

ISSN Impreso: 1810-634X
ISSN on line. : 2309-8740

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL CONTINUA

Volumen 90 N° 1
ENERO - MARZO 2024



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
(Rev Soc Quím Perú)

ISSN impreso: 1810-634X

ISSN on line: 2309-8740

Revista Trimestral

Comité Editor

Editor en Jefe : Ana Cecilia Valderrama Negrón

Miembros : Julio Santiago Contreras

Lisveth Flores Del Pino

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

COMITÉ CONSULTIVO

Dr. Hugo Arturo Alarcón Cavero
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Jacinto Hernández, Christian Ronald
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Olivio Nino Castro Mandujano
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Montes de Oca Ávalos
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Mario Ceroni Galloso
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Julio Santiago Contreras
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Dávalos Prado
Instituto de Química-Física "Rocasolano"
España

Dra. Ana Valderrama Negrón
Universidad Nacional de Ingeniería

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

Sede: Av. Nicolás de Araníbar 696 Santa Beatriz – Lima 01

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 960 189 928

e-mail: sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú

Certificado N 95-1567

Vol 90

ENERO - MARZO 2024

N° 1

En el Perú: N° suelto S/ 15

Suscripción anual: S/ 60.00

En el extranjero suscripción anual: US \$ 50

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2022 – marzo 2024)

| | |
|--------------------------------|--|
| Presidente | : Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana |
| Tesorera | : Dra. Ana Lucy Siccha Macassi |
| Secretario | : Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga |
| Director Administrativo | : Mg. Helmer Helí Lezama Vigo |
| Vocales | : Q.F. Gabriela Soriano Chávez Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas Mg. Fernando Carlos Carrasco Solís Dra. Magali Camila Vivas Cuéllar Dra. Mercedes Puca Pacheco MSc. Christian Ronald Jacinto Hernández |

Comisión de Economía y Finanzas

Presidenta: Dra. Ana María Osorio Anaya

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidente: Mg. Fernando Carrasco Solís

**INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

CONTENIDO

(Vol. 90 – N° 1 – 2024)

- Actividad antioxidante de los esteres del ácido piperico sintetizados a partir del *piper nigrum* por, César Tarazona Ramirez, Candy Ruiz Martel, Billy Cabanillas. Pags. 1 - 9
- Application of a kit-free ecotoxicity assay based on the luminescence of *Vibrio fischeri* in the testing of sunscreens por, Pierina M. Ratto, Lisveth V. Flores del Pino, Ana A. Kitazono. Pags. 10 - 22
- Efecto de la semilla de la *Moringa oleífera* en polvo como coagulante natural para la remoción de la turbidez del agua del río Caplina, Perú por, Gabi Diaz Pilco, Fiorella Estrada Cardenas. Pags. 23 - 32
- Elagitaninos y flavonoides de *Cuphea carthagenesis* (Jacq.) J.F. Machr. aislados por cromatografía líquida semipreparativa por, Mirtes Midori Tanae, Ingrit Elida Collantes Díaz, Antonio José Lapa. Pags. 33 - 45
- Validation of an analytical methodology for the quantification of amino acids in the fish *Anisotremus scapularis* “Chita” por, Anthony Ruiz Soto, Leenin Flores Ramos, Alberto Isidoro Oscanoa Huaynate, Holger Jelimer Maldonado García. Pags. 46 - 64
- Informaciones

Revista Arbitrada

Derechos reservados: Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.

Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación, pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos al correo electrónico revsqperu@gmail.com a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles (autores nacionales) ó 30 dólares (autores extranjeros) por concepto de gastos administrativos (por revisión del artículo), como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:

Cuando todos los autores son socios: S/ 120.00

Cuando todos los autores no son socios: S/ 200.00

Si entre los autores hay socios y no socios: S/ 150.00

Si los autores residen en el extranjero US \$ 110.00

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, S/ 30.00 por cada autor en exceso.

Si el trabajo es enviado del extranjero, será US \$ 15.00 más por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará después de la segunda, un mínimo de S/ 30.00.

The publication of each work is subject to payment of the following ones:

When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/ 120.00

When all the authors are not partners: S/ 200.00

If among the authors there are partners and non partners: S/ 150.00

If the authors reside abroad US \$ 110.00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 15.00 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico revsqp@gmail.com

El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 1 1/2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar"). Los decimales deben llevar coma.

Los idiomas de publicación son español e inglés.

El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.

Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).

Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).

El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.

Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábiga seguido de punto. A continuación, se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.

Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.

Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y List of Journals Indexed in Index Medicus, (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ÉSTERES DEL ÁCIDO PIPÉRICO SINTETIZADOS A PARTIR DEL *PIPER NIGRUM*

Cesar Tarazona Ramirez^a, Candy Ruiz Martel^{*a}, Billy Cabanillas^b

RESUMEN

El presente estudio tiene por objeto el desarrollo de nuevos candidatos a antioxidantes preparados mediante hemisíntesis a partir de la piperina aislada de los frutos de *Piper nigrum*. El primer derivado sintetizado fue el ácido pipérico, con un rendimiento del 2,55%. A partir de este último se obtuvieron: el piperato de metilo, piperato de etilo y piperato de isopropilo con rendimientos del 76,75 %; 88,93 % y 95,3 %, respectivamente. Las moléculas aisladas y sintetizadas fueron caracterizadas mediante infrarrojo y espectrometría de masas. El análisis de la actividad antioxidante mediante DPPH arrojó valores de IC₅₀ de 8,77; 2,75; 8,35; 0,30 y 0,12 mg/ml para la piperina, ácido pipérico, piperato de metilo, piperato de etilo y piperato de isopropilo, respectivamente. Estos resultados indican una mejora significativa de la actividad antioxidante con respecto al producto de partida, la piperina.

Palabras clave: Piperina, hemisíntesis, actividad antioxidante.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ÉSTERES DEL ÁCIDO PIPÉRICO SINTETIZADOS A PARTIR DEL *PIPER NIGRUM*

ABSTRACT

The present study aims to develop new antioxidant candidates prepared by hemisynthesis from piperine isolated from *Piper nigrum* fruits. The first derivative synthesized was piperic acid, with a yield of 2,55%, and from the latter were obtained: methyl piperate, ethyl piperate and isopropyl piperate with yields of 76,75 %, 88,93 % and 95,3 %, respectively. The isolated and synthesized molecules were characterized by infrared and mass spectrometry. Analysis of antioxidant activity by DPPH yielded IC₅₀ values of 8,77; 2,75; 8,35; 0,30 and 0,12 mg/ml for piperine, piperic acid, methyl piperate, ethyl piperate and isopropyl piperate, respectively. These results indicate a significant improvement in antioxidant activity over the starting product, piperine.

Key words: Piperine, hemisynthesis, antioxidant activity.

^a Escuela de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepén 290, Lima 10, Perú, cruz@unfv.edu.pe.

^b Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú

INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es consecuencia del desequilibrio entre el sistema de defensa de antioxidantes y la producción de radicales libres¹, cuando hay un exceso de radicales libres, las biomoléculas como las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos se ven afectadas provocando efectos adversos como envejecimiento celular, enfermedades degenerativas, trastornos metabólicos como la diabetes y el cáncer^{1,2}. Una de las causas principales de este desequilibrio es la deficiencia de antioxidantes nutricionales¹. Los antioxidantes son sustancias que reaccionan con los radicales libres neutralizando su efecto dañino en el cuerpo², es por esta razón la exploración y búsqueda de nuevos compuestos orgánicos capaces de prevenir el daño oxidativo, que pueden tener un origen natural o ser producto de una hemisíntesis. En muchos casos la combinación de extracción natural con reacciones sintéticas proporciona procesos sostenibles y eficientes en la producción de compuestos activos³. La piperina es un compuesto natural bioactivo presente en el *Piper nigrum* y sus derivados son moléculas con gran potencial farmacológico, en especial como antioxidantes⁴. Estudios acerca de la piperina han reportado su uso para prevenir el envejecimiento de la piel, la estereosclerosis, diabetes, tumores, obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, alopecia, celulitis, osteoporosis, enfermedades cerebrales, pérdida de la memoria, estrés, síndromes menopáusicos e hipertrofia benigna^{4,5}, todas estas enfermedades están relacionadas con el estrés oxidativo. También, se ha reportado actividad antioxidante de la piperina contra DPPH donde su IC₅₀ fue igual 2,133 mg/ml⁶. En otra investigación no determinaron el IC₅₀ de la piperina, sin embargo, reportaron que a una concentración de 0,05 mg/ml de piperina y de ácido pipérico el porcentaje de actividad antioxidante contra DPPH fue de 10,28 % y 29,5% respectivamente⁷. De igual manera, las amidas sintéticas del ácido pipérico mostraron una alta actividad contra DPPH con un EC₅₀ de 20 µM a 140 µM y actividad inhibidora de α-glucosidasa que alcanzó un IC₅₀ entre 12 µM a 21 µM⁸. En otras investigaciones, se diseñaron dos análogos de piperina que, al ser probados junto con vincristina, colchicina y paclitaxel revertían la resistencia de las células cancerosas (KB y SW480)⁹. También se evaluaron la actividad anticancerígena del derivado obtenido de la síntesis del ácido pipérico con diversas anilinas donde encontraron que uno de estos derivados tenía gran potencial anticancerígena contra línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer de hígado (HEPG2)¹⁰. Once ésteres del ácido pipérico formaron parte de un estudio de predicción de citotoxicidad y toxicidad selectiva de células tumorales¹¹. Además, se ha desarrollado un protector solar a base de la piperina y sus derivados, donde reportaron que el piperato de isopropilo tiene gran potencial para ser agente de protección UV¹². Basados en los prometedores efectos terapéuticos y farmacológicos de la piperina como de sus derivados, en este estudio estamos interesados en sintetizar ésteres del ácido pipérico, comprobar su actividad antioxidante contra DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazilo) y hacer una comparación con el compuesto original piperina.

PARTE EXPERIMENTAL

Todos los reactivos para la síntesis química se adquirieron en Sigma-Aldrich. En los análisis por TLC se utilizaron placas de gel de sílice de 60 mm F254 (MERCK). Todos los solventes químicos empleados fueron grado HPLC y MS. El Espectrómetro de masas fue un equipo de Thermo Scientific™ Q Exactive Plus™. La detección de masa fue

llevada a cabo utilizando una fuente de electrospray ESI en modo de ionización negativa a 70000 de poder de resolución utilizando el modo scan Full MS. Para la ionización MS2 se utilizó el modo dd-MS2/dd-SIM FT con resolución 17500. El rango de masa fue de 130 - 1600 m/z, la temperatura del capilar fue 290°C con voltaje de ionización spray 2,5 KV (modo negativo), el gas carrier fue N₂ y la energía de colisión utilizada fue 20,40,60. El tipo de data de espectro fue profile. El rango de masa fue de 140-2000 Da y la temperatura del capilar fue 300 °C con voltaje de ionización spray a 4.0 kV (modo positivo) y 4,2 kV (modo negativo) y los espectros IR se realizaron en un espectrómetro Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10.

Aislamiento de la piperina

Se siguió el procedimiento según Choochana et al.¹² En resumen, se pesó 100 g del fruto seco de *Piper nigrum* y se extrajo mediante reflujo con etanol 95 % (400 ml). La mezcla se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida con un evaporador obteniéndose un extracto crudo de color pardo oscuro. Para eliminar las impurezas (oleorresina), el extracto crudo se mezcló con 30 ml de hidróxido de potasio 16% en etanol y se filtró. La piperina se precipitó adicionando agua helada. El sólido obtenido se recrystalizó con isopropanol, obteniéndose 2,55g de cristales de color amarillo.

Síntesis del ácido pipérico

Se utilizó el método descrito por Ali et al.¹³ Brevemente, se disolvió 36 g de hidróxido de potasio en 180 ml de etanol, y se agregó 3 g de piperina. La mezcla se calentó a reflujo durante 8 h y luego se eliminó el solvente en un rotavapor. El sólido obtenido se mezcló con 300 ml agua y se filtró para eliminar la piperidina. El ácido pipérico se precipitó acidificando con HCl al 10 %, hasta pH 3. La solución se filtró y el sólido obtenido se recrystalizó en etanol obteniéndose 1,40 g de cristales amarillo.

Síntesis del piperato de metilo

Este compuesto se preparó según la metodología descrita por Choochana et al.¹² En un balón se colocó 0,31 g de ácido pipérico, se añadió 7 ml de metanol y ácido sulfúrico 0,5 ml. La mezcla se conectó a un aparato Dean-Stark y se calentó a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el solvente y el residuo se disolvió en 10 ml de acetato de etilo. La solución se llevó a una pera de decantación y se adicionó 10 ml de agua destilada. Se lavó con bicarbonato de sodio al 5 %. La fase orgánica se separó, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. El solvente se eliminó en un rotavapor y el sólido obtenido se recrystalizó en acetona. Como resultado se obtuvo 0,25g de cristales amarillo pálido.

Síntesis del piperato de etilo

Se empleó el método desarrollado por Choochana et al.¹² En un balón se mezclaron 0,31g de ácido pipérico, 7 ml de etanol y 0,5 ml de ácido sulfúrico. La mezcla se llevó a reflujo en un aparato Dean-Stark. El solvente se eliminó y el residuo se disolvió con 10 ml acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio al 5 %. La fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y eliminó el solvente a presión reducida. El sólido se recrystalizó en acetona dando como resultado 0,39 g de cristales amarillo pálido.

Síntesis del piperato de isopropilo

Según lo descrito por Choochana et al.¹² En un matraz de fondo redondo de 50 ml se mezclaron 0,30 g de ácido pipérico, 7 ml de isopropanol y 0,5 ml de ácido sulfúrico. El matraz se conectó con el aparato Dean-Stark y se calentó a reflujo durante 3 horas a una temperatura de 70 °C. La mezcla de la reacción se concentró usando evaporador rotatorio. El residuo se le adicióno acetato de etilo y se llevó a una pera de decantación, se adicióno 10 ml de agua destilada. Se lavó con bicarbonato de sodio al 5 % y se recolectó la fase orgánica. Se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el solvente. Como resultado se obtuvo un 0,29 g de líquido amarillo pálido.

Análisis de la actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se determinó utilizando el método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) utilizado por Zarai et al.⁷, con algunas modificaciones. En resumen, se preparó una solución de DPPH 0,2 mM en etanol al 80 %. Las muestras fueron disueltas en un solvente adecuado hasta la completa disolución. Para la lectura se mezcló 100 µL de DPPH (0,2 mM) con 1000 µL de muestra, se dejó reposar por 30 minutos y se midió la absorbancia a 517 nm. Para la obtención del IC₅₀ se realizó cinco puntos a diferentes concentraciones para cada muestra. El ácido ascórbico se utilizó como control positivo. La actividad de inhibición fue calculada de la siguiente forma:

$$I\% = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

Donde I% es el porcentaje de inhibición, A₀ es la absorbancia del blanco, A₁ es la absorbancia de la muestra. Los ensayos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los frutos de *Piper nigrum* se logró aislar la piperina con un rendimiento 2,55 %, este resultado es menor al reportado por Ramesh et al. (2018)¹⁰ que fue de 3 %, la diferencia en el porcentaje puede deberse a la procedencia de la muestra, que influye significativamente en el contenido de los compuestos. Para el caso del ácido pipérico se obtuvo un rendimiento de 61,13% cercano al reportado por Li et al. (2025)¹⁴ de 72 %. Con respecto a los ésteres de piperato de metilo, piperato de etilo, piperato de isopropilo se obtuvieron rendimientos de 76,75 %, 88,93% y 95,3 % respectivamente, los valores son similares a lo reportado por Choochana et al. (2015)¹² de 84,94 %, 92,79% y 84,60 %, en ambos casos los rendimientos de la síntesis son altos.

En la tabla 1 se observa los porcentajes de rendimiento de la piperina, del ácido pipérico y de los 3 ésteres sintetizados.

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de la piperina y sus derivados

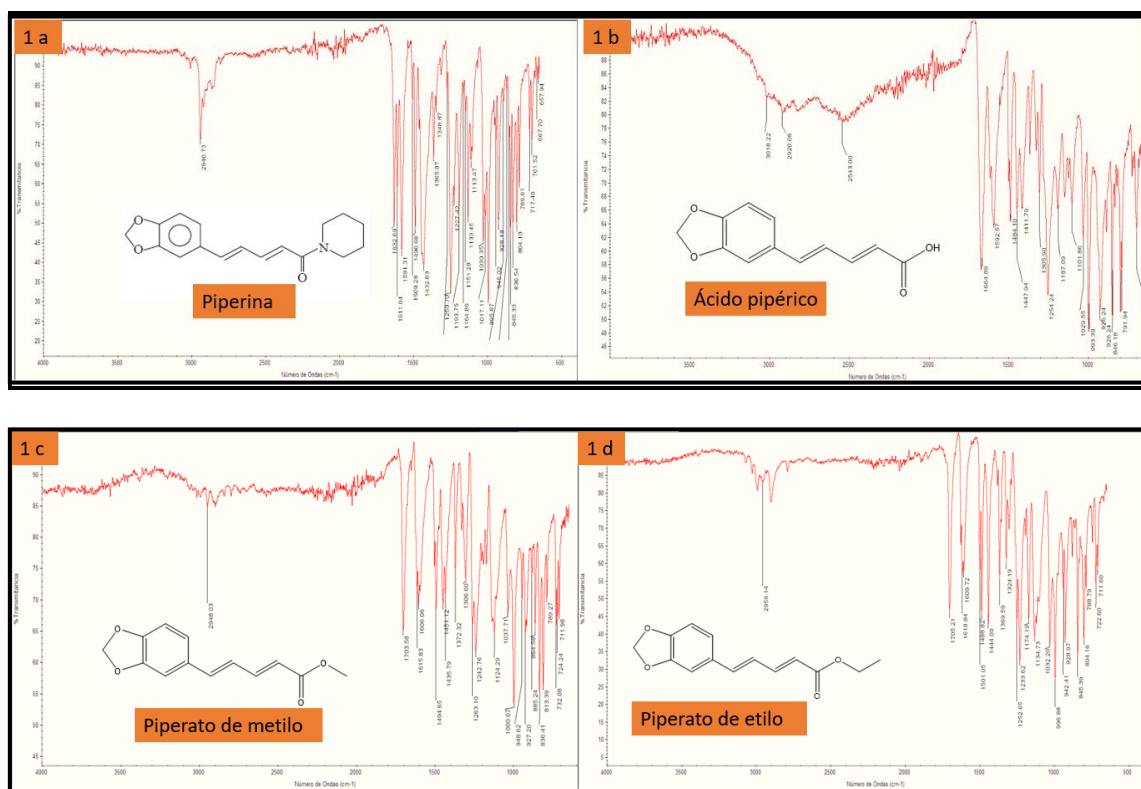
| MOLECULA | PESO (g) | PORCENTAJE DE RENDIMIENTO |
|-------------------------------|----------|---------------------------|
| <i>Piperina</i> | 2,55 g | 2,55 % |
| <i>Ácido pipérico</i> | 1,40 g | 61,13 % |
| <i>Piperato de metilo</i> | 0,25 g | 76,75 % |
| <i>Piperato de etilo</i> | 0,39 g | 88,93 % |
| <i>Piperato de isopropilo</i> | 0,29 g | 95,3 % |

Los compuestos obtenidos se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja y espectrometría de masas de alta resolución. Las bandas del espectro infrarrojo de piperina coinciden con lo reportado por Reyes et al. (2017): 2940.73 (C-H, tensión), 1611.04-1581.31-1490.68 (-C=C-Ar, tensión), 1632.69 (-CO-N, tensión). Grupo metilendióxido: 1432.63 (-CH₂ flexión), 1250.70-1193.75(=C-O-C *as*, tensión), 1030.35 (=C-O-C *sim*, tensión), 925.87 (C-O, tensión), 1133.45 (C-H, flexión), 995.87 (-CH=CH- trans, flexión), 846.33-830.54-804.1 (C-H 1-2-4-trisust, flexión) (Figura 1a). El espectro infrarrojo de ácido pipérico (Figura 1b) 3300-2800 (-COOH), 1664.89 (C=O, tensión), 1592.57-1484.10 (-C=C-Ar, tensión). Grupo metilendióxido: 1447.94 (-CH₂ flexión), 1254.24-1187.09 (=C-O-C *as*, tensión), 1101.86 (=C-O-C *sim*, tensión), 993.39 (C-O, tensión), 926.24-846.18-791.94 (C-H 1-2-4-trisust, flexión) similar a lo reportado por Bahri et al. (2019)¹⁵. El espectro infrarrojo piperato de metilo (Figura 1c) 2948.03 (-CH, tensión), 1703.58 (C=O, tensión), 1606.06-1494.65 (-C=C-Ar). Grupo metilendióxido: 1451.12 (-CH₂, flexión), 1242.76-1124.29 (=C-O-C *as*, tensión), 1037.71 (=C-O-C *sim*, tensión), 1000.07 (C-O, tensión), 836.41-813.39-789.27 (C-H 1-2-4-trisust, flexión) similar a lo reportado por Choochana et al. (2015). El espectro infrarrojo del piperato de etilo (Figura 1d): 2959.14 (-CH, tensión), 1705.21 (C=O, tensión), 1609.72-1488.82 (-C=C-Ar, tensión). Grupo metilendióxido: 1444.09 (-CH₂ flexión), 1252.65-1174.19 (=C-O-C *as*, tensión), 1032.20 (=C-O-C *sim*, tensión), 996.88 (C-O, tensión), 928.97,845.39,804.16(C-H 1-2-4 trisust, flexión) similar a lo reportado por Choochana et al.(2015) y finalmente el espectro infrarrojo piperato de isopropilo (Figura 1e) 2978.57 (-CH, tensión), 1700.09 (-C=O), 1608.69-1488.35(-C=C-Ar, tensión). Grupo metilendióxido: 1445.51 (-CH₂, flexión), 1250.41-1173.72 (=C-O-C *as*,tensión), 1137.71 (=C-O-C *sim*, tensión), 1104.27 (C-O, tensión), 1036.51-995.07-929.07 (C-H, 2-4 trisust, flexión) similar a Choochana et al.(2015).

Los espectros de masas de los compuestos se registraron en modo ESI positivo de alta resolución. El espectro de masas full MS para la piperina mostró un ion molecular de un valor m/z 286,1436; el ácido pipérico a un valor de m/z 219,0653, el éster de metilo a un valor de m/z 233,0808, el piperato de etilo a un valor de m/z 247.0964 y el piperato de isopropilo a un valor de m/z igual 261,1122. Las fórmulas de los compuestos se calcularon con un error inferior a 5 ppm encontrándose coincidencia con las fórmulas de cada compuesto. Estos datos coinciden con lo reportado por Choochana et al. (2015). El espectro MS/MS de la piperina coincide con lo reportado por Reyes et al. (2017).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la tabla 2 se muestran los valores de actividad antioxidante contra DPPH de la piperina y sus derivados. Estudios anteriores reportan que el porcentaje de actividad captadora de radicales de DPPH de la piperina y el ácido pipérico a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ fue del 10,28 % y 29,5 %, respectivamente (Zarai et al., 2013), mientras que en este trabajo de investigación se pudo determinar el IC_{50} de la piperina y ácido pipérico que fue de 8,85 mg/ml y 2,65 mg/ml respectivamente, secundando lo expuesto por Zarai donde expresa que el ácido pipérico tiene mayor actividad antioxidante que la piperina. El IC_{50} del piperato de metilo es 8,35 mg/ml, mientras que el IC_{50} del piperato de etilo y el piperato de isopropilo presentan un alto porcentaje de inhibición igual a 0,286 mg/ml y 0,115 mg/ml respectivamente. Con este estudio se demuestra que, al hacer modificaciones en la estructura, podemos mejorar su actividad, como es el caso del éster de piperato de etilo y del piperato de isopropilo que aumentan 31 y 77 veces respectivamente, su actividad respecto a la piperina. Para el caso del piperato de isopropilo esto puede deberse a que la molécula tiene mayor deslocalización electrónica (Choochana et al., 2015). Finalmente, este estudio da un aporte acerca de la actividad antioxidante de la piperina como de sus derivados contribuyendo al aumento del conocimiento científico y a la vez propone seguir estudiando dichos compuestos por ser consideradas moléculas muy interesantes para ser probada en otras actividades.



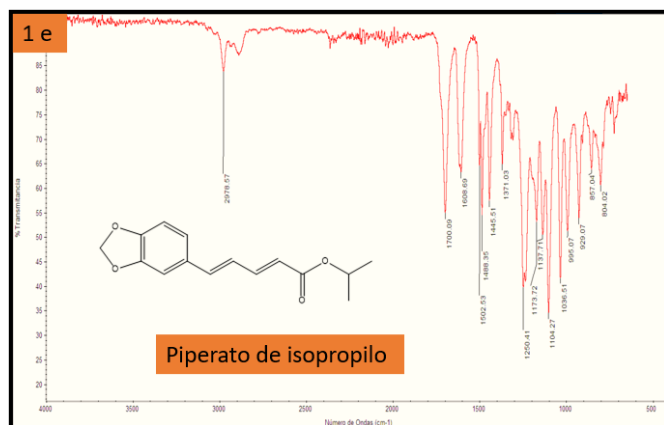
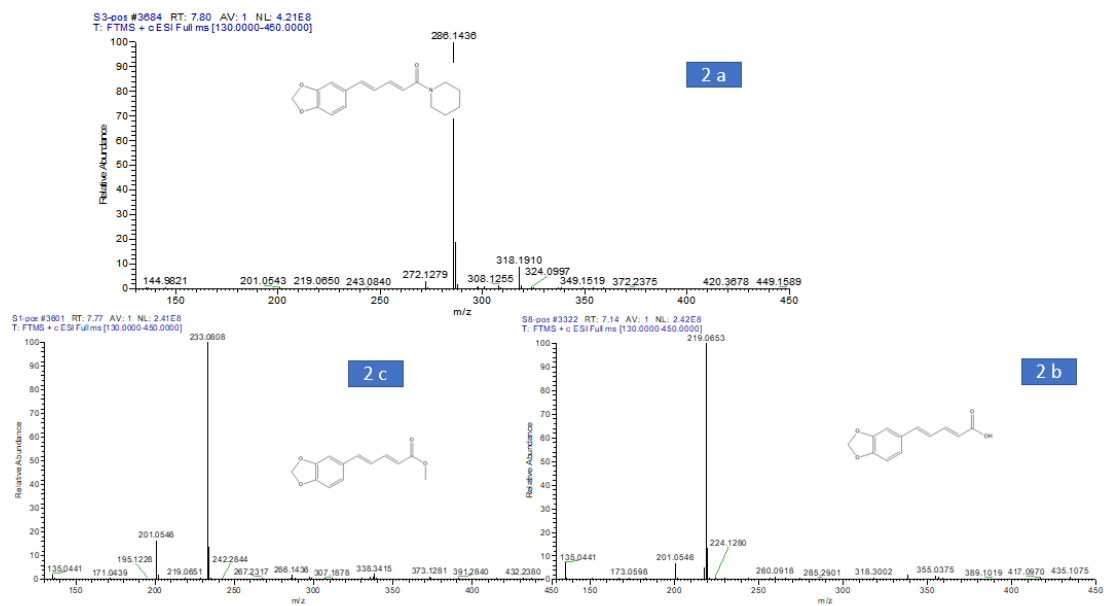


Figura 1. Espectros IR de 1a (piperina), 1b (ácido pipérico) 1c (piperato de metilo) 1d (piperato de etilo) y 1e (piperato de isopropilo).

Tabla 2. Actividad antioxidante frente al DPPH de la piperina y sus derivados

| <i>MOLECULA</i> | <i>IC₅₀ (mg/ml)</i> |
|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Piperina</i> | 8,77 ± 0,57 |
| <i>Ácido pipérico</i> | 2,75 ± 0,27 |
| <i>Piperato de metilo</i> | 8,35 ± 0,02 |
| <i>Piperato de etilo</i> | 0,30 ± 0,02 |
| <i>Piperato de isopropilo</i> | 0,12 ± 0,01 |
| <i>Ácido ascórbico</i> | 0,002 ± 0,00 |



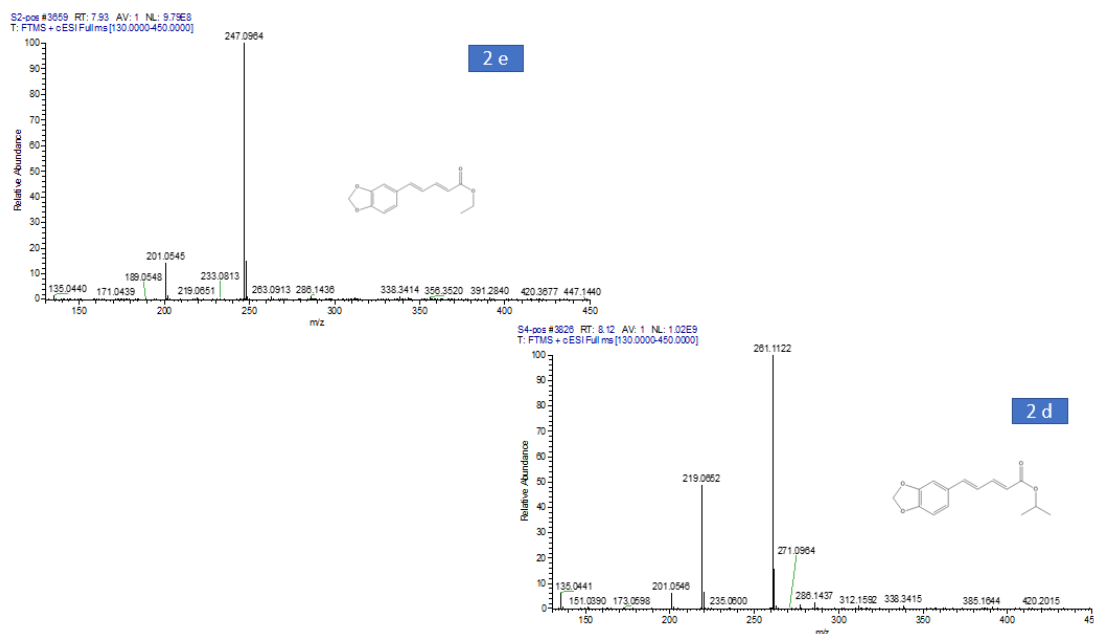


Figura 2 Espectros de masas Full MS (HRESI) en modo positivo de 2a (piperina), 2b (ácido pipérico), 2c (piperato de metilo), 2d (piperato de etilo) y 2e (piperato de isopropilo).

CONCLUSIONES

En este estudio se aisló la piperina a partir del *Piper nigrum* con un rendimiento de 2,5%. Además, se sintetizó el ácido pipérico a partir de la piperina con rendimiento de 61.13 %. Mediante la reacción de Fisher se obtuvieron tres ésteres de piperato con rendimientos altos: piperato de metilo (76,75 %), piperato de etilo (88,93%) y piperato de isopropilo 95.3 %. Tanto la piperina, el ácido pipérico y sus ésteres respectivos fueron caracterizados por IR y MS, comprobando los grupos funcionales de las moléculas sintetizadas y obteniendo su M/z para la piperina (M/Z 285,1438), ácido pipérico (M/Z 218,0652), piperato de metilo (M/Z 232,0808), piperato de etilo (M/Z 246,0964) y piperato de Isopropilo (M/Z 260,1122).

El éster de mayor actividad antioxidante fue el piperato de isopropilo con un IC₅₀ igual a 0,115 mg/ml, seguido de piperato de etilo con un IC₅₀ a 0,286 mg/ml y el piperato de metilo dio un IC₅₀ igual a 8.354 mg/ml. El ácido pipérico y la piperina dieron un IC₅₀ de 2.753 mg/ml y 8.767 mg/ml respectivamente.

AGRADECIMIENTO

Agradecer al Concurso de Proyectos de Investigación Formativa - 2022 de la Universidad Nacional Federico Villarreal por el financiamiento de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bouzammit R, Lakkab I, El fadili M, Kanzouai Y, Chalkha M, et al., Synthesis, crystal structure, antioxidant activity and molecular docking studies of 2-(1-(3-methyl-1-oxo-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl) ethyl) malononitrile. *J. Mol. Struc.* 2024; 1312:138582. doi:10.1016/j.molstruc.2024.138582.
2. Hu Y, Zheng Z, Zhai D, Liang P, Wang Z, Jiang C, et al., A mini-review: Exploring the application prospects of the three major rules in the field of antioxidants. *J.Mol. Struc.* 2024; 1304:137746. doi:10.1016/j.molstruc.2024.137746.
3. Groussin A, Antoniotti S. Valuable chemicals by the enzymatic modification of molecules of natural origin: Terpenoids, steroids, phenolics and related compounds. *J. Biortech.* 2012;115:237-243. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.050.
4. Iahtisham U, Muhammad I, Muhammad N, Tabussam T, Tanweer A, Mohammad S. Piperine: A review of its biological effect. *Phytother. Res.* 2020;1-21. doi:10.1002/ptr.6855
5. Chopra B, Dhingra AK, Kapoor RP, Prasad DN. Piperine and Its Various Physicochemical and Biological Aspects: A Review. *J Open Chem Journal.* 2016; 3:75-96. doi:10.2174/1874842201603010075
6. Reyes LM, Sánchez RA, Restrepo J. Encapsulation of the Piperine Present in *Piper tuberculatum* Species Using Multilamellar Vesicles and Determination of its Antioxidant Power. *Rev. Cienc.* 2017;21:11-28.
7. Zarai Z, Boujelbene E, Salem N, Gargouri Y, Sayari A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. *LWT - FS&T.* 2013;50:634-641. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.036
8. Takao K, Miyashiro T, Sugita Y. Synthesis and biological evaluation of piperic acid amides as free radical scavengers and α glucosidase inhibitors. *Chem. Pharm Bull.* 2015; 63:326-333. doi:10.1248/cpb.c14-00874
9. Syed SB, Arya H, Fu I H, Yeh TK, Periyasamy L, Hsieh HP, et al. Targeting P-glycoprotein: Investigation of piperine analogs for overcoming drug resistance in cancer. *Sci. Rep.* 2017; 1:1-18. doi:10.1038/s41598-017-08062-2
10. Ramesh A, Sundarraj P, Balamani DrJ. Synthesis and Biological Evaluation Of 5-(3,4- Methyleneedioxyphenyl)-2,4-Pentadienoic Acid Derivatives As Potent Antimicrobial And Cytotoxicity Agents. *IOSR-JbAC.* 2018;11:51-57. doi.10.9790/5736-1105015157
11. Nagai J, Imamura M, Sakagami H, Uesawa Y. QSAR Prediction Model to Search for Compounds with Selective Cytotoxicity Against Oral Cell Cancer. *Med.* 2019; 6:45. doi:10.3390/medicines6020045
12. Choochana P, Mounjaroen J, Jongkon N, Gritsanapan W, Tangyuenyongwatana P. Development of piperic acid derivatives from *Piper nigrum* as UV protection agents. *Pharm. Biol.* 2015; 53: 477-482.
13. Li, Y, Alam MS, Hamid H, Husain A, Bano S, Dhulap A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of piperic acid triazolyl derivatives as potent anti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2015; 92, 12-13. doi:10.1016/j.ejmech.2015.01.00
14. Li H, Wu X, Li X, Cao X, Li Y, Cao H, Men Y. Multistage Extraction of Star Anise and Black Pepper Derivatives for Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Activity. *Front. Chem.* 2021; 9:660138. doi: 10.3389/fchem.2021.660138
15. Bahri S, Ambarwati Y, Iqbal M, Baihaqy AA. Synthesis 4-Piperoilmorpholine from Piperine. *J. Phys Conf Ser.* 2019;1338,2-3. doi:10.1088/1742-6596/1338/1/012010

APPLICATION OF A KIT-FREE ECOTOXICITY ASSAY BASED ON THE LUMINESCENCE OF *VIBRIO FISCHERI* IN THE TESTING OF SUNSCREENS

Pierinna M. Ratto,^{a,b} Lisveth V. Flores del Pinob,^c Ana A. Kitazonoa^d

ABSTRACT

One of the most used ecotoxicity bioassays is based on the luminescence of *Vibrio fischeri*, for which commercial kits such as Microtox® and several others are available. However, this assay might not always be suitable for several reasons: Its protocol cannot be easily adapted for particular purposes, and it requires the continuous purchases of the kit and the availability of specialized equipment or at least, a luminometer. As a versatile alternative, this paper describes an optimized and kit-free protocol, referred to as “Macrotox”, which allows a wide range of treatment periods (for example, 1, 3, 7, 12, 24, 30 and 36 h) to follow the effects on the luminescence and proliferation of *V. fischeri*. While the optimized protocol involves 1-mL treatments, it could be easily adapted to use other volumes and times. Importantly, to evaluate the effects on luminescence, only a digital camera is needed to take photographs in the dark, which are then analyzed using the open access software ImageJ. To evaluate the effects on proliferation, cell densities are estimated via spectrophotometric measurements. In this work, both the Microtox® and Macrotox protocols were applied for the determination of the ecotoxicities of a commercial sunscreen and a moisturizer as a control. However, the described Macrotox protocol can be similarly applied for the ecotoxicity assay of any sample.

Key words: Microtox®; ecotoxicity of sunscreens; *Photobacterium phosphoreum*; *Allivibrio fischeri*.

^a Laboratory of Biological Chemistry and Bioanalysis, Academic Department of Chemistry, School of Sciences, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

^b Master Program in Environmental Sciences, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

^c Center for Research in Chemistry, Toxicology and Environmental Biotechnology, Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú.

^d Corresponding author. Academic Department of Chemistry, School of Sciences, Universidad Nacional Agraria La Molina - Av. La Molina s/n - La Molina - Lima – Perú - anakitazono@lamolina.edu.pe

APLICACIÓN DE UN ENSAYO ECOTOXICÓGICO QUE NO REQUIERE EL USO DE UN KIT Y SE BASA EN LA LUMINISCENCIA DE *VIBRIO FISCHERI* PARA EL ANÁLISIS DE BLOQUEADORES SOLARES

RESUMEN

Uno de los más usados bioensayos de ecotoxicidad se basa en la luminiscencia de *Vibrio fischeri*, para el que existen kits comerciales como el de Microtox® y varios otros. Sin embargo, este ensayo no puede ser siempre aplicado por varias razones. Por un lado, su protocolo no puede ser fácilmente adaptado o modificado, y además, requiere la adquisición continua del kit y la disponibilidad de equipamiento especializado o por lo menos, de un luminómetro. Como una alternativa versátil, este artículo describe un protocolo optimizado que no requiere el uso de un kit, denotado como “Macrotox”, que permite un rango amplio de periodos de tratamiento (por ejemplo, 1, 3, 7, 12, 24, 30 y 36 h), siguiendo los efectos en la luminiscencia y proliferación de *V. fischeri*. Aunque el protocolo optimizado envuelve tratamientos de 1 mL, puede ser fácilmente adaptado para usar otros volúmenes y tiempos. Es importante destacar que, para evaluar los efectos en la luminiscencia, solo una cámara digital es necesaria para tomar las fotografías en la oscuridad, las que son luego analizadas mediante el software de acceso abierto Image J. Para la evaluación de los efectos sobre la proliferación, las densidades celulares son estimadas mediante mediciones espectrofotométricas. En este artículo, ambos métodos Microtox® y Macrotox fueron aplicados para la determinación de los niveles de ecotoxicidad de un bloqueador comercial y una loción humectante como control. Sin embargo, el protocolo Macrotox descrito puede ser similarmente aplicado para el ensayo ecotoxicológico de cualquier otra muestra.

Palabras clave: Microtox®; ecotoxicidad de fotoprotectores, *Photobacterium phosphoreum*; *Allivibrio fischeri*.

INTRODUCTION

The quality of water and other environmental matrices is usually investigated via independent assays that determine several physicochemical and biological parameters¹. However, this determination is not fully accurate because the resulting data only represent the quality of the sample at a defined moment in time. On the other hand, it is possible to rely on the Water Quality Indexes (WQI), which are based on mathematical calculations that involve the values of the parameters established in the Environmental Quality Standards. However, it is important to consider that obtaining results that are within the WQI cannot always be taken as a guarantee for the integrity of an ecosystem. Ecotoxicity assays arise from the need to evaluate and prevent the ecological damage that could be caused by the presence of chemical or other agents in a natural environment². These tests, commonly called bioassays, use biological units to evaluate the toxic effect of a contaminated environmental matrix on individual characteristics such as survival, development, reproduction, etc.³. There is a wide range of methodologies using various

organisms to assess toxicity of aquatic ecosystems^{4,5}. Among the best known assays are those that evaluate the effects on the mortality and reproduction of the planktonic crustacean *Daphnia magna*¹, and the germination and radicle growth of the seeds of the lettuce *Lactuca sativa*⁶.

However, because of its simplicity, one of the most frequently used assays is based on the luminescence of the marine bacterium *Vibrio fischeri*⁷. This bacterium emits a blue-green light through a reaction catalyzed by the luciferase enzyme between the reduced flavin mononucleotide (FMNH₂), an aldehyde compound and oxygen, to produce oxidized flavin mononucleotide (FMN), water, and a carboxylic acid⁸. This reaction is linked to cellular respiration through the electron chain and, therefore, any compound that affects these processes will cause a decrease in luminescence levels⁹.

The ecotoxicity assay based on the luminescence of *V. fischeri* was developed by the Beckman Instrument Co. in 1979 as a faster and simpler procedure than the traditional fish and invertebrate tests¹⁰. Over time, the methodology was validated and approved by several international organizations, and the first standardized protocol was implemented in 1984 by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)¹⁰. Subsequently, different organizations adopted and updated the same methodology, implementing for example, the ISO 11348-3:2007, "Determination of the inhibitory effect of water samples on the luminescence of *Vibrio fischeri* (luminescent bacterial assay)". Since that time, several companies started commercializing kits applying this methodology (Microtox, LumiStox, ToxAlert, Biotox, BioLight, BioFix, and others), which include the required amounts of a lyophilized culture and solutions, and a detailed protocol^{11,13}.

The ecotoxicity assay kits based on *V. fischeri*, generalized as Microtox®, have become very popular because they can be used with various types of samples, are very sensitive, and the results are obtained in a short time⁹. Despite the advantages of performing this standardized bioassay, several investigators have reported problems involving the inability to detect long-term effects, not only on luminescence emission, but also on cell proliferation and other physiological processes^{14,15}. Another disadvantage is the need to purchase the kit every time the assay needs to be performed, since the provided lyophilized *V. fischeri* culture needs to be used immediately after it is reconstituted. Additionally, an important aspect to consider is the initial investment cost for the acquisition of the equipment required for the luminescence measurements: A luminometer, fluorescence spectrophotometer, or a more specialized equipment.

In this study, the objective was to optimize a kit-free ecotoxicity assay, which was based on the luminescence of *V. fischeri* and denoted as "Macrotox". As a proof of principle, this assay was applied in the testing of sunscreens and the results were compared to those obtained with the classical Microtox kit.

EXPERIMENTAL PART

Culture media

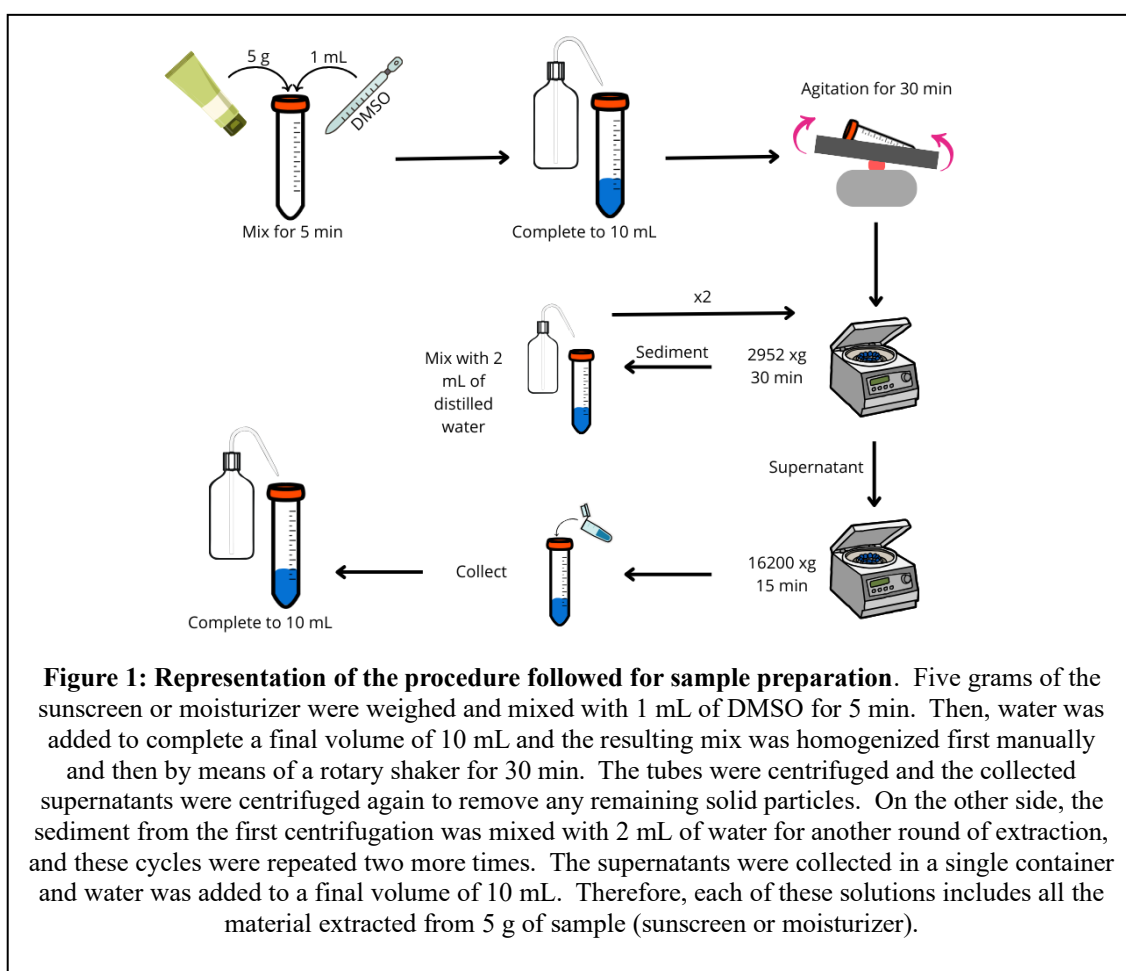
V. fischeri was grown and treated using the "Luria-Bertani salt" (LBS) medium and an adaptation of the "sea water medium" (SWM), respectively (16, 17). The first, used to grow *V. fischeri*, was composed of 10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract, 20 g/L NaCl and 0.05 M Tris buffer pH 7.5. The second, used in the bioassays, contained 28.1 g/L NaCl, 0.8 g/L KCl, 1.6 g/L CaCl₂·2H₂O, 3.5 g/L MgSO₄·7H₂O and 10 g/L peptone.

Equipment

For the sample preparations, a refrigerated centrifuge (ThermoScientific Sorval Legend X1R) and a microcentrifuge (ThermoScientific MicroCL17) were used. The luminometer used for the Microtox® assays (Berthold Detection System GmbH) was kindly provided by Dr. Javier Quino (University of Lima). The proliferation assay was based on absorbance determinations using a ThermoScientific Genesys 10S spectrophotometer. Macrotox®, while a digital camera (Canon EOS 1200D) was used to determine the effects on luminescence.

Sample preparation

The analyzed commercial sunscreen included as photoprotective actives homosalate, octocrylene, avobenzone, octisalate, bemotrizinol, titanium dioxide (nano) and ensulizole. The extraction of the components was performed using dimethyl sulfoxide (DMSO) and distilled water, following the steps described in figure 1^{4,13,18}.



Ecotoxicity assay using the Microtox® system

The BioTox™ WaterTox™ EVO commercial kit (Environmental Bio-Detection Products Inc. (Canada) was used, which applies the conventional Microtox method (ISO 11348- 3:2007). Measurements were performed using a Berthold Detection System

GmbH luminometer, which was kindly provided by Dr. Javier Quino-Favero of the Research Group on Technological Solutions for the Environment of the Universidad de Lima (Peru).

V. fischeri suspensions were treated with 1% DMSO (control), 50 g/L of moisturizer, or five different concentrations of sunscreen (3.1, 6.3, 12.5, 25 and 50 g/L). These samples were prepared using 2% NaCl, following the supplier's instructions. Measurements were carried out at the beginning of the treatment and after 15 minutes. The calculation of the percentage inhibition was made by applying the following equation:

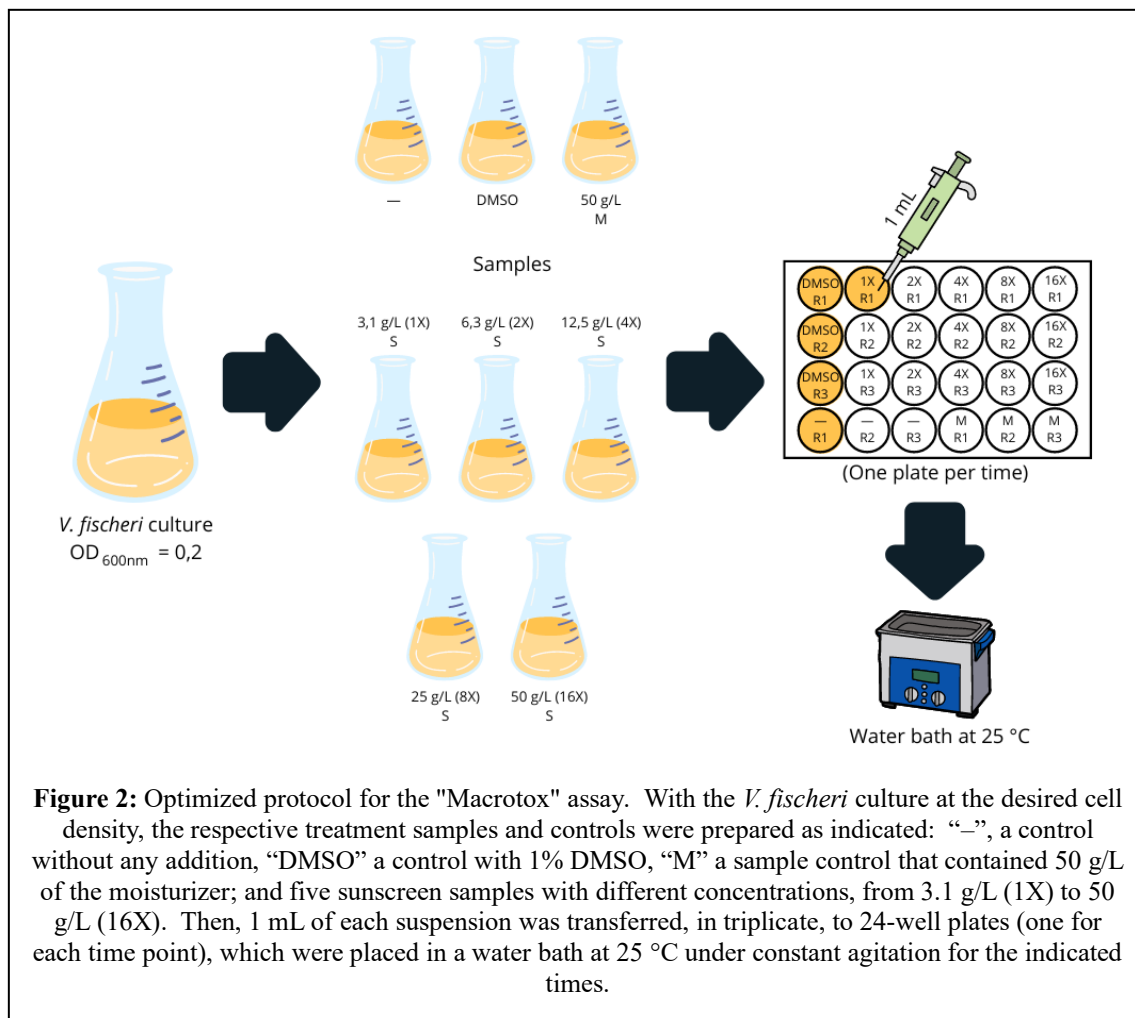
$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - 100 * \left(\frac{L_{15}}{L_0 * k_f} \right)$$

Where L_0 and L_{15} represent the luminescence read in RLU (Relative Light Unit) at times 0 and 15 minutes, respectively; while k_f is a constant obtained by dividing the luminescence of the control (1% DMSO) at time 15 over that obtained at time 0¹⁹.

“Macrotox” ecotoxicity assay

The *V. fischeri* strain used in these assays was recovered from the purchased kit (BioTox™ WaterTox™ EVO). These cells were grown in LBS medium under constant agitation at 25 °C for up to 16 hours. The cell suspensions were diluted to OD_{600nm} of 0.2 using SWM medium, always maintaining an LBS:SWM media ratio of 1:2 to ensure that all assays were performed at the same nutrient concentration. The prepared extracts (moisturizer, sunscreen) or DMSO were included in the cell suspensions to start the treatments as follows: One control with 1% DMSO, another with 50 g/L of the moisturizer, and different concentrations of the sunscreen (see figure 2). The samples were distributed in 24-well plates (one for each time point), transferring 1 mL and considering three replicates. The plates were kept in a water bath at 25 °C with constant agitation for the required time¹⁷.

The treatments were run for 1, 3, 7, 12, 24, 30 and 36 h, thus requiring seven 24-well plates. For the luminescence assays, photos of the plates were taken in the dark, adjusting the parameters of a Canon EOS 1200D camera to a sensitivity of ISO 6400 and an exposure time of 8 seconds. Each of the images obtained was processed with the well-known public domain software ImageJ (<https://imagej.net/ij/download.html>), generating a circular area of common size for all the wells of the plates. The program was configured to measure, based on the plotted area, the gray value average, calculated from the average value of the intensity of the RGB bands of each image. On the other hand, to determine the effect on cell proliferation, spectrophotometric readings were taken at 600nm, immediately after capturing the luminescence image. All tests were repeated twice, on different dates.



RESULTS AND DISCUSSION

As indicated above, although the Microtox® method is widely applied, it has important disadvantages and among these, a very important one is related to its cost and the requirement of specialized equipment or at least, a luminometer. Additionally, the possibilities of applying the assay are limited to the availability of the lyophilized cells (purchase of the kit) and to the established protocol. The main objective of this work was to optimize a kit-free, in-house protocol, applying it for the determination of the ecotoxicity of a sunscreen and a photoprotective active ingredient. Ecotoxicity studies were performed with samples prepared similarly, using the standard assay with a commercial kit (Microtox®) and with a more conventional kit-free protocol based on cultures of *V. fischeri* denoted as "Macrotox".

The results of the Microtox® assay are listed in **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** When evaluating the results of the sunscreen, an increase in luminescence is seen in the treatments with concentrations equal to or lower than 12.5 g/L, while the samples with 25 and 50 g/L causes the opposite effect, with the maximum inhibition levels of around 15.70%. In turn, the moisturizer showed 16.35% inhibition, a result that, surprisingly, was close to the inhibitory effect of the 50 g/L sunscreen sample (15.70%). It should be noted that cosmetic creams commonly include parabens, which can be toxic

at very low concentrations to *V. fischeri* (20). For this reason, it was important to include the moisturizer as a control in this assay and thus, it was expected to find stronger inhibitory effects in the presence of the photoprotective actives. Notably, these were not evident under the conditions of this assay, even at the highest concentrations of the sunscreen.

Table 1. Results of percentage inhibition of luminescence using the Microtox® assay

| Sample | | Inhibition (%) | | | Average | Standard deviation |
|-------------|----------|----------------|-------|-------|---------|--------------------|
| | | R1 | R2 | R3 | | |
| Moisturizer | 50 g/L | 20.17 | 13.82 | 15.09 | 16.36 | 3.36 |
| | 3.1 g/L | 1.06 | -1.95 | -7.35 | -2.74 | 4.26 |
| | 6.3 g/L | -3.91 | -3.78 | -8.47 | -5.39 | 2.67 |
| Sunscreen | 12.5 g/L | 1.72 | -2.38 | -4.79 | -1.82 | 3.29 |
| | 25 g/L | 12.17 | 6.62 | 2.95 | 7.24 | 4.64 |
| | 50 g/L | 16.38 | 17.2 | 13.52 | 15.7 | 1.93 |

R1, R2, R3: Repetitions

On the other hand, the Macrotox assay was also performed following the methodology described in figure 2. For the luminescence assays, photos were taken of the plates containing the samples and the gray value of each one was determined using the ImageJ software. Figure 3 includes in the top panel a representative example of the photos taken in the dark (7-hour treatment), and at the bottom, a graph that includes the gray values obtained for all samples and treatments.

As shown in figure 3B, the luminescence levels increase in all samples during the first 12 hours of the test, decreasing with the passage of time until reaching values close to zero. However, even from the first time-point (1-hour treatment), the stronger inhibitory effect of the sunscreen is evident in a dose-dependent manner. During almost all the time, the 1% DMSO control is the one that achieved the maximum light emission, which can be noticed especially at 12 hours with a gray value above 80. This result is very different from the control that did not include the solvent (“-”), which showed luminescence levels up to a gray value of around 50. According to several reports, DMSO, at low concentrations, causes an inductive effect on luminescence, which could be explained by its ability to donate electrons, thus positively interfering with luminescence emission (Nasuhoglu *et al.*, 2017).

Taking as a reference the results with the 1% DMSO control, the luminescence levels for the sunscreen samples decreased as its concentration increased, obtaining a gray value of approximately 40 at 12 hours in the 50 g/L treatment (16X), representing an inhibition of 53%. However, the visual differences are more noticeable at 7 hours, as can be seen in figure 3A, since the inhibition at that time reached a value close to 69%. As can be observed, higher concentrations of the sunscreen led to stronger inhibition of the luminescence of *V. fischeri*. Additionally, the moisturizer produced lower luminescence than the 8X sunscreen sample (25 g/L). Since the only difference between the sunscreen and the moisturizer is the presence of the photoprotective actives in the former, it could be inferred that the luminescence inhibition is due to these compounds.

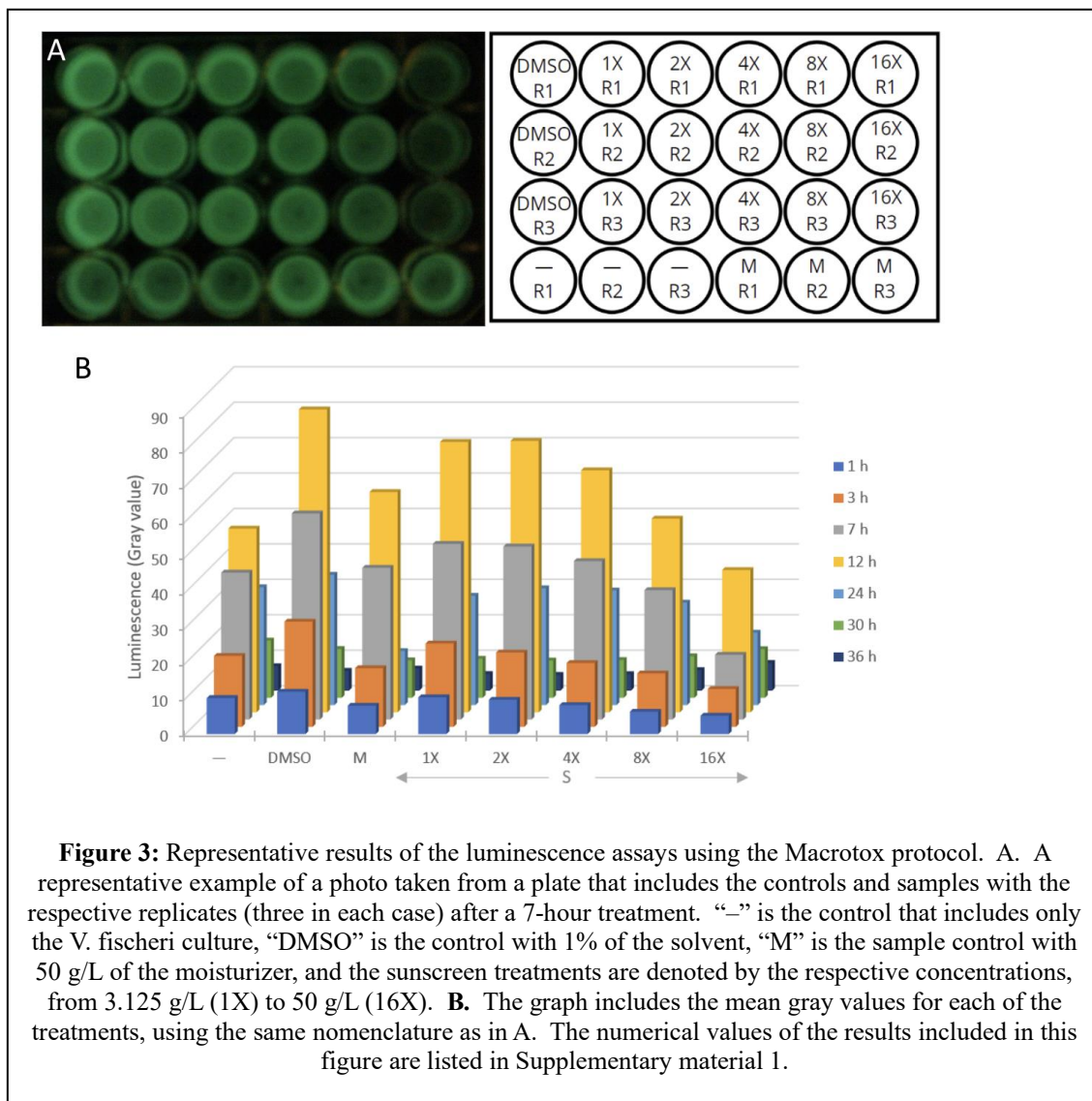
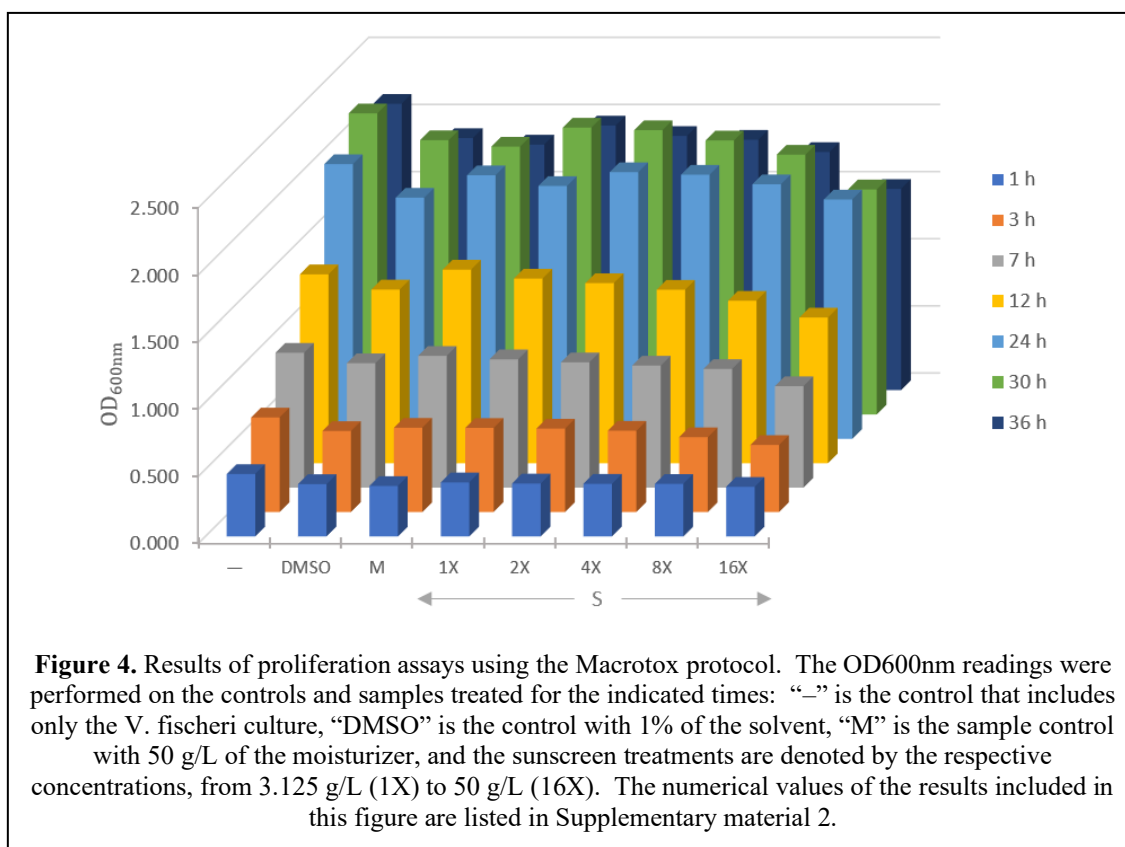


Figure 3: Representative results of the luminescence assays using the Macrotox protocol. **A.** A representative example of a photo taken from a plate that includes the controls and samples with the respective replicates (three in each case) after a 7-hour treatment. “—” is the control that includes only the *V. fischeri* culture, “DMSO” is the control with 1% of the solvent, “M” is the sample control with 50 g/L of the moisturizer, and the sunscreen treatments are denoted by the respective concentrations, from 3.125 g/L (1X) to 50 g/L (16X). **B.** The graph includes the mean gray values for each of the treatments, using the same nomenclature as in A. The numerical values of the results included in this figure are listed in Supplementary material 1.

Thus, the results presented so far show that, while using similarly prepared samples and controls, only the Macrotox protocol allowed the detection of the inhibitory effects on luminescence. Although no difference was detected between the moisturizer and the sunscreen using the Microtox® protocol (Table 1), the differences were obvious with the Macrotox assay even after a 1-hour treatment. Similarly, several Microtox® studies on UV filters have reported low toxicity with most of the compounds present in the sunscreen used in this study. One interesting exception is avobenzone, which shows luminescence inhibition levels above 50%¹³.

Simultaneously, the proliferation assay was carried out with the sunscreen samples (figure 4). An increasing trend in cell density was observed until 24 - 30 hours, when the maximum level was reached in each case. In contrast to luminescence, it is observed that the inclusion of 1% DMSO causes a decrease in the levels of cell proliferation. As for the sunscreen samples, cell proliferation levels decreased as the concentration increased, with lower values than the controls. However, when compared with the DMSO control,

a similar toxicity was observed for the 4X and 8X sunscreen samples (12.5 and 25 g/L), while the moisturizer had a minor effect.



A possible explanation for the inhibitory effect of the sunscreen could be the indirect action of the titanium dioxide nanoparticles. These are too large to pass through the bacterial cell membrane, but it can be adsorbed on the surface causing an increase in permeability, reducing fluidity, and promoting lipid peroxidation when the particles are positively charged²¹. These results demonstrate that the proliferation assay is a valuable complementary method for the evaluation of toxic effects, which importantly, as described in the Macrotox protocol, can be run simultaneously with the one for luminescence. It is noteworthy that no such study has been found for photoprotective actives, and only a few for other compounds. For example, Fulladosa *et al.*²² reported the effects of organic arsenical compounds on the proliferation of *V. fischeri*. Accordingly, it is hoped that, the reported results and Macrotox protocol will facilitate both luminescence and cell proliferation studies.

CONCLUSIONS

The Macrotox protocol applied in this work allows the detection of toxic components in aqueous samples, especially when examining the effect on luminescence. Advantageously, besides its simplicity and lower cost, it can be easily adapted to run assays for 36 hours or more using the preferred sample volumes. This could be

demonstrated with the reported results, since, for example, the Microtox® protocol was not able to detect any effect of the sunscreen extracts on luminescence. On the other hand, the versatility of the Macrotox protocol allowed determination of 69% inhibition with 7-hour treatments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by CONCYTEC-PROCIENCIA within the call for the Applied Research and Technological Development Projects 2020-02 - Phase II [Contract No. 146-2020-FONDECYT]. We are grateful to Dr. Javier Quino-Favero (University of Lima) for the use of the luminometer, and the members of the Laboratory of Biological Chemistry and Bioanalysis for their help and support.

REFERENCES

1. Quispe C, Astudillo L, Villasenor J, Delgadillo Á. Ozonización del antibiótico Trimetoprim: Evolución de la toxicidad durante la degradación. *Rev Soc Quím Perú*. 2010;76:149-55.
2. Cairns J, Pratt JR. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiologia*. 1989;188:5-20.
3. Valavanidis A, Vlachogianni T. Ecotoxicity test methods and ecological risk assessment. *Ecosystems*. 2015;10:13.
4. González MP, Vilas A, Beiras R. Ecotoxicological evaluation of sunscreens on marine plankton. *Cosmetics*. 2022;9(1):20. doi: 10.3390/cosmetics9010020.
5. Soler de la Vega AC, Cruz-Alcalde A, Sans Mazón C, Barata Martí C, Diaz-Cruz MS. Nano-TiO₂ phototoxicity in fresh and seawater: *Daphnia magna* and *Artemia* sp. as proxies. *Water*. 2021;13(1):55. doi: 10.3390/w13010055.
6. da Cunha Barros DG, dos Santos Gonçalves do Nascimento GC, Okon C, Rocha MB, Santo DE, de Lima Feitoza L, et al. Benzophenone-3 sunscreen causes phytotoxicity and cytogenotoxicity in higher plants. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023;30(52):112788-98.
7. Gregucci D, Nazir F, Calabretta MM, Micheli E. Illuminating Progress: The contribution of bioluminescence to Sustainable development goal 6—Clean water and sanitation of the United Nations 2030 Agenda. *Sensors*. 2023;23(16):7244.
8. Drzymała J, Kalka J. Elimination of the hormesis phenomenon by the use of synthetic sea water in a toxicity test towards *Aliivibrio fischeri*. *Chemosphere*. 2020;248:126085. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126085.
9. Abbas M, Adil M, Ehtisham-ul-Haque S, Munir B, Yameen M, Ghaffar A, et al. *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Sci Total Environ*. 2018;626:1295-309.
10. Johnson BT. Microtox® acute toxicity test. Small-scale freshwater toxicity investigations: Toxicity Test Methods: Springer; 2005. p. 69-105. Johnson BT. Microtox® Acute Toxicity Test. En: Blaise C, Féraud JF, editores. Small-scale Freshwater Toxicity Investigations: Toxicity Test Methods. Dordrecht: Springer Netherlands; 2005. p. 69-105.

11. Kudłak B, Jatkowska N, Liu W, Williams MJ, Barcelo D, Schiöth HB. Enhanced toxicity of bisphenols together with UV filters in water: Identification of synergy and antagonism in three-component mixtures. *Molecules*. 2022 May 19;27(10):3260. doi: 10.3390/molecules27103260.
12. Li AJ, Sang Z, Chow C-H, Law JC-F, Guo Y, Leung K-Y. Environmental behavior of 12 UV filters and photocatalytic profile of ethyl-4-aminobenzoate. *J Hazard Mater*. 2017;337:115-25.
13. Marcin S, Aleksander A. Acute toxicity assessment of nine organic UV filters using a set of biotests. *Toxicol Res*. 2023;39(4):649-67.
14. Froehner K, Backhaus T, Grimme L. Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere*. 2000;40(8):821-8.
15. Nasuhoglu D, Westlund P, Isazadeh S, Neamatallah S, Yargeau V. Development of a facile and high-throughput bioluminescence assay using *Vibrio fischeri* to determine the chronic toxicity of contaminated samples. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;98(2):196-203.
16. Christensen DG, Visick KL. *Vibrio fischeri*: Laboratory Cultivation, Storage, and Common Phenotypic Assays. *Curr Protoc Microbiol*. 2020 Jun;57(1):e103. doi: 10.1002/cpmc.103.
17. Fulladosa E, Murat JC, Villaescusa I. Effect of cadmium(II), chromium(VI), and arsenic(V) on long-term viability- and growth-inhibition assays using *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2005;49(3):299-306.
18. Lozano C, Matallana-Surget S, Givens J, Nouet S, Arbuckle L, Lambert Z, Lebaron P. Toxicity of UV filters on marine bacteria: Combined effects with damaging solar radiation. *Sci Total Environ*. 2020;722:137803. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137803.
19. ISO. ISO 11348-3: 2007 Water Quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test)—Part 2: Method using liquid-dried bacteria. Geneva, Switzerland; ISO; 2007.
20. Lee J, Bang SH, Kim YH, Min J. Toxicities of Four Parabens and Their Mixtures to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Environ Health Toxicol*. 2018;33(4):e2018018. doi: 10.5620/eht.e2018018.
21. Hou J, Wang L, Wang C, Zhang S, Liu H, Li S, Wang X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *J Environ Sci (China)*. 2019;75:40-53.
22. Fulladosa E, Murat J-C, Bollinger J-C, Villaescusa I. Adverse effects of organic arsenical compounds towards *Vibrio fischeri* bacteria. *Sci Total Environ*. 2007;377(2-3):207-13.

REFERENCES SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material 1

Results of the Macrotox luminescence tests with samples containing sunscreen and moisturizer: Gray values were determined using the ImageJ software.

| Sample | Result | 1 h | 3 h | 7 h | 12 h | 24 h | 30 h | 36 h |
|----------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| — | Average | 10.16 | 20.00 | 41.49 | 51.86 | 33.26 | 16.16 | 6.89 |
| | SD | 1.87 | 4.73 | 4.37 | 18.34 | 5.17 | 4.08 | 0.72 |
| DMSO | Average | 11.93 | 29.70 | 58.17 | 85.51 | 36.79 | 13.80 | 5.60 |
| | SD | 1.82 | 1.90 | 1.16 | 1.76 | 5.34 | 0.76 | 0.38 |
| 50 g/L Moisturizer | Average | 8.00 | 16.55 | 42.84 | 62.19 | 15.27 | 10.60 | 6.23 |
| | SD | 1.92 | 1.19 | 2.49 | 7.66 | 5.73 | 1.81 | 2.21 |
| 3.1 g/L (1X) Sunscreen | Average | 10.38 | 23.52 | 49.58 | 76.34 | 30.87 | 11.05 | 4.69 |
| | SD | 2.14 | 1.09 | 1.57 | 5.99 | 6.37 | 1.13 | 0.21 |
| 6.3 g/L (2X) Sunscreen | Average | 9.69 | 20.96 | 48.86 | 76.62 | 32.99 | 10.53 | 4.46 |
| | SD | 2.22 | 0.58 | 1.30 | 2.38 | 2.56 | 1.53 | 0.31 |
| 12.5 g/L (4X) Sunscreen | Average | 8.17 | 18.01 | 44.72 | 68.32 | 32.37 | 10.68 | 4.66 |
| | SD | 2.29 | 0.68 | 1.20 | 2.52 | 1.57 | 1.80 | 0.33 |
| 25 g/L (8X) Sunscreen | Average | 6.30 | 15.06 | 36.54 | 54.68 | 28.94 | 11.74 | 5.80 |
| | SD | 1.97 | 0.91 | 2.01 | 6.29 | 2.37 | 1.76 | 0.45 |
| 50 g/L (16X) Sunscreen | Average | 5.17 | 10.68 | 18.28 | 40.17 | 20.45 | 13.73 | 7.83 |
| | SD | 1.98 | 1.45 | 2.14 | 4.74 | 5.86 | 1.10 | 0.80 |

SD, standard deviation

Supplementary material 2

Results of the Macrotox proliferation tests (OD_{600nm}) with the samples containing sunscreen and moisturizer.

| Sample | Result | 1 h | 3 h | 7 h | 12 h | 24 h | 30 h | 36 h |
|--------------------------------|----------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| — | Average | 0.465 | 0.705 | 1.005 | 1.407 | 2.046 | 2.243 | 2.132 |
| | SD | 0.061 | 0.092 | 0.042 | 0.162 | 0.219 | 0.048 | 0.153 |
| DMSO | Average | 0.390 | 0.604 | 0.927 | 1.294 | 1.796 | 2.043 | 1.877 |
| | SD | 0.028 | 0.026 | 0.035 | 0.146 | 0.205 | 0.113 | 0.199 |
| 50 g/L Moisturizer | Average | 0.376 | 0.628 | 0.982 | 1.442 | 1.963 | 1.995 | 1.828 |
| | SD | 0.032 | 0.030 | 0.057 | 0.158 | 0.084 | 0.111 | 0.158 |
| 3.1 g/L (1X) Sunscreen | Average | 0.403 | 0.627 | 0.956 | 1.375 | 1.883 | 2.136 | 1.971 |
| | SD | 0.034 | 0.036 | 0.066 | 0.215 | 0.126 | 0.122 | 0.138 |
| 6.3 g/L (2X) Sunscreen | Average | 0.394 | 0.622 | 0.933 | 1.342 | 1.986 | 2.117 | 1.893 |
| | SD | 0.028 | 0.032 | 0.079 | 0.196 | 0.059 | 0.170 | 0.128 |
| 12.5 g/L (4X) Sunscreen | Average | 0.392 | 0.606 | 0.909 | 1.293 | 1.967 | 2.041 | 1.864 |
| | SD | 0.037 | 0.033 | 0.069 | 0.162 | 0.125 | 0.084 | 0.158 |
| 25 g/L (8X) Sunscreen | Average | 0.392 | 0.558 | 0.884 | 1.211 | 1.896 | 1.935 | 1.773 |
| | SD | 0.030 | 0.010 | 0.065 | 0.134 | 0.147 | 0.037 | 0.091 |
| 50 g/L (16X) Sunscreen | Average | 0.370 | 0.500 | 0.756 | 1.085 | 1.783 | 1.676 | 1.498 |
| | SD | 0.022 | 0.017 | 0.053 | 0.113 | 0.220 | 0.030 | 0.104 |

SD, standard deviation

EFECTO DE LA SEMILLA DE LA *MORINGA OLEÍFERA* EN POLVO COMO COAGULANTE NATURAL PARA LA REMOCIÓN DE LA TURBIDEZ DEL AGUA DEL RÍO CAPLINA, PERÚ

Gabi Diaz Pilco*^a Fiorella Estrada Cardenas

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la *Moringa oleífera* como coagulante alternativo para el tratamiento primario de aguas en la remoción de turbidez. Se realizó la caracterización de los parámetros fisicoquímicos del agua de río, la semilla tuvo un tratamiento manual para su pulverización y aplicación, se trabajó bajo un diseño factorial 2x3 teniendo como variables la dosis del coagulante, concentración de Hidróxido de Sodio (NaOH) y tiempo de agitación. Los resultados mostraron que el efecto de la *Moringa Oleífera* tiene una eficiencia de hasta el 97,77 % para turbidez, así mismo con respecto a los demás parámetros, los valores se encuentran dentro de los Estándares de Calidad de Agua de producción de agua potable de la normativa peruana. Se concluye que es una alternativa amigable con el ambiente para el tratamiento de aguas asumiendo consideraciones futuras para el reaprovechamiento de los residuos que se pudiesen generar.

Palabras clave: Coagulante alternativo, *Moringa oleífera*, parámetros fisicoquímicos, turbidez.

EFFECT OF MORINGA OLEIFERA SEED POWDER AS A NATURAL COAGULANT FOR TURBIDITY REMOVAL IN CAPLINA RIVER WATER, PERU

ABSTRACT

The present research article aims to evaluate the effect of *Moringa oleifera* as an alternative coagulant for primary water treatment in reducing turbidity. The study included the characterization of the physicochemical parameters of river water. The seeds underwent manual treatment for pulverization and application, and experiments were conducted using a 2x3 factorial design, considering the coagulant dose, sodium hydroxide (NaOH) concentration, and agitation time as variables. The results demonstrated that *Moringa oleifera* achieved an efficiency of up to 97.77% in turbidity removal. Regarding other parameters, the values complied with the Peruvian Water Quality Standards for potable water production. It is concluded that this method is an environmentally friendly alternative for water treatment, with future considerations for repurposing the residues that may be generated.

^a Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Miraflores S/N, Tacna 23000, Perú. gdiarp@unjbg.edu.pe

Key words: Alternative coagulant, *Moringa oleifera*, physicochemical parameters, turbidity.

INTRODUCCIÓN

La gestión del agua y el problema de calidad de las mismas; es tema de relevancia en todo el mundo, debido a que la accesibilidad a este recurso para consumo influye en la salud de la población receptora. La eficiencia de las plantas potabilizadoras se rige a una normativa vigente del estado en el que se encuentre operativo, asegurándose que se mantenga un estándar de calidad, siendo así, la turbidez uno de los parámetros principales y determinantes, dado que esta muestra el contenido de sustancias en estado coloidal, minerales o materia orgánica que son indicadores de contaminación (1).

Del tratamiento de potabilización se generan residuos, resultado del uso de insumos químicos, como el Sulfato de Aluminio ($Al_2(SO_4)_3$), Aluminato de Sodio ($NaAlO_2$), Sulfato Férrico ($Fe_2(SO_4)_3$), entre otros (2), estos se oxidan y como sub-producto, trazan una limitación para el aprovechamiento del residuo generado como el lodo de alumbre, que estimándose representan del 1 % al 3 % por m^3 de agua tratada, frente a una crecida poblacional la cantidad generada de este tipo de residuos va a seguir incrementándose y los costos que implican su eliminación influirán al total del tratamiento dado, puesto que a diferencia de los lodos obtenidos a partir del tratamiento de aguas residuales no tienen un valor nutricional ni calorífico por lo cual hay una limitación en su reutilización (3); además considerando los efectos negativos a la salud con respecto al aluminio residual en el agua potable, hay un potencial que aumenta el riesgo de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer; por lo mencionado; siendo la coagulación uno de los procesos principales del tratamiento de aguas, esta se enfrenta a cambios progresivos situacionales que la van haciendo ineficiente en su convencionalidad, por lo cual viene siendo materia de investigación para la búsqueda de nuevas alternativas, contemplando así a los coagulantes naturales e híbridos, del cual su accionar dependería de las propiedades de la materia orgánica natural, su tamaño, estado de carga e hidrofobicidad y en cuanto compete al tipo de coagulante su dosis y condición de mezcla influenciado por el pH, el potencial sobre los coagulantes naturales del tipo vegetal muestran ventaja como biodegradación, renovabilidad, cero toxicidad y una agradable relación de costos y eficacia (4).

La turbidez nos indica un cierto grado de contaminación en el agua, dado que está ligada de manera correlacional a los coliformes fecales y totales, así como el color aparente (1), para su tratamiento es que se lleva a cabo la coagulación, fundamentándose en la precipitación de partículas en el agua, bajo apoyo de un agente coagulante responsable de realizar la desestabilización de partículas coloidales con carga eléctrica; se han realizado estudios de aplicación en el cual la semilla de *Moringa oleifera* viene siendo una opción viable y eficaz en la remoción turbidez, sólidos totales, sólidos suspendidos y el color, algunos de los componentes hallados en la composición química de esta semilla, según Zumalacárregui & Ferrer (5), serían metabolitos como: taninos hidrolizables, alcaloides y flavonoides, así como saponinas, esteroides, fenoles, entre otros; su mecanismo se basa en la presencia de proteínas catiónicas solubles en agua, que propician a la neutralización de cargas, inversión y adsorción contra partículas impuras suspendidas y cargadas negativamente (6).

En esta investigación realizada se evaluó el efecto de la semilla de *Moringa Oleifera* en polvo para la remoción de turbidez del río Caplina, una de las cuencas principales de agua

de la región de Tacna. Se consideró la influencia del NaOH en el medio experimental, así mismo se analiza la influencia del coagulante en parámetros fisicoquímicos tales como pH, TDS y salinidad, relacionándolos a los Estándares de Calidad Ambientales para el agua en el marco normativo peruano.

PARTE EXPERIMENTAL

Toma de muestra de agua

El agua para llevar a cabo esta investigación se extrajo en cuatro botellas de poliestireno tereftalato (PET) de 2,5 L de capacidad de la bocatomía del río Caplina del departamento de Tacna – Perú (17°51'15.8"S 70°07'16.3"W), siguiendo la metodología de monitoreo de calidad de los recursos hídricos superficiales de la Autoridad Nacional del Agua (ANA). Las muestras se llevaron al laboratorio de análisis de agua de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental (ESAM) de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (UNJBG) para posteriormente medir los parámetros fisicoquímicos como la turbidez (NTU) mediante el uso del Turbiquant® 1100 IR MERCK.; el pH, TDS (mg/L) y la salinidad (%) fueron medidos con el multiparámetro marca Hach HQ40D, ello antes y posterior al tratamiento realizado.

Preparación del coagulante de semilla de Moringa oleífera

Las semillas de moringa fueron adquiridas de un mercado local (500 g), se aplicó la metodología de Avendaño & Castillo (7) para la obtención de las semillas en polvo, se seleccionaron e hizo el retiro manual de las cáscaras de la moringa aplicando fuerza en las yemas de los dedos de la mano, seguidamente se llevó a una licuadora, sin hacer uso de agua, hasta obtener aproximadamente un total 337g de polvo fino; el cual se dejó secar por un lapso de cinco días, para posteriormente ser llevado al laboratorio donde se utilizó papel adsorbente y un mortero para retirar el aceite natural excedente que contenía el polvo de la moringa.

Diseño de investigación

En la presente investigación se realizó una prueba de jarras. Para definir los tratamientos se optó por un diseño factorial 2^3 completo de dos niveles (máximo y mínimo) y tres factores (dosis de moringa, concentración de NaOH y tiempo de agitación), realizándose 8 corridas con 3 puntos centrales y 3 repeticiones, obteniéndose un total de 33 unidades experimentales. El diseño mencionado permite estimar la dosis óptima, mayor eficiencia y limitar la medida del uso de los factores en evaluación (8). M1,...,M11 representan las corridas brindadas por el programa y los puntos centrales de estas once corridas están representados por M9, M10 y M11; para los valores de dosificación de moringa y tiempo de agitación manual de los puntos centrales se tomó como referencia a Jurado et al., (9) y para la concentración de NaOH a Tirado et al., (8).

Tabla 1. Diseño factorial 2³ para el tratamiento de coagulación.

| Factores | Valor mínimo | Puntos centrales | Valor máximo |
|---------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| Dosis de Moringa (mg) | 97.5 | 104 | 110.5 |
| Concentración de NaOH (M) | 0.0025 | 0.0038 | 0.0050 |
| Tiempo de agitación (min) | 1 | 3 | 5 |

Para el análisis de resultados de influencia sobre la turbidez, pH, salinidad y TDS se realizó un ANOVA para determinar la significancia estadística de los factores experimentales, además se aplicó la fórmula que Garcia et al. (10) usó para determinar la eficiencia del coagulante en la remoción de la turbidez en porcentaje (%) como se muestra en la ecuación 1.

$$E_f \% = \frac{(\text{Valor inicial} - \text{Valor final}) \times 100\%}{(\text{Valor inicial})} \dots\dots\dots \text{Eq. (1)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2, se muestran los valores de las condiciones iniciales de la medición de los parámetros fisicoquímicos de la muestra madre de agua del río Caplina a 26.4°C.

Tabla 2. Condiciones iniciales de los parámetros fisicoquímicos de las muestras de agua del río Caplina.

| Turbiedad (NTU) | pH | TDS (mg/L) | Salinidad (%) |
|------------------------|-----------|-------------------|----------------------|
| 90.656 | 4.45 | 653 | 0.65 |

Para el análisis estadístico se realizaron las mediciones post-tratamiento de los parámetros fisicoquímicos de turbiedad, pH, TDS y salinidad por muestra enumerada, triplicado y promediado a fin de realizar la comparación respectiva con la muestra inicial, tal como se expresa en la tabla 3, de ello se calculó una eficiencia de hasta el 97.77% de remoción de turbidez.

Del análisis de varianza ANOVA para los resultados mostrados en la tabla 3 considerando el análisis de los factores por individual y las interacciones entre ellos, se expresa una influencia significativa únicamente para la remoción de turbidez con un porcentaje de confiabilidad del 95 % (valor-p es menor a 0.05), en cuanto el resto de parámetros expresa influencia significativa únicamente de la concentración de NaOH aplicado. Este análisis demostró que el factor dosis de moringa tiene un valor-p de menor a 0.001, concentración de NaOH de 0.019 y tiempo de agitación de 0.03, la interacción de los tres tiene un valor 0.001 para la remoción de turbidez.

Tabla 3. Resultados de los parámetros fisicoquímicos antes y después del tratamiento.

| | Muestras | Parámetro | | | |
|----------------|----------|-----------------|-------|------------|---------------|
| | | Turbiedad (NTU) | pH | TDS (mg/L) | Salinidad (%) |
| Antes | Mo | 90.656 | 4.45 | 653 | 0.65 |
| | M1 | 2.576 | 6.830 | 816.000 | 0.823 |
| Después | M2 | 3.509 | 6.800 | 804.333 | 0.813 |
| | M3 | 3.109 | 6.300 | 739.333 | 0.747 |
| | M4 | 4.513 | 6.300 | 739.000 | 0.743 |
| | M5 | 2.830 | 6.767 | 814.000 | 0.820 |
| | M6 | 4.288 | 7.000 | 810.333 | 0.813 |
| | M7 | 3.008 | 5.900 | 744.000 | 0.753 |
| | M8 | 3.049 | 6.233 | 742.000 | 0.750 |
| | M9 | 2.669 | 6.167 | 763.000 | 0.770 |
| | M10 | 2.757 | 6.400 | 767.000 | 0.7666 |
| | M11 | 2.018 | 6.467 | 759.333 | 0.730 |

En la figura 1 se muestra el gráfico de contorno donde se evidencia la influencia de la concentración del NaOH y la dosis de *Moringa Oleífera* para el resultado porcentual de remoción de turbidez de acuerdo a lo obtenido en la medición de parámetro fisicoquímicos de las unidades experimentales posterior al tratamiento. En eje de las ordenadas se encuentran los valores de concentración de NaOH en unidad de molaridad (M) teniendo valores de 0.0025 y 0.0050 M, mientras que en eje de las abscisas están los valores de dosis aplicadas del coagulante natural (mg), encontrándose entre los 98 y 110 mg. La colorimetría indica el grado de remoción de turbidez porcentual en una gradiente de color verde claro cuyos valores son menores al 95.5 % hasta el verde oscuro con porcentajes resultantes mayores al 97.5 %, siendo este un rango de eficiencia elevada, donde los factores como NaOH se encuentra alrededor de 0.0040 M y la dosis de moringa entre los 104 y 108 mg.

En la figura 2, figura 3 y figura 4 de los gráficos de radar se muestran los resultados de parámetros tales como pH, TDS y salinidad respectivamente para los tratamientos realizados con sus variaciones con respecto a la muestra de control (Mo). Los valores de pH de M1 a M11 muestran similitudes entre sí, no obstante, con respecto a Mo existe una tendencia de ácido a básico (4.45 – 7). Para los TDS no se demuestra efecto notable, la variación negativa con respecto a Mo va de 653 – 816 mg/L. La salinidad muestra una tendencia similar a los otros parámetros, con leves variaciones entre los tratamientos, con una variación de 0.65 – 0.823 que estadísticamente no demuestra significancia.

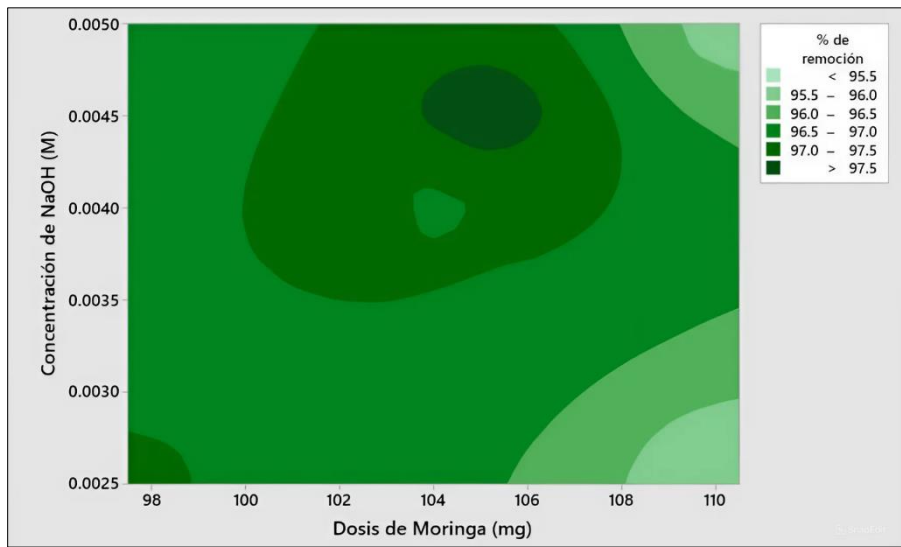


Figura 1. Gráfico de contorno de dosis de moringa vs concentración de NaOH.

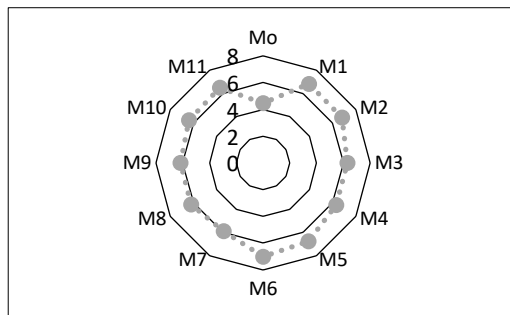


Figura 2. Gráficos de radar de pH posterior al tratamiento con respecto a la muestra de control.

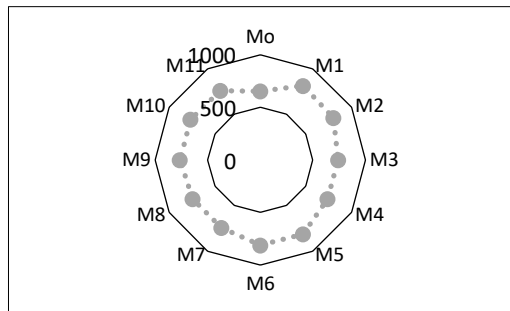


Figura 3. Gráficos de radar de TDS posterior al tratamiento con respecto a la muestra de control.

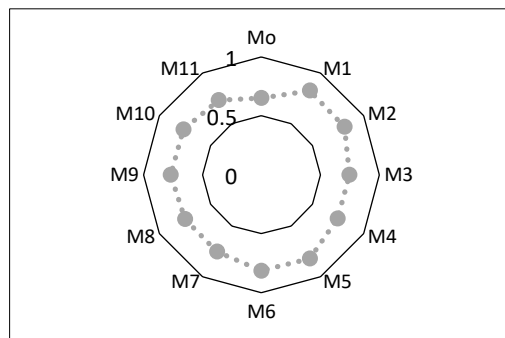


Figura 4. Gráficos de radar de salinidad posterior al tratamiento con respecto a la muestra de control

Con lo mostrado en la tabla 2 y tabla 3, el porcentaje de eficiencia de remoción de turbidez varía entre 95.02% - 97.77% a partir del uso de *Moringa Oleífera* como coagulante natural para el agua del río Caplina cuya dosis óptima fue de 105 mg/400 mL y pH regulado por NaOH, resultados similares los obtuvo Mejía et al. (11) quien trabajó con aguas residuales cuya eficiencia alcanzó hasta un 97.08% que por lo que atribuye se debería también al cloruro de sodio (NaCl) para la activación de las proteínas de la moringa y que esta al ser aplicada tiene mayor solubilidad con una dosis de 0.74 g/L, esta solución salina también fue usado y verificado en la comparación de resultados que obtuvo por Skaf et al. (12) aumentando su eficiencia.

De acuerdo a lo expuesto y de igual forma influyendo en los antecedentes reportados, la aplicación del NaOH se efectúa con la finalidad de realizar una corrección de pH, por lo mencionado por Castillo (13) estando en un rango de 6.5 – 8 ; osea mientras más alcalino sea el medio la eficiencia de remoción será más elevada, en lo que respecta en su investigación experimental ello no fue de realce pues las variaciones no tuvieron significancia, por tanto bajo la aplicación de semilla de Moringa oleífera no habría la necesidad de realizar ajustes de pH, así mismo Hadadi, Imessaoudene, Bollinger, Cheikh, et al. (14) trabajando con una solución sintética logrando una eficiencia del 98.5% con dosis de coagulante de 3.5 mL/200 mL, menciona que el pH interfiere en el proceso de eliminación de turbidez y que el rango donde se evidencia significancia para su experimento fue de 2 – 8, por encima de ello la eficiencia va disminuyendo puesto que, siendo el coagulante de origen vegetal, este tiende a la formación predominante de puentes de polímeros entre polisacárido, no obstante, al haber usado una solución salina como el cloruro de sodio (NaCl) 0.5 M se rechaza la dependencia al aplicarse la semilla de moringa como coagulante debido a la protonación del grupo funcional amino proteico en interacción con los coloides del medio acuoso y afirma mayor importancia al tamaño de partícula de coagulante y su dosificación, por lo contrario Cedillo et al. (15) de acuerdo a los estudios revisados considera que los sitios de unión en las proteínas de la Moringa oleífera se relacionan con cambios de pH por la competencia entre iones hidrógeno, protones hidratados e iones hidroxilo, mientras que en el caso de valores de pH bajos, la competencia es por iones hidratados e iones hidroxilo, esto último mencionado podría estar relacionado con los resultados de esta investigación presentando un pH de 6.167 - 7 en la rapidez de precipitación y la formación de una capa superficial en los recipientes de cada unidad experimental al aplicar el NaOH y la dosis de coagulante teniéndose como intervalos de mayor eficiencia de remoción de acuerdo a la figura 1 una concentración de NaOH entre 0.0025 - 0.0050 M y de dosificación variando de 98 – 110 mg; Mekonin & Ebba (16) en aguas residuales ácidas logrando una remoción de hasta 99.5% y en básicas con el 98 %, observó que hay mayor remoción de turbidez con pH cercano a 9 por la carga superficial negativa del coagulante mientras que con un pH cercano a 3 propicia a aumentar la concentración de iones hidrógeno que propiciaría a la neutralización del coagulante reduciendo las fuerzas de atracción con las partículas suspendidas del agua.

En cuanto la dosificación los datos usados en el diseño factorial fueron a partir de estudios previamente realizados por diversos investigadores demostrándose su veracidad en los porcentajes de remoción de turbiedad que es importante tomar en cuenta puesto que así como Licapa et al. (17) quien lo demostró que haciendo uso de la *Opuntia ficus-indica* con una eficacia del 84.1% aplicando 30 mg/L de coagulante más allá de ese valor puede llegar a desequilibrar el medio acuoso y saturarlo, interfiriendo en la formación de puentes de polímeros, por ende en la adhesión de partículas coloidales. Zea et al. (18) quien reporta que el tratamiento tuvo efecto en un 14.5%, mientras que la aplicación de moringa

representó un 22.9 indiferente si este tuviese grasa o no al presentar similitudes de comportamiento, no obstante menciona que para tanto la selección del coagulante y el tratamiento a aplicarse deben buscar una sinergia para optimizarse, así mismo declara que el tiempo de contacto no fue determinante a lo que experimentó, de acuerdo al análisis estadístico de esta investigación sí es un factor que influye, sin embargo se le atribuye mayor importancia a la dosificación de la *Moringa oleífera* y la concentración de NaOH, de acuerdo a Gandiwa et al. (19) el tiempo de agitación fomenta los choques entre partículas que tienen cargas neutralizadas que se aglomeran forman los flóculos para posteriormente precipitar con mayor rapidez.

De la tabla 3, como se muestra en la figura 2, los valores de pH son similares entre ellos al aplicarse la semilla de moringa en polvo teniendo una tendencia básica a diferencia de la muestra de control, de la figura 3 y figura 4 tanto para TDS y salinidad las variaciones son ligeras, es decir que el coagulante no tuvo efecto sobre ellas, sin embargo de acuerdo a lo investigado por Sandoval & Laines (20) pudo aumentar la carga orgánica.

En lo que respecta a su relación con los ECA establecido por el Ministerio del Ambiente (21) para aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable, siendo el rango de pH para encontrarse entre las categoría de uso poblacional y recreación, para las sub-categorías A1 y A2 con tratamientos de desinfección y convencional respectivamente entre los rangos de 5.5 – 9, en la muestra de control como se muestra en la tabla 1 se encontraba en 4.45, los valores resultantes posterior al tratamiento, así mismo valores aceptables se tuvieron con los parámetros de TDS, salinidad y turbidez como objeto principal del presente trabajo de investigación con la aplicación de semilla de *Moringa oleífera*.

CONCLUSIONES

La aplicación de la semilla de *Moringa oleífera* en polvo demostró eficiencia en la remoción de turbidez del agua del río Caplina en 97.77%, considerando dosis óptima del coagulante alternativo con 105 mg/400mL, concentración de 0.004 M de NaOH y tiempo de agitación manual de 4 min., el pH, salinidad y TDS tienen ligera variación de su condición inicial debido al NaOH. Los resultados obtenidos con respecto a los parámetros hallados en los ECA se encuentran dentro de las sub-categorías A1 y A2 que no implican tratamientos avanzados o alta tecnología considerándose una alternativa eco-amigable en el tratamiento de agua para el consumo humano, así mismo, se sugiere que futuros estudios profundicen el modo de aplicabilidad y conservación de los coagulantes naturales de origen vegetal para su inserción en el mercado industrial a gran escala de tratamiento de aguas por limitaciones al tener naturaleza orgánica.

AGRADECIMIENTO

El autor agradece a la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental por el acceso al laboratorio de agua y permitir el uso de sus instrumentos de medición.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gómez L, Martínez M, Medrano B, Mendoza J, Zafra C. Evaluación de la turbiedad como parámetro indicador del tratamiento en una planta potabilizadora municipal. *Rev UIS Ing.* 2020 Feb 1;19(1):15–24.
2. Betancur AM, Upegui SA. Comparación de técnicas alternativas de potabilización de agua, y su posible aplicación en el área rural del territorio nacional colombiano. *Cuad Act.* 2015;5(4662):56.
3. Minto A, Gilmour D, Jorat E, Tierney I. Potential Benefits and Disbenefits of the Application of Water Treatment Residuals from Drinking Water Treatment Processes to Land in Scotland: Development of a Decision Support Tool. *Sustainability.* 2023; 15(12): 9268. doi:10.3390/su15129268.
4. Knap A, Żubrowska M. Natural Organic Matter Removal in Surface Water Treatment via Coagulation—Current Issues, Potential Solutions, and New Findings. *Sustainability.* 2023; 15 (18): 13853. doi: 10.3390/su151813853.
5. Zumalacárregui B, Ferrer C. Caracterización fisicoquímica de hojas, semillas y aceite vegetal de *Moringa oleifera* ecotipo Plain. *Rev Cuba Química.* 2022;34(2):227–41.
6. Koul B, Bhat N, Abubakar M, Mishra M, Arukha AP, Yadav D. Application of Natural Coagulants in Water Treatment: A Sustainable Alternative to Chemicals. *Water.* 2022; 14(22): 3751. doi:10.3390/w14223751.
7. Avendaño E, Castillo M. Efecto de las semillas de Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) en las condiciones para la clarificación del agua del río Sama. *Rev Soc Quím Perú.* 2020 Mar 31;86(1):47–57.
8. Apaza J, Portugal M, Tirado E, Tirado L. Optimización de dos coagulantes naturales coadyuvados por hidróxido de sodio para la potabilización de aguas del río Caplina. *Rev Verit Sci - UPT.* 2022 May 24;11(1):87–98.
9. Jurado M, Mercado I, Meza M, Olivero R, Riaños K. Evaluación del poder coagulante del sulfato de aluminio y las semillas de Moringa oleifera en el proceso de clarificación del agua de la ciénaga de Malambo-Atlántico. *Rev UIS Ing.* 2018 Mar 15;17(2):95–104.
10. Garcia G, Siqueira B, Vicensoto M, Yumi C, Pereira M, Gonçalves A. Impact of *Moringa oleifera* Seed-Derived Coagulants Processing Steps on Physicochemical, Residual Organic, and Cytotoxicity Properties of Treated Water. *Water.* 2022; 14(13), 2058. doi:10.3390/w14132058.
11. Mejía P, Urquía K, Cabello R, Valdiviezo L. Evaluación de la *Moringa oleifera* en el tratamiento de aguas con alta turbidez y carga orgánica. *Ing del agua.* 2020 Apr 30;24(2):119. doi:10.4995/ia.2020.12274.
12. Skaf D, Punzi V, Rolle J, Cullen E. Impact of *Moringa Oleifera* extraction conditions on zeta potential and coagulation effectiveness. *J Environ Chem Eng.* 2021;9(1):104687. doi:10.1016/j.jece.2020.104687.
13. Castillo M. Revisión sobre clarificación del agua y el uso de semillas de moringa, *Moringa oleifera* Lam. *Rev Soc Cient Parag.* 2023 May 31;28(1):169–89.
14. Hadadi A, Imessaoudene A, Bollinger JC, Cheikh S, Assadi AA, Amrane A, et al. Parametrical Study for the Effective Removal of Mordant Black 11 from Synthetic Solutions: Moringa oleifera Seeds' Extracts Versus Alum. *Water.* 2022; 14(24): 4109. doi:10.3390/w14244109.

15. Cedillo J, Ponce A, González V, Vega M, Zayas T, Soriano G. Utilización de *Moringa oleífera* como coagulante-floculante natural para la descontaminación de agua. RD-ICUAP. 2024 Jan 7;10(28):224–35.
16. Mekonin W, Ebba M. Wastewater treatment using a natural coagulant (*Moringa oleifera* seeds): optimization through response surface methodology. Heliyon. 2021;7(11):e08451. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08451
17. Licapa G, Poma P, Licapa R, Farfán G, Vega M. Eco-friendly Coagulant in the Treatment of Turbidity in the Water of the Mashcón River. In: Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology. 4-6 diciembre 2023. doi:10.18687/LEIRD2023.1.1.176
18. Zea A, Gutiérrez J, Caballero P. Use of *Moringa Oleifera* as a Natural Coagulant in the Reduction of Water Turbidity in Mining Activities. Water. 2024; 16(16): 2315. doi:10.3390/w16162315.
19. Gandiwa B, Moyo L, Ncube S, Mamvura T, Mguni L, Hlabangana N. Optimisation of using a blend of plant based natural and synthetic coagulants for water treatment: (*Moringa Oleifera*-Cactus *Opuntia*-alum blend). South African J Chem Eng. 2020;34:158–64.
20. Sandoval M, Laines J. *Moringa oleifera* una alternativa para sustituir coagulantes metálicos en el tratamiento de aguas superficiales. Ingeniería. 2013;17(2):93–101.
21. MINAM. Aprueban Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen disposiciones complementarias. El Peruano [Internet]. 2017;6–9. [Citado 12 mayo 2024]. Disponible en: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>

ELAGITANINOS Y FLAVONOIDES DE *CUPHEA* *CARTHAGENENSIS* (JACQ.) J.F.MACBR. AISLADOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA SEMIPREPARATIVA

Mirtes Midori Tanae^a, Ingrit Elida Collantes Díaz^{*b}, Antonio José Lapa^a

RESUMEN

Cuphea carthagenensis fue seleccionada por el Ministerio de Salud del Brasil (CEME Programa 1984 – 1998) como una fuente nativa para desarrollar fitomedicamentos para el servicio público de salud. El presente trabajo reporta la identificación y el aislamiento de elagitaninos y flavonoides mayoritarios presentes en la fase butanólica del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. carthagenensis* por cromatografía líquida de alta performance semipreparativa. La identificación de los compuestos fue realizada por análisis de sus espectros de resonancia magnética nuclear y espectro de masas. Los elagitaninos que están bien definidos fueron oenoteina B (1) y woodfordina C (3) y los flavonoides quercetina (8) y quercetina-3-O-β-D-glucuronopiranosideo (10). También fue identificado el elagitanino trimero oenoteina A (2), pero se encuentra en sus posibles mezclas anoméricas, así como, un tetramero (4, 5, 6 y 7) también en sus posibles mezclas anoméricas, este último confirmamos por el análisis de sus espectros de masas.

Palabras claves: *Cuphea carthagenensis*, planta medicinal, elagitaninos, flavonoides, HPLC

ELLAGITANNINS AND FLAVONOIDS FROM *CUPHEA* *CARTHAGENENSIS* (JACQ.) J.F.MACBR. ISOLATED BY SEMIPREPARATIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ABSTRACT

Cuphea carthagenensis was selected by the Brazilian Ministry of Health (CEME Program 1984-1998) as a native source to develop phytomedicines for the public health service. The present work reports the isolation and identification of major ellagitannins and flavonoids present in the butanolic phase of the aqueous extract of the aerial parts of *C. carthagenensis* by semi-preparative High Performance Liquid Chromatography. The identification of the compounds was carried out by analysis of nuclear magnetic resonance spectrum and mass spectrometry. The well-defined ellagitannins were oenotein B (1), woodfordin C (3) and flavonoids were quercetin (8), and quercetin-3-O-β-D-glucuronopyranosideo (10). The ellagitannin trimer oenotein A (2) was also identified,

^a Natural Products Section, Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

^b Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210 Rímac, Lima-Perú. icollantesd@uni.edu.pe

but it is found in its possible anomeric mixtures, as well as a tetramer (4, 5, 6 and 7) also in its possible anomeric mixtures, the latter confirmed by the analysis of its mass spectra.

Keywords: *Cuphea carthagenensis*, medicinal plant, ellagitannins, flavonoids, HPLC

INTRODUCCIÓN

La familia Lythraceae incluye 31 géneros con aproximadamente 600 especies diseminadas en las regiones subtropical y tropical^{1,2,3}. El género *Cuphea* es el más representativo de esta familia y comprende alrededor de 250 especies dispersas en el continente americano, siendo 100 especies nativas en el Brasil, distribuidas en las regiones noreste, sureste y sur^{1,2,3}. *Cuphea* es una planta herbácea de bajo crecimiento anual, dependiendo de la especie cultivada, su altura varía entre 20 cm – 4 m en plantas cruzadas o autopolinizable. Muchas especies de *Cuphea* son conocidas popularmente en el Brasil como “sete-sangrias” porque el té de sus hojas son usadas por la medicina popular brasilera para el tratamiento de la hipertensión, otros usos también son mencionados como para el tratamiento de la diarrea, fiebre, reumatismos, malaria, sífilis, hipercolesterolemia y arterioesclerosis^{4,5,6}. *Cuphea carthagenensis* es abundante y fue seleccionada por el Ministerio de Salud del Brasil (CEME Programa 1984 – 1998) como una fuente nativa para desarrollar fitomedicamentos por el servicio público de salud.

Estudios farmacológicos con los extractos y compuestos aislados del género *Cuphea* presentaron actividad anticancerígena^{7,8,9,10,11}, antiprotozoal^{12,13}, antioxidante¹⁴, antiviral¹⁵, antiulcera¹⁶, antihipertensivo/hipotensora^{17,18,19} y también para la pérdida de peso^{20,21}. También fueron identificados los ácidos caprílico, cáprico, mirístico y láurico que son usadas en la industria química, farmacéutica y nutricional, haciendo así, *Cuphea* como una planta de alta importancia económica^{22,23,24,25}. Entre los metabolitos secundarios identificados están los flavonoides apigenina glicosilada, luteolina *O*-glicosilada, kaempferol *O*-glicosilado, quercetina *O*-glicosilada y miricetin *O*-glicosilada^{26,12,13}. Los taninos hidrolizables del tipo elagitaninos como cuphiin D₁, cuphiin D₂, oenotheina B y woodfordin C fueron identificados en *C. hysopifolia* nativa de Méjico, Guatemala y honduras^{7,27}. Los triterpenos epifriedelinol y cartagenol fueron identificados en *C. carthagenensis* nativa de America del Sur²⁵. En el Brasil existen pocos reportes sobre *C. carthagenensis* mismo siendo conocida como una planta medicinal, por ese motivo hemos desarrollado por HPLC semipreparativo un método de purificación del extracto y aislamos e identificamos algunos componentes de un extracto acuoso.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos y materiales

Solventes para el sistema HPLC: ácido trifluoroacético (TFA), acetonitrilo (ACN) (grado HPLC, de la marca MERCK), agua ultrapura (Nanopure® Deionization System).

Solventes para la extracción, éter etílico, acetona, acetato de etilo y butanol (Grado PA).

Obtención de la *Cuphea carthagenensis*

La *C. carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. fue cultivada en el Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA-UNICAMP) del estado de São Paulo, Brasil y sus partes aéreas fueron utilizadas para los estudios fitoquímicos y farmacológicos.

Obtención del extracto bruto

Las partes aéreas fueron secadas bajo sombra por 2 días, luego fueron secadas a 40°C y molidas hasta obtener 1 mm de tamaño. El material seco y molido fue sometido a extracción con agua caliente (100 g/L, 72 °C, 30 min), la infusión obtenida fue enfriada, filtrada y congelada para después ser sometida a liofilización hasta la remoción total del agua, conduciéndonos a la obtención del extracto acuoso (EA). 100 g de EA de las partes aéreas fueron extraídos con 600 mL de agua:acetona (70:30) a temperatura de ambiente con agitación constante por 10 h por tres veces, el extracto fue filtrado y extraído con éter etílico (3 x 100 mL), seguido de acetato de etilo (3 x 100 mL) y finalmente por butanol (3 x 100 mL), los solventes fueron removidos con rotaevaporador obteniéndose finalmente las fases de éter etílico, acetato de etilo y butanólica. La fase butanólica fue sometida a análisis por cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) analítico.

Cromatógrafo líquido analítico (HPLC analítico)

El HPLC analítico (Shimadzu® - Japan) está conformado por 2 bombas LC-20AT, detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-10A), una controladora CBM-20A operando con software Shimadzu LC solución 1.24 SP1 y columna VP ODS-Shimadzu (25 x 0.46 cm x 5 µm).

Método con el HPLC analítico

El extracto acuoso y la fase butanólica secos fueron sometidos a análisis por HPLC analítico para obtener las condiciones cromatográficas adecuadas para la mejor separación de las señales presentes en el cromatograma: el solvente A (H₂O/TFA 0,1%) y de 15 – 60% del solvente B (H₂O/acetonitrilo 75%) en 30 min a un flujo constante de 1 mL/min y a la longitud de onda de 260 nm.

Cromatógrafo líquido semipreparativo (HPLC semipreparativo)

El HPLC semipreparativo (Shimadzu® - Japan) está conformado por 2 bombas (LC-8A), un detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-6A) operando a 260 nm, una controladora SCL-8A, un integrador CR-4A y un colector de fracciones FCV-100B, fue usada una columna Shimpack-prep ODS (25 x 2 cm x 5 µm).

Método con el HPLC semipreparativo

La fase butanólica (3 g) debidamente seca fue sometida a separación y aislamiento de sus componentes usando como eluyente el solvente A (H₂O/TFA 0,1%) y 15 - 60 % del solvente B (H₂O/acetonitrilo 75%) en 30 min a un flujo constante de 10 mL/min, 10 fracciones fueron colectados, el solvente orgánico fue removido con rotaevaporador y la fase acuosa fue removida por liofilización. Las fracciones liofilizadas fueron analizadas

por resonancia magnética nuclear (RMN) y por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (LC-MS/MS).

Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono 13 (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker DRX 500 operando a 500 y 125 MHz respectivamente. Fueron usados acetona- d_6 y dimetilsulfoxido- d_6 como solventes deuterados.

Cromatógrafo líquido acoplado a espectrómetro de masas (CL-MS/MS)

El cromatógrafo líquido (Shimadzu® - Japan) está conformado por 2 bombas (LC-10AVP), con detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-M10AVP), con una controladora (SCL-10AVP) acoplado a un espectrómetro de masas Ion Trap LC-MS/MSⁿ-Bruker Datonics Esquire 3000 Plus. Fue usado como eluyente el solvente A: H_2O and B: H_2O /acetonitrilo 75%; 15 – 60% de B en 30 min. el flujo fue a $100\mu\text{L}/\text{min}$ a 325°C , 7 L/min del gas seco y nebulizado a 27 psi y HV 4000 V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma analítico de la fase butanólica (Figura 1-I) presento 10 picos óptimos para ser sometido a aislamiento por HPLC semipreparativo, ni todas las señales observadas en la fase butanólica se puede apreciar en el cromatograma del extracto acuoso (Figura 1-II), esta diferencia fue observada debido a que la fase butanólica esta más preconcentrado los componentes (4 - 7), mientras que en el extracto acuoso se encuentra más diluidos. El análisis de los espectros (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y LC-MS/MS) de las fracciones aisladas de la fase butanólica del extracto acuoso de *C. carthagenensis*, demuestran la presencia de taninos hidrolizables del tipo elagitaninos y de flavonoides como mostramos sus estructuras en la Figura 2.

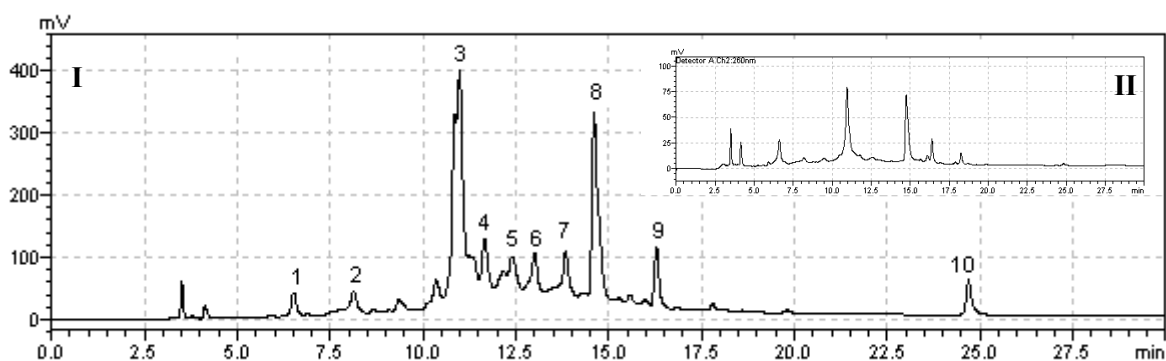


Figura 1.- Cromatograma obtenido por HPLC analítico a λ 260 nm, usando como columna (VP ODS–Shimadzu, 25x0.46 cm), con gradiente el solvente A ($\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0,1%) y de 15 – 60% del solvente B ($\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrilo}$ 75%) en 30 min a un flujo constante de 1 mL/min. I de la fase butanólica y II del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. carthagenensis*.

Fracción 1 (1).- Fue obtenido como un polvo crema amorfo. Su espectro de masas en el modo positivo presentó los iones m/z 1586.4 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$, 1569.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y 1551.4 $[\text{M}+\text{H}-$

$\text{H}_2\text{O}]^+$ sugiriendo que su fórmula molecular sería $\text{C}_{68}\text{H}_{48}\text{O}_{44}$. El análisis en el modo negativo presenta un ion molecular m/z 1567.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ y su fragmento en m/z 783.1 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ como pico base, este fragmento es un ion doblemente cargado que sugiere que F1 es un elagitanino, también llamado de un dímero macrocíclico formado por la dimerización de 2 monómeros de telimagrandina I vía dos enlaces *m*-DOG, al formar el dímero cada unidad pierde 2 Da y es por esa razón que se observa el fragmento m/z 783.1 de elagitanino oenoteína B²⁸. Los desplazamientos químicos de sus espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C en $\text{Me}_2\text{CO}-d_6$, se encuentran en las Tablas 2 y 3 respectivamente, la comparación de estos desplazamientos químicos con los reportados por la literatura²⁹ confirmó que se trataba de oenoteína B.

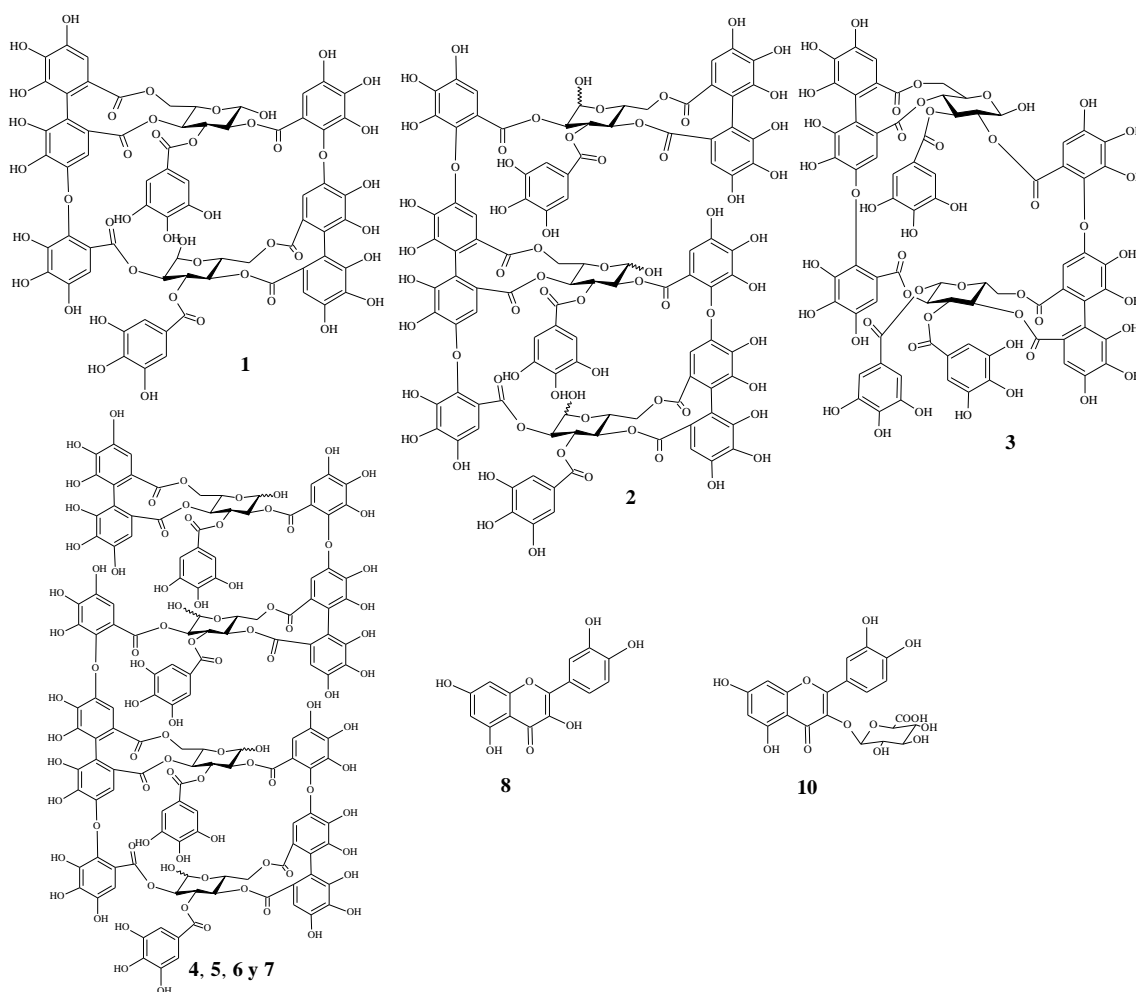


Figura 2.- Moléculas identificadas en la fase butanólica del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. carthagenensis* oenoteína B (1), oenoteína A (2), woodfordina C (3), tetrámero (4, 5, 6 y 7), quercetina (8) y quercetina-3-*O*-β-D-glucuronopiranosideo (10).

Fracción 2 (2).- Fue obtenido un polvo crema amorfo. Su espectro de masas en el modo negativo presentó el fragmento m/z 1175,3 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ como pico base, esta señal es un ion doblemente cargado que sugiere que F2 es un trímero de masa molar de 2352.28 Da con fórmula molecular $\text{C}_{102}\text{H}_{72}\text{O}_{66}$. Biosintéticamente se generó después de formada la oenoteína B se enlazó un monómero adicional de telimagrandina I vía un enlace DOG (1568Da + 786Da -2Da), sugiriendo que F2 es oenoteína A^{28,30}. Sus espectros de RMN-

^1H y RMN- ^{13}C presentan desplazamientos químicos complejos debido a que se trata de un trímero y debe estar en sus diferentes mezclas anoméricas posibles, la comparación de estos con los reportados por la literatura^{31,32} confirmaron que se trataba de oenoteina A. Fracción 3 (**3**).- Fue obtenido un polvo amorfo de color crema, sus desplazamientos químicos de sus espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C son reportados en las Tablas 2 y 3 respectivamente, la comparación de estos con los reportados por Kadota et al 1990 sugiriendo que es woodfordina C. Su espectro de masas en el modo negativo presentó el fragmento m/z 859.2 $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ como pico base, es un ion doblemente cargado que sugiere que el ion molecular es m/z 1719 $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondiente a woodfordina C ($\text{C}_{75}\text{H}_{52}\text{O}_{48}$). Su estructura fue confirmada por la referencia bibliográfica³⁴.

Tabla 1.- Fragmentos presentes en los cromatogramas totales de iones de las fracciones 4, 5, 6 y 7 del fraccionamiento de la fase butanólica del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. carthagenensis*. La propuesta es que se trata de un tetrámero de masa molar 3136 Da.

| Fracción | TR | Pseudo ion molecular | Fragmentos m/z |
|----------|------|----------------------|--|
| 4 | 12.3 | | 1569.1, 1251.7, 1177.2 |
| | 12.9 | | 1568.7, 1251.2, 1176.6 |
| | 13.9 | | 1568.7, 1251.7 |
| 5 | 12.3 | 1045.6 | 1568.6, 1251, 1176.6 |
| | 12.9 | | 1639.2 1568.6, 1251.6, 1176.2, 994.7, 934.9, |
| | 13.3 | | 1644.1, 1569.1, 1256,3, 1176.2, 1095.5, 935, 859 |
| | 13.9 | | 1644, 1568.6, 1252.6, 1176.1, 1095.5 |
| 6 | 12.3 | | 1569.2, 1251.1, 1176.7, 995.9 |
| | 12.9 | | 1568.7, 1444.5, 1219.8, 1176.6 |
| | 13.9 | | 1569.1, 1252.4, 1095.9, 834.3 |
| 7 | 13.8 | | 1569.1, 1252, 1176.2, 1095.7 |

m/z relación masa carga, TR tiempo de retención

Fracciones 4, 5, 6 y 7 (**4**, **5**, **6** y **7**).- Sus espectros de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C presentan muchas señales demostrando su complejidad para la identificación. Ya sus espectros de masas en el modo negativo proporcionan más información, los cromatogramas totales de iones de las cuatro fracciones presenta señales muy similares como se puede observar en la Tabla 1. La referencia bibliográfica^{28,35,36} sugiere que estamos frente a isómeros de un elagitanino tetramérico de masa molar 3136 Da con fórmula molecular $\text{C}_{136}\text{H}_{96}\text{O}_{88}$, que viene del enlace del trímero con la telimagrandina I vía un enlace DOG (2352Da + 786Da -2Da). Con los cromatogramas de cada fracción se puede apreciar que las tres fracciones tienen las mismas señales, pero en diferentes proporciones, excepto la fracción 5 que presenta una señal a más en 13.3 min. El tetrámero propuesto debe tener una serie de combinaciones anoméricas por esa razón es difícil su identificación por RMN. En la Tabla 1 se presentan las fracciones (4, 5, 6 y 7) con sus respectivas absorciones en los diferentes tiempos de retención, también se observa que el pseudo ion molecular en m/z 1045 $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ así denominado por Karonen et al 2010 es un ion triplemente cargado, y los demás fragmentos presentes como m/z 1569 que se origina por la pérdida de la oenoteina B del tetrámero $[\text{M}-\text{H}-\text{Oenoteina B}]^-$ como mostramos en la Figura 3. Una manera de explicar

los resultados observados en las fracciones 4, 5, 6 y 7 es que como en el cromatógrafo semipreparativo se trabaja con mucho mayor cantidad de masa comparado con un cromatógrafo analítico, entonces puede que se hayan sobrepuesto las señales, es por ello que tuvimos esos resultados observados en la Tabla 1.

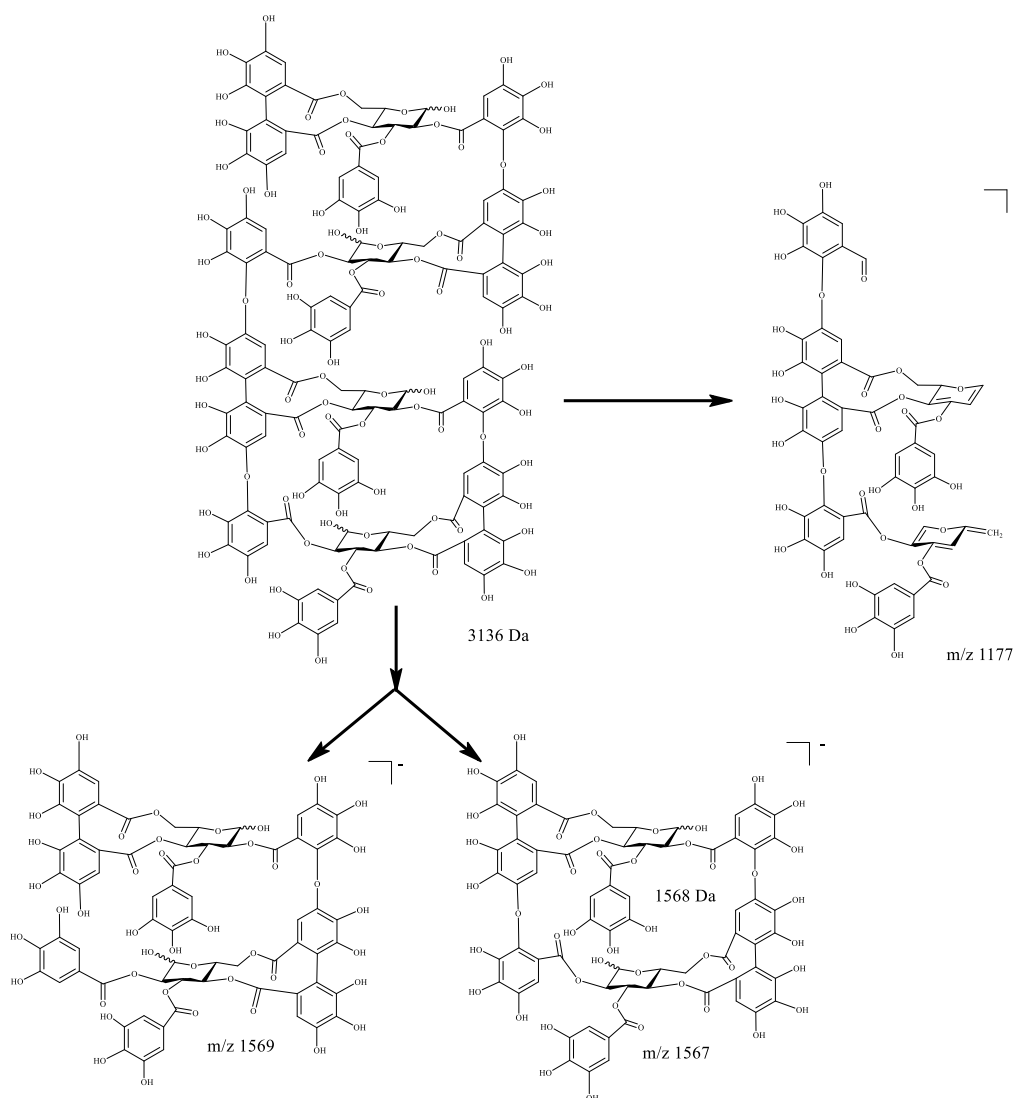


Figura 3.- Fragmentación propuesta para las diferentes combinaciones anoméricas del tetrámero presente en las fracciones 4, 5, 6 y 7.

Fracción 8 (**8**).- Fue obtenido un polvo amarillo amorfo, su espectro de RMN- ^1H ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$) presenta característicos desplazamientos químicos de un flavonoide donde el anillo B esta disustituido y el anillo A presenta señales en δ 6.19 ($J = 1.95$ Hz) y en δ 6.42 ($J = 2.2$ Hz), sus desplazamientos químicos están en la Tabla 2. El espectro de RMN- ^{13}C ($\text{Me}_2\text{SO}-d_6$) presenta 15 señales y sus desplazamientos químicos están en la Tabla 3. Por comparación de los desplazamientos químicos con los reportados por la literatura^{37,38} confirmamos que se trata de quercetina.

Fracción 10 (**10**).- Fue obtenido un polvo amarillo amorfo, los desplazamientos químicos de su espectro de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C se encuentran en la tabla 2 y 3 respectivamente,

la comparación de estos con la respectiva literatura sugiere que la fracción 10 es quercetina-3-*O*- β -D-glucuronopiranosido³⁹. La confirmación de su estructura nos la dio el espectro de masas m/z 955.3 [2M-H]⁻ como el reportado por Yang et al 2016.

Tabla 2.- Desplazamiento químico de los espectros de RMN-¹H (Me₂CO-*d*₆, ppm, 500 MHz) de los compuestos F1, F3, F8 y F10

| H | F1 | F3 | H | F8 | F10 |
|-------|--------------------------------------|------------------------------------|-----|-----------------------------------|------------------------------------|
| | β -glucosa | β -glucosa | | | |
| 1 | 4.43 <i>d</i> , <i>J</i> =8.1 | 4.4 <i>d</i> <i>J</i> =7.9 | 1 | - | - |
| 2 | 5.17 <i>dd</i> , <i>J</i> =9.5, 8.2 | 5.21 <i>dd</i> <i>J</i> =9.5, 8 | 2 | - | - |
| 3 | 5.43 <i>t</i> , <i>J</i> =9.7 | 5.49 <i>t</i> <i>J</i> =9.7 | 3 | - | - |
| 4 | 4.89 <i>t</i> , <i>J</i> =9.5 | 4.92 <i>t</i> <i>J</i> =9.93 | 4 | - | - |
| 5 | 4.14 <i>dd</i> , <i>J</i> =9.7, 4.2 | 4.17 <i>dd</i> <i>J</i> =9.9, 5.2 | 5 | - | - |
| 6a | 3.86 <i>d</i> , <i>J</i> =13.2 | 3.89 <i>d</i> <i>J</i> =13.31 | 6 | 6.19 <i>d</i> <i>J</i> =1.95 | 6.22 <i>d</i> <i>J</i> =2.2 |
| 6e | 5.02 <i>dd</i> , <i>J</i> =12.8, 7.4 | 5.04 <i>dd</i> <i>J</i> =13.5, 5.6 | 7 | - | - |
| A | 6.67 <i>s</i> | 6.67 <i>s</i> | 8 | 6.42 <i>d</i> <i>J</i> =2.2 | 6.42 <i>d</i> <i>J</i> =1.91 |
| B | 6.29 <i>s</i> | 7.09 <i>s</i> | 9 | - | - |
| C | 7.02 <i>s</i> | 6.52 <i>s</i> | 10 | - | - |
| G-2 | 7.24 <i>s</i> | 7.32 <i>s</i> | 1' | - | - |
| G-6 | 7.24 <i>s</i> | 7.32 <i>s</i> | 2' | 7.66 <i>d</i> <i>J</i> =2.2 | 7.52 <i>d</i> <i>J</i> =2.5 |
| | α -glucosa | α -glucosa | 3' | - | - |
| 1 | 6.23 <i>d</i> , <i>J</i> =3.5 | 7.29 <i>d</i> <i>J</i> =2.9 | 4' | - | - |
| 2 | 5.99 <i>m</i> | 6.24 <i>m</i> | 5' | 6.89 <i>d</i> <i>J</i> =8.3 | 6.84 <i>d</i> <i>J</i> =8.56 |
| 3 | 6.12 <i>m</i> | 6.22 <i>m</i> | 6' | 7.54 <i>dd</i> <i>J</i> =8.6, 2.2 | 7.60 <i>dd</i> <i>J</i> =8.56, 2.2 |
| 4 | 5.60 <i>m</i> | 5.83 <i>t</i> <i>J</i> =10 | 1'' | - | 5.49 <i>d</i> <i>J</i> =7.33 |
| 5 | 4.58 <i>dd</i> , <i>J</i> =9.3, 6.7 | 4.68 <i>dd</i> <i>J</i> =9.9, 7 | 2'' | - | 3.30 <i>t</i> <i>J</i> =8.8 |
| 6a | 3.62 <i>d</i> , <i>J</i> =12.6 | 3.71 <i>d</i> <i>J</i> =13.1 | 3'' | - | 3.38 <i>t</i> <i>J</i> =9.29 |
| 6e | 5.25 <i>dd</i> , <i>J</i> =13.2, 6.5 | 5.33 <i>dd</i> <i>J</i> =13.5, 6.7 | 4'' | - | 3.49 <i>m</i> |
| A' | 6.47 <i>s</i> | 6.53 <i>s</i> | 5'' | - | 3.58 <i>d</i> <i>J</i> =9.78 |
| B' | 6.48 <i>s</i> | 6.32 <i>s</i> | 6'' | - | - |
| C' | 6.69 <i>s</i> | 6.73 <i>s</i> | | | |
| G'-2 | 7.02 <i>s</i> | 7.22 <i>s</i> | | | |
| G'-6 | 7.02 <i>s</i> | 7.22 <i>s</i> | | | |
| G''-2 | - | 7.04 <i>s</i> | | | |
| G''-6 | - | 7.04 <i>s</i> | | | |

multiplete (*m*), doblete (*d*), duplodoblete (*dd*), singlete (*s*), tripleta (*t*), constante de acoplamiento en Hz (*J*)

Tabla 3.- Desplazamiento químico de los espectros de RMN -¹³C (Me₂CO-*d*₆, ppm, 125 MHz) de los compuestos F1, F3, F8 y F10

| C | F1 β-glucosa | F3 β-glucosa | C | F1 α-glucosa | F3 α-glucosa | C | F8 | F10 |
|------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|-----|--------|--------|
| 1 | 95.72 | 95.89 | 1 | 91.29 | 91.46 | 1 | - | - |
| 2 | 74.86 | 74.92 | 2 | 74.37 | 73.23 | 2 | 147.46 | 156.83 |
| 3 | 73.51 | 73.39 | 3 | 71.52 | 71.52 | 3 | 136.35 | 133.65 |
| 4 | 73.65 | 73.99 | 4 | 70.41 | 69.81 | 4 | 176.47 | 177.78 |
| 5 | 72.03 | 72.49 | 5 | 69.72 | 72.06 | 5 | 161.33 | 161.78 |
| 6 | 62.37 | 65.50 | 6 | 63.37 | 62.91 | 6 | 98.87 | 99.42 |
| A 1 | 125.76 | 125.53 | A' 1' | 125.1 | 126.35 | 7 | 164.52 | 164.84 |
| A 2 | 116.04 | 116.06 | A' 2' | 115.31 | 116.06 | 8 | 94.06 | 94.26 |
| A 3 | 144.46 | 146.05 | A' 3' | 144.80 | 144.9 | 9 | 156.79 | 156.89 |
| A 4 | 136.73 | 136.98 | A' 4' | 136.41 | 136.84 | 10 | 103.65 | 104.49 |
| A 5 | 145.32 | 146.05 | A' 5' | 145.32 | 144.9 | 1' | 122.61 | 122.36 |
| A 6 | 107.84 | 107.86 | A' 6' | 107.86 | 108.16 | 2'' | 115.67 | 115.84 |
| A CO | 169.74 | 169.84 | A' CO | 166.85 | 168.46 | 3' | 145.69 | 145.54 |
| B 1 | 126.89 | 127.04 | B' 1' | 126.89 | 127.04 | 4'' | 148.33 | 149.24 |
| B 2 | 117.59 | 121.52 | B' 2' | 117.59 | 117.35 | 5' | 116.26 | 116.59 |
| B 3 | 145.59 | 146.05 | B' 3' | 145.32 | 145.12 | 6'' | 120.7 | 121.47 |
| B 4 | 135.82 | 141.16 | B' 4' | 136.41 | 135.72 | 1'' | - | 101.63 |
| B 5 | 147.66 | 146.86 | B' 5' | 147.11 | 147.96 | 2'' | - | 71.96 |
| B 6 | 105.88 | 115.77 | B' 6' | 106.6 | 106.04 | 3'' | - | 76.43 |
| B CO | 167.56 | 167.88 | B' CO | 168.05 | 168.46 | 4'' | - | 72.8 |
| C 1 | 112.34 | 121.30 | C' 1' | 112.34 | 118.43 | 5'' | - | 74.38 |
| C 2 | 138.96 | 143.25 | C' 2' | 136.73 | 143.99 | 6'' | - | 170.41 |
| C 3 | 139.99 | 140.23 | C' 3' | 138.96 | 145.59 | | | |
| C 4 | 139.99 | 138.35 | C' 4' | 141.07 | 134.01 | | | |
| C 5 | 143.92 | 138.42 | C' 5' | 143.08 | 139.26 | | | |
| C 6 | 110.25 | 109.04 | C' 6' | 109.05 | 109.22 | | | |
| C CO | 166.85 | 168.08 | C' CO | 166.07 | 167.08 | | | |
| G 1 | 121.74 | 121.97 | G' 1' | 121.68 | 121.97 | | | |
| G 2 | 110.38 | 111.02 | G' 2' | 110.38 | 111.02 | | | |
| G 3 | 145.32 | 145.94 | G' 3' | 145.32 | 146.33 | | | |
| G 4 | 138.96 | 139.19 | G' 4' | 138.96 | 139.81 | | | |
| G 5 | 145.59 | 145.94 | G' 5' | 145.59 | 146.33 | | | |
| G 6 | 110.38 | 111.02 | G' 6' | 110.38 | 111.02 | | | |
| G CO | 166.07 | 166.43 | G' CO | 167.56 | 165.26 | | | |
| | | | G'' 1'' | - | 121.67 | | | |
| | | | G'' 2'' | - | 110.61 | | | |
| | | | G'' 3'' | - | 145.86 | | | |
| | | | G'' 4'' | - | 139.43 | | | |
| | | | G'' 5'' | - | 145.86 | | | |
| | | | G'' 6'' | - | 110.51 | | | |
| | | | G'' CO | - | 168.08 | | | |

CONCLUSIONES

Cuatro tipos de elagitaninos (oenoteína B, oenoteína A, woodfordina C y un tetrámero) y dos flavonoides (quercetina y quercetina-3-*O*-β-*D*-glucuronopiranosideo) fueron aislados e identificados en la fase butanólica del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. carthagenensis*. Los flavonoides ya habían sido reportados en la especie colectada en Parana^{41,42} y en Rio Grande do Sul⁴³ del Brasil, también fue reportado quercetina en *C. pinetorum*¹², *C. ingrata*³⁴, *C. ignea*⁴⁴. Los taninos hidrolizables oenoteína B y woodfordina C también fueron aislados en *C. hissopifolia*^{7,27}, mientras que en *C. ingrata* fue identificado oenoteína B³⁴. Es primera vez que se reporta la presencia del trímico oenoteína A y un tetrámero en *C. carthagenensis*. Los elagitaninos son polifenoles encontrados en plantas como metabolitos secundarios, que han demostrado su habilidad para reducir la emisión de metano por rumiantes³⁵.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Pedro M. Magalhães del CPQBA – UNICAMP, Brasil por la provisión de *Cuphea carthagenensis*; también agradecen por el soporte financiero de FAPESP y FADA-UNIFESP del Brasil.

REFERENCIA

1. Graham SA, The flowering plant family Lythraceae, the loosestrifes: the genera of North America including Mexico and Central America. 1998a.
2. Graham SA, A taxonomic monograph of the genus *Cuphea* (Lythraceae). 1998b.
3. Ramos LCS, Roath MW, Cavalcanti TB, Kirkbride JH, *Cuphea* (Lythraceae) descriptors. Staff Report. North central regional plant introduction station. Agriculture and home experiment station. Iowa State University of Science and Technology. Ames, Iowa, 1992.
4. Cruz GL, Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil, Velloso, S.A. (Ed.). Belo Horizonte, Brasil, 1965, p. 864.
5. Corrêa MP, Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultiváveis, v. 1, Rio de Janeiro, Brasil, 1975, 483.
6. Lorenzi N, Plantas daninhas do Brasil terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais, 1991.
7. Wang C-C, Chen L-G, Yang L-L. Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Cancer Letters* 1999; 140(1-2): 195 – 200.
8. Wang C-C, Chen L-G, Yang L-L. Cuphiin D, the macrocyclic hydrolysable tannin induced apoptosis in HL-60 cell line. *Cancer Letters* 2000; 149 (1-2) 77 – 83.
9. Wang CC, Chen LG, L.L. Yang LL. Cytotoxic effects of cuphiin D1 on the growth of human cervical carcinoma and normal cells. *Anticancer Research* 2002a; 22(5): 2677 – 2684.
10. Wang CC, Chen LG, Yang LL. In vitro immunomodulatory effects of cuphiin D1 on human monoclear cells. *Anticancer Research* 2002b 22 (6C) 4233 – 4236.
11. Avila EV, Aguilar RT, Estrada MJ, Ortega ML, Ramos RR. Cytotoxic activity of *Cuphea aequipetala* Proceedings of the Western Pharmacology Society. 2004; 47: 129 – 133
12. Calzada F. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhea. *Phytotherapy Research* 2005; 19(8): 725 – 727.
13. Barbosa E, Calzada F, Campos R. In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109(3): 552 – 554.
14. Schuldt EZ, Farias MR, Ribeiro-do-Valle RM, Ckless K. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fraction from *Cuphea carthagenensis* leaves. *Phytomedicine* 2004; 11(6): 523 – 529.
15. Andrighetti-Fröhner CR, Sincero TCM, da Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettega JMR, Mancini M, de Almeida MTR, Barbosa RA, Farias MR, Barardi CRM, Simões CMO. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic tropical forest. *Fitoterapia* 2005; 76 (3-4): 374 – 378.
16. Castillo-Juárez I, González V, Jaime-Aguilar H, Martínez G, Linares E, Bye R, Romero I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional

- medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 122(2): 402 – 405.
17. Braga FC, Wagner H, Lombardi JA, de Oliveira AB. Screening the Brazilian flora for antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine* 2000; 7(3): 245 – 250.
 18. Isla KKY, Tanae MM, Lima-Landman MTR, Magalhães PM, Lapa AJ, Souccar C. Vasorelaxant effects of ellagitannins isolated from *Cuphea carthagenensis*. *Planta Medica* 2024; 90(4): 276 – 280.
 19. Schuldt EZ, Ckless K, Simas ME, Farias MR, Ribeiro-Do-Valle RM. Butanolic fraction from *Cuphea carthagenensis* Jacq McBride relaxes rat thoracic aorta through endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2000; 35(2): 234 – 239.
 20. Biavatti MW, Farias C, Curtius F, Brasil LM, Hort S, Schuster L, Leite SN, Prado SRT. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93(2-3): 385 – 389.
 21. Dickel ML, Rates SM, Ritter MRJ. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109(1): 60 – 71.
 22. Wolf RB, Graham SA, Kleiman R. Fatty acid composition of *Cuphea* seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1983; 60(1): 103 – 104.
 23. Knapp SJ, Tagliani LA. Genetic variation for seed dormancy in *Cuphea laminuligera* and *Cuphea lanceolate*. *Euphytica* 1990; 47: 65 – 70.
 24. Dehesh K. How can we genetically engineer oilseed crops to produce high levels of medium-chain fatty acids?. *European Journal of Lipid Science Technology*. 2001; 103(10): 688 – 697.
 25. González AG, Valencia E, Siverio Exposito T, Bermejo Barrera J, Gupta MP. Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: A new triterpene from *C. carthagenensis* *Planta Medica* 1994; 60(6): 592 – 593.
 26. Santos DYAC, Salatino MLF, Salatino A. Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 1995; 23(1): 99 – 103.
 27. Chen LG, Yen KY, Yang LL, Hatano T, Okuda T, Yoshida T. Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D₁ and D₂, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Phytochemistry* 1999; 50(2): 307 – 312.
 28. Karonen M, Parker J, Agrawal A, Salminen J-P. First evidence of hexameric and heptameric ellagitannins in plants detected by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010; 24: 3151 – 3156.
 29. Santos SC, Waterman PG. Polyphenols from *Eucalyptus considiana* and *Eucalyptus viminalis*. *Fitoterapia* 2001; 72: 95 – 97.
 30. Saha S, Imran IB. Isolation, detection and quantification of hydrolysable tannins of the biosynthetic pathway by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2021; 35(5): e9005
 31. Yoshida T, Chou T, Matsuda M, Yasuhara T, Yazaki K, Hatano T, Nitta A, Okuda T. Woodfordin D and oenothien A, trimeric hydrolysable tannins of macro-ring structure with antitumor activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1991; 39(5):1157 – 1162.

32. Yoshida T, Chou T, Nitta A, Okuda T. Tannins and related polyphenols of Lythraceous plants. III- Hydrolyzable tannin oligomers with macrocyclic structures, and accompanying tannins from *Woodfordia fruticosa* Kurz. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1992; 40(8): 2023 – 2030.
33. Kadota S, Takamori Y, Nyein KN, Kikuchi T, Tanaka K, Ekimoto H. Constituents of the leaves of *Woodfordia fruticosa* Kurz. I. Isolation, structure, and proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance signal assignments of woodfruticosin (woodfordin C), an inhibitor of deoxyribonucleic acid topoisomerase II. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1990; 38(10) 2687 – 2697.
34. Sobolewska D, Owczarek A, Olszewska M, Paulino N, Podolak I, Pasko P, Wróbel-Biedrawa D and Michalska K. UHPLC-PDA-ESI-MS profile of phenolic compounds in the aerial parts of *Cuphea ingrata* Cham. & Schltld. Natural Products Research 2021; 36(6): 1 – 5.
35. Baert N, Karonen M, Salminen J-P. Isolation, characterization and quantification of the main oligomeric macrocyclic ellagitannins in *Epilobium angustifolium* by ultra-high- performance chromatography with diode array detection and electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 2015; 1419(Suppl 1): 26 – 36.
36. Karonen M, Ahern JR, Legroux L, Suvanto J, Engström MT, Sinkkonen J, Salminen J-P and Hoste H. Ellagitannins inhibit the exsheathment of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* larvae: The efficiency increases together with the molecular size. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2020; 68(14): 4176 – 4186.
37. Napolitano JG, Lankin DC, Chen S-N, Pauli GF. Complete ¹H-NMR spectral analysis of ten chemical markers of *Ginkgo biloba*. Magnetic Resonance in Chemistry Letters 2012; 50(8): 569 – 575.
38. Wawer I, Zielinska A. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. Magnetic Resonance in Chemistry 2001; 39(1-2): 374 – 380.
39. Parejo IF, Viladomat J, Bastidas G, Schmeda-Hirschmann J, Burillo C, Codina J. Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) waste. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2004; 52(7): 1890 – 1897.
40. Yang L-L, Xiao N, Li X-W, Fan Y, Alolga RN, Sun X-Y, Wang S-L, Li P, Qi L-W. Pharmacokinetic comparison between quercetin and quercetin 3-*O*- β -glucuronide in rats by UHPLC-MS/MS. Scientific Reports 2016; 6:35460
41. Barbosa LN, Lívero FA dos R, Prado TBL, Ribeiro R de CL, Lourenco ELB, Budel JM, de Souza LM, Acco A, Dalsenter PR, Junior AG. Atheroprotective effects of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. In New Zealand rabbits fed with chloresterol-rich diet. Journal of Ethnopharmacology 2016; 187: 134 – 145.
42. Schaedler MI, Palozi RAC, Tirloni CAS, Silva AO, Araújo V de O, Lourenco ELB, De Souza LM, Lívero FA dos R, Junior AG. Redox regulation and NO/cGMPplus K⁺ channel activation contributes to cardiorenal protection induced by *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. In ovariectomized hypertensive rats. Phytomedicine 2018; 51: 7 – 19.
43. Santos MC, Toson NSB, Pimentel MCB, Bordignon SAL, Mendez ASL, Henriques AT. Polyphenols composition from leaves of *Cuphea* spp. And inhibitor potential, in vitro, of angiotensin I-converting enzyme (ACE). Journal of Ethnopharmacology 2020; 255: 112781

44. Ismail WM, Ezzat SM, El-Mosallamy AEMK, El Deeb KS, El Fishawy AM. In vivo Antihypertensive activity and UHPLC-Orbitrap-HRMS profiling of *Cuphea ignea* A. DC. ACS Omega 2022; 7: 46524 – 46535.

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE QUANTIFICATION OF AMINO ACIDS IN THE FISH *Anisotremus scapularis* "Chita"

Anthony Ruiz Soto^{*a}, Leenin Flores Ramos^a, Alberto Isidoro Oscanoa Huaynate^a, Holger Jelimer Maldonado García^b

ABSTRACT

The *Anisotremus scapularis* "Chita" is a species that lives on the coast of Peru and is considered potential for fish farming. Studies on the amino acid profile have not yet been reported. The aim of this investigation was to develop an analytical method for the quantification of amino acids in lyophilized muscle from the Chita by HPLC-FL. To achieve this objective, the hydrolysis conditions were optimized, as a result, the HCl concentration, hydrolysis time and temperature were 6 M, 24 h and 100 °C respectively. The results of the most relevant performance parameters were: the linearity had a coefficient of determination ($R^2 > 0,999$), the accuracy showed that all amino acids did not exceed the bias of 15%. The recovery ranged from 97,08% to 102,44%. The coefficients of variation for repeatability and intermediate precision were ranging from 1,93% to 5,43% and 2,08% to 10,69% respectively. The LOD and LOQ were ranging from 0,002 to 0,014 g/100 g and 0,005 to 0,043 g/100 g respectively. The robustness showed that the method is sensible to changes to the studied factors. Finally, the method met the majority of acceptance criteria, and it is suitable for the analysis of amino acids in Chita.

Keywords: Optimization, Derivatization, Reference material, Box-Behnken, *Anisotremus scapularis*.

VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN EL PEZ *Anisotremus scapularis* "Chita"

RESUMEN

El pez *Anisotremus scapularis* "Chita" es una especie que habita en la costa de Perú y se considera potencial para la acuicultura. Los estudios sobre el perfil de aminoácidos aún no han sido reportados. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método analítico para la cuantificación de aminoácidos en músculo liofilizado de Chita mediante HPLC-FL. Para lograr este objetivo, se optimizaron las condiciones de hidrólisis, resultando una concentración de HCl de 6 M, un tiempo de hidrólisis de 24 horas y una temperatura de 100 °C. Los resultados de los parámetros de rendimiento más relevantes fueron los siguientes: la linealidad presentó un coeficiente de determinación ($R^2 > 0,999$),

^a Laboratorio de Análisis Instrumental, Instituto del Mar del Perú, Esquina Gamarra y General Valle S/N – 07021, Callao, Perú, aruiz@imarpe.gob.pe

^b Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. República de Venezuela S/N, Lima 15081, Lima, Perú.

la veracidad mostró que todos los aminoácidos no superaron un sesgo del 15%. La recuperación varió del 97,08% al 102,44%. Los coeficientes de variación para la repetibilidad y la precisión intermedia variaron del 1,93% al 5,43% y del 2,08% al 10,69%, respectivamente. El LOD y LOQ oscilaron entre 0,002 y 0,014 g/100 g y entre 0,005 y 0,043 g/100 g, respectivamente. La robustez mostró que el método es sensible a cambios en los factores estudiados. Finalmente, el método cumplió con la mayoría de los criterios de aceptación y es adecuado para el análisis de aminoácidos en Chita.

Palabras clave: Optimización, Derivatización, Material de referencia, Box-Behnken, *Anisotremus scapularis*.

INTRODUCTION

Since the 1970s, the most trustful analytical technique for the quantification of amino acids is the high-performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase coupled with a detector of fluorescence, ultraviolet or mass spectrometry, due to his great precision and high detection sensitivity¹.

Over the years, the analytical laboratories have developed different analytical methods for the amino acids analysis in food and feed products by HPLC. These methods generally include the derivatization pre-column or post-column. Some of the best known derivatizing reagents are the o-phthalaldehyde (OPA), 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC), phenyl isothiocyanate (PITC), ninhydrin, etc². However, some of these reagents present disadvantages such as the lack of reactivity with secondary amino acids and the instability of the formed fluorescent products. In the early 1990s, Cohen and Michaud³ developed a pre-column derivatization method, and they used a novel derivatizing reagent 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) for amino acids. The advantages of AQC are that it reacts with primary and secondary amines, its derivatized products are stable, they are highly fluorescent, they have a fast kinetic reaction and present low matrix interference^{4,5}.

Additionally, according to current international standards, the developed methodologies must be validated to meet specifications regarding the intended use of analytical results^{6,7}. Thus, the International Organization for Standardization (ISO), Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Eurachem, Association of Official Analytical Collaboration (AOAC International), the Codex Alimentarius, the US Pharmacopeia (USP) and others, recommend the validation of the analytical method by evaluating the performance parameters, such as the accuracy, precision, specificity, linearity, detection limit, quantification limit, sensibility and robustness⁸⁻¹¹.

Worldwide, the fishing and aquaculture industry have incremented their production levels due to the high demand for food, reaching a historical maximum of 179 million tons in the year 2018, where the aquaculture represented a total production of 46%, and 88% of that was used for direct human consumption, registering a per capita consumption of 20,5 kg, promoting the global efforts directed to eradicate hunger and malnutrition¹².

The Plan Nacional de Desarrollo Acuícola – (DS N°30-2001-PE)¹³ and the Programa Nacional de Ciencia, Desarrollo Tecnológico e Innovación en Acuicultura 2013-2021 (C+DT+i)¹⁴ indicate that, in Peru, the aquaculture has experimented a sustained growth, letting the supply of aquatic species such as shrimp (*Penaeus vannamei*), Peruvian scallop (*Argopecten purpuratus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and tilapia (*Oreochromis*

niloticus). These represent around 95% of the total market production, having an important contribution towards the country's economy and the human nutrition. Additionally, the law N° 27460, "Ley de promoción y desarrollo de la acuicultura"¹⁵, establishes the need to support research for the technological development of aquaculture based on species with potential for cultivation and commercialization. For this reason, IMARPE has developed research projects in the fish aquaculture of "chita" (*Anisotremus scapularis*), "lenguado" (*Paralichthys adspersus*) and "cabrilla" (*Paralabrax humeralis*) since 2013¹⁶.

Particularly, the "Chita" is considered a specie with high aquaculture potential and is one of the principal specie that sustain the traditional coastal fishery in Peru. The "Chita" has a high commercial value and great demand for the direct human consumption due to its delicious taste. Moreover, it has a good nutritional quality, due to its high concentration of proteins and polyunsaturated fatty acids, such as eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA)¹⁷. A critical point to achieve the cultivation of this specie is the evaluation of the quality of the protein, and therefore, the objective of this work was to develop and validate an analytical method, with the goal of obtaining a method for quantification of amino acids in the fish *Anisotremus scapularis* "Chita" by HPLC-FL according to the Peruvian guideline for validation INACAL DA-acr-20D:2017.

EXPERIMENTAL PART

Chemicals and reagents

The 17 amino acids (AAs) mixture standard (code AAS18) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). It contained 2,5 µmol/mL of each amino acid: L-alanine (Ala), ammonium chloride, L-arginine (Arg), L-aspartic acid (Asp), L-glutamic acid (Glu), L-glycine (Gly), L-histidine (His), L-isoleucine (Ile), L-leucine (Leu), L-lysine (Lys), L-methionine (Met), L-phenylalanine (Phe), L-proline (Pro), L-serine (Ser), L-threonine (Thr), L-tyrosine (Tyr), L-valine (Val), except L-cystine, which contained a concentration of 1,25 µmol/mL. The internal standard L-2-aminobutyric acid (Aab) (code A1879) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). The derivatizing reagent AQC, AccQ-Fluor™ reagent kit (code WAT052880) was purchased from Waters Corporation (Milford, MA, USA). The type 1 water was provided by a purification system Barnstead™ EASYpure™ II (Dubuque, USA). The sodium acetate anhydrous ACS® grade and the phosphoric acid 85% ACS® grade were obtained by Merck® (Darmstadt, Alemania). The acetonitrile HPLC grade was purchased by J.T.Baker (California, USA) and the hydrochloric acid fuming 37% ACS® grade was obtained by Supelco (Darmstadt, Germany).

Biological sample and pretreatment

The fish *Anisotremus scapularis* "Chita" was provided by the Laboratorio de cultivo de peces of IMARPE. The samples were processed according to the procedure of the Department for Environmental Protection of Kentucky-USA¹⁸. The fish fillet of 2 cm was lyophilized in a freeze-dryer Labconco (Kansas, USA) at a vacuum pressure between 0,022-0,070 mbar. The collector temperature was -56 °C. The temperature ramp was -15 °C, for 8 h; then 0,5 °C/min, until 5 °C, for 15 h; and finally 0,5 °C/min until 25 °C, for

7 h. The sample was homogenized, placed in a sample bag and stored at -20 °C in a freezer Egiasac (Lima, Peru) until analysis.

Hydrolysis

An amount of $10,00 \pm 0,50$ mg of lyophilized sample was weighted in a 13x100 mm glass tube and 2 mL of HCl 6 M was added. The sample was hydrolyzed at 100 °C for 24 h in a thermoblock ThermoScientific (China). An aliquot of 50 μ L of the hydrolyzed sample was transferred to a 16 x 100 mm glass tube, then 100 μ L of internal standard Aab 2,5 mM and 4850 μ L of water were added. The final solution was filtered in a polytetrafluoroethylene (PTFE) syringe filter of 0,45 μ m.

Derivatization

An amount of 10 μ L of hydrolyzed sample was derivatized according to the instructions of the reagents kit AccQ.Fluor™^{19,20}. The concentration of the amino acids was calculated using the following equation:

$$C_{AA} \text{ (g / 100 g)} = \frac{C_m \times V_e \times V_f \times PM}{W_s \times V_a \times 10000000} \quad (1)$$

Where C_{AA} is the amino acid concentration from the lyophilized sample, C_m is the amino acid concentration from the calibration curve (pmol/ μ L), PM is the amino acid molecular weight, V_e is the HCl 6 M volume (mL), V_a is the aliquot volume (mL), V_f is the final dilution volume from the aliquot (mL) and W_s is the sample weight (g).

Chromatography method

The separation of amino acids was performed according to the AccQ-Tag method²¹ with certain modifications. The HPLC system LaChrom Elite® (Tokyo, Japan) had a fluorescence detector Hitachi L-2485. The analytical column was ThermoScientific™ Hypersil GOLD C18, 5 μ m, 150 mm x 4,6 mm (Lithuania) with a guard column ThermoScientific™, Hypersil GOLD, 5 μ m, 10 x 4 mm (Lithuania). The mobile phase consisted in water (A), a solution of sodium acetate 19 g/L at pH of $5,10 \pm 0,01$ adjusted with phosphoric acid 85% (B) and acetonitrile (C), the gradient elution is shown in table 1. The flow was 1 mL/min, the column temperature was set at 37 °C, the injection volume was 5 μ L, the excitation and emission wavelength were 250 nm and 395 nm respectively. The data processing from these experiments was performed with the software EZChrom Elite 3.2.1 (Agilent). The amino acids identified were Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr and Val. The applied analytical technique was not able to identify the amino acids asparagine, glutamine, cysteine, methionine and tryptophan (Asn, Gln, Cys, Met and Trp).

Optimization of the hydrolysis

Box-Behnken response surface methodology was applied to maximize the amino acid concentration in the fish sample. The factors in the experimental design were the Temperature (100, 110 and 120 °C), Hydrolysis time (8, 16 and 24 hours) and HCl concentration (3, 6 and 9 M). The experimental design consisted in 15 completely randomized runs with two replicates.

Method Validation

The developed method was validated according to Peruvian guideline for validation INACAL DA-acr-20D:2017⁷, which are based on the study of the following performance parameters such as accuracy, recovery, precision, selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and robustness.

Accuracy

Twenty replicates of the certified reference material of soy flour code SRM 3234 NIST (Gaithersburg, USA) was analyzed to compare the amino acid concentration. The %bias was calculated according to the equation 2, and a percentage lower than 15% was proposed as acceptance criteria²². The certified reference material of soy flour was chosen, since there is no reference material of the fish muscle matrix to quantify the concentration of amino acids.

$$\% \text{Bias} = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \times 100\% \quad (2)$$

Where \bar{x} is the average of all the measurements and μ is the accepted reference value.

Recovery

The hydrolyzed sample of 50 μL was fortified by triplicate in 3 concentration levels corresponding to the 25, 50 and 75% of the estimated amino acid concentration in the sample. The percentage recovery was calculated following the equation 3. It was proposed as acceptance criteria the theoretical range of 97-103% according to FAO/WHO¹¹ and NMKL²³.

$$R (\%) = \frac{C_f - C_m}{C_a} \times 100\% \quad (3)$$

Where C_f is the fortified amino acid concentration (pmol/ μL), C_m is the original amino acid concentration (pmol/ μL) and C_a is the added amino acid concentration (pmol/ μL).

Precision

The instrumental precision was evaluated by injecting the same sample four times. The repeatability was evaluated analyzing the sample twenty times, and the result was expressed as a percentage of the relative standard deviation (%RSDr). It was proposed as acceptance criteria a maximum %RSDr of 5%^{24,25}.

The within-laboratory reproducibility was evaluated analyzing the sample by triplicate around 5 different days with 2 analysts and the relative standard (%RSD_{RW}) was calculated according to the guidelines NTP-ISO 5727-2:2021²⁶. It was proposed as acceptance criteria a maximum %RSD_{RW} of 15%²⁷.

Selectivity

100 μL of the specific interference Aab 2,5 mM was added to the sample, the influence of Aab in the separation of the analytes was determined by calculating the differences in the retention time of the peaks before and after the addition of Aab. The resolution for each analyte was calculated according to the following equation:

$$R_s = \frac{2 \times \Delta t}{w_1 + w_2} \quad (4)$$

Where Δt is the difference of the retention time of both near peaks and w is the width of both peaks. AOAC International recommended that a good value of R_s between both peaks would have to be at least 1,5, and 1 is the minimal usable separation¹⁰.

Linearity

The calibration curve was prepared in six levels of amino acid standard solutions with 4 replicates for each level. The concentrations of the calibration standards were 5, 12,5, 25, 37,5, 50 and 100 μM . The acceptance criteria for the linearity was a coefficient of determination (R^2) of at least 0,99²⁸.

Limit of detection and quantification

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated according to the equations 5 and 6²⁹: $\text{LOD} = 3,3s_b/m$ (5) and $\text{LOQ} = 10s_b/m$ (6). Where m is the slope of the calibration curve and s_b is the intercept error. According to the laboratory requirements, the acceptance criteria for LOQ was established at 0,1 g/100g.

Robustness

The fractional factorial design 2^{7-4} of resolution III was performed with seven factors, two center points and two levels. The factors were: column temperature (35, 37 and 39 $^{\circ}\text{C}$), pH of the mobile phase B (5,0, 5,1 and 5,2), excitation wavelength (245, 250 and 255 nm), emission wavelength (390, 395 and 400 nm), flow (0,9, 1,0 and 1,1 mL/min), injection volume (4, 5 and 6 μL) and sample weight (9, 10 and 11 mg).

Statistical analysis

The data analysis was performed in the software Minitab 19. The analysis of variance (ANOVA), t -student was used at a significance level of $\alpha=0,05$. The outliers were identified using the Grubbs, Cochran or Mandel's k and h consistency according the guidelines NTP-ISO 5727-2:2021²⁶.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the hydrolysis

The Box-Behnken response surface design was used to optimize hydrolysis factors such as Temperature, Hydrolysis time and HCl concentration, in order to maximize the concentration of amino acids in fish sample. The thirty experimental runs were conducted in random order, with six center points, and the results are shown in Table 1. The results

presented in Table 1 indicate that the concentration for the case of the amino acid Ile ranged from 2.56 to 4.80 g/100 g respect to the experimental runs used.

Table 1. Box-Behnken design (BBD) and responses for the optimization of hydrolysis.

| Run | Coded level | | | Uncoded level | | | Amino acids (g/100 g) ^a | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Asp | Glu | Ser | Gly | His | Arg | Thr | Ala | Pro | Tyr | Val | Lys | Ile | Leu | Phe |
| 1 | -1 | 0 | 1 | 100 | 16 | 9 | 9,25 | 13,68 | 3,69 | 5,07 | 1,75 | 6,06 | 3,76 | 5,33 | 2,85 | 2,77 | 3,56 | 8,18 | 3,54 | 6,63 | 3,57 |
| 2 | 1 | 0 | -1 | 120 | 16 | 3 | 9,24 | 13,77 | 3,19 | 4,58 | 1,88 | 6,07 | 3,61 | 5,19 | 2,61 | 2,88 | 4,41 | 8,33 | 4,39 | 6,94 | 3,67 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 100 | 24 | 6 | 9,06 | 13,63 | 3,52 | 4,82 | 1,85 | 6,02 | 3,71 | 5,17 | 2,77 | 2,66 | 4,19 | 8,20 | 4,14 | 6,74 | 3,60 |
| 4 | 0 | 1 | 1 | 110 | 24 | 9 | 9,94 | 14,85 | 3,56 | 4,91 | 2,04 | 6,39 | 3,96 | 5,54 | 2,77 | 3,08 | 4,73 | 9,04 | 4,66 | 7,40 | 3,91 |
| 5 | 1 | 0 | 1 | 120 | 16 | 9 | 9,25 | 13,81 | 3,26 | 4,79 | 1,91 | 6,25 | 3,63 | 5,20 | 2,59 | 2,86 | 4,40 | 8,47 | 4,43 | 6,97 | 3,71 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 110 | 16 | 6 | 9,21 | 13,73 | 3,50 | 4,59 | 1,84 | 6,10 | 3,74 | 5,15 | 2,61 | 2,88 | 4,07 | 8,52 | 4,11 | 6,84 | 3,63 |
| 7 | -1 | -1 | 0 | 100 | 8 | 6 | 8,04 | 9,74 | 2,81 | 4,18 | 1,04 | 4,26 | 2,31 | 4,25 | 2,15 | 2,15 | 1,59 | 7,23 | 2,13 | 4,41 | 2,44 |
| 8 | 0 | 1 | -1 | 110 | 24 | 3 | 9,19 | 13,78 | 3,16 | 4,56 | 1,89 | 5,84 | 3,61 | 5,16 | 2,61 | 2,71 | 4,49 | 8,68 | 4,51 | 6,96 | 3,70 |
| 9 | 0 | -1 | 1 | 110 | 8 | 9 | 9,46 | 12,88 | 3,59 | 4,52 | 1,44 | 5,17 | 3,39 | 5,13 | 2,42 | 2,79 | 2,59 | 8,08 | 2,63 | 6,07 | 3,26 |
| 10 | 0 | -1 | -1 | 110 | 8 | 3 | 9,21 | 12,59 | 3,43 | 4,40 | 1,42 | 5,09 | 3,29 | 5,00 | 2,42 | 2,69 | 2,53 | 7,87 | 2,56 | 5,83 | 3,12 |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 120 | 24 | 6 | 9,72 | 14,54 | 3,15 | 4,78 | 2,01 | 6,17 | 3,71 | 5,40 | 2,72 | 3,00 | 4,68 | 8,99 | 4,80 | 7,26 | 3,91 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 120 | 8 | 6 | 10,29 | 14,82 | 3,93 | 4,89 | 1,84 | 5,97 | 3,93 | 5,64 | 2,87 | 2,98 | 3,52 | 8,78 | 3,50 | 7,09 | 3,83 |
| 13 | -1 | 0 | -1 | 100 | 16 | 3 | 9,40 | 13,91 | 3,70 | 4,65 | 1,81 | 6,10 | 3,83 | 5,24 | 2,67 | 2,82 | 3,66 | 8,51 | 3,75 | 6,79 | 3,68 |

^aThe results were presented as the average of two replicates (n=2), except the center point (n=6).

X₁: Temperature (°C), X₂: Hydrolysis time (min), X₃: HCl concentration (M).

The analysis of variance (ANOVA) of the Box-Behnken design for the amino acid Ile is shown in Table 2. The factors, temperature, hydrolysis time, (HCl concentration)², (Hydrolysis time)² and the interaction (Temperature*Hydrolysis time) presented significant differences (p-value<0,05). The quadratic polynomial model is the one that adjusts better (R²=0,9883). Additionally, the lack of fit is not statistically significant (p-value= 0,442>0,05), which indicates that the specified model adjusts properly to the data. Therefore, the quadratic model from the response surface design for the amino acid Ile establishes a relationship between the concentration of Ile (dependent variable) and the factors (independent variables): Temperature (X₁), Hydrolysis time (X₂), and HCl concentration (X₃), as represented by the following equation:

$$\text{Ile (g/100 g)} = 4.1391 + 0.4117*X_1 + 0.8943*X_2 - 0.0365*X_3 - 0.4715 X_2^2 - 0.1358*X_3^2 - 0.2495*X_1*X_2 + 0.0624*X_1*X_3 - 0.0653*X_2*X_3 \quad (7)$$

Table 2. ANOVA of Box-Behnken design for amino acid Isoleucine.

| Source | Degree of freedom | Sum of squares | Mean square | F-value | p-value |
|--------------------------------|-------------------|----------------|-------------|---------|--------------|
| Model | 8 | 16,2464 | 2,03080 | 189,48 | 0,000 |
| X ₁ | 1 | 12,0035 | 4,00117 | 210,83 | 0,000 |
| X ₂ | 1 | 2,2596 | 2,25957 | 889,26 | 0,000 |
| X ₃ | 1 | 9,5307 | 9,53072 | 1,81 | 0,195 |
| X ₂ ² | 1 | 0,0194 | 0,01944 | 133,60 | 0,000 |
| X ₃ ² | 1 | 1,5293 | 0,76463 | 11,34 | 0,003 |
| X ₁ *X ₂ | 1 | 1,4319 | 1,43191 | 33,18 | 0,000 |
| X ₁ *X ₃ | 1 | 0,1216 | 0,12156 | 2,91 | 0,105 |
| X ₂ *X ₃ | 1 | 0,4153 | 0,13842 | 2,66 | 0,120 |
| Error | 18 | 0,3556 | 0,35563 | | |
| Lack of Fit | 4 | 0,0311 | 0,03114 | 1,00 | 0,442 |
| Pure Error | 14 | 0,0285 | 0,02849 | | |
| Total | 26 | 0,1929 | | | |
| R ² = 0,9883 | | | | | |

Additionally, the Table 2 shows that the pure error sum of squares (0,0285) is less than the total sum of squares (0,1929), indicating the correct reproducibility of the evaluated central point³⁰. On the other hand, the coefficient of determination (R²) introduced a value of 0.9883, establishing that 98.83% of the variability of the results is explained by the model proposed that a good R² should be greater than 0.8³¹, demonstrating that the quadratic model is optimal for predicting the concentration of the amino acid Ile in fish samples.

Based on the quadratic model from equation 7, the 3D surface plots (Figure 1) were developed to represent the relationship between the independent variables and the response variable (Isoleucine concentration).

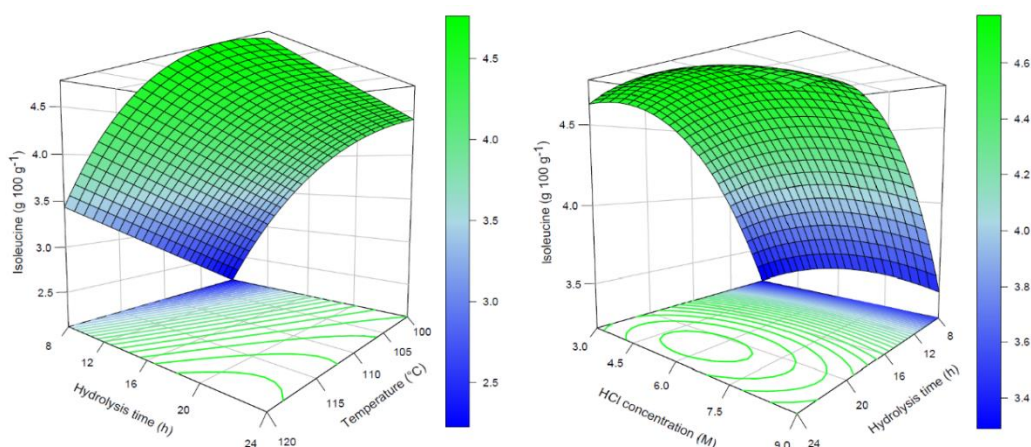


Figure 1. Left: Surface plot of isoleucine concentration vs temperature, hydrolysis time, HCl concentration=6 M. Right: Surface plot of isoleucine concentration vs HCl concentration, hydrolysis time, Temperature= 120 °C.

On the left side of Figure 1, the presence of a quadratic model due to the curvature in the levels of the Hydrolysis time factor can be observed. In contrast, the temperature levels presented a linear model with a maximum concentration of Ile at its highest level (120 °C). However, for the rest of the amino acids, the maximum concentration occurred at the lowest temperature level (100 °C) except for Val (Table 3).

On the other hand, on the right side of Figure 1, the presence of a quadratic model is also shown due to the presence of a curvature in the concentration levels of the HCl concentration factor, where the highest concentration of Ile is found at the center level (~ 6 M).

According to the experimental results, the HCl concentration factor did not present significant differences (p value > 0.05) for the rest of the amino acids: Asp, Glu, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Lys and Leu as shown in Table 3. Consequently, it was obtained that the maximum concentration in majority of AAs was obtained through the following hydrolysis conditions: HCl concentration 6 M, hydrolysis time 24 h and temperature 100 °C except for Ile, Arg and Val. The HCl concentration 6 M is reported by many authors in different matrix of fishes such as, grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and catfish (*Ictalurus punctatus*)^{32,33} and food^{34,35,36}. Besides, the hydrolysis time of 24 h is reported by different studies for the quantification of amino acids in muscle of the snakehead fish (*Channa striatus*)³⁷, catfish (*Sperata seenghala*)³⁸ and feed³⁴. Additionally, the temperature depends on the ratio HCl volume/sample weight, obtaining values from 100 to 120 °C for different matrix of food³⁹. The temperature of 100 °C is in the range of 105 ± 5 °C reported in the article about the quantification of amino acids in tissue's fish of Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*)⁴⁰.

Table 3. Optimum values of hydrolysis.

| Amino acid | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
|------------|----------------|----------------|----------------|
| Asp | 100 | 24 | N.S |
| Glu | 100 | 24 | N.S |
| Ser | 100 | 24 | N.S |
| Gly | 100 | 24 | N.S |
| His | 100 | 24 | N.S |
| Arg | 100 | 17 | N.S |
| Thr | 100 | 24 | N.S |
| Ala | 100 | 24 | N.S |
| Pro | 100 | 24 | N.S |
| Tyr | 100 | 24 | N.S |
| Val | 120 | 12 | N.S |
| Lys | 100 | 24 | N.S |
| Ile | 120 | 17 | 6 |
| Leu | 100 | 24 | N.S |
| Phe | 100 | 24 | N.S |

X₁: Temperature (°C), X₂: Hydrolysis time (min), X₃: HCl concentration (M), N.S: No significance

Method Validation

The elution profile of 15 AAs derivatized with AQC and separated on the Hypersil GOLD C-18 column with fluorescence detection is shown in Figure 2. The chromatographic separation was optimal for all the AAs analyzed.

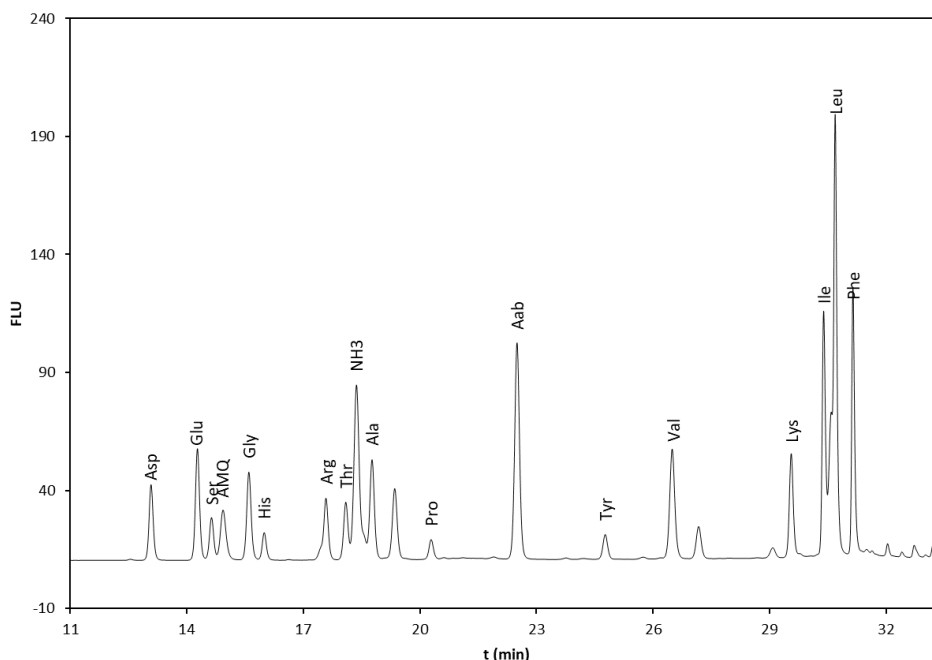


Figure 2. Typical amino acid chromatogram of tissue fish *Anisotremus Scapularis* "Chita".

The results of method validation are shown below. First, the type of distribution of the data obtained from 30 repetitions was evaluated using the Anderson-Darling test. Our results indicated that the data obtained from all AAs studied presented a normal distribution (p value > 0.05)⁴¹.

Accuracy was assessed by the bias percentage of each amino acid as shown in Table 4. A certified reference material (CRM) for the studied matrix was not available on the market, for this reason, the soy flour was chosen as a reference sample for the accuracy. According to our results, the % bias for all AAs were less than 15%. These results comply with the acceptance criteria proposed²². Similar values of bias% were reported for other authors ranging from (-12.84% to 12.37%)⁴², (2.3% to 11%)² and (1.86% to 12.85%)⁴³, respectively.

On the other hand, accuracy was evaluated using spiked samples. The table 4 shows the recovery values of each amino acid. Satisfactory recovery rates were obtained for all AAs, ranging from 97.08% to 102,44%. These recoveries are within the acceptance range (97-103%), according to Codex Alimentarius¹¹, AEFI⁴⁴ and AOAC International⁴⁵ fulfilling the veracity of the method. Our results had less dispersion than that described by other authors, introducing recoveries between (87 to 104%)² and (90 to 110%)⁴⁶, respectively. In addition, the Student's t-test indicated that there is no significant difference between the mean recovery and 100% for all AAs.

Table 4. Percentage recovery, bias percentage, precision expressed in relative standard deviation percentage and selectivity of each amino acid.

| Amino acid | Recovery | | Accuracy | | Precision | | Selectivity | | |
|------------|----------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|------|----------------|
| | R (%) (n=3) | t _{exp} ^a | %Bias (n=20) | Instrumental (n=4) | RSD _r (%) (n=20) | RSD _{RW} (%) (n=3) | Δt _R | ΔA | R _s |
| Asp | 97,08 ± 3,75 | 1,31 | -3,58 | 0,68 | 2,51 | 2,79 | 0,01 | 0,02 | 3,01 |
| Glu | 97,20 ± 4,27 | 1,10 | -8,37 | 0,58 | 2,26 | 2,44 | 0,00 | 0,01 | 1,07 |
| Ser | 100,08 ± 2,27 | 0,06 | -0,61 | 0,37 | 2,64 | 10,69 | 0,00 | 0,02 | 0,69 |
| Gly | 102,44 ± 3,61 | 1,20 | -4,41 | 0,46 | 2,60 | 5,39 | 0,00 | 0,01 | 1,02 |
| His | 100,42 ± 0,74 | 0,99 | 2,03 | 0,59 | 2,24 | 2,34 | 0,00 | 0,00 | 4,42 |
| Arg | 100,33 ± 1,45 | 0,40 | 9,61 | 0,51 | 2,98 | 6,26 | 0,00 | 0,06 | 4,97 |
| Thr | 101,80 ± 1,33 | 2,39 | -0,98 | 0,22 | 2,33 | 3,19 | 0,00 | 0,04 | 0,83 |
| Ala | 100,48 ± 2,27 | 0,37 | -3,65 | 0,27 | 2,47 | 9,34 | 0,00 | 0,00 | 1,26 |
| Pro | 99,01 ± 1,48 | 1,15 | -6,12 | 1,76 | 2,13 | 5,85 | 0,00 | 0,03 | 4,92 |
| Tyr | 99,23 ± 1,49 | 0,89 | -13,26 | 1,47 | 5,43 | 7,42 | 0,02 | 0,02 | 3,92 |
| Val | 100,44 ± 1,97 | 0,39 | -11,15 | 0,60 | 1,93 | 2,08 | 0,02 | 0,02 | 1,50 |
| Lys | 101,95 ± 3,70 | 0,93 | 1,63 | 1,70 | 3,03 | 3,30 | 0,01 | 0,28 | 1,85 |
| Ile | 101,34 ± 1,98 | 1,19 | -1,96 | 1,79 | 3,40 | 4,41 | 0,01 | 0,18 | 1,06 |
| Leu | 101,16 ± 0,76 | 2,67 | -6,47 | 1,49 | 3,24 | 4,88 | 0,01 | 0,09 | 1,38 |
| Phe | 100,63 ± 1,24 | 0,89 | -2,33 | 1,88 | 2,92 | 4,15 | 0,01 | 0,12 | 1,56 |

^at_{exp} < t_{crit} (α=0,05) = 4,30

Δt_R: Difference in the amino acid retention time (min) before and after the addition of Aab.

ΔA: Difference in the amino acid percentage area before and after the addition of Aab.

R_s: Resolution.

The precision was measured as repeatability and intermediate precision. The RSD (%) of repeatability and intermediate precision is summarized in Table 4. The instrumental precision was within 1,88%, similar values were reported in the literature with RSD ranging from 0.04 to 1.28%⁴⁷. The repeatability for all AAs was within 5,43%, these similar values are reported in other validation studies^{24,46,48}. The within-laboratory reproducibility for all AAs was within 10,69%, complying with the acceptance criteria (%RSD < 15%)²⁷ and similar to the values reported by other authors^{2,49,50,48}. The precision values reported in the literature are similar to obtained here, using the same derivatizing reagent, fulfilling with the proposed acceptance criteria.

The selectivity, according to EURACHEM, is the extent to which the method can be used to determine particular analytes in mixtures or matrices without interferences from other components of similar behavior⁹. Selectivity was determined by comparing the sample chromatograms respect to the sample chromatogram with the addition of the internal standard Aab. As shown in Figure 3, the amino acid chromatogram was not affected by the addition of the internal standard Aab. Hence, the validated method is selective for the amino acids analyzed in presence of the internal standard Aab.

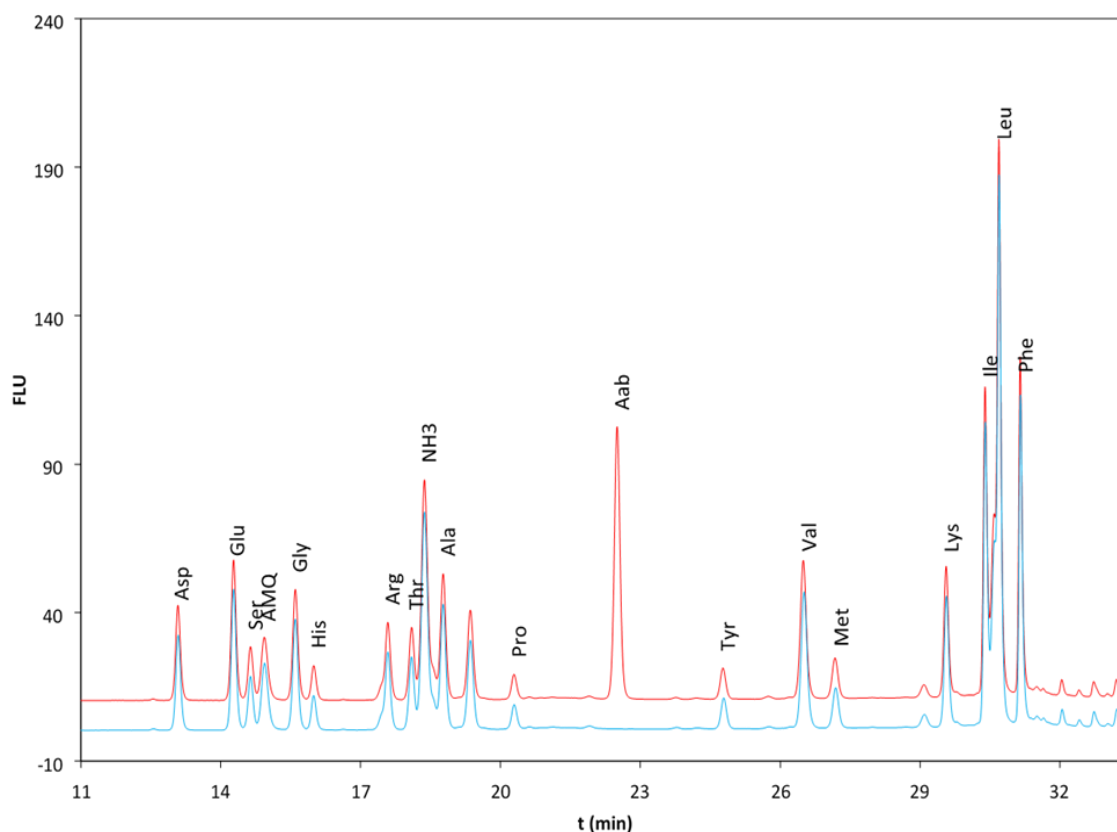


Figure 3. Chromatogram of amino acid analyses in fish *Anisotremus Scapularis* “Chita”. Red line: sample with internal standard and blue line: sample without internal standard.

Furthermore, as can be seen in Table 4, it shows a minimal difference of retention time (0,02 min) for Tyr and Val, and (0,00 min) for the rest of AAs. Moreover, it was found that the difference in the percentage area of the chromatogram peak is lower than 0,28%. These results are similar to other validation study using AQC derivatizing reagent in gelatin. The authors obtained Δt_R between 0.06 to 0.13 min higher than our results (0,00-0,02 min). Similarly, they obtained ΔA between 0,00 to 0,54%, higher than our results of 0,28%⁵¹.

Good chromatographic separation was achieved with $R_s > 1.5$ for most of the AAs. However, acceptable R_s (1.0-1.5) were obtained for Glu, Gly, Ala, Ile and Leu. Figure 2 shows that most AAs had well-defined peaks, except for Ser and Thr with $R_s < 1$, due to overlapping chromatographic peaks by the presence of secondary products in the reaction such as AMQ (6-Aminoquinolone) and NH_3 (ammonia)^{5,52}. Other authors reported values of $R_s > 0.8$ for the separation of AAs by HPLC using AQC derivatizing reagent^{53,54}.

The linearity was tested on concentration range of 5–100 μM . Each concentration was prepared with four replicates. Linearity was evaluated by the correlation coefficient (R^2) of the regression line. The Table 5 show that the coefficient of determination (R^2) for all AAs is greater than 0,990 and the intercepts were close to zero, indicating excellent linearity and fulfilling the proposed acceptance criteria ($R^2 > 0,99$)^{28,55}. Similarly, in validation studies, other authors reported R^2 greater than 0,990^{53,56}. Moreover, the F test for each amino acid presented values greater than $F_{crit} = 7,71$, showing that the slope is different from zero. As estimated from the calibration curve, the LOD and LOQ values

were in the range of 0,002 - 0,014 g/100 g and 0,005 - 0,043 g/100 g, respectively (Table 5). The highest LOD and LOQ were registered for Phe (0,014 - 0,043 g/100 g), while the lowest values were registered for Gly (0,002 - 0,005 g/100 g). These values of LOD and LOQ obtained in this work are similar to those previously reported by other authors using AQC derivatizing reagent with fluorescence detection, ranging from 0,0002 to 0,1570 g/100 g and 0,006 to 0,5230 g/100 g, respectively^{2,46,57}. Hence, the present method is sensitive to detect low concentrations of these AAs.

Table 5. Linearity parameters, limits of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ).

| Amino acid | Regression equation ^a | Range (µM) | Coefficient of determination (R ²) | Slope (m) | Intercept | LOD (g/100 g) | LOQ (g/100 g) | F-value ^b |
|------------|----------------------------------|------------|--|-----------|-----------|---------------|---------------|----------------------|
| Asp | $y = 0,4375x - 0,00003$ | 5-100 | 0,9999 | 0,437 | 0,0000 | 0,008 | 0,023 | 31159,9 |
| Glu | $y = 0,4815x - 0,0002$ | 5-100 | 0,9999 | 0,482 | -0,0002 | 0,008 | 0,024 | 36801,0 |
| Ser | $y = 0,6054x + 0,0005$ | 5-100 | 0,9999 | 0,605 | 0,0005 | 0,004 | 0,013 | 58044,5 |
| Gly | $y = 0,583x + 0,0098$ | 5-100 | 1,0000 | 0,583 | 0,0098 | 0,002 | 0,005 | 220327,6 |
| His | $y = 0,8517x + 0,00003$ | 5-100 | 0,9999 | 0,852 | 0,0000 | 0,007 | 0,023 | 44498,4 |
| Arg | $y = 0,8419x - 0,0029$ | 5-100 | 0,9999 | 0,842 | -0,0029 | 0,010 | 0,031 | 30659,5 |
| Thr | $y = 0,8049x + 0,0015$ | 5-100 | 1,0000 | 0,805 | 0,0015 | 0,004 | 0,011 | 118907,0 |
| Ala | $y = 0,7614x + 0,00009$ | 5-100 | 0,9999 | 0,761 | 0,0001 | 0,005 | 0,017 | 27070,6 |
| Pro | $y = 0,3621x + 0,0015$ | 5-100 | 0,9999 | 0,362 | 0,0015 | 0,005 | 0,017 | 45119,1 |
| Tyr | $y = 0,7358x - 0,002$ | 5-100 | 0,9999 | 0,736 | -0,0020 | 0,010 | 0,029 | 35677,6 |
| Val | $y = 1,3021x + 0,0009$ | 5-100 | 0,9999 | 1,302 | 0,0009 | 0,007 | 0,020 | 31321,0 |
| Lys | $y = 0,6985x + 0,0044$ | 5-100 | 0,9999 | 0,698 | 0,0044 | 0,009 | 0,027 | 28541,7 |
| Ile | $y = 2,1208x + 0,011$ | 5-100 | 0,9997 | 2,121 | 0,0110 | 0,012 | 0,036 | 12748,0 |
| Leu | $y = 2,2313x + 0,0034$ | 5-100 | 0,9997 | 2,231 | 0,0034 | 0,011 | 0,033 | 14656,1 |
| Phe | $y = 3,1108x + 0,0115$ | 5-100 | 0,9997 | 3,111 | 0,0115 | 0,014 | 0,043 | 14007,4 |

The ruggedness (robustness) of an analytical procedure, according to EURACHEM is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method parameters. Ruggedness provides an indication of the method's reliability during normal usage⁹.

Previous studies have revealed that a good chromatography resolution requires stringent control in different factors such as, pH of mobile phase, mobile phase composition and organic solvent concentration^{58,59,60}. For this reason, small changes in seven factors were studied as shown in Table 6. The amino acids Asp and Glu were only sensitive to changes in the excitation and emission wavelengths, so they were more robust compared to others. In contrast, the amino acids Ser, Gly, His, Thr, Ala, Ile and Leu were sensitive to changes all the factors, due to the overlapping of some amino acid with the secondary products in the reaction, such as, 6-aminoquinoline (AMQ) and NH₃^{5,52,61}. Also, Cohen & Michaud³ reported that the separation of polar amino acids and AMQ depended completely on the pH, with AMQ eluting in the middle of the chromatogram under alkaline conditions of mobile phase. In this method, the peak of AMQ elute between Ser and Gly as shown in Figure 2. Other studies mentioned that the factors such as pH and temperature of column play an important role in the resolution and separation of the AAs⁶².

Table 6. Summary of the effects for each parameter.

| Amino acid | Effects | | | | | | |
|------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-----------|------------------|---------------|
| | Temperature of column | pH of mobile phase B | Excitation wavelength | Emission wavelength | Flow rate | Injection volume | Sample weight |
| Asp | 0,15* | 0,22* | -0,26 | 0,23* | 0,20* | -0,19* | 0,23* |
| Glu | 0,14* | 0,09* | -0,24* | 0,35 | 0,34* | -0,32* | 0,25* |
| Ser | -2,33 | -2,28 | -2,51 | 2,44 | 2,49 | 2,27 | -2,37 |
| Gly | 4,08 | 3,88 | -0,79 | 4,60 | 0,81 | -0,71 | 0,99 |
| His | -0,62 | -0,33 | 0,47 | -0,54 | 0,50 | 0,54 | 0,58 |
| Arg | 0,11* | 0,61 | -0,30 | 0,20 | -0,14* | -0,29 | 0,41 |
| Thr | -0,71 | 1,12 | -0,92 | 1,07 | -0,77 | 0,89 | 1,08 |
| Ala | 1,22 | 1,19 | 1,73 | 0,55 | 0,6 | 0,44 | 2,02 |
| Pro | 0,02* | -0,19 | 0,29 | 0,04* | 0,17 | -0,04* | -0,01* |
| Tyr | 0,02* | -0,21 | 0,35 | 0,09* | 0,17* | 0,04* | -0,06* |
| Val | -0,06* | -0,12* | 0,13 | 0,16 | -0,06* | -0,15 | 0,10* |
| Lys | 0,06* | 1,85 | 0,19 | 0,12* | -2,48 | -0,58 | 0,48 |
| Ile | -1,47 | -1,62 | -1,00 | 1,40 | 1,22 | 1,07 | -0,91 |
| Leu | 1,36 | -2,03 | -1,54 | -1,95 | -1,99 | 1,34 | 1,63 |
| Phe | -0,28 | -0,16 | -0,15 | -0,42 | -0,18 | -0,06* | 0,26 |

*No statistically significant difference ($\alpha=0,05$).

CONCLUSION

The analytical method was validated according to the Peruvian guideline for validation INACAL DA-acr-20D:2017. According to our results, the optimal hydrolysis conditions for the amino acids analysis in the lyophilized muscle were the concentration of HCl 6 M, time of 24 h and temperature of 100 °C. The performance parameters evaluated were the accuracy that showed that all amino acids don't exceed the limit %bias of 15%. The recovery ranged from 97,08% to 102,44%. The repeatability and intermediate precision were ranging from 1,93% to 5,43% and 2,08% to 10,69% respectively. The linearity had a working range from 5 to 100 μ M with coefficients of determination (R^2) higher than 0,999. The limits of detection and quantification were in the range from 0,002 to 0,014 g/100 g and 0,005 to 0,043 g/100 g respectively. The selectivity showed that the amino acid chromatogram was not affected by the presence of the internal standard. The robustness showed that the method is sensible against changes in the column temperature, pH of the mobile phase, excitation wavelength, emission wavelength, flow, injection volume and sample weight. Finally, the analytical methodology met the majority of defined acceptance criteria and is considered suitable for use in the laboratory.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to the Programa Nacional Presupuestal N094 (PpR094): "Gestión y Desarrollo de la Acuicultura"-PRODUCE, PERÚ and the Laboratorio de cultivo de peces - IMARPE for the sample provided.

BIBLIOGRAFIC REFERENCES

1. Ji Liu H. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr A*. 1994; 670(1): 59-66. doi: 10.1016/0021-9673(94)80280-7.
2. Szkudzińska K, Smutniak, Rubaj J, Korol W, Bielecka G. Method validation for determination of amino acids in feed by UPLC. *Accredit Qual Assur*. 2017; 22(1): 247-252. doi: 10.1007/s00769-017-1281-9.
3. Cohen SA, Michaud DP. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1993;(211): 279-287. doi:10.1006/abio.1993.1270.
4. Moreno-Arribas MV, Polo MC. High-performance Liquid Chromatography. In Caballero B, editor. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Maryland: Academic Press; 2003. 1274-1280. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00232-7.
5. KNAUER. Determination of 17 AQC derivatized Amino acids in baby food samples. [Online].; 2011 [accessed December 21, 2022]. Available from: https://www.knauer.net/Application/application_notes/vbs0011n_uhplc-pda-fld_determination_aqc_amino_acids_bluespher.pdf.
6. El Peruano. Aprueban Guía para la Validación de métodos de ensayo y las directrices para la implementación y evaluación de métodos de ensayos sensoriales. [Online].; 2003 [accessed December 16, 2022]. Available from: <https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/guiaValidacion.pdf>.
7. DA-acr-20D. Directriz para la validación de métodos de ensayo. [Online]. Lima; 2017 [accessed December 16, 2022]. Available from: [https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%2FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO\(1\).pdf](https://www.inacal.gob.pe/repositorioaps/data/1/1/4/jer/documentosespecificos/files/Directrices%2FDA-acr-20D-DIRECTRIZ.PARA.LA.VALIDACION.DE.METODOS.DE.ENSAYO(1).pdf).
8. ISO/IEC. ISO/IEC 17025:2017-General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 3rd ed. Geneva: SO/IEC; 2017.
9. Eurachem. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods- A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd ed. Magnusson B, Örnemark U, editors. Gembloux: Eurachem; 2014.
10. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. [Online].; 2019 [accessed December 16, 2022]. Available from: https://s27415.pcdn.co/wp-content/uploads/2020/01/64ER20-7/Validation_Methods/d-AOAC_Guidelines_For_Single_Laboratory_Validation_Dietary_Supplements_and_Botanicals.pdf.
11. Joint FAO/WHO. Codex alimentarius commision procedure manual. Twenty-fourth ed. Rome: FAO/WHO; 2010.
12. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma: FAO; 2020.
13. DS N°30-2001-PE. Reglamento de la Ley de Promoción y Desarrollo de la Acuicultura. [Online].; 2001 [accessed December 16, 2022]. Available from:

- <https://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/VUANORMA/D.S.%20N%C2%BA%20030-2001-PESQUERIA.pdf>.
14. PRODUCE. Programa nacional de ciencia, desarrollo tecnológico e innovación en acuicultura (C+DT+i). [Online].; 2013 [accessed December 16, 2022]. Available from: <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2020/01/PROGRAMA-NACIONAL-DE-CIENCIA-DESARROLLO-TECNOL%C3%93GICO-E-INNOVACI%C3%93N-EN-ACUICULTURA-CDTi-2013-2021.pdf>.
 15. LEY N° 27460. Ley de Promoción y Desarrollo de la Acuicultura. [Online].; 2001 [accessed 2022 December 16, 2022]. Available from:
 16. https://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/1/jer/PROPESCA_OTRO/marco-legal/1.2.%20Ley%20Acuicultura%20127460.pdf.
 17. Instituto del Mar del Perú. Plan operativo institucional. [Online].; 2018 [accessed December 16, 2022]. Available from:
 18. http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/archivos/res_DEC_253_2018.pdf.
 19. Dionicio J, Rosado M, Flores J, Flores L, Aguirre A. Evaluación de dietas comerciales en el crecimiento y su efecto en la composición bioquímica muscular de juveniles de chita, *Anisotremus scapularis* (Tschudi, 1846) (Familia: Haemulidae). *Lat Am J Aquat Res.* 2017; 45(2): 410-420. doi:10.3856/vol45-issue2-fulltext-16.
 20. DEQ. Standard Operating Procedure for Preparation and Homogenization of Fish Tissue Samples. Kentucky: Environmental Protection; 2019.
 21. Cohen S, Michaud D. Activated carbamates compounds. US patent 5,296,599. 1994 Marzo 22.
 22. Cohen S, Michaud D. Preparation and use of novel activated carbamates. EP 0 533 200 B1. 1991.
 23. Waters Corporation. Analyzing Feed Hydrolysates Samples Using the AccQ-Tag Method. [Online].; 1996 [accessed December 16, 2022]. Available from: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/4acqtag.pdf>.
 24. Peters J, Homburg/Saar MH, Schmitt Heidelberg MH, Daldrup Düsseldorf T, Mußhoff Bonn F. Requirements for the validation of analytical methods. Germany; 2009.
 25. NordVal International. International Protocol for the validation of chemical alternative (proprietary) methods against a reference method – Protocol No. 2. [Online].; 2018 [accessed December 19, 2022]. Available from: https://www.nmkl.org/wp-content/uploads/2022/06/NordVal-protocol-No-2_Chem_Oct-2018-1.pdf.
 26. Bartolomeo MP, Maisano F. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. *J Biomol Tech.* 2006; 17(2): 131-137.
 27. Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products. Kingston; 2004.
 28. NTP-ISO 5725-2. Exactitud (veracidad y precisión) de los métodos y resultados de medición. Lima: INACAL; 2021.
 29. US Food and Drug Administration. Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. [Online]. 2018 [accessed December 20, 2022]. Available from: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>.
 30. UNODC. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment use for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological

- Specimens. New York: United Nations Office on Drugs and Crime; 2009. Report No.: ISBN 978-92-1-148243-0.
31. Rajakovic V, Markovic D, Rajakovic V, Antanasijevic D. Review: The approaches for estimation of limit of detection for ICP-MS trace analysis of arsenic. *Talanta*. 2012; 102(1): 79-87. doi:10.1016/j.talanta.2012.08.016.
 32. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2009.
 33. Elkady EF, Fouad MA, Mozayad AN. Application of Box-Behnken experimental design and response surface methodology for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the simultaneous determination of methocarbamol, indomethacin and betamethasone in their pharmaceutical dosage form. *BMC Chem*. 2022; 16(1). doi:10.1186/s13065-022-00908-9.
 34. Lise CC, Marques C, Bonadimann FS, Pereira EA, Mitterer-Daltoé ML. Amino acid profile of food fishes with potential to diversify fish farming activity. *J Food Sci Technol*. 2020; 58(1): 383-388. doi:10.1007/s13197-020-04747-1.
 35. Mohanty B, Mahanty A, Ganguly S, Sankar TV, Chakraborty K, Rangasamy A, et al. Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and Their Importance in Clinical Nutrition. *J Amino Acids*. 2014; 2014(1): 1-7. doi:10.1155/2014/269797.
 36. AOAC international. AOAC Official Method 994.12 Amino acid in Feeds. Performic acid oxidation with acid hydrolysis-sodium metabisulfite. 22nd ed. Rockville: AOAC international Method; 2023.
 37. Waters. Amino acid analysis. Milford; 2018.
 38. Mustatea G, Ungureanu E, Lorga E. Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: A short review. *J Hyg Eng Des*. 2019; 26(1): 81-87.
 39. Harn LG, Chiuan YL, Saringat B. Amino acid composition of snakehead fish (*Channa striatus*) of various sizes obtained at different times of the year. *Malays J Pharm Sci*. 2005; 3(2): 19-30.
 40. Prasanna B, Das D, Paria P, Ganguly S. Nutrient Profile of Giant River-Catfish *Sperata seenghala* (Sykes). *Natl Acad Sci Lett*. 2012; 35(3): 155-161. doi:10.1007/s40009-012-0014-1.
 41. Menden E, Diedrich H. Laboratory methods for the evaluation of changes in protein quality. In Albanese AA, editor. *Newer Methods of Nutritional Biochemistry with Applications and Interpretations*. London: Albanese, A; 1970. 1-238. doi:10.1016/B978-0-12-048004-3.X5001-4.
 42. Moses S, Agbaji E, Ajibola V, Gimba C. Amino Acid Composition and Proximate Analysis in *Tilapia* (*Oreochromis Mossambicus*) Fish from Dams and Rivers in Zamfara State, Nigeria. *J Appl Sci Environ Manage*. 2018; 22(6): 899-905. doi:10.4314/jasem.v22i6.10.
 43. Dodge. Anderson-Darling Test. New York: Springer; 2008. doi:10.1007/978-0-387-32833-1_11.
 44. Han M, Xie M, Han J, Yuan D, Yang T, Xie Y. Development and validation of a rapid, selective, and sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of D- and L-amino acids in human serum: application to the study of hepatocellular carcinoma. *Anal Bioanal Chem*. 2018; 410(1): 2517-2531. doi:https://doi.org/10.1007/s00216-018-0883-3.
 45. Bruno C, Durebex CV, Lukuntunda CH, Andres CR, Moreau N, Bendavid C, et al. Validation of plasma amino acid profile using UHPLC-mass spectrometer (QDa) as

- a screening method in a metabolic disorder reference centre: Performance and accreditation concerns. *Clin Biochem.* 2021; 92: 34-45. doi:10.1016/j.clinbiochem.2021.03.004.
46. AEFI. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: AEFI; 2001.
 47. AOAC International. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [Online].; 2016 [accessed August 8, 2024]. Available from: https://www.aoac.org/wp-content/uploads/2019/08/app_f.pdf.
 48. Jajic I, Krstovic S, Glamocic D, Jaksic S, Abramovic B. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *J Serb Chem Soc.* 2013; 78(6): 839-850. doi:10.2298/JSC120712144J.
 49. Bosch L, Alegría A, Farré R. Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant foods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Feb 2;831(1-2):176-83. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.12.002.
 50. COMMISSION REGULATION (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *OJEU.* 2009; 27: 1-130.
 51. Kahsay BN, Moeller L, Imming P, Neubert RHH, Gebre-Mariam T. Development and Validation of a Simple, Selective, and Accurate Reversed-Phase Liquid Chromatographic Method with Diode Array Detection (RP-HPLC/DAD) for the Simultaneous Analysis of 18 Free Amino Acids in Topical Formulations. *Chromatographia.* 2022; 85(1): 665-676. doi:10.1007/s10337-022-04160-0.
 52. Raimbault A, Noireau A, West C. Analysis of free amino acids with unified chromatography-mass spectrometry-application to food supplements. *J Chromatogr A.* 2020; 1616(1): 460772. doi:10.1016/j.chroma.2019.460772.
 53. Azilawati M, Hashim DM, Jamilah B, Amin I. Validation of a reverse-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of amino acids in gelatins by application of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate reagent. *J Chromatogr A.* 2014; 1(1353): 49-56. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.050.
 54. Waters Corporation. Derivatization of Amino Acids Using Waters AccQ•Tag Chemistry. [Online].; 2024 [accessed August 12, 2024]. Available from: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/derivatization-of-amino-acids-using-waters-accqtag-chemistry.html>.
 55. Zeng F, Ou J, Huang Y, Li Q, Xu G, Liu Z, et al. Determination of 21 Free Amino Acids in Fruit Juices by HPLC Using a Modification of the 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Method. *Food Anal Methods.* 2015; 8(2): 428-437. doi:10.1007/s12161-014-9905-8.
 56. Eid SM, Farag MA, Bawazeer S. Underivatized Amino Acid Chromatographic Separation: Optimized Conditions for HPLC-UV Simultaneous Quantification of Isoleucine, Leucine, Lysine, Threonine, Histidine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan, and Tyrosine in Dietary Supplements. *ACS Omega.* 2022; 7(35): 31106-31114. doi:10.1021/acsomega.2c03228.
 57. Analytique & Validation du Nettoyage. *La Vague.* 2021; (70).
 58. Callejón RM, Tesfaye W, Torija MJ, Mas A, Troncoso AM, Morales ML. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *Eur Food Res Technol.* 2008; 227(1): 93-102. doi:10.1007/s00217-007-0697-6.

59. Gwatidzo L, Botha BM, McCrindle RI. Determination of amino acid contents of manketti seeds (*Schinziophyton rautanenii*) by pre-column derivatisation with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and RP-HPLC. *Food Chem.* 2013; 141(3): 2163-2169. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.101.
60. Cohen SA, Antonis KM. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. Analysis of feed grains, intravenous solutions and glycoproteins. *J Chromatogr A.* 1994; 661(1): 25-34. doi:10.1016/0021-9673(93)E0821-B.
61. Hernández-Orte P, Ibarz MJ, Ferreira V. Amino Acid Determination in Grape Juices and Wines by HPLC Using a Modification of the 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) Method. *Chromatographia.* 2003; 58(1): 29-35. doi:10.1365/s10337-003-0002-1.
62. Liu H, Sañuda-Peña MC, Harbey-White JD, Kalra S, Cohen SA. Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *J Chromatogr A.* 1998; 828(1): 383-395. doi:10.1016/s0021-9673(98)00836-x.
63. Waters Corporation. Complete amino acid analysis of foods and feeds. [Online]; 2015 [accessed August 10, 2024]. Available from: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/mKT15180.pdf>.
64. Naffa R, Holmes G, Zhang W, Maidment C, Shehadi I, Norris G. Comparison of liquid chromatography with fluorescence detection to liquid chromatography-mass spectrometry for amino acid analysis with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate: Applications for analysis of amino acids in skin. *Arab J Chem.* 2020; 13(12): 3997-4008. doi:10.1016/j.arabjc.2019.05.002.

