2.11	TABLA N° 11: CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GLICÓLICO OBTENIDA EN MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL ALIMENTADOS CON VEGETALES Y CUYA OBTENCIÓN SE REALIZÓ DURANTE EL MES DE MARZO.	113
12.2.12	TABLA N° 12: VALORES CRÍTICOS DE LA R DE PEARSON PARA UNA PRUEBA UNILATERAL SEGÚN GRADOS DE LIBERTAD (N-2).	114
12.2.13	TABLA N° 13: VALORES T DE STUDENT Y PROBABILIDAD P ASOCIADA EN FUNCIÓN DE LOS GRADOS DE LIBERTAD (GL)	115
12.2.14	TABLA N° 14: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA EL PARÁMETRO DE PRECISIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANALITO DE LA A.O.A.C.	116
12.2.15	TABLA N° 15: CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA EL PARÁMETRO DE EXACTITUD, RELACIONANDO EL % DE RECUPERACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL ANALITO DE LA A.O.A.C.	117
12.3	ANEXO N°3: CROMATOGRAMAS	118
12.3.1	FIGURA N° 1: CROMATOGRAMA OBTENIDO AL INYECTAR UNA MUESTRA DE SECRECIÓN DE CARACOL CORRESPONDIENTE AL MES DE OCTUBRE Y ALIMENTACIÓN HARINA DE MAÍZ.	118
12.3.2	FIGURA N° 2: CROMATOGRAMA OBTENIDO AL INYECTAR UNA MUESTRA DE SECRECIÓN DE CARACOL CORRESPONDIENTE AL MES DE DICIEMBRE Y ALIMENTACIÓN HARINA DE MAÍZ.	118
12.3.3	FIGURA N° 3: CROMATOGRAMA OBTENIDO AL INYECTAR UNA MUESTRA DE SECRECIÓN DE CARACOL CORRESPONDIENTE AL MES DE MARZO Y ALIMENTACIÓN HARINA DE MAÍZ.	119
12.3.4	FIGURA N° 4: CROMATOGRAMA OBTENIDO AL INYECTAR UNA MUESTRA DE SECRECIÓN DE CARACOL CORRESPONDIENTE AL MES DE OCTUBRE Y ALIMENTACIÓN HARINA DE SOYA.	119
12.4	ANEXO N° 4: EJEMPLOS DE CÁLCULOS.	123
12.4.1	CÁLCULO PARA DETERMINAR LOS GRAMOS DE SECRECIÓN LIOFILIZADA QUE SE NECESITAN PESAR PARA PREPARAR 3 ML DE SUSPENSIÓN.	123
12.4.2	CÁLCULO PARA DETERMINAR LOS FACTORES DE DILUCIÓN DE CADA MUESTRA.	123
12.4.3	CÁLCULO PARA DETERMINAR EL % RECUPERACIÓN	124
12.4.4	CÁLCULO PARA DETERMINAR CONCENTRACIÓN ESPERADA DE ÁCIDO GLICÓLICO AL REALIZAR LA MEZCLA DE MUESTRA Y ESTÁNDAR DE ÁCIDO GLICÓLICO.	124

1 **ABREVIATURAS**

A.O.A.C	: Association of Oficial Analytical Chemist.
°C	: Grados Celsius.
C.V	: Coeficiente de variación.
D.S	: Desviación estándar
FDA	: Food and Drug Administration.
GLP	: Buenas prácticas de laboratorio.
GMP	: Buenas prácticas de manufactura.
g / mol	: Gramos por mol.
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography. (Cromatografía Líquida Alta Eficiencia).
ISP	: Instituto de Salud Pública.
K´	: Factor de Capacidad.
kDa	: Kilodaltons
mM	: Milimolar.
mL	: Mililitro.
mL / Min	: Mililitro por minuto.
mPa	: Milipascales
mV x Min	: Milivolt por minuto.
Nº	: Número.
nm	: nanómetro
pKa	: Índice que expresa la fortaleza de un ácido débil.
pH	: Potencial Hidrógeno, expresa grado de acidez o basicidad de una

disolución acuosa.

UV : Ultravioleta

$\mu\text{g/mL}$: Microgramo por mililitro.

μL : Microlitros.

2 RESUMEN

En los últimos años el campo de la tecnología cosmética ha experimentado un amplio interés por la aparición de la Baba o secreción de Caracol, un producto natural con propiedades cosméticas y medicinales fascinantes. Se trata de una secreción producida por los caracoles de tierra que cumple funciones vitales para ellos como los procesos de reparación y regeneración.

En este trabajo, se desarrolló un método analítico por HPLC-UV para determinar y cuantificar ácido glicólico en la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller. Además, se determinó si existen diferencias en la concentración del ácido, según la dieta del caracol (vegetales verdes, harina de soya y harina de maíz) y el período de obtención de la secreción (octubre, diciembre y marzo, correspondiente al inicio, mitad y término del período activo del caracol, respectivamente). Previo al análisis de las muestras, se validó el método establecido, resultando ser lineal para el rango de concentraciones trabajadas (20- 100 $\mu\text{g/mL}$). Además, la sensibilidad, selectividad, precisión y exactitud hacen que el método sea conveniente para realizar análisis de rutina de muestras de secreción.

Se determinó que tanto la alimentación, como el período estacional influyen en la concentración de ácido glicólico en la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller, obteniéndose concentraciones promedio desde 77,84 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a muestras de caracoles alimentados con harina de soya y obtenidas durante el mes de diciembre, hasta 258,24 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente a muestras de caracoles alimentados con vegetales y obtenidas durante marzo.

ABSTRACT

In recent years, the cosmetics industry has demonstrated widespread interest in the emergence of the snail secretion, a natural product with fascinating cosmetic and medicinal properties. This is a secretion produced by snails which has proven vital for shell repair and regeneration.

In this study, an analytical method of HPLC- UV was developed to identify and quantify glycolic acid in secretion of the snail *Helix aspersa* Müller. Furthermore, possible differences in glycolic acid concentration were determined, according to the snail's diet (vegetables, soybean flour and maize flour) and obtaining period of secretion (October, December and March, corresponding to the start, middle and end of the snail's active period, respectively). This method was validated prior to sample analysis, demonstrating a linear relationship for the concentrations range worked (20- 100 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, sensitivity, selectivity, precision and accuracy make this method suitable for the routine analysis of secretion samples.

Conclusions revealed that both food and seasonal periods influence on glycolic acid concentrations in secretion of *Helix aspersa* Müller. Average concentrations from 77,84 $\mu\text{g/mL}$ were obtained, corresponding to snails samples fed with soybean and obtained during December, to 258, 24 $\mu\text{g/mL}$, corresponding to snails samples fed with vegetables and obtained during March.

3 INTRODUCCION

3.1 CARACOL

El caracol es un molusco perteneciente a la clase Gasterópodo, es decir, se arrastra gracias a un aparato motor situado debajo del vientre (Wallach, 2005). La clase gasterópodos es la más diversa entre los moluscos, comprende desde formas marinas con muchos caracteres primitivos, hasta formas terrestres altamente evolucionadas (Hickman *et al.*, 2002).

La especie de caracol silvestre *Helix aspersa* Müller es nativa del este europeo, Gran Bretaña y de la costa del Mediterráneo y fue introducida en el sur de los Estados Unidos, donde se difundió ampliamente. Desde allí se distribuyó al Sur de América (Cockrum y McCauley, 1967).

3.1.1 Anatomía Externa

- Cabeza: Posee una cabeza carnosa provista de dos pares de tentáculos, un par de ojos (sobre los tentáculos superiores) y la boca (Storer *et al.*, 1986). Dentro de la boca hay una estructura peculiar, la rádula, órgano con forma de lengua y que tiene doble función: raspa el alimento en finas partículas, y sirve de cinta transportadora para llevarlas en un flujo continuo hacia el tracto digestivo (Hickman *et al.*, 2002). Cerca de la cabeza, en el lado derecho, se abre el poro genital. El ano y el poro respiratorio, que es mayor, están en el borde blando del manto, en el borde de la concha (Storer *et al.*, 1986).

- Pie: Órgano musculoso ventral reptador (Meglitsch, 1978) que se une directamente a la cabeza (Storer *et al.*, 1986). El pie, además de estar adaptado para la locomoción, lo está también para la fijación a los diferentes sustratos. Se trata de una estructura en forma de suela, ventral, en la que las ondas de contracción muscular provocan una locomoción por reptación. El moco segregado se utiliza frecuentemente como ayuda a la adhesión o para la formación de una pista por la que el caracol se desliza (Hickman *et al.*, 2002). Este moco es producido por glándulas del pie, específicamente por una gran glándula pedia ubicada debajo de la boca (Ruppert y Barnes, 1996).
- Concha: Se halla directamente sobre el pie. Es segregada por el manto, membrana delgada que además de segregar la concha, rodea las vísceras (Storer *et al.*, 1986). Típicamente tiene tres capas. El periostraco, que es la capa externa, de aspecto córneo, constituida por una sustancia orgánica llamada conquiolina. Contribuye a la protección de las capas subyacentes contra el ataque de organismos perforantes. La capa media o prismática se compone de prismas de carbonato de calcio densamente empaquetados y depositados en una matriz proteica. La capa nacarada de la concha es la más interna, está adosada al manto y es secretada continuamente por la superficie del mismo (Hickman *et al.*, 2002) (Anexo N° 1, Figura N° 1).

3.1.2 Anatomía interna

Está compuesta por una masa visceral que contiene todos los aparatos funcionales del caracol y por el manto, cubierta de tegumento que se extiende desde la masa visceral y que cuelga sobre cada lado del cuerpo; protege las partes blandas y crea entre ellas y la masa visceral, un espacio denominado cavidad paleal o del manto. La superficie externa del manto segrega la concha y en esta cavidad se alojan los sistemas funcionales (Hickman *et al.*, 2002). Todas las partes blandas pueden retraerse completamente dentro de la concha por la acción del músculo columnelar, que se extiende interiormente hasta la espira superior de la concha (Storer *et al.*, 1986) (Anexo N° 1, Figura N° 2).

- Aparato digestivo: Comprende la boca; la faringe muscular, la rádula ventral; un esófago alargado; un gran buche de paredes finas; un estómago redondeado; un largo intestino replegado y el ano (Storer *et al.*, 1986).

- Aparato respiratorio: A diferencia de otros gasterópodos, la especie *Helix aspersa* Müller pertenece al orden Pulmonados, que se caracteriza por poseer un pulmón, y no branquias el que está formado por una red de vasos sanguíneos. El aire entra y sale por un poro respiratorio (Storer *et al.*, 1986) denominado Pneumostoma y se encuentra cerca del orificio anal.

- Aparato circulatorio: este sistema se encarga de coleccionar la sangre oxigenada de las paredes del manto y la conduce hacia el corazón (formado por una aurícula y un ventrículo más grande, ambos en la cavidad pericárdica) y de aquí a través de la aorta a la cabeza, al pie y a la masa visceral (Cockrum y McCauley, 1967).
- Aparato excretor: Este sistema consta de un solo riñón que emite un uréter anterior, el cual corre a lo largo de la porción posterior del intestino y se vacía al exterior a través del nefridiostoma (Cockrum y McCauley, 1967).
- Aparato nervioso: Compuesto, principalmente, por ganglios nerviosos. Los nervios procedentes de estos se dirigen a todos los órganos (Storer *et al.*, 1986).
- Aparato sensorial: El extremo de cada tentáculo posterior tiene un ojo con cornea, cristalino y retina. Además, poseen órganos del equilibrio denominados estatocistos y, probablemente, tiene un órgano olfativo. (Storer *et al.*, 1986).
- Aparato locomotor: El avance de los caracoles es lento y se produce por desplazamiento hacia delante (Benito, 2004) por medio de ondas de contracción muscular que recorren el pie (Ruppert y Barnes, 1996), el que se ve favorecido por la secreción de una sustancia mucosa producida por glándulas ubicadas en él. (Benito, 2004).

- Aparato reproductor: En cada individuo hay un sistema reproductor mixto, masculino y femenino, en donde la copulación es recíproca. El pene de cada uno se inserta en la vagina del otro, transfiriendo un espermatozoido; luego se separan los dos individuos. Depositán una o varias masas de huevos recubiertos por una cubierta gelatinosa, en lugares húmedos o en agujeros poco profundos (Storer *et al.*, 1986).

3.1.3 Ritmo biológico

La actividad natural de los caracoles de jardín se puede clasificar en dos grandes etapas: actividad e inactividad. Cuando estos se vuelven inactivos durante el invierno, el estado que alcanzan se denomina hibernación. Si éste ocurre en el verano, se denomina estivación. Sin embargo, estos términos no han sido usados correctamente, lo que ha traído confusión entre los diferentes autores. Además, no está claro si la estivación y la hibernación ocurren con procesos fisiológicos similares que solamente se diferencian por el período en que ocurre o si son procesos fisiológicos completamente diferentes (Anexo N° 1, Figura N° 3).

Sí está claro que, durante el período inactivo, los caracoles secretan una sustancia mucosa que sella el orificio de su concha para protegerse de condiciones desfavorables. Esta membrana calcificada se conoce con el nombre de opérculo o epifragma (Herreid, 1977) (Anexo N° 1, Figura N° 4). Durante el período activo, preferentemente de noche y en períodos de humedad (Storer *et al.*, 1986) ocurren cuatro funciones importantes en la vida del caracol: la locomoción, la alimentación, el crecimiento de las especies jóvenes y la reproducción de los adultos (Aupinel y Bonnet, 1996).

Durante el día, se esconden en las oquedades o debajo de los objetos que haya sobre el suelo, con la cabeza y el pie metidos en la concha (Cockrum y McCauley, 1967).

3.1.4 Nutrición

La especie *Helix aspersa* Müller se caracteriza por ser una especie herbívora. Su alimento consiste, principalmente, en plantas verdes, que son humedecidas por las secreciones de las glándulas salivales y raspadas hasta fragmentarlas en pequeños trozos mediante la rádula multidentada (Cockrum y McCauley, 1967).

Se describe que caracoles *Helix aspersa* Müller, pueden tener diferentes preferencias alimenticias. Por lo tanto, cuando estos están en criaderos, se aconseja ir acostumbrándolos a una dieta determinada. Algunos de los alimentos que consumen en los criaderos son: cebada, pepino, zanahoria, repollo, coliflor, apio, cebollines, trébol, puerro, ortiga, lechuga, avena, cebolla, perejil, duraznos, peras maduras, ciruelas, cerezas, papa, rábano, rosas, espinaca, cardo, tomates, nabo, trigo, hojas de plantas, pasto, además de los diferentes tipos de harinas, como la de trigo, soya y maíz, entre otras (Bustamante, 2004). Para que la dieta sea aún más completa, los helicultores recomiendan agregar cantidades determinadas de calcio para ayudar en el crecimiento del caracol joven y en la formación o reparación de la concha cuando ésta se daña. Condición que ya se ha comprobado y resulta necesaria para la crianza de caracoles de jardín. (Crowell, 1973; Perea *et al.*, 2004).

Se ha demostrado en *Helix aspersa máxima* que la composición, tanto de la concha como del músculo, se ve claramente influenciada por la calidad de la dieta

(Milinsk *et al.*, 2003). Esto resultaría de gran importancia para aquellos helicultores que los crían con fines gastronómicos, ya que con ello podrían determinar qué dieta logra una mejor calidad del músculo del caracol para así entregar una mejor composición nutricional al consumidor.

Como ya se detalló, son varios los alimentos que el caracol de jardín puede consumir, pero en esta oportunidad, se describirán los utilizados para este trabajo que fueron vegetales verdes (lechuga; *Lactuca sativa* y repollo; *Brassica oleracea capitata*), harina de maíz (*Zea mays*) y harina de soya (*Glycine max*) que son los alimentos más utilizados en el criadero de caracoles de donde se obtuvieron las diferentes muestras de secreción.

- El maíz es un cereal de la familia de las gramíneas. Su composición consta de proteínas, extracto etéreo, fibra cruda, cenizas, almidón y azúcares que varían dependiendo de la parte del grano; pericarpio, endospermo o germen.
(<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T04.htm>)
- La soya es una planta de la familia de las leguminosas. Su composición consta de proteínas, lípidos, carbohidratos y cenizas.
(<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T14.htm>)
- La lechuga es una hortaliza de la familia asteraceae. Su composición consta de agua en grandes proporciones, proteínas, vitaminas A, C y E, fibra y minerales.
(<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T33.htm>)

- El repollo es una hortaliza de la familia brassicáceas. Es rico en vitaminas C y A, calcio, betacarotenos y fibra (<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T29.htm>).

3.1.5 Secreción

El mucus es un gel constituido por una red de polímeros que funciona como una capa protectora de superficies de tegumentos y mucosas, tanto de animales simples como de mamíferos (Verdugo *et al.*, 1987).

El pie de los gasterópodos está cubierto con una fina capa de este mucus, el que es usado para una variedad de funciones, incluyendo adhesión, lubricación, repulsión de posibles predadores y para acoplarse durante la reproducción. Esta secreción pedía tiene aspecto de gel, que contiene aproximadamente 91 a 98% peso en peso de agua, dependiendo de la especie, combinado con una pequeña cantidad de glicoproteínas de alto peso molecular (Denny, 1984), que en *Helix aspersa* alcanzan pesos de 82, 97 y 175 kDa (Pawlicki *et al.*, 2003).

Muchos moluscos, tanto especies marinas como terrestres, cuando están inactivos, utilizan esta secreción de gran capacidad adhesiva, para pegarse a diversas superficies. Sin embargo, resulta extraño, ya que no se espera que un gel tan diluido, que comúnmente funciona como lubricante, pueda tener propiedades tan grandes de adhesión (Pawlicki *et al.*, 2003).

La literatura describe que para la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller existen dos tipos de secreción. Una de ellas traslúcida de tipo “no adhesivo”, que es la que deja el caracol cuando se desplaza y una similar, pero más espesa, condensada, viscosa y elástica, que es la que utiliza para adherirse a diversas superficies. Ambas se

diferencian claramente por el tipo de proteínas presentes en ellas (Pawlicki *et al*, 2003). Se ha descrito también que la naturaleza de la estimulación del caracol determina claramente el tipo de secreción que éste libera, la que varía desde una secreción viscosa y pegajosa producida bajo condiciones normales o por una estimulación ligera hasta una secreción espumosa y clara que el caracol libera bajo estimulación continua e incluso, violenta (Campion, 1961).

Existen publicaciones que describen detalladamente la estructura de las glándulas secretoras, tanto la pedia como también la opercular, quedando muy claro que la estructura del pie y las glándulas asociadas están adaptadas a sus diferentes formas de vida y sus requerimientos fisiológicos y ambientales (Shirbhate y Cook, 1987).

En el caso de *Helix aspersa* Müller, la secreción está compuesta por productos sintetizados por diferentes tipos de glándulas secretoras. Éstas son todas glándulas unicelulares que se encuentran en el tejido conectivo y secretan sus productos a través de poros que pasan entre las células epidérmicas. Son de diversas formas y usualmente tienen un conducto excretor largo. Se han encontrado ocho tipos diferentes de glándulas secretoras. Cuatro de ellas secretan diferentes tipos de mucus; proteínas, calcio, pigmentos y por último, lípidos (Campion, 1961).

El mecanismo molecular que controla el almacenamiento de esta secreción, dentro de las células glandulares, y su liberación está poco claro. Un estudio realizado en la babosa *Ariolimax columbianus*, postula que la liberación de calcio de compartimentos intragranulares influye directamente en la liberación de secreción de otras glándulas (Verdugo *et al.*, 1987).

Para *Helix aspersa* se postula que una de las causas de que las células glandulares liberen esta secreción es que en el sistema circulatorio del caracol ocurren constantes cambios de presión, que suceden por el movimiento propio del caracol, los que comprimen los cuerpos celulares glandulares que responden liberando la secreción. Sin embargo, cuando el animal deja de moverse, las células dejan de secretar mucus. Por lo tanto, esto sólo explicaría la liberación de secreción durante el movimiento del caracol. Posteriormente, se postuló que la inervación de las células glandulares podría tener alguna responsabilidad. Aunque no hay estudios sobre este tema, el mecanismo de liberación de la secreción podría acercarse más a esta teoría que a la anteriormente descrita, en donde la liberación de la secreción estaría controlada por el sistema nervioso, lo que explicaría el aumento de calcio secretado cuando los caracoles son estresados (Campion, 1961).

La secreción del caracol o también conocida comúnmente como baba de caracol, se ha transformado en una de las sustancias más apetecidas por los laboratorios cosméticos y farmacéuticos de los mercados mundiales, debido a las propiedades que se le han atribuido por la composición de ésta, la que varía en su aspecto y calidad de acuerdo a la manera de extraerla (Campion, 1961), a las condiciones ambientales en donde se encuentra (Campion, 1961), a la estacionalidad (Davies *et al.*, 1991; Lira, 2008) y a los hábitos alimenticios a los que están sometidos (Campion, 1961; Lira, 2008). Con esto se aclara que la composición de la secreción de caracoles, tanto de *Helix aspersa* Müller, como también de otras especies, varía por los factores antes mencionados lo que influirá directamente en la calidad de la secreción y, por lo tanto, en

las propiedades de algún producto a fabricar con ella, como por ejemplo, las cremas de uso cosmético.

Por esto resulta interesante determinar si la alimentación y la estacionalidad influyen en la concentración de los componentes de la secreción de la especie *Helix aspersa* Müller, que es la especie que ha cobrado gran importancia en la actualidad, lo que sería de gran ayuda para una mejor crianza de caracoles, determinándose así, que alimentación y/o período estacional pudieran favorecer la presencia de algún componente en particular o el conjunto de ellos, otorgándole así una mejor calidad a los productos cosméticos que con ella se elaboran.

3.1.6 Historia y actualidad

Revisiones históricas relacionadas al uso terapéutico de los caracoles revelan que desde la antigüedad hasta hoy, el hombre ha considerado que estos tienen numerosas propiedades biológicas y terapéuticas. En la época de Hipócrates, ya se proponía el uso de la secreción del caracol. Celso, Pliny, Galeno y Ambroise Paré tenían diferentes teorías que justificaban el uso de caracoles en diversos preparados: crudos; molidos, incluida la concha; hervidos y asados a la parrilla en conjunto con una copa de vino. En el siglo diecinueve fueron utilizados como jugos, caldos o pastas, preferentemente para el tratamiento de hernias y para darle brillo y suavidad a la piel. Más adelante comenzaron a usarse para afecciones tales como tos, bronquitis, catarro, asma, amigdalitis, faringitis, espasmos intestinales, gastritis y para afecciones de la piel como el sarampión y erisipelas. Ya en el siglo XX, se confirma la propiedad sedativa de la secreción de caracol *Helix pomatia*. Este mucus se extraía y procesaba para obtener

una solución aséptica. Además, se conoció el efecto bronco-relajante producido por esta sustancia que se relaciona con la liberación de prostaglandina E-2 (Bonnemain, 2005).

Sin embargo, es la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller la que ha cobrado gran importancia en la actualidad, ya que fabricantes de diversos productos cosméticos le han atribuido diferentes propiedades dermatológicas, ya sea para quitar manchas, como también para disminuir las líneas de expresión, estrías, celulitis y acné, ya que sostienen que esta secreción contiene de manera natural diversos componentes, tales como alantoína, ácido glicólico, antibióticos, proteínas como colágeno y elastina y vitaminas (Antena 3 Directo Chile; Elicina: Crema de caracol; El mercurio on line; Instituto Politécnico Nacional de México). No obstante, a pesar de todas las propiedades que se le han atribuido a la secreción de la especie *Helix aspersa* Müller, es sólo información de productos comerciales y sólo se han encontrado antecedentes de trabajos realizados en la Universidad Austral de Chile que confirman la presencia de alantoína en esta secreción (Manosalva, 2005; Lira, 2008).

Actualmente, la secreción o baba de caracol, de distintos criaderos, se comercializa como materia prima en el mercado chileno. Un ejemplo de ello es Pro-Lham®, distribuido por MAPRIN LTDA, empresa que provee de secreción de caracol a algunos laboratorios que fabrican productos cosméticos a base de ella, alcanzando, esta materia prima, valores aproximados de \$145.000 el litro.

Se ha descrito que existen factores antimicrobianos, proteínas, glicoproteínas y carbohidratos en el mucus de otras especies de caracoles de tierra (Iguchi *et al*, 1982; Obara, 1992), lo que incentiva a estudiar los componentes de la secreción del caracol

de jardín *Helix aspersa* Müller, que es la especie que se encuentra en nuestro país. Así, una vez determinados y cuantificados, estos componentes, se podrán atribuir las verdaderas propiedades a la secreción, ya que son muchos los laboratorios cosméticos que fabrican cremas con ella, pero ninguno de ellos ha publicado la cantidad de secreción utilizada en su fabricación, menos aún la concentración de los componentes que cumplen las funciones atribuidas a tan codiciado producto.

3.2 ÁCIDO GLICÓLICO

Los Alfa- Hidroxiácidos (AHAs), son una familia de ácidos orgánicos que tienen un grupo hidroxilo en el átomo de carbono alfa (Jiang y Qureshi, 1998) y se encuentran, preferentemente, en alimentos naturales.

Numerosos son los ácidos que pertenecen a esta familia y se diferencian en el largo de la molécula. El ácido glicólico es uno de ellos y se encuentra, principalmente, en la caña de azúcar. Estructuralmente es el más corto, ya que contiene sólo dos átomos de carbono en su estructura, lo que permite que sea un compuesto de fácil manejo dermatológico, ya que puede atravesar fácilmente las capas de la piel (Cotellesa *et al.*, 1995).

3.2.1 Química del ácido glicólico

El ácido glicólico, ácido hidroxiacético o ácido hidroxietanoico, es un constituyente natural del jugo de la caña de azúcar. Sin embargo, se puede obtener de la reacción química entre el ácido monocloroacético e hidróxido de sodio o también de la reducción electrolítica del ácido oxálico. Es un polvo incoloro, levemente

higroscópico, soluble en agua, metanol, alcohol, acetona, ácido acético y éter. Clasificado como ácido débil, de fórmula $C_2H_4O_3$ y peso molecular de 76,05 g/mol, tiene un pKa (25°C) igual a 3.83 y su punto de fusión es 80°C (Merck Index, 2001) (Anexo N° 1, Figura N° 5).

3.2.2 Síntesis del ácido glicólico en la naturaleza

Los alfa- Hidroxiácidos (AHAs) son ácidos orgánicos generalmente extraídos de frutas y de la caña de azúcar. Ellos son metabolitos del ciclo de los carbohidratos y de otros procesos metabólicos importantes (Nicoletti *et al.*, 1999).

El ácido glicólico se produce en la fotosíntesis, específicamente en un proceso metabólico denominado fotorrespiración. En este último, los glúcidos formados en la fotosíntesis son oxidados a CO_2 y agua en presencia de luz, perdiéndose energía (Taiz y Zeiger, 2002) (Anexo N°1, Figuras N° 6 y 7).

3.2.3 Ácido glicólico y cosmética

Los hidroxiácidos se utilizan en dermatología desde hace varios años en diferentes indicaciones terapéuticas, aunque su uso más extendido es en el fotoenvejecimiento cutáneo (Briden, 2004). Diversas publicaciones describen el uso tópico de ácido glicólico sobre la piel. En el tratamiento antiarrugas se han obtenido muy buenos resultados en diferentes formas de aplicación (Coro-Antich *et al.*, 2000; Funasaka *et al.*, 2001). Además, se comprobó que este ácido actúa como dermoabrasivo al emplearlo en estos tratamientos, ya que al ser aplicado sobre la piel de la cara adelgaza el estrato córneo, engrosa la epidermis y aumenta el contenido de

colágeno en la dermis papilar (Coro-Antich *et al.*, 2000). Además, se han obtenido buenos resultados en el tratamiento de diversas patologías dermatológicas, tales como acné, en su forma pápulo-pustular y comedónica; hiperqueratosis; ictiosis; psoriasis; verrugas; envejecimiento y fotoenvejecimiento (Cotellessa *et al.*, 1995).

La FDA establece que aquellos productos cosméticos que contienen ácido glicólico son seguros si se utilizan en concentraciones iguales o menores al 10% y que alcanzan un pH no menor a 3,5. Aquellos productos cosméticos que contengan concentraciones de 20%, 30% y más de ácido glicólico, y que alcanzan un pH no mayor a 3, solamente se pueden utilizar en centros cosméticos autorizados y deben ser aplicados por personal especializado.

3.3 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método analítico empleado ampliamente en la separación, identificación y determinación de componentes químicos en mezclas complejas. El notable aumento en la calidad del material de relleno y el avance en la instrumentación, llevaron al nacimiento y rápido crecimiento de una nueva modalidad: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), en el cual los principales logros son la rapidez, resolución y reproducibilidad.

Actualmente, la cromatografía de fase ligada es el método dominante y puede clasificarse en fase normal y fase reversa, de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz. Así, la fase reversa se caracteriza porque la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar (Quattrocchi *et al.*, 1992).

3.4 VALIDACION DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación se define como el establecimiento de pruebas documentales que aportan un alto grado de seguridad de que un proceso planificado se efectuará uniformemente en conformidad con los resultados previstos especificados (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998).

Los estudios de validación son requisitos para las GMP y GLP, estándares internacionales de calidad que están dirigidas a disminuir los riesgos, inherentes a toda producción farmacéutica, que no pueden ser previstos completamente mediante la evaluación de los productos terminados y a describir los principios que deben regir los procesos de organización de un laboratorio de control de calidad, respectivamente (<http://www.ispch.cl/ctrl/Inspeccion/herramientas.html>).

Una vez desarrollado un método de análisis por HPLC, al igual que toda técnica analítica, ésta deberá validarse para así confirmar y documentar que los resultados obtenidos por el método utilizado, son confiables (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Para la validación de métodos analíticos, se deben determinar como mínimo los siguientes parámetros: Linealidad, Precisión, Exactitud y Sensibilidad con estándares de ácido glicólico, de acuerdo a las condiciones de tratamiento de muestras y cromatográficas establecidas en la literatura (Quattrocchi *et al.*, 1992).

3.4.1 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Para su determinación se prepara una serie de al menos cinco diluciones de un estándar, comprendiendo los ámbitos estimados de

trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el límite superior y un defecto de 50 % debajo del límite inferior. Estas soluciones se inyectan al menos por duplicado y se determina la curva de regresión $Y = bX + a$, donde a corresponde al estimador de la ordenada y b , la pendiente. Independientemente de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado (por ejemplo, $p=0,05$):

- Del coeficiente de regresión lineal (r): se determina para evaluar el ajuste al modelo lineal propuesto, $Y = bX + a$.
- De la pendiente (b): se determina como parámetro indicativo de la sensibilidad del método o para evaluar la correlación de diferentes métodos.
- De la ordenada al origen (a): se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es decir, que la recta pase por el origen y que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio.

El valor $r=1$ ó -1 , indica una recta perfectamente lineal. En la práctica r es generalmente mayor a 0,99. Además se calcula el coeficiente de determinación r^2 , porcentaje de variabilidad de los datos que se explica por la asociación entre las dos variables. Sin embargo, el mejor indicador del modelo lineal no es r sino un *test* estadístico, en el cual se calcula un valor de t_r con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido. Si el valor observado de t_r es mayor que t_{tabla} , se rechaza la hipótesis, siendo la correlación lineal significativa con la probabilidad calculada (Quattrocchi *et al.*, 1992).

3.4.2 Precisión

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, δ , estimada analíticamente por s o más comúnmente como la desviación estándar relativa (**RSD**) o coeficiente de variación (**CV**). Ambos estimadores, desviación estándar y desviación estándar relativa permiten evaluar la incertidumbre en la estimación de la medida (error aleatorio, correspondiente a la dispersión de datos alrededor de la media).

Se calcula como:

$$\%CV = (s \times 100) / \bar{X}$$

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre:

- **El sistema:** evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.
- **El método:** evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.

En este caso, la precisión debe medirse en condiciones de **Repetibilidad** (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y **Reproducibilidad** (diferente analista,

diferente día, diferente instrumento). El criterio de aceptación puede ser variable y estará dictado por los objetivos buscados. (Quattrocchi *et al.*, 1992).

La USP XXIV y la OMS hacen énfasis en el término “**precisión intermedia**”, que establece la posibilidad de variar el analista, el equipo o el día del análisis, sin cumplir con los tres requisitos a la vez como lo exige la condición de “Repetibilidad”.

3.4.3 Exactitud

La exactitud de un método, también conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero.

Matemáticamente, suele expresarse como porcentaje de recuperación.

$$\text{Recuperación: } R = \left(\frac{\bar{X}}{X} \right) \times 100$$

Donde \bar{X} es el valor medio y X el valor verdadero. Si bien este valor de concentración no se conoce sino que sólo puede estimarse, es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado y utilizarla como referencia.

La exactitud debe ser tan pequeña como sea posible para que el valor medido se aproxime al de referencia. Dicho de otro modo, la recuperación del analito debe acercarse al 100%. Para esta determinación se requiere que el valor medio no difiera significativamente del aceptado como referencia. También puede utilizarse un ensayo *t de student*, efectuando varias determinaciones de al menos tres concentraciones del

analito, preparadas al menos por triplicado, comprendidas dentro del rango de linealidad del sistema. Se calcula un t experimental que se compara con el t de tablas para n-1 grados de libertad en el nivel de confianza escogido, generalmente p= 0,05. (Quattrocchi *et al.*, 1992).

$$T_{\text{experimental}} = [100 - R] / (\%CV \sqrt{n})$$

Los valores de t experimental y el tabulado se comparan para el intervalo de confianza requerido con n-1 grados de libertad y la exactitud o inexactitud se evalúan para el promedio de recuperaciones de todas las concentraciones. Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$, no existe diferencia significativa con el 100% de recuperación y la exactitud es apropiada.

3.4.4 Selectividad o especificidad

Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra.

En muchos casos, la determinación de este parámetro no puede seguir modelos tan sistemáticos y dependerá del arte e ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias:

- 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 estos y la comparación cuidadosa de los cromatogramas resultantes, puede servir como primera aproximación.

- Modificación de las condiciones cromatográficas: variando la proporción de solventes, modificadores, pH, etc.
- Caracterización espectral.
- Cambiar a un detector de mayor selectividad.
- Empleo de técnicas enzimáticas para la transformación del analito.
- Reacciones degradativas: (oxidación, reducción, fotólisis) empleadas para comprobar la disminución o desaparición de la señal del analito (Quattrocchi *et al.*, 1992).

3.4.5 Sensibilidad

La sensibilidad de un método analítico corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo.

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son los límites de detección y de cuantificación.

- **Límite de Detección:** corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal/ ruido en un factor de 2 ó 3.

- **Límite de Cuantificación:** corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y también se expresa en unidades de concentración. En este caso, generalmente se mide la señal de fondo (relación señal/ruido), efectuando mediciones repetidas sobre un blanco o placebo, se mide su desviación estándar y se calcula el límite de cuantificación multiplicando esa desviación estándar por un factor, generalmente igual a 10.

Los límites de detección y cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Los límites de detección y cuantificación se calculan de la siguiente manera:

Límite de detección: $\underline{Y_{bl} + 3 S_{bl}}$

B

Límite de cuantificación: $\underline{Y_{bl} + 10 S_{bl}}$

B

B: es la pendiente de la curva de calibración.

Y_{bl} : estimado de la respuesta del blanco

S_{bl} : desviación estándar a concentración cero.

4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

La secreción de caracol silvestre *Helix aspersa* Müller contiene ácido glicólico, y su concentración varía según el tipo de alimentación y el período estacional de obtención.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

- Implementar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia para la identificación y cuantificación de ácido glicólico.
- Determinar si existen variaciones en la concentración de ácido glicólico en diferentes muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, según tipo de alimentación del caracol y período estacional de obtención de la secreción.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un método de extracción de ácido glicólico desde la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.
- Desarrollar e implementar un método analítico por HPLC para identificar y cuantificar ácido glicólico en la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller.

- Validar un método analítico a través de la determinación de los parámetros; linealidad, exactitud, precisión, selectividad y sensibilidad.

- Determinar la concentración de ácido glicólico en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller en tres épocas del año (octubre, diciembre y marzo) las cuales corresponden al inicio, mitad y término del período activo del caracol y con tres diferentes tipos de alimentación del caracol (vegetales verdes, específicamente lechuga y repollo, harina de maíz y harina de soya).

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Se desarrolló un método analítico para determinar ácido glicólico en muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller. Éste consta, básicamente, de precipitación de proteínas, eliminación de impurezas con un solvente orgánico y filtración de la muestra para inyectarse al equipo cromatográfico.

Posteriormente, el método fue validado considerando los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, selectividad y sensibilidad.

Una vez validado el método, las diferentes muestras de secreción fueron tratadas y analizadas para determinar la presencia del analito en cuestión. Posteriormente, se estudió si existen diferencias entre ellas respecto a la concentración de ácido glicólico, a través del análisis estadístico ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni, utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 4.00 para Windows, GraphPad Software, san Diego, California, USA.

6.1 MUESTRAS

- Secreción pura de caracol *Helix aspersa* Müller, obtenida de un criadero ubicado en la localidad de Caulín, Ancud, Región de Los Lagos. (41°49'51.77" latitud Sur y 73°31'13.73" longitud Oeste). Los caracoles se dividieron en tres grupos para ser alimentados de manera diferente. Un grupo fue alimentado sólo con vegetales, lechuga y repollo; otro con harina de maíz y el último, con harina de soya. Cada uno de estos grupos estuvo formado por 300 caracoles adultos, los que se mantuvieron en cajas plásticas. Se realizó aseo diario y ayuno un día antes de la obtención de la secreción para disminuir las probabilidades de contaminación con sus propios

desechos, durante este proceso. A cada uno de estos grupos se les extrajo su secreción de forma manual, directamente desde el pie, en diferentes períodos del año; octubre de 2005, diciembre de 2005 y marzo de 2006, correspondiente al inicio, mitad y término del período activo del caracol, obteniéndose un total de 9 tipos de muestras diferentes.

6.2 REACTIVOS UTILIZADOS

- Estándar ácido glicólico Sigma ®.
- Agua grado HPLC Merck ®.
- Metanol grado HPLC Merck®
- N- Hexano Merck®.
- Ácido tricloroacético (TCA) Merck®
- Fosfato de amonio dihidrogenado Merck®
- Ácido fosfórico 85% Merck®

6.3 INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

- Cromatógrafo líquido de alta resolución 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
- Centrífuga P. Selecta Mixtasel 96.
- Liofilizador VIRTIS 10-145 MR- BA.

- Filtros millipore durapore 0,25 um de poro.
- Columna Phenomenex® C- 18, 250 x 4,6 mm 5 micrón.
- Software Jasco ChromPass Chromatography Data System connection V. 1.7.403.1.
- Jeringa 100 µL Hewlett Packard®
- Material de vidrio.

6.4 METODOLOGÍA ANALÍTICA

6.4.1 Condiciones Cromatográficas.

Para implementar el método y las condiciones cromatográficas, se revisó bibliografía que contiene estudios de determinación de ácido glicólico en frutos (Abreu *et al.*, 2001), cosméticos (Nicoletti *et al.*, 1999; Couch, L., Howard, P., 2002; Scalia *et al.*, 1998), sangre y orina (Narayanan *et al.*, 1999), todas por HPLC.

Después de probar cada uno de los métodos anteriormente mencionados y modificaciones de ellos, se establecieron las siguientes condiciones de análisis:

- Condiciones isocráticas.
- Fase móvil: Buffer fosfato de amonio dihidrogenado. (NH₄H₂PO₄) 5 mM, pH 2,2.
- Velocidad de flujo: 0,5 mL/ min.
- Longitud de onda: 210 nm.
- Tiempo de análisis: 10 minutos.
- Temperatura: Ambiente, 22° C aproximadamente.
- Presión: 8,5 a 9,2 MPa.
- Volumen de inyección: 20 µL.

6.4.1.1 Preparación de la fase móvil

Para preparar la fase móvil, se pesaron 0,5752 gramos de fosfato de amonio dihidrogenado los que se disolvieron en agua grado HPLC para obtener 1 litro de solución. El pH fue ajustado a 2,2 con ácido fosfórico al 8,5%. Antes de utilizar la fase móvil, ésta se filtró a través de filtros millipore de 2 micras de tamaño de poro.

6.4.2 Tratamiento de muestras de secreción de caracol

Las muestras de secreción de caracol fueron obtenidas por estimulación directa del pie de éste, con una espátula metálica, hasta obtener una secreción espesa, muy viscosa y elástica. Éstas se fraccionaron en envases plásticos, cubiertos con papel aluminio y congeladas a -21°C para su mantención. Posteriormente, las muestras se liofilizaron para disminuir la probabilidad de contaminación y de degradación durante los días de análisis. Se pesó la cantidad determinada de liofilizado (Anexo N° 2, Tablas N° 1 y N° 2) para preparar la suspensión correspondiente y luego se sometieron al análisis. Para obtener cromatogramas más limpios, sólo se pesó un cuarto de lo debido, obteniéndose suspensiones diluidas, a las que posteriormente, se les corrigieron sus concentraciones multiplicando por su factor de dilución, igual a 4 (Anexo N°4, Ejemplo N°1).

Para cada determinación se preparó 3 mL de secreción, diluida cuatro veces, a los que se les agregó ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para precipitar las proteínas, en cantidad suficiente para alcanzar pH 1, ya que no todas las muestras necesitaban igual cantidad (Anexo N°2, Tabla N° 2). La muestra se mantuvo 15 minutos en el congelador (-21°C) para ayudar en la precipitación y posteriormente se centrifugó por

15 minutos a 3500 revoluciones por minuto. De este proceso se retiró la solución sobrenadante que se utilizó para el siguiente paso, y el *pellet* fue descartado.

La solución sobrenadante se inyectó al cromatógrafo, sin embargo, se obtuvo un cromatograma con muchos picos y algunos de ellos, poco definidos. Por lo tanto, se realizó una extracción de impurezas de la muestra utilizando solventes orgánicos. Se mezcló en un embudo de decantación de 100 mL, el sobrenadante, con 9 mL de Hexano, se agitó por 2 minutos, se descartó la fase orgánica de la mezcla y la fase acuosa, que contenía el analito en cuestión y que presentaba pH 1, se filtró y se inyectó en el equipo cromatográfico, obteniéndose claramente un cromatograma mucho más limpio.

Cabe mencionar que se probaron diferentes agentes deproteinizantes como Metanol, Acetona, Ácido Perclórico (PCA) y también diferentes soluciones extractivas Hexano, Diclorometano, Tetracloruro de Carbono, en variadas proporciones, puras y mezclas de ellas. Sin embargo, fueron las condiciones anteriormente establecidas las que permitieron obtener cromatogramas con menos interferentes.

6.4.3 Validación

6.4.3.1 Preparación de estándares

Antes de comenzar el proceso de validación, se preparó una solución *stock* de ácido glicólico al 0,1 %. Para ello se pesaron 0,0250 gramos de estándar de ácido glicólico y se aforó en un matraz de 25 mL con fase móvil. De esta solución *stock*, se tomaron diferentes alícuotas para preparar estándares a diferentes concentraciones, los que también fueron diluidos con fase móvil.

6.4.3.2 Linealidad

Para determinar este parámetro, se utilizó una curva de calibración de ácido glicólico, que consideró los siguientes puntos: 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, donde cada uno de ellos se inyectó por triplicado. Se obtuvo entonces, el coeficiente de correlación, el de determinación y la ecuación de la recta. Posteriormente se comprobó la linealidad del método, utilizando un test estadístico.

6.4.3.3 Precisión del sistema instrumental

6.4.3.3.1 Repetibilidad

Para determinar si el sistema instrumental es preciso en condiciones de repetibilidad se utilizaron estándares de ácido glicólico en tres diferentes concentraciones, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ y 80 $\mu\text{g/mL}$, los que fueron inyectados diez veces cada uno para evaluar su dispersión. Se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

6.4.3.3.2 Precisión Intermedia

Para determinar si el sistema instrumental es preciso en condiciones de precisión intermedias, es decir, diferente día de análisis, se utilizó un estándar de 80 $\mu\text{g/mL}$ el que se inyectó por triplicado durante cuatro días consecutivos. Se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

6.4.3.4 Precisión del método

6.4.3.4.1 Repetibilidad

Para determinar si el método utilizado es preciso en condiciones de repetibilidad, se sometieron diferentes concentraciones de estándares al método analítico completo. Para ello se utilizaron estándares de ácido glicólico en tres diferentes concentraciones, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ y 80 $\mu\text{g/mL}$. Cada uno de ellos se sometió siete veces al método analítico completo, durante el mismo día, obteniéndose un total de 21 determinaciones. Posteriormente se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

6.4.3.4.2 Precisión Intermedia

Para determinar si el método utilizado es preciso en condiciones de precisión intermedia, se sometieron diferentes concentraciones de estándares al método analítico completo. Para ello se utilizó estándares de ácido glicólico en tres diferentes concentraciones, 40 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$ y 80 $\mu\text{g/mL}$. Cada uno de ellos se sometió tres veces al método analítico completo, durante cuatro días consecutivos, obteniéndose un total de 12 determinaciones por cada nivel de concentración. Posteriormente se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

6.4.3.5 Exactitud

Este parámetro, también conocido como porcentaje de recuperación, se determinó utilizando estándares de ácido glicólico a diferentes concentraciones, 40

$\mu\text{g/mL}$, $60 \mu\text{g/mL}$ y $80 \mu\text{g/mL}$, los que se sometieron al método analítico completo. Cada uno de los estándares se inyectó por duplicado antes de someterlos al método analítico para tener una visión aproximada de las áreas al inicio de la determinación. Cada estándar se sometió cuatro veces al método analítico. Se calculó el promedio de las concentraciones obtenidas y se determinó el porcentaje de recuperación según la fórmula. Además, se realizó el ensayo de *t de Student* para confirmar el resultado obtenido.

6.4.3.6 Selectividad

Este parámetro puede determinarse de varias maneras. En esta oportunidad se analizaron los tiempos de retención de 10 inyecciones de un estándar de ácido glicólico de $80 \mu\text{g/mL}$. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Sin embargo, otra de las formas de determinar si el método es selectivo es agregar, a una muestra de secreción, una cantidad de ácido glicólico de concentración conocida y ver si se aprecia un aumento en el *pick* en cuestión de la muestra. Esto se realizó y se puede apreciar en el análisis de las muestras de secreción.

6.4.3.7 Sensibilidad

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se determinó la pendiente de la curva de calibración. Posteriormente se obtuvo otra curva de calibración, inyectando cada punto por triplicado, pero en este caso para concentraciones más bajas de analito, determinándose la ecuación de esta nueva recta y extrapolando la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la

respuesta del blanco, Y_{bl} . Finalmente, se determinó la desviación estándar correspondiente a cada concentración de la curva fabricada con concentraciones bajas de analito, se determinó la recta correspondiente a concentración ($\mu\text{g/mL}$) v/s desviación estándar y se extrapola como en el caso anterior, la desviación estándar a concentración cero, obteniéndose el estimado S_{bl} , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

7 RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

7.1.1 Linealidad

Para evaluar si el método utilizado para la determinación de ácido glicólico en las muestras es lineal en las concentraciones utilizadas, se preparó una curva de calibración con 5 puntos, a partir de una solución madre de 1000 $\mu\text{g/mL}$, donde cada uno de ellos se inyectó por triplicado. (Quattrochi *et al.*, 1992).

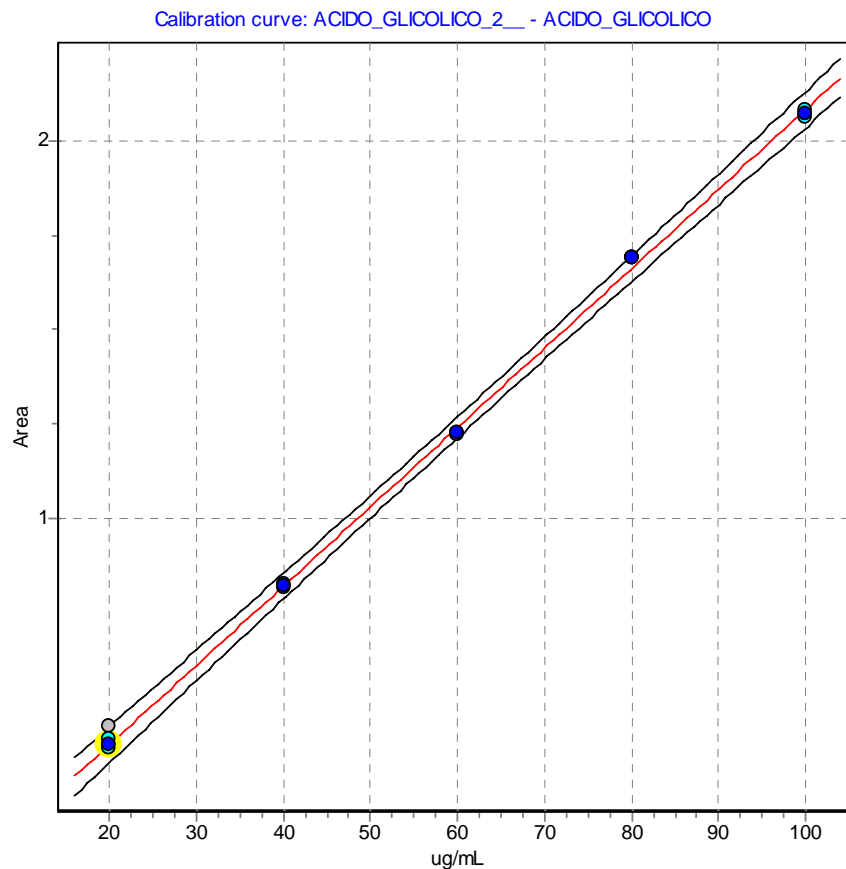
Tabla N° 1: Curva de calibración Concentración ($\mu\text{g/mL}$) v/s Área (mVx Min) para determinar linealidad del método analítico.

Punto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mVxMin)	Área Promedio (mVxMin)
1	20	0.42	0.40
2	20	0.39	
3	20	0.40	
4	40	0.82	0.82
5	40	0.83	
6	40	0.82	
7	60	1.23	1.23
8	60	1.23	
9	60	1.23	
10	80	1.69	1.69
11	80	1.69	
12	80	1.69	
13	100	2.08	2.07
14	100	2.07	
15	100	2.07	

La ecuación obtenida de la curva analizada es:

$Y = 0,02103X - 0,01815$, cuyo coeficiente de correlación $r = 0,9994$

Grafico N° 1: Curva de calibración Concentración ($\mu\text{g/mL}$) v/s Área ($\text{mV} \times \text{Min}$)



7.1.2 Precisión del Sistema instrumental

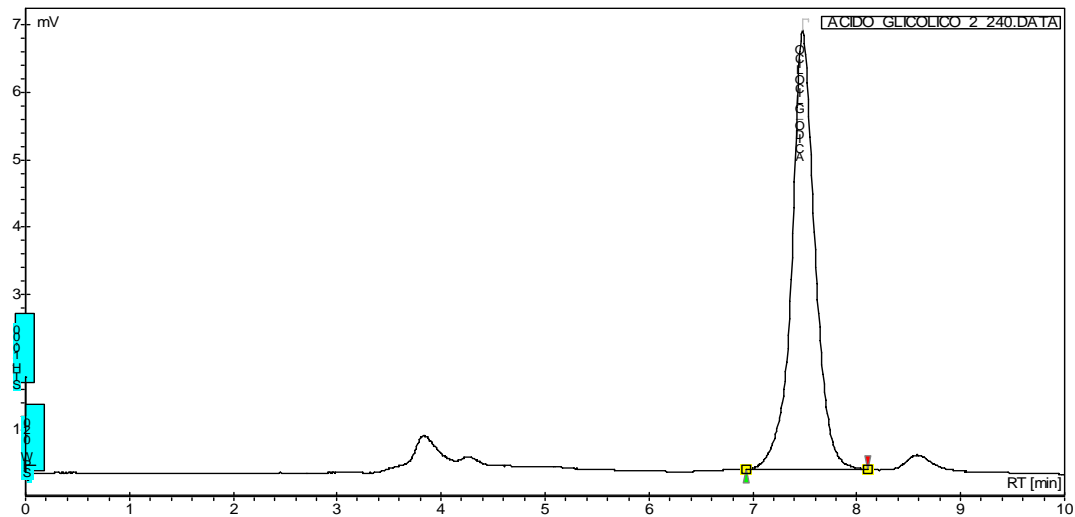
7.1.2.1 Repetibilidad de sistema instrumental

Los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad del sistema instrumental se encuentran resumidos en la siguiente tabla, indicando el promedio, desviación estándar (D.S) y coeficiente de variación porcentual (%C.V) de las áreas de los picos (Quattrochi *et al.*, 1992).

Tabla N° 2: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del sistema instrumental en condiciones de repetibilidad.

Concentración	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL
Área (mVxMin)	0,85	1,27	1,68
Área (mVxMin)	0,85	1,23	1,66
Área (mVxMin)	0,86	1,29	1,68
Área (mVxMin)	0,88	1,29	1,71
Área (mVxMin)	0,87	1,29	1,71
Área (mVxMin)	0,88	1,26	1,70
Área (mVxMin)	0,86	1,29	1,72
Área (mVxMin)	0,88	1,27	1,70
Área (mVxMin)	0,89	1,29	1,72
Área (mVxMin)	0,87	1,26	1,72
Promedio	0,87	1,27	1,70
D.S	0,0137	0,0201	0,0205
%C.V	1,58	1,58	1,21

Figura N° 1: Cromatograma de un estándar de ácido glicólico de concentración 80 $\mu\text{g/mL}$ para la determinación del parámetro de precisión del sistema instrumental en condiciones de repetibilidad.



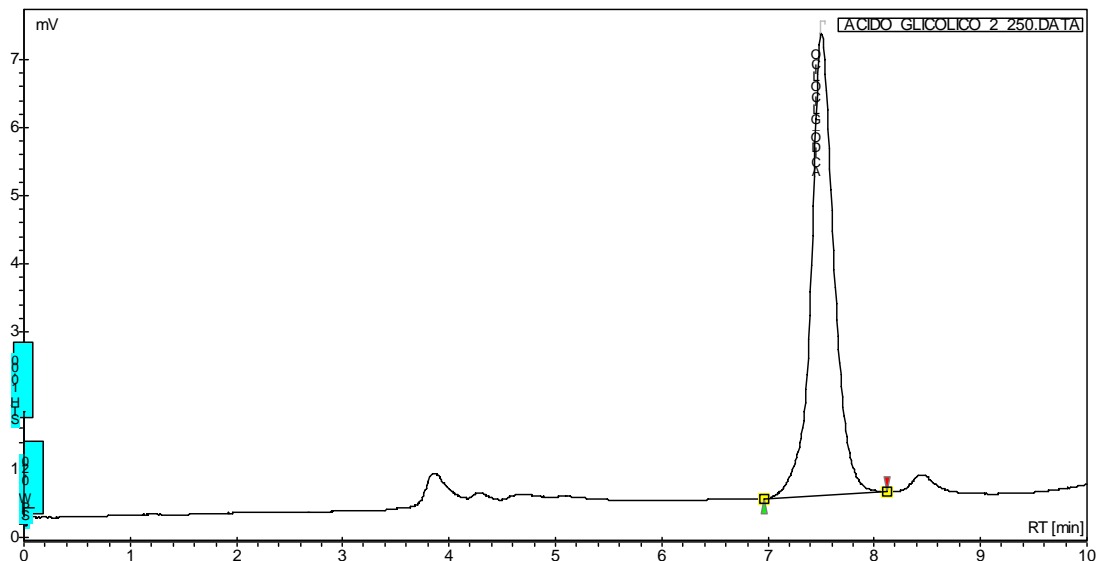
5.1.2.2 Precisión Intermedia del sistema instrumental

Los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de precisión intermedia del sistema se encuentran resumidos en la siguiente tabla, indicando el promedio, desviación estándar (D.S) y coeficiente de variación porcentual (% C.V) de las áreas de los picos.

Tabla N° 3: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del sistema instrumental en condiciones de precisión intermedia.

Concentración / Período	80 µg/mL Día 1	80 µg/mL Día 2	80 µg/mL Día 3	80 µg/mL Día 4
Área (mVxMin)	1,65	1,68	1,69	1,72
Área (mVxMin)	1,71	1,66	1,70	1,70
Área (mVxMin)	1,67	1,68	1,72	1,71
Promedio	1,68	1,67	1,70	1,71
D.S	0,0306	0,0115	0,0153	0,0100
% C.V	1,82	0,69	0,90	0,58

Figura N° 2: Cromatograma de un estándar de ácido glicólico de concentración 80 µg/mL para la determinación del parámetro de precisión del sistema instrumental en condiciones de precisión intermedia. Día 4.



7.1.3 Precisión del método

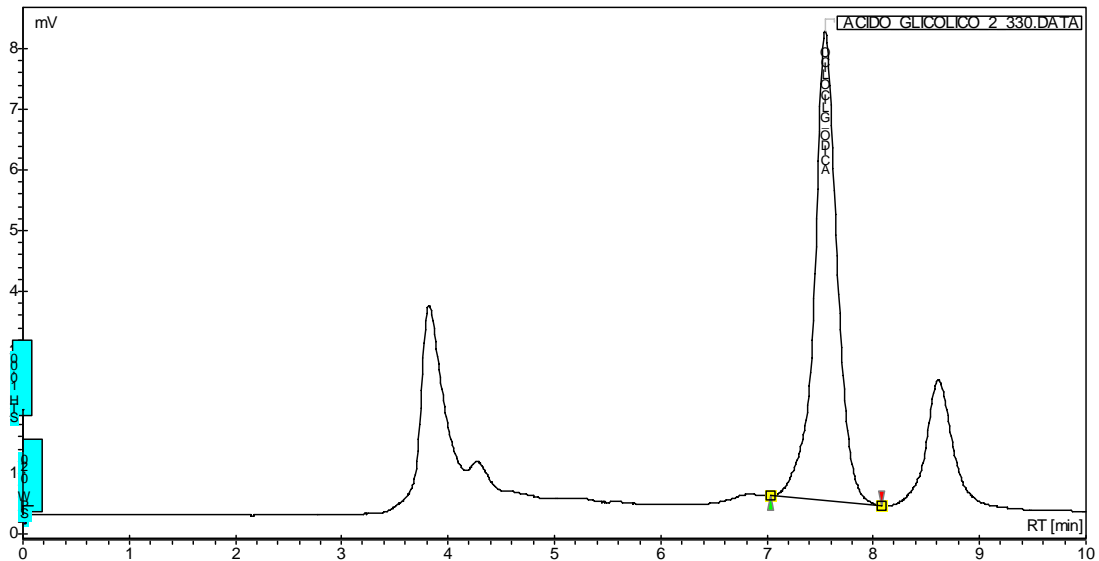
7.1.3.1 Repetibilidad del método

Los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad del método se encuentran resumidos en la siguiente tabla, indicando el promedio, desviación estándar (D.S) y coeficiente de variación porcentual (% C.V) de las áreas.

Tabla N° 4: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del método en condiciones de repetibilidad.

Concentración	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL
Área (mVxMin)	1,01	1,36	1,68
Área (mVxMin)	1,04	1,48	1,66
Área (mVxMin)	1,04	1,47	1,68
Área (mVxMin)	1,01	1,54	1,71
Área (mVxMin)	1,05	1,54	1,71
Área (mVxMin)	1,00	1,46	1,70
Área (mVxMin)	1,01	1,53	1,72
Promedio	1,02	1,48	1,69
D.S	0,0198	0,0640	0,0215
% C.V	1,93	4,31	1,27

Figura N° 3: Cromatograma de un Estándar de ácido glicólico de concentración 80 $\mu\text{g/mL}$ para la determinación del parámetro de precisión del método en condiciones de repetibilidad.



7.1.3.2 Precisión Intermedia del método

Los resultados cromatográficos obtenidos bajo condiciones de precisión intermedia del método se encuentran resumidos en la siguiente tabla, indicando el promedio, desviación estándar (D.S) y coeficiente de variación porcentual (% C.V) de las áreas de los picos.

Tabla N° 5: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del método en condiciones de precisión intermedia para un estándar de 40 µg/mL.

Concentración / Período	40 µg/mL Día 1	40 µg/mL Día 2	40 µg/mL Día 3	40 µg/mL Día 4
Área (mVxMin)	1,01	1,01	0,99	0,99
Área (mVxMin)	1,04	1,00	0,99	0,99
Área (mVxMin)	1,04	1,01	1,00	1,00
Promedio	1,03	1,01	0,99	0,99
D.S	0,0173	0,0058	0,0058	0,0058
% C.V	1,68	0,57	0,58	0,58

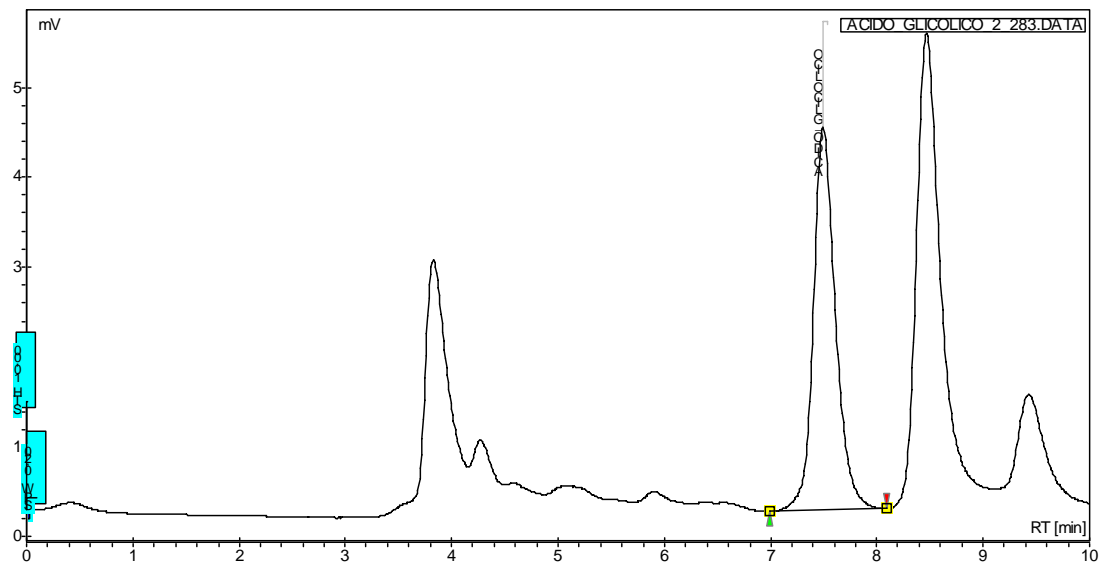
Tabla N° 6: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del método en condiciones de precisión intermedia para un estándar de 60 µg/mL.

Concentración / Período	60 µg/mL Día 1	60 µg/mL Día 2	60 µg/mL Día 3	60 µg/mL Día 4
Área (mVxMin)	1,36	1,44	1,46	1,41
Área (mVxMin)	1,48	1,52	1,52	1,41
Área (mVxMin)	1,47	1,51	1,54	1,47
Promedio	1,44	1,49	1,51	1,43
D.S	0,0666	0,0436	0,0416	0,0346
% C.V	4,63	2,93	2,76	2,42

Tabla N° 7: Valores obtenidos para el parámetro de precisión del método en condiciones de precisión intermedia para un estándar de 80 µg/mL.

Concentración / Período	80 µg/mL Día 1	80 µg/mL Día 2	80 µg/mL Día 3	80 µg/mL Día 4
Área (mVxMin)	1,96	2,06	2,01	2,02
Área (mVxMin)	1,96	2,04	2,01	2,00
Área (mVxMin)	1,93	2,13	2,06	2,06
Promedio	1,95	2,08	2,03	2,03
D.S	0,0173	0,0473	0,0289	0,0306
% C.V	0,89	2,28	1,42	1,51

Figura N° 4: Cromatograma de un estándar de ácido glicólico de concentración 40 µg/mL para la determinación del parámetro de precisión del método en condiciones de precisión intermedia. Día 1.



7.1.4 Exactitud / Porcentaje de recuperación

Antes de determinar este parámetro, se inyectó un estándar de cada concentración para ver el área inicial de estos y a partir de esta información determinar el % de recuperación.

Tabla N° 8: Concentración inicial de Estándares de ácido glicólico.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	40	60	80
Área (mVxMin)	0,85	1,26	1,71
Área (mVxMin)	0,85	1,24	1,69
Promedio	0,85	1,25	1,70

Tabla N° 9: Porcentajes de recuperación obtenidos para los diferentes estándares de ácido glicólico.

Concentración (µg/mL)	Área (mVxMin)	Concentración (µg/mL)	Prom. (µg/mL)	D.S	% C.V	% Recup.	Prom. % Recup.
40	0,88	42,34				105,85	
40	0,81	38,76				96,90	
40	0,84	40,61				101,53	
40	0,85	40,88	40,65	1,4700	3,62	102,20	101,63
60	1,24	59,81				99,68	
60	1,27	61,20				102,00	
60	1,28	61,80				103,00	
60	1,28	61,82	61,16	0,9433	1,54	103,03	102,00
80	1,67	80,20				100,25	
80	1,72	82,63				103,29	
80	1,73	83,01				103,76	
80	1,71	82,45	82,07	1,2700	1,55	103,06	102,59
Promedio					2,24		102,07

(Anexo N° 4, ejemplo N° 3)

Además se realizó un ensayo de *t de Student*. Para esto se utilizó la siguiente fórmula y se comparó con los valores de la tabla *t de Student* (Anexo N° 2, Tabla N° 13).

Según la fórmula;

$$T_{\text{experimental}} = [100 - R] / (\%CV \sqrt{n})$$

R: Porcentaje de recuperación promedio

$$T_{\text{experimental}} = [100 - 102,07] / (2,24\sqrt{12})$$

%CV: Coeficiente de variación promedio

$$T_{\text{experimental}} = \mathbf{0,2703}$$

n: número de estándares sometidos al proceso

Figura N° 5: Cromatograma de un estándar de ácido glicólico de concentración 40 $\mu\text{g/mL}$ antes de someterlo a la metodología para la determinación del porcentaje de recuperación.

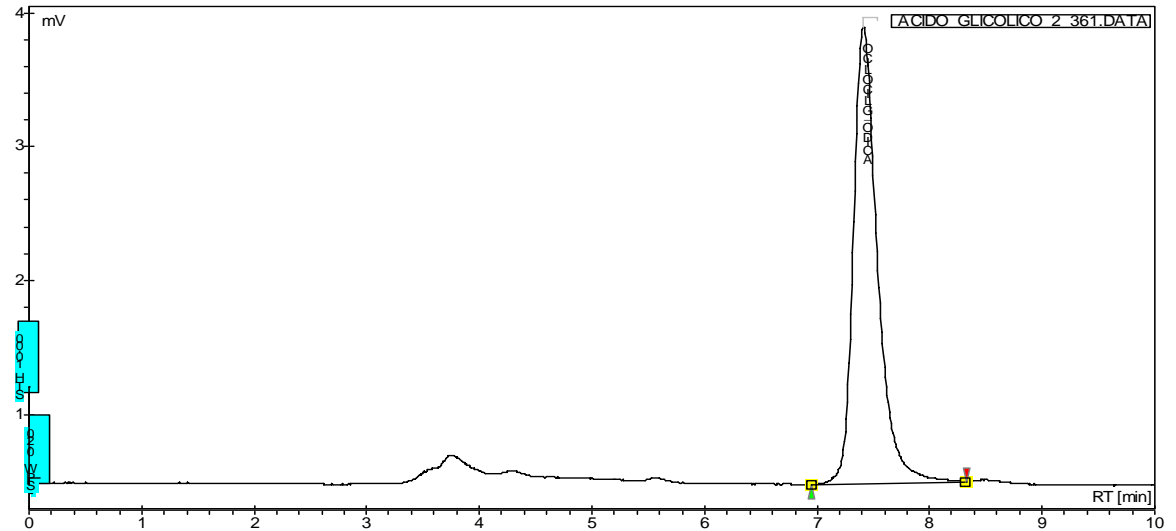
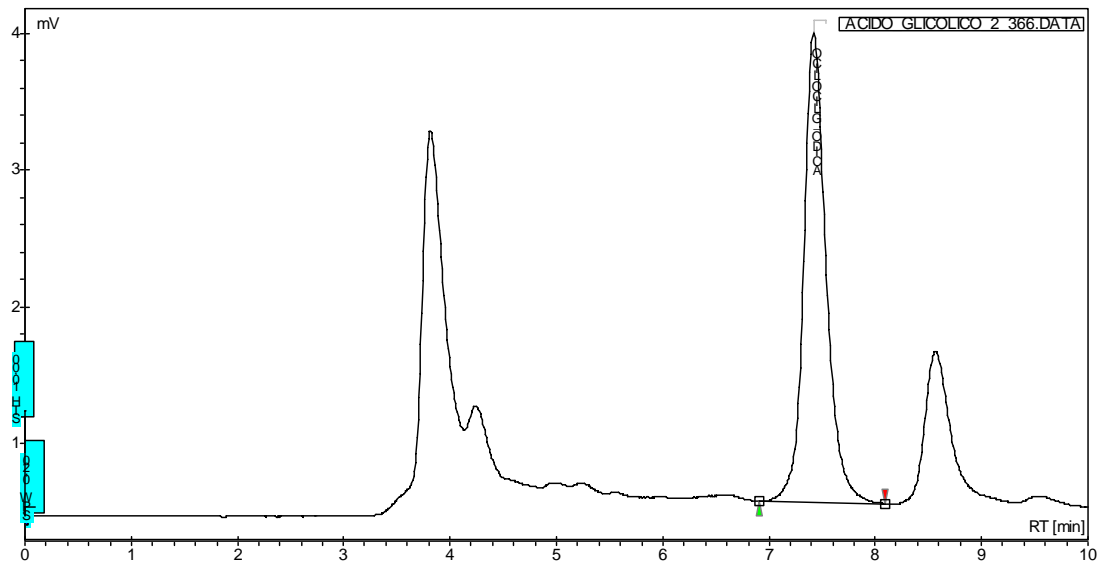


Figura N° 6: Cromatograma de un estándar de ácido glicólico de concentración 40 $\mu\text{g/mL}$ después de someterlo a la metodología para la determinación del porcentaje de recuperación.



7.1.5 Selectividad o Especificidad

Los resultados se muestran en la siguiente tabla, donde además se determinó el promedio de los tiempos de retención obtenidos al inyectar 10 estándares, la desviación estándar y el coeficiente de varianza porcentual.

Tabla N° 10: Tiempos de retención para la determinación del parámetro de selectividad.

Estándar (µg/mL)	Tiempo de Retención (Min)
1	7,533
2	7,533
3	7,483
4	7,483
5	7,475
6	7,475
7	7,475
8	7,467
9	7,467
10	7,458
Promedio	7,485
D.S	0,0264
% C.V	0,3532

7.1.6 Sensibilidad (Límite de detección y Límite de cuantificación)

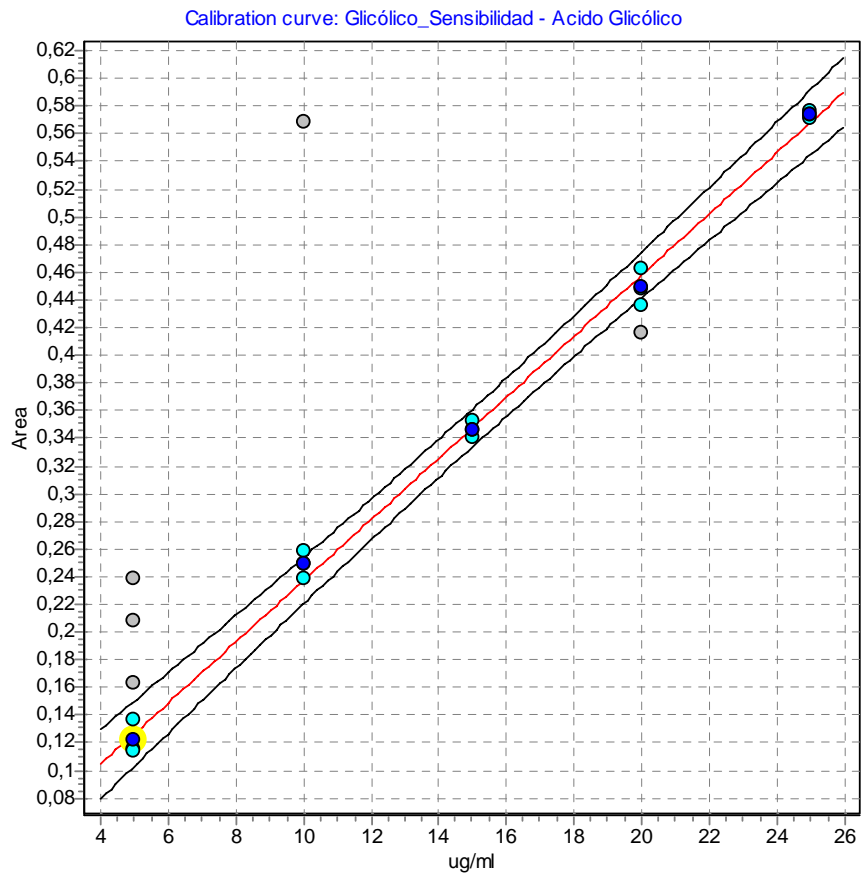
Tabla N° 11: Curva de calibración concentración ($\mu\text{g/mL}$) v/s área (mVx Min) para determinar el parámetro de sensibilidad del método analítico.

Punto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área (mVxMin)	Área Promedio (mVxMin)	D.S
1	5	0.11		
2	5	0.14		
3	5	0.11		
4	10	0.26		
5	10	0.25		
6	10	0.24	0,25	0,0100
7	15	0,35		
8	15	0,34		
9	15	0,35		
10	20	0,44		
11	20	0,46		
12	20	0,45	0,45	0,0096
13	25	0,57		
14	25	0,57		
15	25	0,58		

La ecuación obtenida de la curva analizada es:

$$Y = 0,02210X + 0,01626, \text{ cuyo coeficiente de correlación } r = 0,9978$$

Grafico N° 2: Curva de calibración concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) v/s área ($\text{mV} \times \text{Min}$) para la determinación de la sensibilidad del método.



Además, de la recta correspondiente a concentración (de 5 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) v/s D.S se obtiene:

$$Y = -0,000468X + 0,01672.$$

Recordemos que de la curva de calibración se obtuvo (Tabla N° 1):

$$Y = 0,02103X - 0,01815$$

7.1.6.1 Cálculo de los límites de detección y cuantificación.

Límite de detección:
$$\frac{Y_{bl} + (3 S_{bl})}{b}$$

Límite de cuantificación:
$$\frac{Y_{bl} + (10 S_{bl})}{b}$$

Según lo descrito anteriormente, se tiene que:

$$b = 0,02103$$

$$Y_{bl} = 0,01626$$

$$S_{bl} = 0,01672$$

Por lo tanto:

$$\text{Límite de detección: } \frac{0,01626 + (3 \times 0,01672)}{0,02103} = 3,16 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{Límite de cuantificación: } \frac{0,01626 + (10 \times 0,01672)}{0,02103} = 8,72 \mu\text{g/mL}$$

7.2 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL

Una vez validado el método, se determinó la presencia de ácido glicólico en muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller. Al inyectar una muestra de secreción de caracol, previamente sometida al método analítico, se analizó el cromatograma obtenido donde se aprecia un pico a los 7,5 minutos aproximadamente, correspondiente a ácido glicólico. Para asegurar que éste corresponde al ácido en cuestión, se agregó una cantidad determinada de estándar de ácido glicólico de concentración conocida a la muestra de secreción. Esta muestra, también liofilizada, correspondía a otro criadero en donde los caracoles recibieron alimentación variada.

El aumento en el tamaño del pico de la muestra, confirma que éste corresponde a ácido glicólico.

Figura N° 7 (a): Cromatograma de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, correspondiente a otro criadero (Futrono) y de alimentación variada.

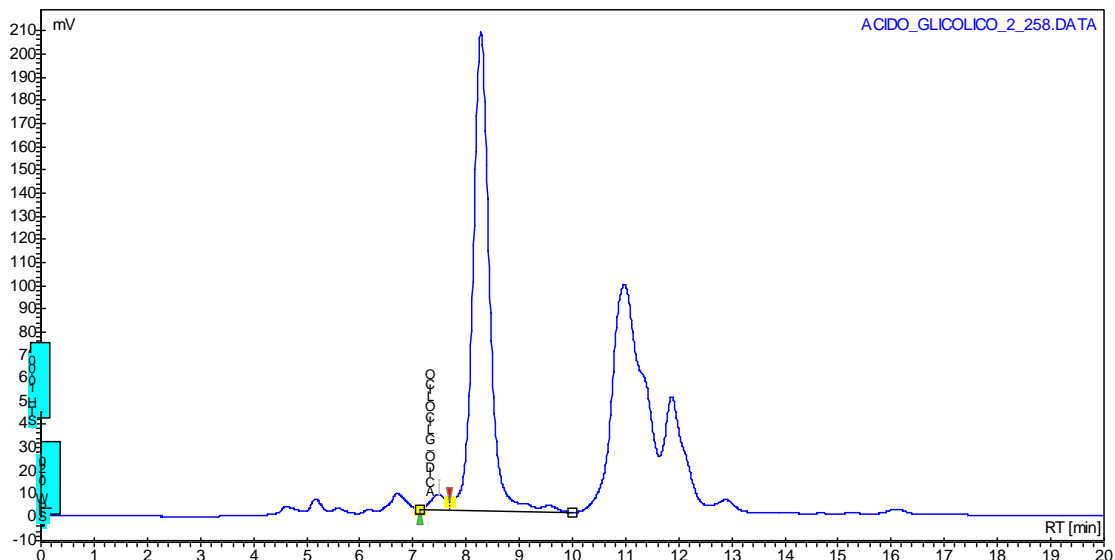
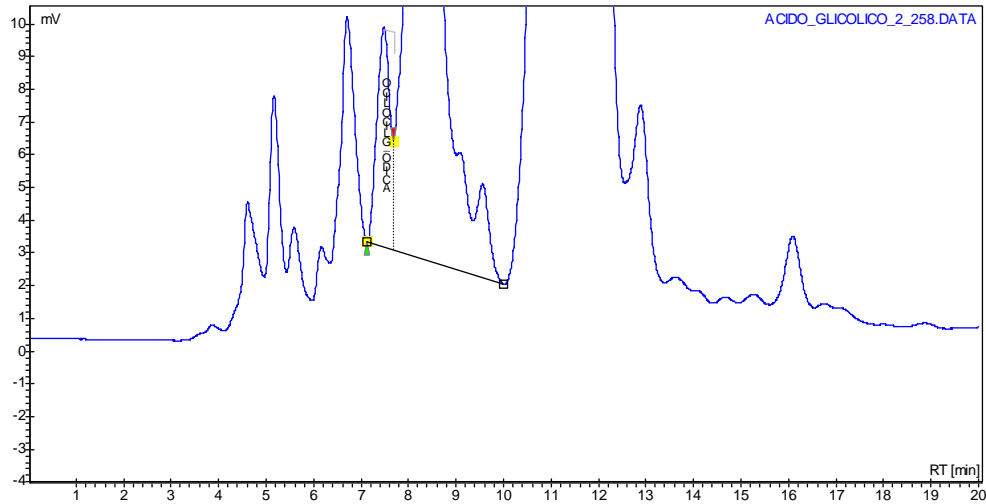


Figura N° 8: Acercamiento del cromatograma anterior.



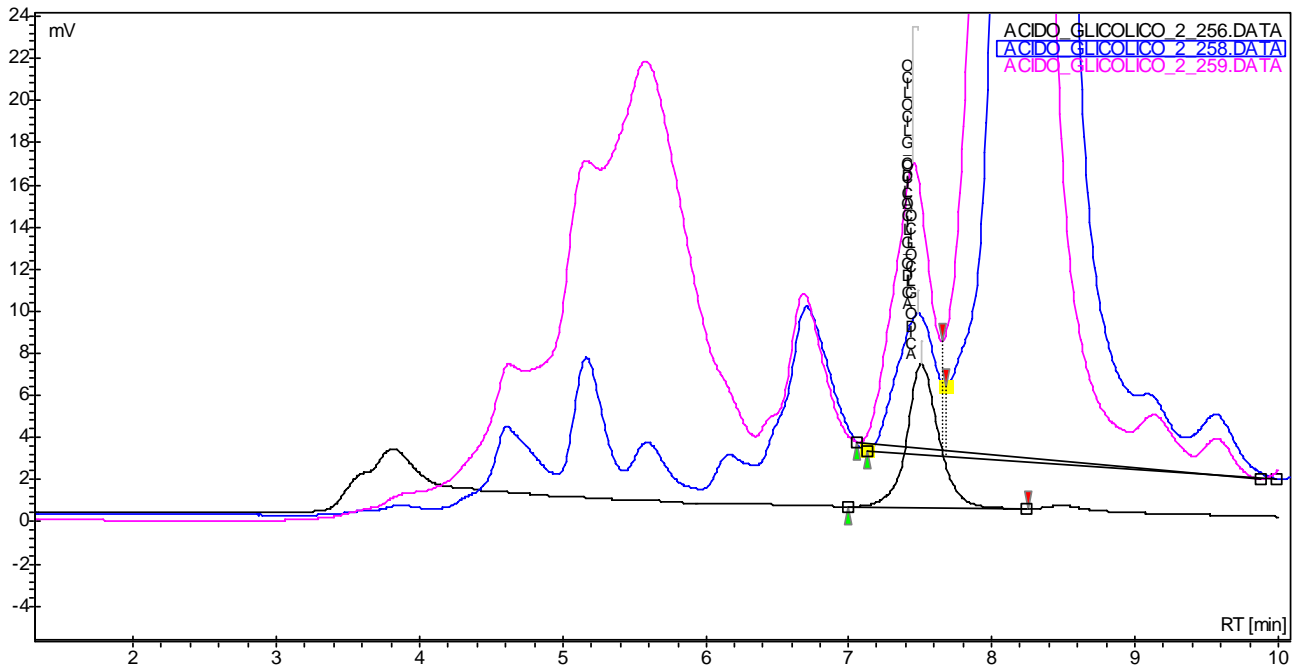
Para confirmar la presencia de ácido glicólico se tomó un estándar de concentración conocida, correspondiente a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se agregó a una muestra de secreción. Para esta mezcla, se tomaron 900 μL de la muestra de secreción de caracol y 100 μL del estándar de ácido glicólico, obteniéndose los resultados que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla N° 12: Confirmación de la presencia de ácido glicólico en muestras de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.

	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) marcada por el equipo	Microgramos que se consideran para la mezcla	Tiempo de retención (Minutos)
Estándar de ácido glicólico 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1037,6	103,76	7,475
Muestra de secreción liofilizada	101,81	91,63	7,467
Mezcla de 900 μL de muestra + 100 μL de estándar 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	191,37	195,39	7,442

Al tomar 100 μL del estándar de ácido glicólico de concentración 1037,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 900 μL de la muestra de secreción de caracol que contiene 101,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido glicólico, se está considerando que teóricamente 103,7 μg de ácido glicólico corresponden a los incorporados por el estándar y 91,63 μg a los de la muestra. Si se suman estos microgramos de ácido glicólico se obtiene el total de microgramos en los 1000 μL de mezcla, que corresponden a 195,39 μg . Por lo tanto, al inyectar la mezcla, se espera obtener una concentración de 195,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aproximadamente. (Anexo N° 4, ejemplo N° 4). Al inyectar esta mezcla al equipo cromatográfico, se aprecia notoriamente un aumento del tamaño del pico de la muestra y la concentración obtenida fue de 191,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Anexo N° 4, ejemplo N° 4).

Figura N° 8: Superposición de Cromatogramas de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller y de estándar de ácido glicólico.



Cromatograma N° 256 (Negro): Estándar de ácido glicólico 100 µg/mL.

Cromatograma N° 258 (Azul): Muestra de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.

Cromatograma N° 259 (Rosado): Mezcla de muestra y Estándar.

Se determinó el factor de capacidad (K') parámetro que se emplea para describir las velocidades de migración de solutos en columnas.

Se define como:

$$K' = (T_r - T_m) / T_m$$

T_r corresponde al tiempo de retención del soluto y T_m al tiempo muerto, es decir, el tiempo en que aparece la señal de la fase móvil. Idealmente, el valor de K' para analitos de una muestra debe estar entre 0,5 y 20 (Quattrocchi *et al.*, 1992).

El tiempo de retención del ácido glicólico es de 7,5 minutos y el tiempo muerto es de 3,8 minutos, aproximadamente.

Por lo tanto:

$$K' = (7,5 - 3,8) / 3,8 = 0,974$$

Una vez confirmada la presencia de ácido glicólico en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, se determinó si la alimentación y el período de obtención, producen variaciones en la concentración de ácido glicólico en las diferentes muestras de la secreción.

Para ello, cada una de las muestras se sometió al proceso analítico establecido, como se explicó anteriormente. (Anexo N° 2, Tablas N° 1 y N° 2).

Los resultados se presentan a continuación.

El detalle de los resultados obtenidos, para cada tipo de muestra, se puede apreciar en el anexo N° 2, tablas N° 2 hasta N° 11.

Los cromatogramas de los resultados obtenidos se aprecian en el anexo N° 3.

Tabla N° 13: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en muestras de secreción de caracoles alimentados con maíz según período de obtención.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Maíz / Octubre	129,57
Maíz / Diciembre	134,52
Maíz / Marzo	160,51

Gráfico N° 3: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller alimentados con Maíz.

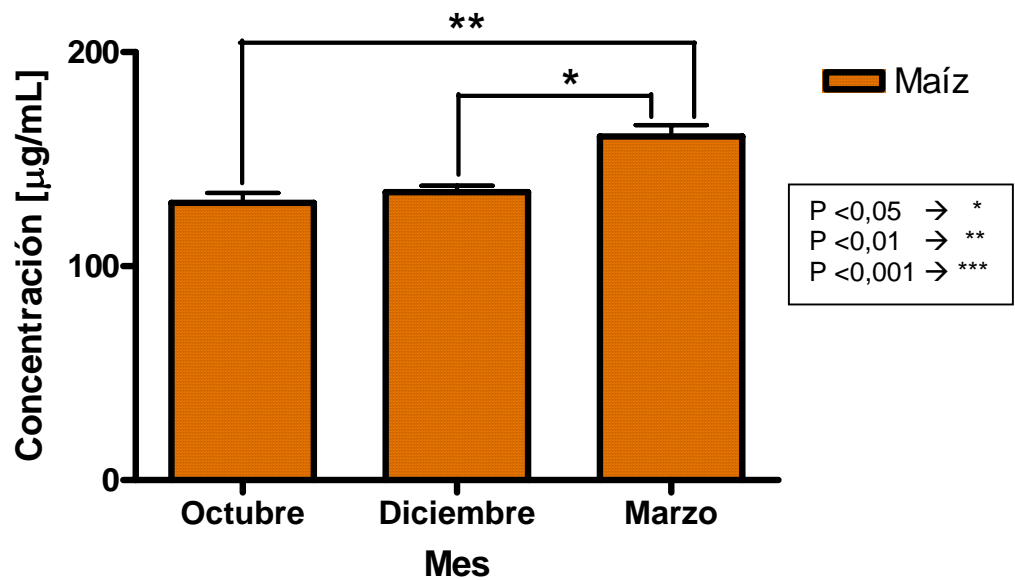


Tabla N° 14: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en muestras de secreción de caracoles alimentados con soya según período de obtención de la secreción.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Soya / Octubre	187,79
Soya / Diciembre	77,84
Soya / Marzo	149,23

Gráfico N° 4: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller alimentados con Soya.

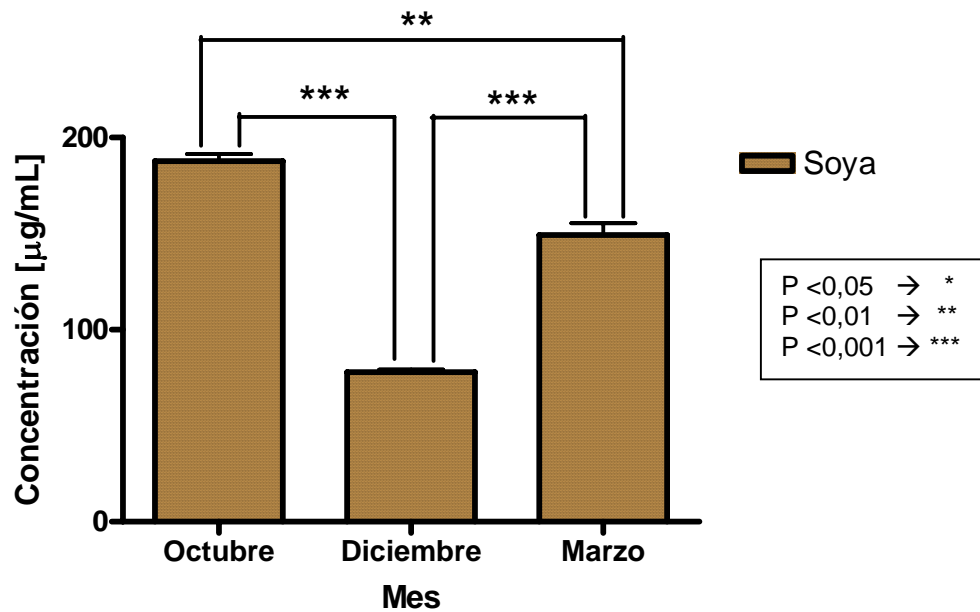


Tabla N° 15: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en muestras de secreción de caracoles alimentados con vegetales según período de obtención de la secreción.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Vegetales / Octubre	244,45
Vegetales / Diciembre	204,81
Vegetales / Marzo	258,24

Gráfico N°5: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller alimentados con Vegetales.

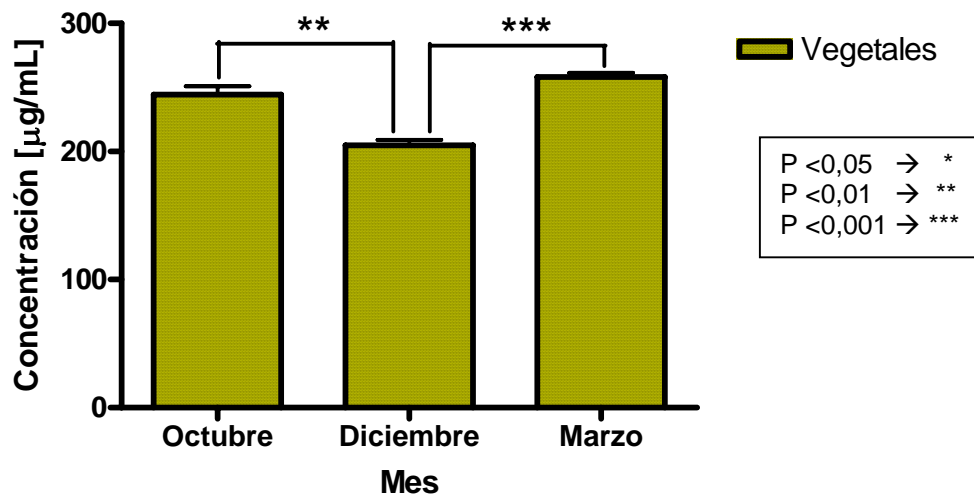


Tabla N° 16: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en muestras de secreción de caracoles según alimentación y período de obtención de la secreción.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Maíz / Octubre	129,57
Maíz / Diciembre	134,52
Maíz / Marzo	160,51
Soya / Octubre	187,79
Soya / Diciembre	77,84
Soya / Marzo	149,23
Vegetales / Octubre	244,45
Vegetales / Diciembre	204,81
Vegetales / Marzo	258,24

Gráfico N°6: Comparación de la concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según alimentación del caracol y mes de obtención de la secreción.

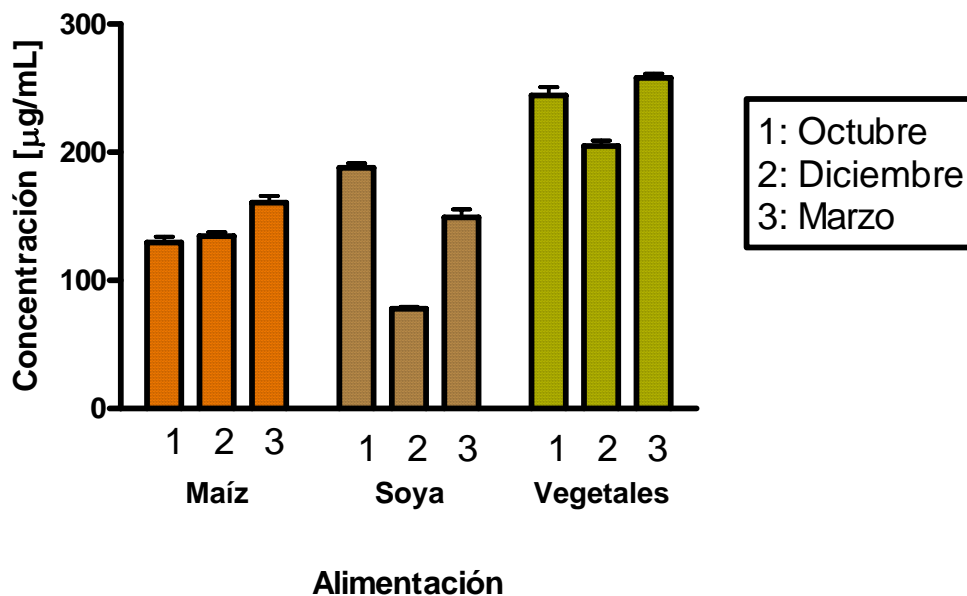


Tabla N° 17: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en secreción de caracol extraída durante el mes de octubre.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Octubre / Maíz	129,57
Octubre / Soya	187,79
Octubre / Vegetales	244,45

Gráfico N°7: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller extraída en el mes de octubre.

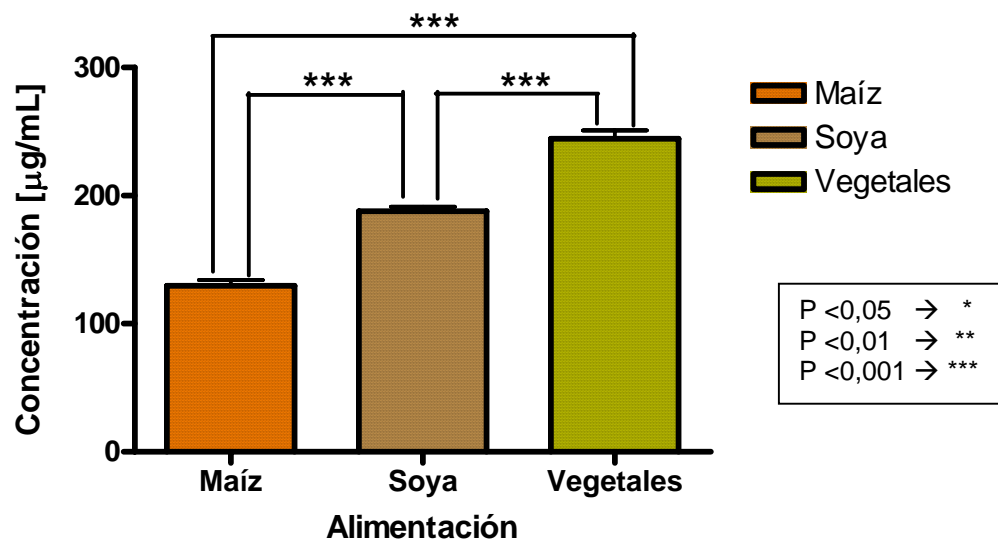


Tabla N° 18: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en secreción de caracol extraída durante el mes de diciembre.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Diciembre / Maíz	134,52
Diciembre / Soya	77,84
Diciembre / Vegetales	149,23

Gráfico N°8: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller extraída en el mes de diciembre.

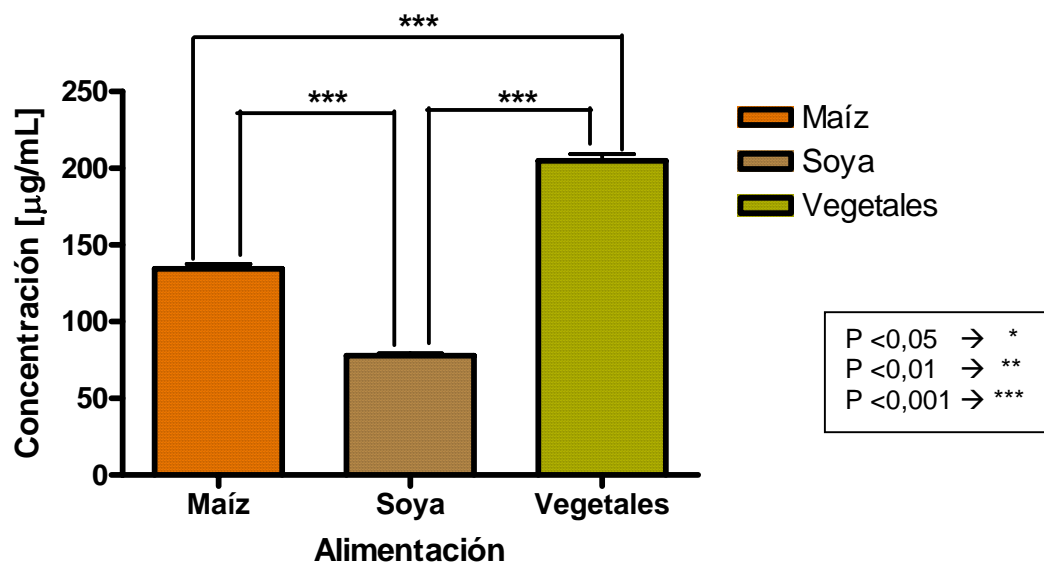


Tabla N° 19: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en secreción de caracol extraída durante el mes de marzo.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Marzo/ Maíz	160,51
Marzo / Soya	149,23
Marzo / Vegetales	258,24

Gráfico N°9: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller extraída en el mes de marzo.

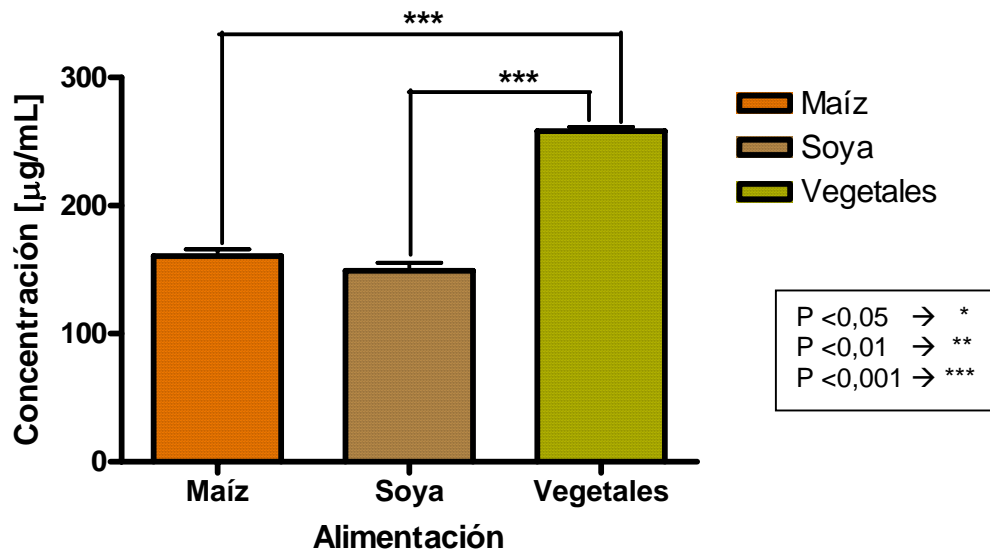


Tabla N° 20: Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico en muestras de secreción de caracoles según período de obtención y alimentación.

Muestra	Concentración promedio ($\mu\text{g/mL}$) de ácido glicólico
Octubre / Maíz	129,57
Octubre / Soya	187,79
Octubre / Vegetales	244,45
Diciembre / Maíz	134,52
Diciembre / Soya	77,84
Diciembre / Vegetales	204,81
Marzo / Maíz	160,51
Marzo / Soya	149,23
Marzo / Vegetales	258,24

Gráfico N°10: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según período de obtención de la secreción y alimentación del caracol.

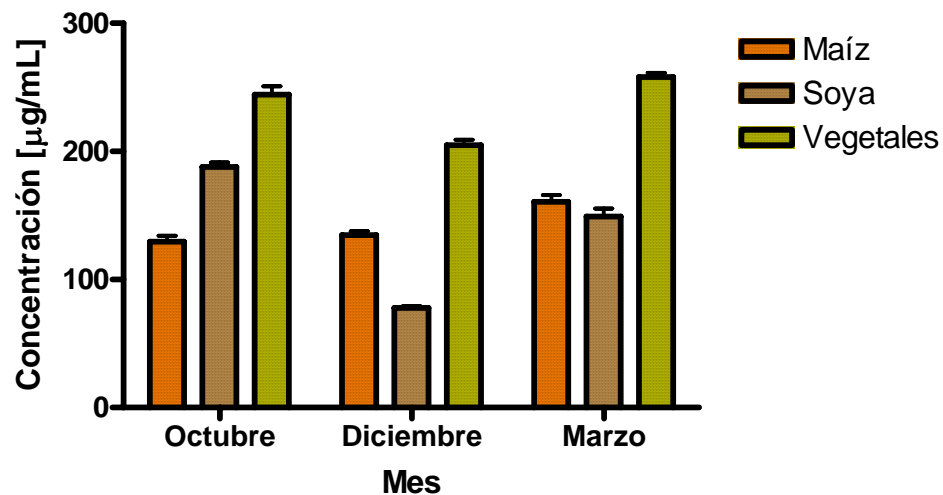


Tabla N° 21: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa*

Müller según período de obtención.

	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en muestras de secreción recolectadas en octubre	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en muestras de secreción recolectadas en diciembre	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en muestras de secreción recolectadas en marzo
Maíz 1	125,28	140,60	154,12
Maíz 2	138,80	132,44	171,12
Maíz 3	124,64	130,52	156,28
Soya 1	184,92	76,56	156,56
Soya 2	195,12	76,16	154,24
Soya 3	183,32	80,80	136,88
Vegetales 1	234,40	198,24	255,16
Vegetales 2	256,48	203,04	264,40
Vegetales 3	242,48	213,16	255,16
Promedio	187,27	139,06	189,32
D.S	50,3199	55,2975	52,4673
% C.V	26,8701	39,7659	27,7129

Gráfico N°11: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según período de obtención de la secreción.

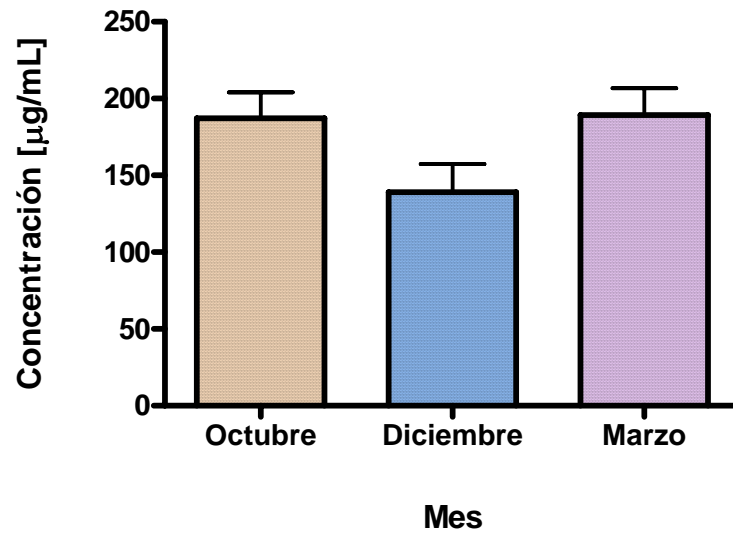
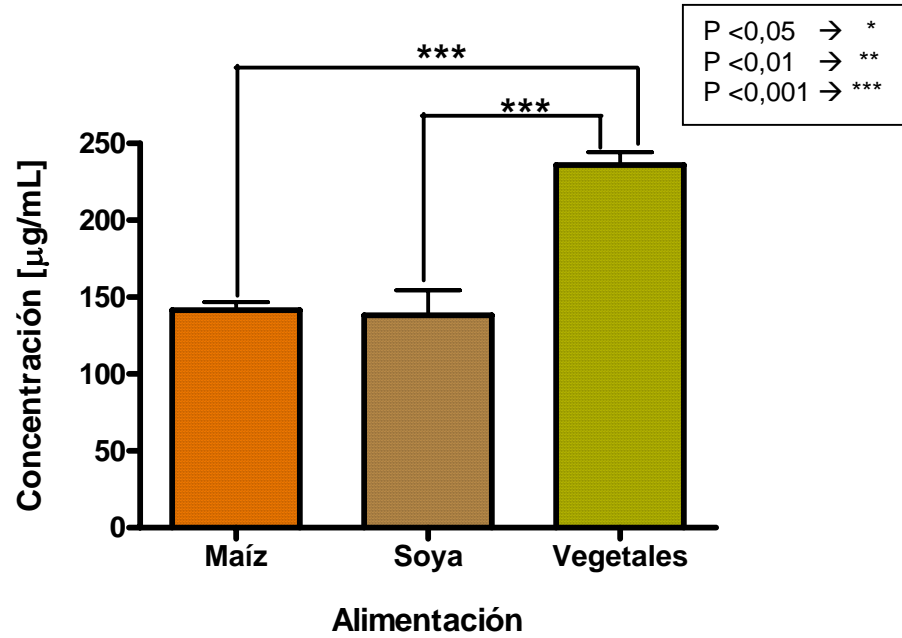


Tabla N° 22: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según alimentación.

	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en secreción de caracoles alimentados con Maíz	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en secreción de caracoles alimentados con Soya	Concentración [μg/mL] de ácido glicólico en secreción de caracoles alimentados con Vegetales
Octubre 1	125,28	184,92	234,40
Octubre 2	138,80	195,12	256,48
Octubre 3	124,64	183,32	242,48
Diciembre 1	140,60	76,56	198,24
Diciembre 2	132,44	76,16	203,04
Diciembre 3	130,52	80,80	213,16
Marzo 1	154,12	156,56	255,16
Marzo 2	171,12	154,24	264,40
Marzo 3	156,28	136,88	255,16
Promedio	141,53	138,28	235,84
D.S	15,8632	48,7310	25,0957
% C.V	11,2081	35,2397	10,6412

Gráfico N°12: Concentración de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según alimentación.



8 DISCUSIÓN

8.1 MÉTODO ANALÍTICO

Al ser, el ácido glicólico, un ácido orgánico (débil) de cadena corta, en solución coexistirá como la suma de sus formas iónica y no iónica (Quattrocchi *et al.*, 1992).



Por lo tanto, para obtener buenos resultados, se pueden utilizar dos formas de cromatografía reversa: el control de la ionización (supresión iónica) o apareamiento iónico. Inicialmente se probó esta última, utilizando una fase móvil de buffer fosfato de amonio dihidrogenado ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) 10 mM, pH 6,5, incorporándole tetrabutilamonio yoduro a 10 mM, utilizándolo como contraión para la forma ionizada y no ionizada del ácido glicólico (Nicoletti *et al.*, 1999). Sin embargo, no se obtuvieron buenos resultados. El cromatograma obtenido fue poco limpio y contenía muchas señales de ruido. Por lo tanto se intentó controlando la ionización, ya que si no fuera de esta manera, sólo se retendría favorablemente la especie no iónica y lo haría mal la iónica, que resulta muy polar.

El pH, por ejemplo, modifica la retención. Si el analito se encuentra disociado, el equilibrio debe desplazarse hacia la forma no ionizada para lograr la retención. En el caso de los ácidos carboxílicos la solución es bastante simple. Basta utilizar un pH entre 2 y 4, que habitualmente es suficiente, para controlar la ionización (Quattrocchi *et al.*, 1992). Según la ecuación de Henderson – Hasselbach, se obtiene que:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log (\text{A}^-)/(\text{HA})$$

El pKa del ácido glicólico es 3,83 (Merck Index, 2001).

- Al trabajar con una fase móvil pH 4, se obtendría lo siguiente:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})}$$

$$4 = 3,83 + \log \frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})} \quad /x \text{ antilog}$$

$$\frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})} = 1,48 / 1,00$$

Es decir, que por cada 100 moléculas de ácido glicólico, se encontrarían 148 moléculas de glicolato.

- Al trabajar con una fase móvil pH 2, se obtendría lo siguiente:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})}$$

$$2 = 3,83 + \log \frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})} \quad /x \text{ antilog}$$

$$\frac{(\text{A}^-)}{(\text{HA})} = 0,0148 / 1,00$$

Es decir, que por cada 100 moléculas de ácido glicólico, se encontrarían 1,48 moléculas de glicolato.

Como la idea es favorecer el equilibrio a la forma no iónica, se decidió trabajar con una fase móvil ácida, lo más cercana a 2, aún sabiendo que se podría estar disminuyendo la vida útil de la columna cromatográfica.

8.2 LINEALIDAD

La curva utilizada se preparó dentro del rango de concentraciones 20 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido glicólico. La cuantificación la realizó el equipo cromatográfico por análisis de regresión de área de los picos contra concentración de los estándares.

La bibliografía establece que la linealidad se puede determinar con el coeficiente de correlación r , el que debe ser mayor a 0,9900 y que para este trabajo resultó ser $r = 0,9994$. Además, de este valor r se puede obtener el coeficiente de determinación r^2 , el que indica la proporción o porcentaje de variabilidad de los datos que se explica por la asociación entre las dos variables. Si $r = 0,9994$, $r^2=0,9988$. Por lo tanto, se puede decir que el 99,88% de la variabilidad de las áreas se explica por la variable independiente (Quattrocchi *et al*, 1992) y queda un 0,12% restante de variabilidad no explicada (Rius y Barón, 2005)

Para obtener el grado de significación se revisó, además, una tabla de prueba de coeficiente de correlación, 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° 12). Por lo tanto el r experimental ($r = 0,9994$) es mayor al r de la tabla ($r=0,441$) lo que nos indica que los datos obtenidos en la curva de calibración de rangos 20 – 100 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) presenta una correlación lineal significativa.

8.3 PRECISIÓN DEL SISTEMA INSTRUMENTAL

8.3.1 Repetibilidad

La A.O.A.C. (*Association of Official Analytical Chemists*) incluye una tabla con datos de precisión en función de la concentración del analito, en el manual de verificación de rangos para métodos analíticos (Anexo N° 2, Tabla N° 14). Para las concentraciones utilizadas en este parámetro; 40, 60 y 80 µg/mL (ppm) el coeficiente de variación porcentual (%CV) tiene que ser inferior a 7,3% (para 10 ppm) e incluso menor a 5,3% (para 100 ppm). Basado en esta tabla, se puede decir que los valores de los coeficientes de variación se encuentran dentro de los rangos aceptados, ya que para 40 ppm y 60 ppm, se obtuvo un %CV igual a 1,58%. Para 80 ppm se obtuvo un %CV de 1,21%.

8.3.2 Precisión Intermedia

Para la concentración utilizada en este parámetro, 80 ppm, que se inyectó por triplicado cada día y que fue realizada durante cuatro días consecutivos, los % CV de cada día son; 1,82%, 0,69%, 0,90% y 0,58%, respectivamente. Cada uno de ellos se encuentra dentro de los rangos establecidos por la A.O.A.C, considerando como valor límite 5,3% para 100 ppm. (Anexo N°2, Tabla N° 14)

8.4 PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.4.1 Repetibilidad

Para las concentraciones utilizadas en este parámetro; 40, 60 y 80 $\mu\text{g/mL}$ (ppm) el coeficiente de variación porcentual (%CV) tiene que ser inferior a 7,3% (para 10 ppm) e incluso menor a 5,3% (para 100 ppm). Basado en la tabla de precisión en función de la concentración del analito de la A.O.A.C (Anexo N° 2, Tabla N° 14) se puede decir que los valores de los coeficientes de variación se encuentran dentro de los rangos aceptados, ya que para 40 ppm el % CV corresponde a 1,93. Para 60 ppm, se obtuvo un %CV igual a 4,31% y finalmente para 80 ppm se obtuvo un %CV de 1,27%.

8.4.2 Precisión Intermedia

Para las concentraciones utilizadas en este parámetro; 40 ppm, 60 ppm y 80 ppm, en donde cada una de ellas se inyectó por triplicado cada día y que fueron analizadas durante cuatro días consecutivos se obtuvo los siguientes % CV. Para 40 ppm: 1,68%, 0,57%, 0,58% y 0,58%, cada día. Para 60 ppm se obtuvo: 4,63%, 2,93%, 2,76% y 2,42% y finalmente, para 80 ppm los % CV fueron: 0,89%, 2,28%, 1,42% y 1,51%. Cada uno de ellos se encuentra dentro de los rangos establecidos por la A.O.A.C, considerando como valor límite 5,3% para 100 ppm. (Anexo N° 2, Tabla N° 14).

8.5 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° 15).

El promedio de los % de recuperación de cada concentración es de 102,07%, valor que está dentro de lo permitido por la A.O.A.C si consideramos el valor 100 ppm que establece un rango entre 90 y 107%. Más aún para 10 ppm que establece un rango entre 80 y 110% como permitido.

Se confirmó el resultado obtenido con el ensayo de *t de Student*. Según la fórmula, se obtuvo el valor $t_{\text{experimental}} = 0,2703$ y el t_{tabulado} es de 1,796. Se aprecia que el valor experimental es menor respecto al t_{tabulado} , no existiendo diferencia significativa con el 100% de recuperación (Anexo N°2, Tabla N° 13)

8.6 SELECTIVIDAD

Este parámetro se determinó, inyectando 10 veces un estándar de ácido glicólico de 80 $\mu\text{g/mL}$ en donde los tiempos de retención obtenidos no presentaron grandes variaciones. (Tabla N° 10).

Sin embargo, para confirmar si el método es selectivo, se le agregó una cantidad conocida de estándar de ácido glicólico de una determinada concentración a una muestra de secreción de caracol y se apreció un aumento del pico en cuestión donde no hubo ensanchamiento de bandas ni aparición de hombros. (Tabla N° 12 y Figura N° 8), lo que confirma que el pico corresponde solamente a ácido glicólico.

8.7 SENSIBILIDAD

Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método analítico son los límites de detección y cuantificación. El Límite de detección obtenido es de 3,16 $\mu\text{g/mL}$ y el límite de cuantificación es de 8,72 $\mu\text{g/mL}$.

El método utilizado corresponde al descrito en la metodología. No obstante, se debe dejar en claro que son varios los métodos que se pueden utilizar para determinar los límites antes calculados (Quattrocchi *et al.*, 1992).

Algunos autores (Quattrocchi *et al.*, 1992) plantean que este parámetro sólo debe determinarse para el análisis de impurezas o trazas o cuando el rango analítico se encuentra muy próximo al límite de detección. Sin embargo, como la validación se realizó antes de determinar las concentraciones de ácido glicólico en las diferentes muestras de secreción, y por lo tanto no se sabía con certeza la concentración en cada una de ellas, se determinó el parámetro con el objetivo de establecer estos límites, y no cometer el error de analizar muestras, que por lo visto son muy variables, sin saber si sus concentraciones son realmente detectables y cuantificables, más aún si se trabajó con muestras diluidas, en donde perfectamente se puede obtener un valor pequeño.

8.8 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE SECRECIÓN DE CARACOL

8.8.1 Determinación de la presencia de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller.

Para determinar la presencia de ácido glicólico en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, no sólo se utilizó la coincidencia del tiempo de retención entre el estándar y el analito de la muestra, sino que además, se agregó una cantidad determinada de estándar de ácido glicólico de concentración conocida a la muestra, que al inyectarla al equipo, produjo claramente un aumento en la altura del pico y no hubo ensanchamiento de bandas ni aparición de hombros. Si embargo, se aprecia una pequeña diferencia entre el valor de la concentración de ácido glicólico esperado de 195, 39 $\mu\text{g/mL}$ y el realmente obtenido 191, 37 $\mu\text{g/mL}$. Esta variación, que por cierto es muy pequeña, no influye en la conclusión obtenida y solamente se considera un error experimental que puede haber ocurrido al momento de mezclar los 900 μL de muestra con los 100 μL de estándar de ácido glicólico de 1000 $\mu\text{g/mL}$, ya que es común que al manipular cantidades tan pequeñas de volúmenes, se produzca este fenómeno, pero queda claramente demostrado que no es un factor que permita la duda en la confirmación de la presencia de ácido glicólico en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller

8.8.2 Determinación del factor K´

Se determinó el factor K´ que corresponde a 0,974, valor que se encuentra dentro del rango establecido, por Quattrocchi *et al.* (1992), como normal (0,5- 20). Esta medición es muy frecuente y no sólo permite determinar la retención del analito sino que también, ajustar la separación si ésta no es adecuada. Cuando los valores de K´ son pequeños, la resolución es pobre. Si K´ alcanza valores mayores, el tiempo de análisis puede ser demasiado largo. Así, los valores de K´ se pueden ajustar para dar lugar, en el cromatograma, a un gran número de picos o viceversa. Si bien el valor de K´ obtenido en este trabajo está dentro del rango aceptado, es pequeño. No obstante, dicho valor, demuestra las dificultades para determinar el analito en cuestión.

8.8.3 Análisis de muestras de secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller sometidos a diferentes dietas y períodos de obtención de la secreción.

Se sabe que el ácido glicólico es un producto de la fotorrespiración, proceso que ocurre en las plantas, y que el caracol se alimenta de ellas. Sin embargo, no existen estudios publicados que establezcan si este molusco, por alguna ruta metabólica, sintetiza el ácido de novo, lo produce a partir de algún intermediario metabólico o si lo obtiene como tal de la alimentación. Cualquiera sea la manera de obtenerlo, mediante una o varias de las posibilidades anteriormente propuestas, se confirma la presencia del analito en cada una de las diferentes muestras analizadas y que la concentración de ácido glicólico varía según la alimentación del caracol y el período estacional de obtención u ordeña de la secreción.

El ciclo anual del caracol *Helix aspersa* Müller varía según las condiciones ambientales y el lugar geográfico en donde se encuentre la población (Iglesias *et al.*, 1996). En este estudio, octubre fue el período de inicio de la actividad del caracol, después de un largo período de letargo, que finalizó durante el mes de marzo, para volver al período de hibernación.

Existen autores que han estudiado las diferencias, entre los períodos de hibernación y actividad, en el consumo de Oxígeno (Bishop y Brand, 2000) y metabolismo de algunos componentes en diferentes órganos (Ramos- Vasconcelos y Hermes- Lima, 2003; Ramos- Vaconcelos *et al*, 2005) de *Helix aspersa*. Sin embargo, no existen publicaciones que establezcan si existen variaciones en los componentes de la secreción durante estos dos períodos.

Se ha observado que una vez que los caracoles despiertan del período de hibernación, lo hacen con un hambre desmedido, comiendo grandes cantidades para recuperar la energía perdida durante este período (Benito, 2004).

8.8.4 Determinación de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según período de obtención de la secreción.

En las tablas N° 13, 14, 15 y 16 y gráficos N° 3, 4, 5 y 6 se logran apreciar claramente las diferencias en la concentración de ácido glicólico según el período estacional, es decir, mes en que se realizó la obtención de la secreción, dentro del período activo del caracol.

En aquellos caracoles alimentados con harina de soya y vegetales, la concentración de ácido glicólico es menor durante el mes de diciembre, respecto al mes

de octubre y marzo, no así en aquellos que se alimentaron de harina de maíz, en donde la menor concentración se obtuvo en el mes de octubre y en concentración similar al mes de diciembre, sin encontrar diferencias significativas entre ellas.

Si bien, durante los tres períodos estudiados, los caracoles se encontraban en el período activo, su metabolismo no es constante y varía durante él. En octubre, el caracol recién despierta, consume grandes cantidades de alimento para recuperarse y alcanza altas concentraciones de ácido glicólico las que van disminuyendo a medida que el caracol se vuelve más activo; comienza a moverse, a reproducirse, a eliminar desechos que, probablemente, influyen en la disminución de la concentración del ácido, que ocurrió durante el mes de diciembre. Finalmente, las concentraciones se ven aumentadas en marzo, probablemente, porque el caracol se está preparando para hibernar y, por lo tanto, está almacenando lo que está consumiendo.

En la tabla N° 21 y en el gráfico N° 11 se analizaron los datos según período de obtención de la secreción. Si bien el gráfico muestra un comportamiento de los datos similar a los gráficos N° 4 y 5, no existen diferencias significativas entre los períodos, ya que las concentraciones variaron mucho entre ellas, pues se están considerando las tres alimentaciones por cada período.

8.8.5 Determinación de ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller según alimentación.

En las tablas N° 17, 18, 19 y 20 y en los gráficos N° 7, 8, 9 y 10 se establecen las diferencias obtenidas según la alimentación proporcionada a los diferentes grupos de caracoles. Los alimentos considerados para este experimento contienen de manera

natural ácido glicólico, (Zelitch, 1958; Samish y Pallas Jr, 1972; Zelitch, 1973) en menor o mayor cantidad dependiendo de la planta, la actividad fotosintética y fotorrespiración. Si el caracol obtiene todo o parte del ácido glicólico a partir de la dieta, la concentración de éste debiera variar según lo que consume, así como el ácido debiera hacerlo en cada alimento. Sin embargo, no existen estudios que establezcan la cantidad de ácido glicólico en cada uno de los alimentos utilizados para el estudio.

En cada período estudiado, octubre, diciembre y marzo, la concentración del ácido es mayor en la secreción de aquellos caracoles que se alimentaron con vegetales que en aquellos que lo hicieron con harina de maíz o harina de soya. Esta diferencia que resulta ser estadísticamente significativa ($p < 0,001$), se explica, probablemente, porque la fotorrespiración ocurre en las hojas y por lo tanto, sería el órgano de la planta en donde se encuentra una mayor cantidad de ácido, a diferencia de las otras dos dietas, ya que si bien en ambas plantas, maíz y soya, ocurre el proceso de fotorrespiración (Popov *et al.*, 2003; Broker *et al.*, 1997), en las harinas se encuentra el grano, en donde el ácido glicólico pudiera encontrarse en menor concentración, que en las hojas.

En la tabla N° 22 y en el gráfico N°12 se analizaron los datos según alimentación. Claramente se aprecian diferencias significativas entre los vegetales frente a las harinas de soya y maíz, reafirmando la teoría anteriormente planteada.

8.8.6 Análisis general

Finalmente, todo lo anteriormente discutido, permitió establecer que si bien la alimentación de caracoles basada en vegetales y, probablemente, obtener la secreción en octubre o marzo, producirá una mayor concentración de ácido glicólico en la secreción, esto no ocurrirá, necesariamente, de la misma manera con otros componentes, como por ejemplo, la alantoína (Lira, 2008).

Además, las concentraciones aquí obtenidas corresponden a un proveedor particular, y no necesariamente son iguales para todos los criaderos, ya que cada helicultor tiene una dieta determinada para sus caracoles.

Esto último hace que la estandarización de la secreción sea difícil por parte del ISP (Instituto de Salud Pública), autoridad sanitaria de nuestro país, no existiendo aún valores mínimos ni máximos de los componentes que debe tener la secreción o baba del caracol, para utilizarla, por ejemplo, en productos cosméticos.

Las concentraciones de ácido glicólico obtenidas en las diferentes muestras de secreción de caracol variaron según la alimentación del caracol y la época de obtención de la secreción, las que se encontraron entre 77, 84 $\mu\text{g/mL}$ y 258, 24 $\mu\text{g/mL}$. La FDA establece que los efectos que produce el ácido glicólico, sobre la piel, ocurren al utilizar soluciones de ácido glicólico a altas concentraciones, 10% y más, valores mucho mayores a los encontrados en la secreción de caracol, por lo tanto, las bondades que se le atribuyen a la secreción o baba de caracol y a cremas formuladas a base de ella, se deben probablemente a la mezcla de diferentes compuestos presentes de manera natural en la secreción y no solamente a la presencia de ácido glicólico.

9 CONCLUSIONES

- Se Implementó y validó una metodología por HPLC-UV para determinar y cuantificar ácido glicólico en secreción de caracol (*Helix aspersa* Müller), el que cumple con los parámetros exigidos para una técnica analítica tales como: Linealidad, Precisión, Exactitud, Selectividad y Sensibilidad.
- Se establece la presencia de ácido glicólico en la secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, pertenecientes al criadero de Caulín, Ancud, Chile.
- El período del ciclo en donde se obtuvo la mayor concentración de ácido glicólico en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con harina de maíz fue en marzo (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$); con harina de soya fue en octubre (187,79 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con vegetales fue en marzo (258,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- La alimentación con que se obtuvo la mayor concentración de ácido glicólico en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller, en el inicio, mitad y término de su período activo fue vegetales, encontrándose concentraciones promedios de 244,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 204,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 258,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.
- La concentración de ácido glicólico obtenida en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller en el inicio, mitad y término de su ciclo activo fue de 187,27 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 139,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 189,32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

- La concentración de ácido glicólico obtenida en la secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller alimentados con harina de maíz, harina de soya y vegetales fue de 141,53 µg/mL; 138,28 µg/mL y 235,84 µg/mL, respectivamente.
- Tanto, la alimentación como el período de obtención de la secreción, influyen en la concentración de ácido glicólico en secreción de caracoles *Helix aspersa* Müller, aceptándose la hipótesis planteada.

10 PROYECCIONES

- Esta investigación demuestra que existen probabilidades de que así como las concentraciones de ácido glicólico varían según la alimentación del caracol y estacionalidad, también podrían verse influenciados otros de los componentes presentes en la secreción del caracol *Helix aspersa* Müller.
- Este trabajo permite contar con un método confiable para determinar ácido glicólico en secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, el que puede utilizarse por el ISP para fiscalizar si los laboratorios, que por cierto tienen sus propios métodos y que son de carácter confidencial, cumplen con algún rango de concentraciones de ácido glicólico en la secreción del caracol que el ISP pudiera establecer y así tener un mayor control de esta materia prima que está siendo cada vez más deseada por los laboratorios cosméticos.

11 REFERENCIAS

1. Abreu, J., Miranda, M., Castillo, O. And Redondo, D. (2001) Ácidos Carboxílicos en el fruto de *Bromelia pinguin* L. (Piña de ratón) por HPLC. *Rev Cubana Farm.*, 35 (2): 122-125.
2. Antena 3 Directo, Chile. Elina: Extracto proteico de caracol. <http://www.a3d.cl/antena3webneo/index.aspx?channel=6136&appintanceid=17070&pubid=6828>
(Visitada el 26 de Marzo de 2006)
3. Aupinel, P. y Bonnet, J.C. (1996). Influence de la photopériode sur l'activité saisonnière de l'escargot Petit-gris (*Helix aspersa* Müller). Effet spécifique sur la croissance et la reproduction. *Inra. Prod. Anim.* 9 (1) 79-83.
4. Benito L, Marcela. (2004). Evaluación técnica económica de una crianza intensiva de caracoles (*Helix aspersa*). Tesis, Departamento de Ciencias Animales, facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Pp: 8, 17.
5. Bishop, T. and Brand, M. (2000). Processes contributing to metabolic depression in hepatopancreas cells from the snail *Helix aspersa*. *The Journal of Experimental Biology.* 203; 3603- 3612.
6. Booker, F., Reid, Ch., Brunschön- Harti, S., Fiscus, E., and Miller, J. (1997). Photosynthesis and photorespiration in soybean (*Glycine max*) chronically exposed to elevated carbon dioxide and ozone. *Journal of Experimental Botany.* 48 (315); 1843-1852.

7. Bonnemain, B. (2005). Helix and drugs: Snails for western health care from antiquity to the present. *eCAM*. 2 (1), 25-28.
8. Briden, E. Hidroxiácidos. (2004). Ayer, hoy y mañana: agentes terapéuticos en Dermatología. *Med Cutan Iber Lat Am*. 32 (6): 265-270.
9. Bustamante Jorge Luís. (2004). Antecedentes generales de la alimentación de caracoles de tierra *Helix aspersa*.
<http://www.helix.cl/helix.htm#> (Última actualización; 02 de marzo de 2007)
(Visitada 15 Agosto de 2007)
10. Campion, M. (1961). The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Journal of Microscopical Science*. 102(2): 195-216.
11. Chaloner-Larsson, Gillian., Anderson, Roger. And Egan, Anik. (1998). Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF), segunda parte: Validación. Ginebra.
12. Cockrum, E. and McCauley, W. (1967). Zoología. Interamericana S.A. México. Pp 214, 215
13. Coro-Antich, Rosa., Subirós, N., Cuesta, T., González, A. and Domínguez-Alvarez, C. (2000) Dermoabrasión con ácido glicólico sobre la piel facial. Histomorfometría. Congreso Virtual Hispano Americano de Anatomía Patológica.
14. Cotellessa, C., Peris, K. and Chimenti, S. (1995). Review: Glycolic acid and its use in dermatology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol*. 5: 215-217.
15. Crowell, H. (1973). Laboratory study of calcium requirements of the brown garden snail, *Helix aspersa* Müller. *Proc. Malac. Soc. Lond*. 40, 491-503.

16. Couch, L. and Howard, P. (2002). Quantification of glycolic acid in cosmetic products using reversed phase high performance liquid chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*. 24, 89-95.
17. Davies, M.S., Jones, H.D., and Hawkins, S.J. (1990). Seasonal variation in the composition of pedal mucus from *Patella vulgate* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 144: 101-112.
18. Denny, M.W. (1984). Mechanical properties of pedal mucus and their consequences for gastropod structure and performance. *Amer. Zool.* 24: 23-36
19. Elicina: crema de caracol.
http://www.med-estetica.com/Zona_Comercial/Novedades/Paginas/elicina.htm
(Última actualización: año 2003) (Visitada el día 26 de marzo de 2006)
20. El mercurio on line.
http://www.puntomujer.emol.com/sin_complejos/noticia/detallenoticia.asp?id=%7BA BE8073A-436F-4BE0-8F56-96FAA8E01F4D%7D
(Última actualización: año 2002) (Visitada el día 26 de marzo de 2006)
21. Funasaka, Y., Sato, H., Usuki, A., Ohashi, A., Koyota, H., Miyamoto, K., Hillebrand, G. and Ichihashi, M. (2001). The efficacy of glycolic acid for treating wrinkles: analysis using newly developed facial imaging systems equipped with fluorescent illumination. *Journal of Dermatological Science*. 27 Suppl. 1: S53- S59.
22. Herreid C. (1977). Metabolism of land snails (*Otala lactea*) during dormancy, arousal and activity. *Comp. Biochem. Physiol.* 56A, 211-215.
23. Hickman, C., Roberts, L. and Larson, A. (2002). Principios integrales de Zoología. 11°. Ed. McGraw- Hill Interamericana. España. Pp 328, 329, 330, 333.

24. Iglesias, J., Santos, M., and Castillejo, J. (1996). Annual activity cycles of the land *Helix aspersa* Müller in natural populations in north-western Spain. *J. Moll. Stud.* 62: 495-505.
25. Iguchi, S., Aikawa, T. and Matsumoto, J. (1982). Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comp. Biochem. Physiol.* 72 A N° 3: 571-574.
26. Instituto Politécnico Nacional de México.
<http://www.ipn.mx/investigacion/catprod/documentos/gelCelulitis.pdf>
(Visitada el día 26 de marzo de 2006)
27. Instituto de Salud Pública de Chile.
<http://www.ispch.cl/ctrl/Inspeccion/herramientas.html>
(Visitada el día 02 de enero de 2008)
28. Jiang, M. and Qureshi, S.A. (1998). Assessment of in Vitro percutaneous absorption of glycolic acid through human skin sections using a flow-through diffusion cell system. *Journal of Dermatological Science.* 18, 181-188.
29. Lira C, Adolfo. (2008). Determinación del efecto de la alimentación y período estacional en la concentración de Alantoína en la secreción de caracol chileno (*Helix aspersa* Müller). Tesis en revisión, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
30. Manosalva A, Carolina. (2005). 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, Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.

31. Meglitsch, P. (1978). Zoología de los invertebrados. H. Blume ediciones. España. Pp 335.
32. Milinsk, María Cristina., Padre, Roseli das Gracas., Hayashi, Carmino., Evelázio de Souza, Nilson. and Matsushita, Makoto. (2003). Influence of diets enriched with different vegetable oils on the fatty acid profiles of snail *Helix aspersa maxima*. *Food Chemistry*. 82, 553-558.
33. Narayanan, L., Moghaddam, A., Taylor, A., Sudberry, G. and Fisher, J. (1999). Sensitive high- performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of low levels of dichloroacetic acid and its metabolites in blood and urine. *Journal of Chromatography B*. 729, 271-277.
34. Nicoletti, I., Corradini, C., Cogliandro, E. and Cavazza, A. (1999). Determination of alpha- hydroxy acids in cosmetic products by high- performance liquid chromatography with a narrow- bore column. *International Journal of Cosmetic Science*. 21, 265-274.
35. Obara, K., Otsuka-Fuchino, H., Sattayasai, N., Nonomura, Y., Tsuchiya, T. and Tamiya, T. (1992). Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina áulica* Férussac. *Eur.J.Biochem*. 209, 1-6.
36. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas.
<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T29.htm>
<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T04.htm>
<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T14.htm>
<http://www.fao.org/docrep/005/ac854t/AC854T33.htm>

- (En línea: 1970. Roma: FAO. Estudios Nutricionales)(Visitadas el 20 de septiembre de 2007)
37. Pawlicki, J.M., Pease, L.B., Pierce, C.M., Startz, T.P., Zhang, Y. and Smith, M. (2003). The effect of molluscan glue proteins on gel mechanics. *The Journal of Experimental Biology*. 207: 1127-1135.
38. Perea, J.M., Delgado, M., Mayoral, A., Martín, R., Acero, R. and García, A. (2004). Efecto de la adición de Carbonato cálcico en la dieta de *Helix aspersa* Müller. *Arch. Zootec.* 5, 407-410.
39. Popov, V., Dmitrieva, E., Eprintsev, A., and Igamberdiev, A. (2003). Glycolate oxidase isoforms are distributed between the bundle sheath and mesophyll tissues of maize leaves. *J.Plant Physiol.* 160; 851-857.
40. Quattrocchi, O.A., Abelaira de Andrizzi, S.A. and Laba, R.F. (1992). Introducción a HPLC. Aplicación y práctica. Ed Artes Gráficas Farro. Buenos Aires, Argentina. Pp: 47, 90, 91, 106, 112-122, 302- 327.
41. Ramos-Vasconcelos, G., and Hermes-Lima, M. (2003). Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *The Journal of Experimental Biology*. 206; 675-685.
42. Ramos- Vasconcelos, G., Cardoso, L., and Hermes- Lima, M. (2005). Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 140: 165-174.
43. Rius, F. and Barón, F. (2005). Bioestadística. Ed Thomson. Madrid, España. Pp: 37,39, 66.

44. Ruppert, E. and Barnes, R. (1996). Zoología de los Invertebrados. 6°. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 396, 397.
45. Samish, Y. and Pallas Jr., J. (1972). A re- evaluation of Soybean leaf photorespiration. *Plant Physiol.* 50, 28-30.
46. Scalia, S., Callegari, R. and Villani, S. (1998). Determination of glycolic acid in cosmetic products by solid- phase extraction and reversed- phase ion- pair high- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 795, 219-225.
47. Shirbhate, R. and Cook, A. (1987). Pedal and opercular secretory glands of Pomatias, Bithynia and Littorina. *J. Moll. Stud.* 53:79-96.
48. Storer, T., Usinger, R., Stebbins, R. and Nybakken, J. (1986). Zoología General. 6°. Ed. Omega. Barcelona. Pp 498, 499.
49. Taiz, L. and Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. 3°. Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts. Pp 111-112-145-146.
50. The Merck Index. (2001). 13°. Ed. Staff. Merck & Co. INC. Whitehouse Station, NJ. USA: Pp: 801.
51. U.S. Food and Drug Administration. (2000). AHAs and UV Sensitivity: Results of New FDA- Sponsored Studies.
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cosahauv.html>
(Última actualización: 2000)(Visitada el 20 de septiembre de 2007)
52. U.S. Food and Drug Administration. (1997). Alpha Hidroxy Acids in Cosmetics.
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-aha.html>
(Última actualización: 1997)(Visitada el 20 de septiembre de 2007)

53. United States Pharmacopeia, USP Convention, (2000), 24° Ed., Inc., Pensilvania. Pp: 2150.
54. Verdugo, P., Deyrup-Olsen, I., Aitken, M., Villalon, M. and Johnson, D. (1987). Molecular mechanism of Mucin Secretion: The role of intragranular charge shielding. *J Dent Res.* 66 (2): 506-508
55. Wallach B, Rodrigo. (2005) Helicicultura: Cría de Caracoles Terrestres. Tesis, Departamento de Economía Agraria, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Pp:11,12.
56. Zelitch, I. (1958). The role of Glycolic Acid Oxidase in the respiration of leaves. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 233, N° 6.
57. Zelitch, I. (1973). Alternate pathways of Glycolate synthesis in Tobacco and Maize leaves in relation to rates of photorespiration. *Plant Physiol.* 51: 299-305.

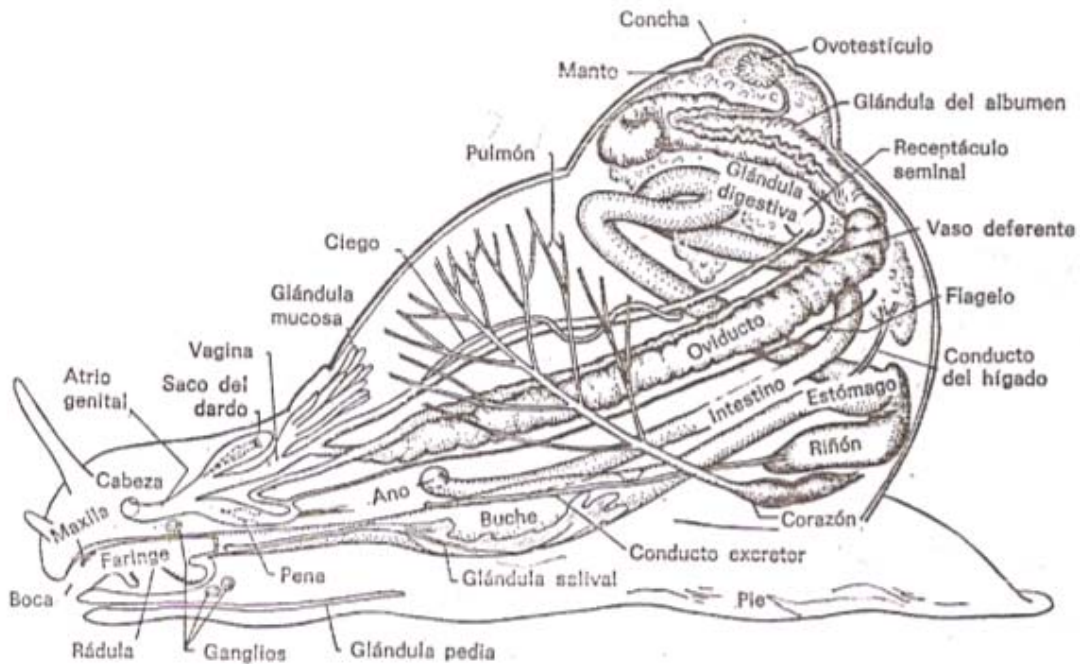
12 ANEXOS

12.1 ANEXO N° 1: FIGURAS

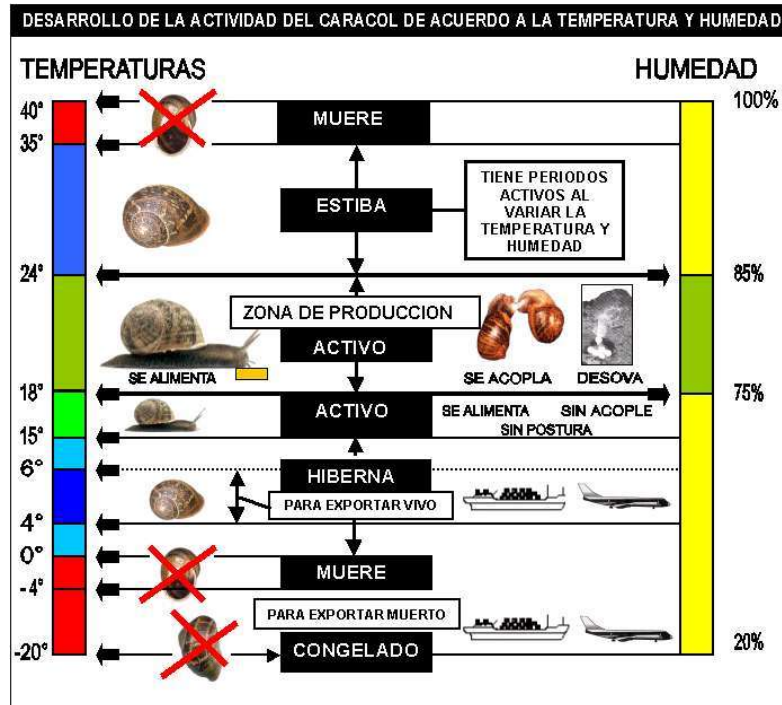
12.1.1 Figura N° 1: Anatomía externa del caracol *Helix aspersa* Müller.



12.1.2 Figura N° 2: Anatomía interna del caracol *Helix aspersa* Müller.



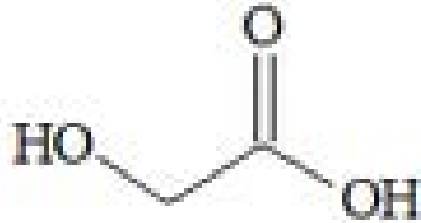
12.1.3 Figura N° 3: Desarrollo de la actividad del caracol de acuerdo a la temperatura y humedad.



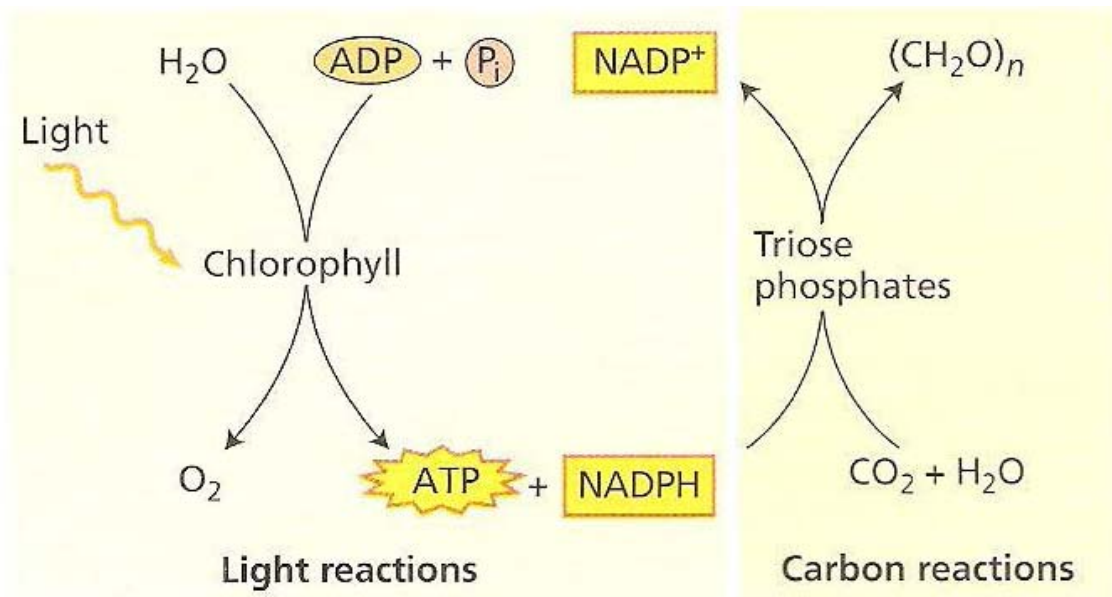
12.1.4 Figura N° 4: Epifragma. Membrana mucosa, calcificada secretada por el caracol durante el período de inactividad.



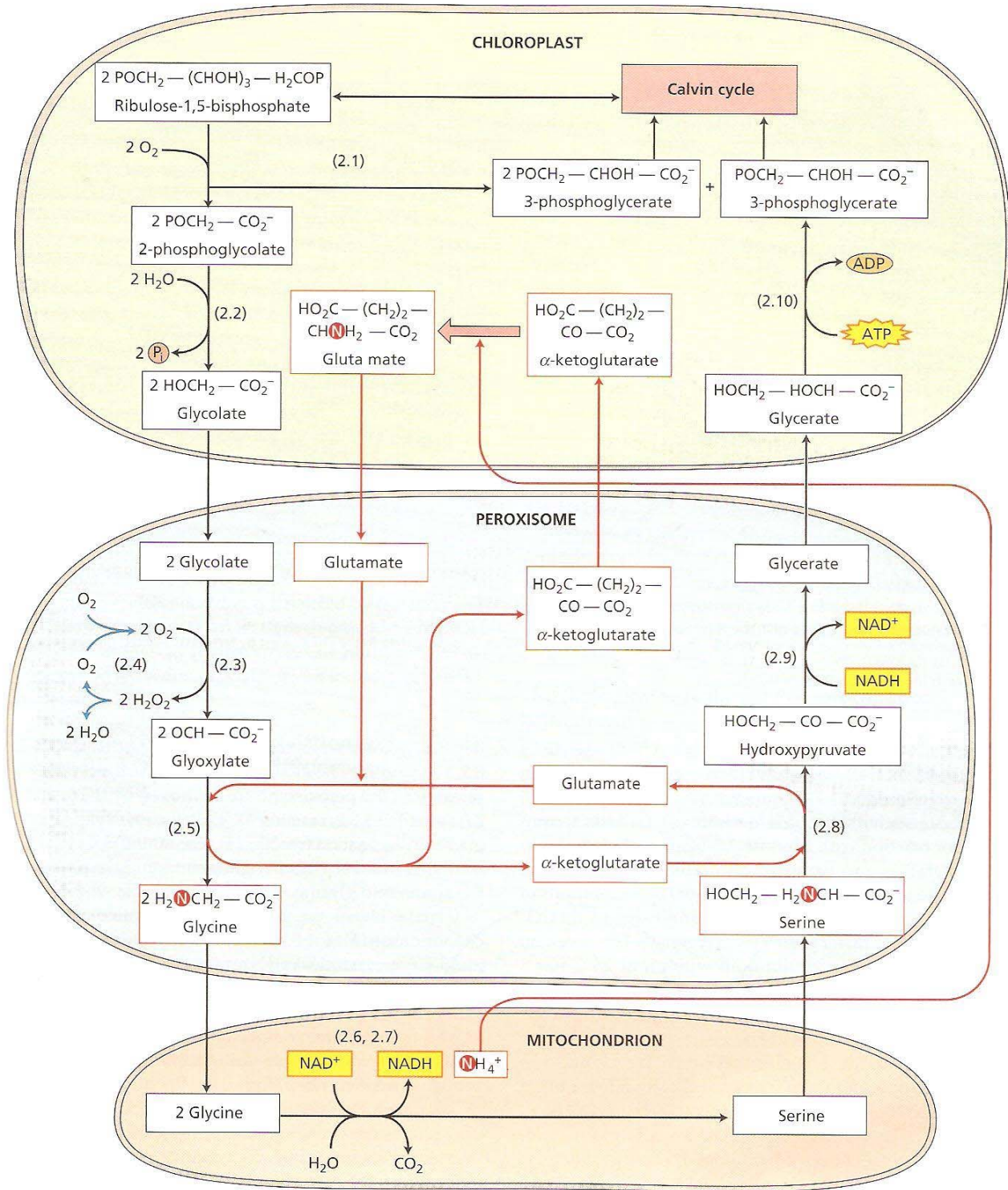
12.1.5 Figura N° 5: Estructura Química del ácido glicólico.



12.1.6 Figura N° 6: Esquema del proceso de Fotosíntesis. A la izquierda, las reacciones luminosas donde se producen ATP y NADPH. A la derecha, las reacciones de fijación del carbono que darán origen a los carbohidratos.



12.1.7 Figura N° 7: Proceso de fotorrespiración y formación de ácido glicólico.



12.2 ANEXO N° 2: TABLAS

12.2.1 Tabla N° 1: Equivalencia de secreción de caracol *Helix aspersa* Müller, antes y después de liofilizar.

Muestra	Mililitros (mL) de secreción antes de liofilizar	Gramos(g) obtenidos de secreción después de liofilizar	Gramos (g) liofilizado para preparar 3mL de suspensión de secreción
Maíz/Octubre	127	3,7016	0,0874
Maíz/Diciembre	86	2,8567	0,0997
Maíz/Marzo	49	1,4755	0,0903
Soya/Octubre	100	2,9316	0,0879
Soya/Diciembre	50	1,6503	0,0990
Soya/Marzo	82	2,8687	0,1050
Vegetal/Octubre	30	0,9593	0,0959
Vegetal/Diciembre	75	1,6217	0,0649
Vegetal/Marzo	113	2,9868	0,0793

12.2.2 Tabla N°2: Tratamiento de muestras de secreción de caracol *Helix aspersa*

Müller.

Muestra	Gramos realmente pesados para 3 mL de suspensión de secreción (Diluida 4 veces)	pH muestra medido con cintas	mL de TCA 10% agregado a la muestra hasta pH 1
Maíz / Octubre	0,0219	8-9	0,3
Maíz /Diciembre	0,0249	8-9	0,3
Maíz / Marzo	0,0226	8-9	0,3
Soya / Octubre	0,0220	9	0,4
Soya/ Diciembre	0,0248	8-9	0,3
Soya/ Marzo	0,0262	8-9	0,3
Vegetal/Octubre	0,0240	8-9	0,3
Vegetal/Diciembre	0,0162	7-8	0,2
Vegetal/ Marzo	0,0198	8-9	0,3

12.2.3 Tabla N° 3: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de maíz y cuya obtención se realizó durante el mes de octubre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Maíz / octubre 1	31,32	4	125,28
Maíz / octubre 2	34,70	4	138,80
Maíz / octubre 3	31,16	4	124,64
Promedio	32,39		129,57
D.S	1,9992		7,9970
% C.V	6,1717		6,1717

12.2.4 Tabla N° 4: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de maíz y cuya obtención se realizó durante el mes de diciembre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Maíz / diciembre 1	35,15	4	140,60
Maíz / diciembre 2	33,11	4	132,44
Maíz / diciembre 3	32,63	4	130,52
Promedio	33,63		134,52
D.S	1,3381		5,3522
% C.V	3,9788		3,9788

12.2.5 Tabla N° 5: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de maíz y cuya obtención se realizó durante el mes de marzo.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Maíz / marzo 1	38,53	4	154,12
Maíz / marzo 2	42,78	4	171,12
Maíz / marzo 3	39,07	4	156,28
Promedio	40,13		160,51
D.S	2,3137		9,2546
% C.V	5,7659		5,7659

12.2.6 Tabla N° 6: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de soya y cuya obtención se realizó durante el mes de octubre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Soya / octubre 1	46,23	4	184,92
Soya / octubre 2	48,78	4	195,12
Soya / octubre 3	45,83	4	183,32
Promedio	46,95		187,79
D.S	1,6003		6,4010
% C.V	3,4087		3,4087

12.2.7 Tabla N° 7: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de soya y cuya obtención se realizó durante el mes de diciembre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Soya / diciembre 1	19,14	4	76,56
Soya / diciembre 2	19,04	4	76,16
Soya / diciembre 3	20,20	4	80,80
Promedio	19,46		77,84
D.S	0,6428		2,5712
% C.V	3,3032		3,3032

12.2.8 Tabla N° 8: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con harina de soya y cuya obtención se realizó durante el mes de marzo.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Soya / marzo 1	39,14	4	156,56
Soya / marzo 2	38,56	4	154,24
Soya / marzo 3	34,22	4	136,88
Promedio	37,31		149,23
D.S	2,6888		10,7553
% C.V	7,2073		7,2073

12.2.9 Tabla N° 9: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con vegetales y cuya obtención se realizó durante el mes de octubre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Vegetal / octubre 1	58,60	4	234,40
Vegetal / octubre 2	64,12	4	256,48
Vegetal / octubre 3	60,62	4	242,48
Promedio	61,11		244,45
S.D	2,7929		11,1715
% C.V	4,5700		4,5700

12.2.10 Tabla N° 10: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con vegetales y cuya obtención se realizó durante el mes de diciembre.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Vegetal/diciembre 1	49,56	4	198,24
Vegetal/diciembre 2	50,76	4	203,04
Vegetal/diciembre 3	53,29	4	213,16
Promedio	51,20		204,81
D.S	1,9041		7,6164
% C.V	3,7187		3,7187

12.2.11 Tabla N° 11: Concentración de ácido glicólico obtenida en muestras de secreción de caracoles alimentados con vegetales y cuya obtención se realizó durante el mes de marzo.

Muestras	Concentración (µg/mL) de ácido glicólico	Factor de dilución	Concentración (µg/mL) Real de ácido glicólico
Vegetal/ marzo 1	63,79	4	255,16
Vegetal/ marzo 2	66,10	4	264,40
Vegetal/ marzo 3	63,79	4	255,16
Promedio	64,56		258,24
D.S	1,3337		5,3347
% C.V	2,0658		2,0658

12.2.12 Tabla N° 12: 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

12.2.13 Tabla N° 13: 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

12.2.14 Tabla N° 14: Criterios de aceptación para el parámetro de precisión en función de la concentración del analito de la A.O.A.C.

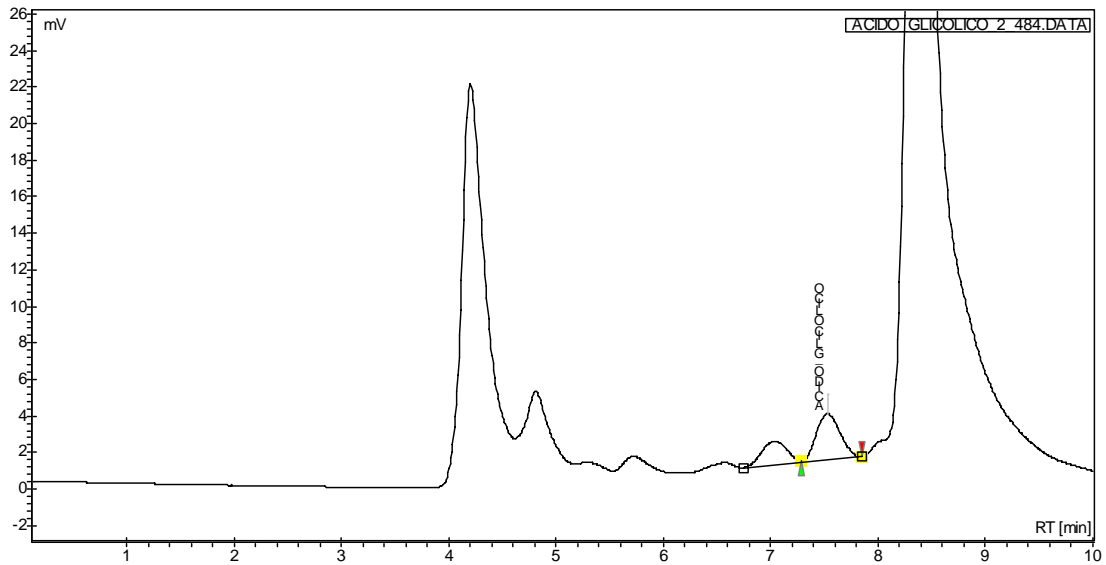
Analito %	Radio analito	Unidad	C.V. (%)
100	1	100%	1.3
10	10-1	10%	2.8
1	10-2	1%	2.7
0.1	10-3	0.1%	3.7
0.01	10-4	100 ppm	5.3
0.001	10-5	10 ppm	7.3
0.0001	10-6	1 ppm	11
0.00001	10-7	100 ppb	15
0.000001	10-8	10 ppb	21
0.0000001	10-9	1 ppb	30

12.2.15 Tabla N° 15: Criterios de aceptación para el parámetro de exactitud, relacionando el % de recuperación en función de la concentración del analito de la A.O.A.C.

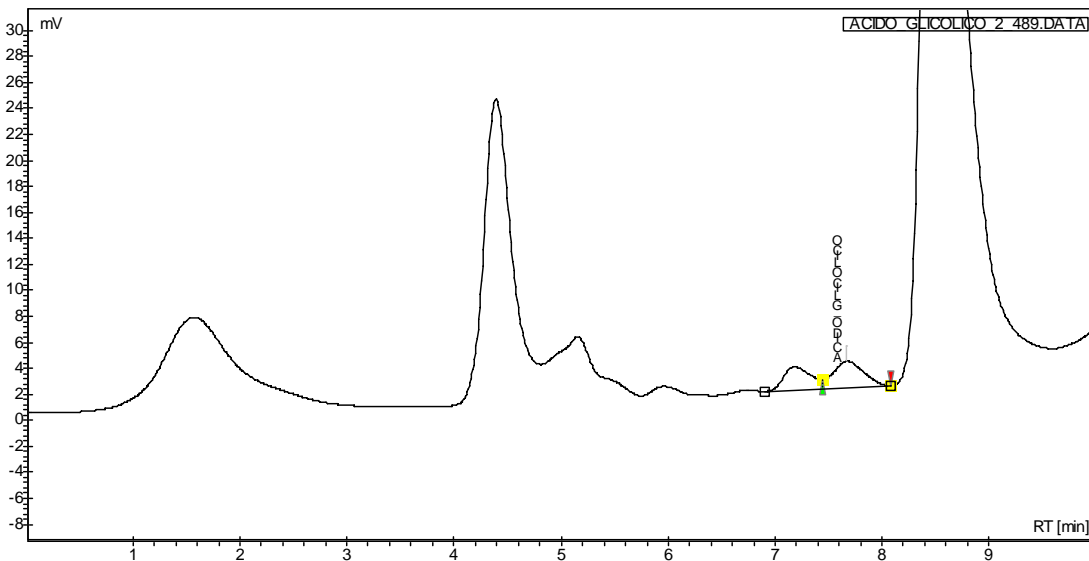
Analito %	Radio analito	Unidad	Porcentaje de recuperación
100	1	100%	98-102
≥ 10	10-1	10%	98-102
≥ 1	10-2	1%	97-103
≥ 0.1	10-3	0.1%	95-105
0.01	10-4	100ppm	90-107
0.001	10-5	10ppm	80-110
0.0001	10-6	1ppm	80-110
0.00001	10-7	100ppb	80-110
0.000001	10-8	10ppb	60-115
0.0000001	10-9	1ppb	40-120

12.3 ANEXO N°3: CROMATOGRAMAS

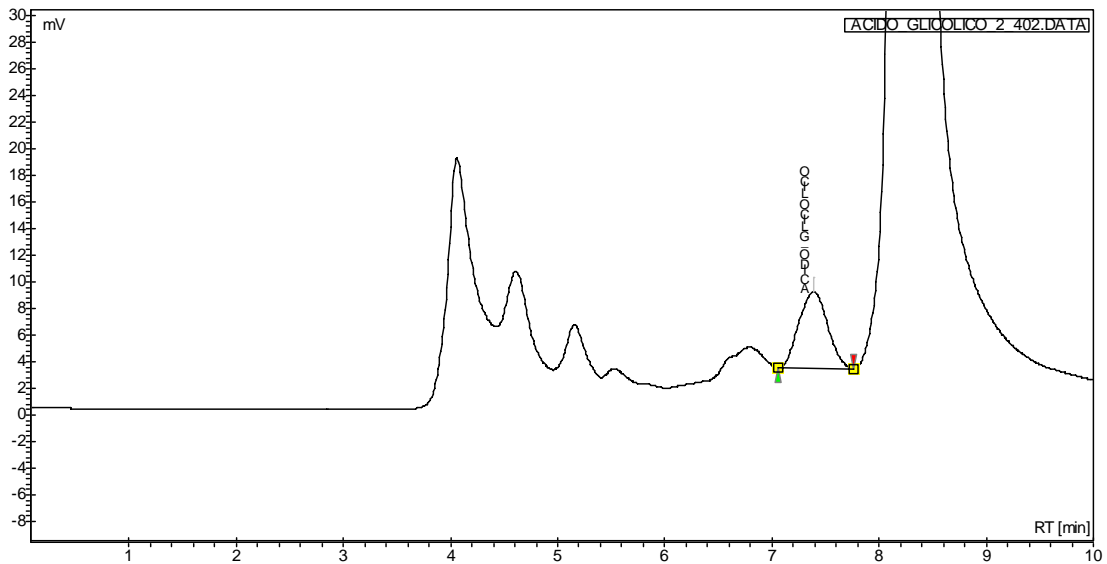
12.3.1 Figura N° 1: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de octubre y alimentación harina de maíz.



12.3.2 Figura N° 2: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de diciembre y alimentación harina de maíz.



12.3.3 Figura N° 3: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de marzo y alimentación harina de maíz.



12.3.4 Figura N° 4: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de octubre y alimentación harina de soya.

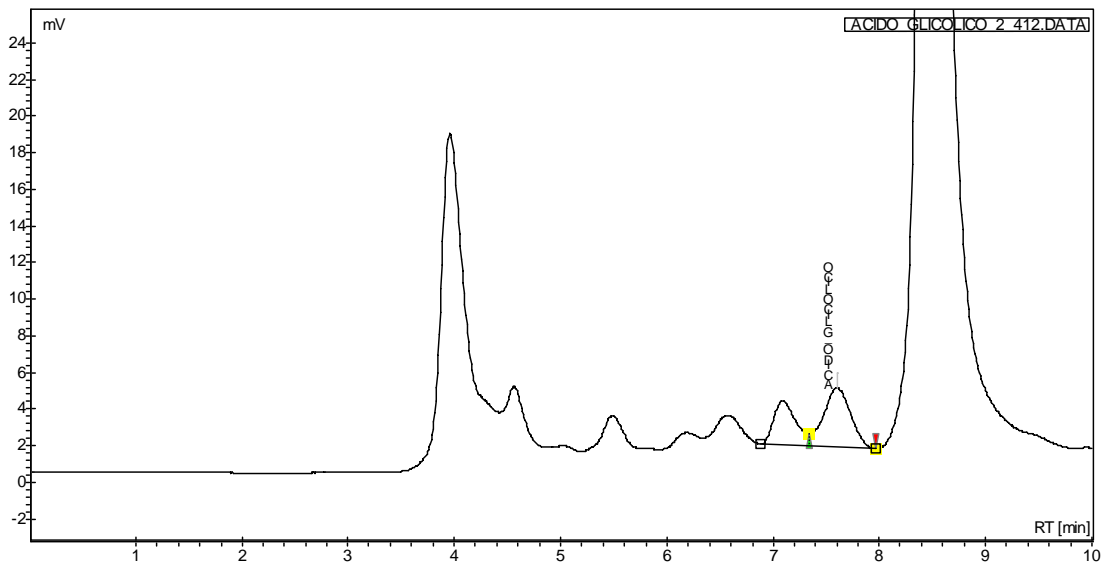


Figura N° 5: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de diciembre y alimentación harina de soya.

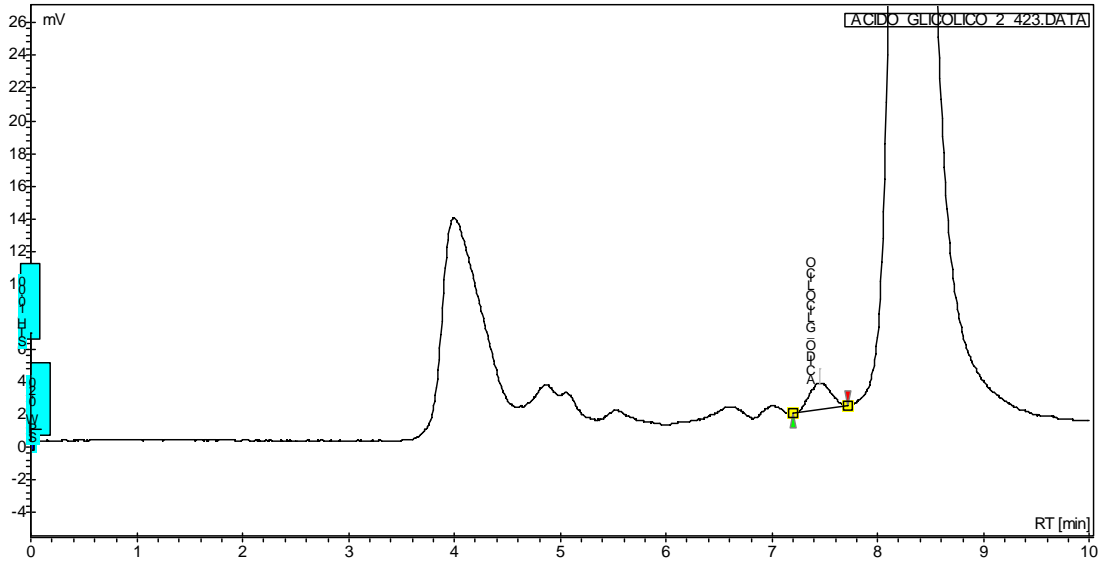


Figura N° 6: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de marzo y alimentación harina de soya.

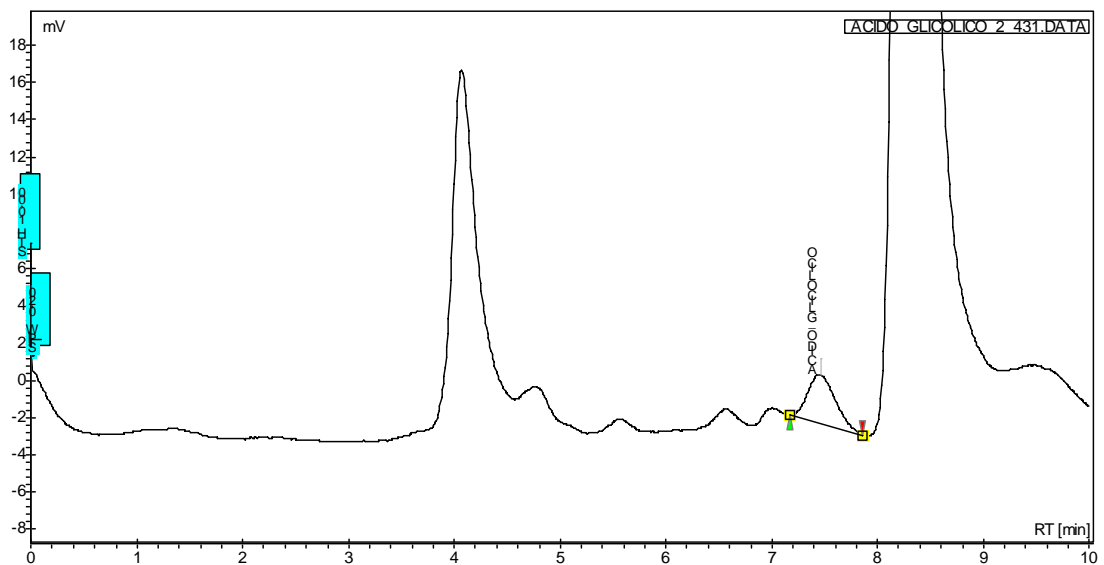


Figura N° 7: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de octubre y alimentación vegetal.

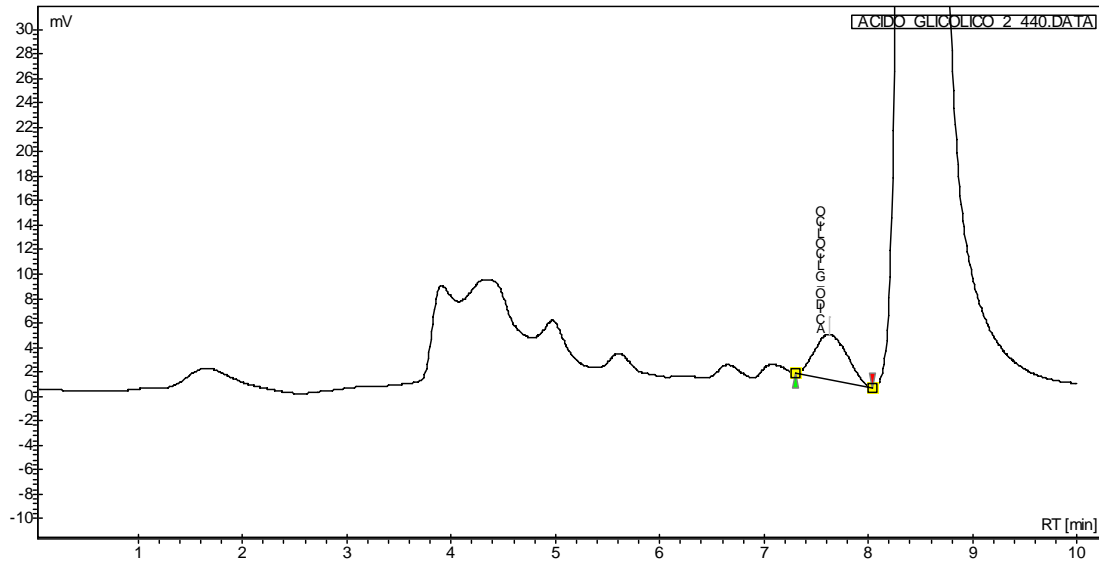


Figura N° 8: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de diciembre y alimentación vegetal.

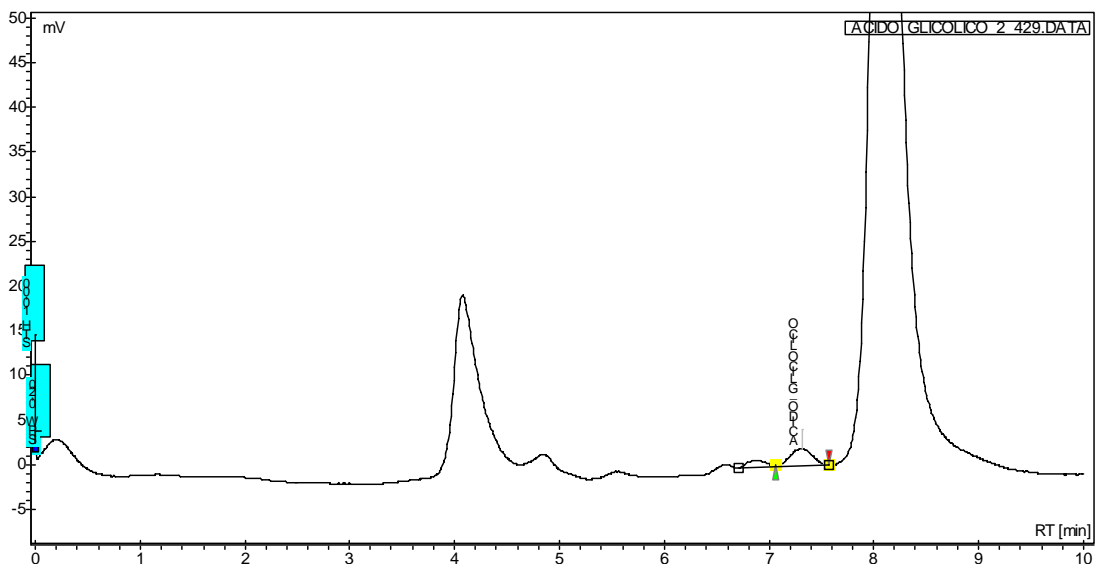
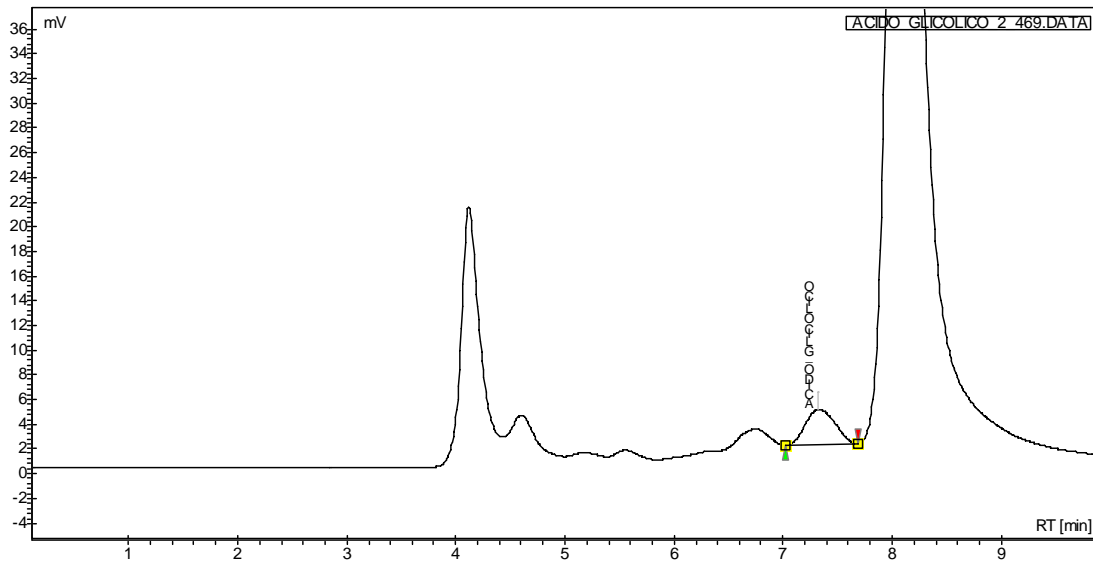


Figura N° 9: Cromatograma obtenido al inyectar una muestra de secreción de caracol correspondiente al mes de marzo y alimentación vegetal.



12.4 ANEXO N° 4: EJEMPLOS DE CÁLCULOS.

12.4.1 Cálculo para determinar los gramos de secreción liofilizada que se necesitan pesar para preparar 3 mL de suspensión.

Para las muestras correspondientes a secreción de caracoles alimentados con maíz y al período de obtención correspondiente al mes de octubre, se ingresó 127 mL de muestra al equipo liofilizador. Una vez finalizado el proceso, se obtuvo 3,7016g. (Ver Tabla N° 1)

$$\begin{array}{r} 127 \text{ mL} \text{ -----} 3,7016 \text{ g.} \\ 3 \text{ mL} \text{ -----} \quad \quad \quad X \quad \quad \quad X = 0,0874 \text{ g.} \end{array}$$

Por lo tanto, para preparar 3 mL de suspensión de secreción de caracol, se deben pesar 0,0874 g. En la tabla N° 2 se explica que solamente se pesó un cuarto de lo debido para obtener suspensiones diluidas. Por lo tanto, para este caso, se pesó un cuarto de 0,0874 g, es decir; 0,0219 g.

12.4.2 Cálculo para determinar los factores de dilución de cada muestra.

Para determinar el factor de dilución se debió considerar el factor 4 que indica haber pesado un cuarto de lo calculado (Tablas N° 1 y 2), por lo tanto, a los valores entregados por el equipo cromatográfico, se multiplicaron por 4.

12.4.3 Cálculo para determinar el % recuperación

La formula es:

Recuperación: $R = (\bar{x} / x) \times 100$, donde \bar{x} es el valor medio y x el valor verdadero.

Si el valor verdadero $x = 40 \mu\text{g}/\text{mL}$, correspondiente a un estándar de ácido glicólico, y el valor medio es el promedio de las concentraciones obtenidas al inyectar 4 estándares de $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ y que corresponde a $\bar{x} = 40,65 \mu\text{g}/\text{mL}$, se obtiene:

$$R = (\bar{x} / x) \times 100$$

$$R = (40,65 / 40,00) \times 100$$

R= 101,63%, que es el resultado obtenido al determinar el % de recuperación para un estándar de ácido glicólico de $40 \mu\text{g}/\text{mL}$. (Tabla N° 11)

12.4.4 Cálculo para determinar concentración esperada de ácido glicólico al realizar la mezcla de muestra y estándar de ácido glicólico.

Según la Tabla N° 14:

☉ Para $1037,6 \mu\text{g}/\text{mL}$

$$1037,6 \mu\text{g} \rightarrow 1000 \mu\text{L}$$

$$X \rightarrow 100 \mu\text{L} \qquad X = 103,76 \mu\text{g}$$

→ Por lo tanto, si se toman $100 \mu\text{L}$, ellos contienen $103,76 \mu\text{g}$

• Para 101,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$101,81 \mu\text{g} \rightarrow 1000 \mu\text{L}$$

$$X \rightarrow 900 \mu\text{L} \quad X = 91,63 \mu\text{g}$$

→ Por lo tanto, si se toman 900 μL , ellos contienen 91,63 μg

• Al mezclar los 100 μL de estándar con los 900 μL de muestra se obtiene una mezcla de 1000 μL que contienen la suma de μg de ácido glicólico anteriormente calculado.

Por lo tanto, $103,76 \mu\text{g} + 91,63 \mu\text{g} = 195,32 \mu\text{g}$ en 1000 μL de mezcla.