

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Se analizaron 25 variedades de maíz de distintos colores proporcionadas por la fundación PRODUCE del estado de Puebla. Las muestras eran originarias de diferentes regiones del estado de Puebla y fueron cultivadas durante los ciclos agrícolas de primavera-verano de 2002 y 2003 bajo diferentes modalidades de riego.

Tabla 4.1. Descripción de las variedades analizadas

Muestra	Municipio	Comunidad	Modalidad	Variedad	Ciclo Agrícola
1 ^{*a}	Xochitlán Todos Santos	Xochitlán Todos Santos	Riego	Pioneer 32R21	Prim-Ver-03
2 ^{*a}	Tecamachalco	Rancho San Isidro	Riego	Pioneer 32R21	Prim-Ver-03
3 ^{*a}	Tecamachalco	Rancho San Isidro	Riego	Pioneer 30R07	Prim-Ver-03
4 ^{*a}	Tecamachalco	Rancho San Isidro	Riego	Pioneer 32J55	Prim-Ver-03
5 ^{*a}	Xochitlán Todos Santos	Xochitlán Todos Santos	Riego	Pioneer 30R07	Prim-Ver-03
6 ^a	Mazapiltepec	Rinconada	Temporal	Aspros AS-600 (Amarillo zanahoria)	Prim-Ver-02
7 ^a	Tlacotepec de Benito Juárez	Rancho Rojas	Riego	Pioneer 32R21	Prim-Ver-03
8 ^a	Mazapiltepec	Rinconada	Temporal	Criollo Amarillo de Mazapiltepec	Prim-Ver-02
9 ^a	Mazapiltepec	Rinconada	Temporal	Criollo Amarillo de Tlachichuca	Prim-Ver-02
10 ^a	Tepanco de López	San Cristóbal	Riego	Hartz Seed Z- 806	Prim-Ver-02
11 ^a	Tlacotepec de Benito Juárez	Rancho Rojas	Riego	Pioneer 3099	Prim-Ver-02
12 ^a	Tlacotepec de Benito Juárez	Rancho Rojas	Riego	Pioneer 32J55	Prim-Ver-02

13 ^a	Mazapiltepec	Rinconada	Temporal	Criollo Amarillo de Ocotenco (Prod: Luz Alvarado)	Prim-Ver-03
14 ^{*a}	Oriental	Oriental	Temporal	Criollo Amarillo de Tlachichuca (donado por SDR)	Prim-Ver-03
15 ^b	Tecamachalco	Xochimilco	Riego	Criollo Azul de Xochimilco	Prim-Ver-03
16 ^b	Mazapiltepec	Rinconada	Temporal	Criollo negro de Mazapiltepec	Prim-Ver-03
17 ^a	Oriental	Oriental	Temporal	Criollo Amarillo de Oriental	Prim-Ver-03
18 ^a	Libres	Nuevo México	Temporal	Criollo Amarillo de Nuevo México	Prim-Ver-03
19 ^c	San Felipe Teotlalzingo	San Felipe Teotlalzingo	Temporal	Criollo Rojo de San Felipe Teotlalzingo	Prim-Ver-03
20 ^b	San Felipe Teotlalzingo	San Felipe Teotlalzingo	Temporal	Criollo Azul de San Felipe Teotlalzingo(2)	Prim-Ver-03
21 ^c	Acatzingo	San Sebastián Teteles	Temporal	Criollo rojo de San Sebastián Teteles(2)	Prim-Ver-03
22 ^c	Acatzingo	San Sebastián Teteles	Temporal	Criollo rojo de San Sebastián Teteles (1)	Prim-Ver-03
23 ^b	San Felipe Teotlalzingo	San Felipe Teotlalzingo	Temporal	Criollo Azul de San Felipe Teotlalzingo (1)	Prim-Ver-03
24 ^b	Los Reyes de Juárez	Virreyes de Juárez	Temporal	Criollo Azul de Virreyes de Juárez	Prim-Ver-03
25 ^b	Acatzingo	San Sebastián Teteles	Temporal	Criollo Azul de San Sebastián Teteles	Prim-Ver-03

* Estas muestras llegaron frescas, se liofilizaron y se mantuvieron en refrigeración para evitar la pérdida de pigmentos

^a Variedades amarillas

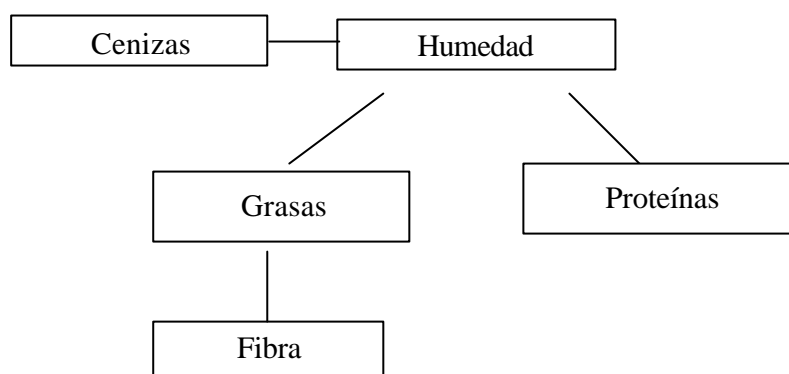
^b Variedades negras -azules

^c Variedades rojas

4.2. Análisis proximal

Todos los análisis proximales se llevaron a cabo de acuerdo con la metodología descrita en las Normas Mexicanas vigentes para cada caso en el orden mostrado a continuación:

Figura 4.1. Análisis proximal



4.2.1. Humedad

El contenido de humedad en las muestras de maíz se determinó siguiendo el procedimiento reportado en la Norma NMX-F-83-1986. En dicha Norma, se entiende por humedad la pérdida en peso que sufre un alimento al someterlo a las condiciones de tiempo y temperatura prescritos.

Reactivos, aparatos y equipo

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Crisoles de porcelana a peso constante
- Horno de secado con control de temperatura
- Desecador
- Pinzas para crisol

Procedimiento

Se pesaron 10 g de muestra pulverizada en un crisol previamente tarado y se colocaron en el horno de secado a 100 °C durante 24 horas. El crisol se transfirió a un desecador, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó. Este procedimiento se repitió hasta obtener peso constante.

Nota: A las muestras 1-5 y 14 no se les midió humedad ya que fueron liofilizadas inmediatamente después de que llegaron.

Cálculos

El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la fórmula que se presenta a continuación:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100$$

Donde:

P = peso del recipiente con la muestra húmeda en gramos

P₁ = peso del recipiente con la muestra seca

P₂ = peso de la muestra en gramos

4.2.2. Cenizas

Las cenizas son el residuo inorgánico que queda después de la incineración de la materia orgánica. Estos residuos están compuestos de óxidos y sales que contienen aniones, tales como fosfatos, cloruros, sulfatos y cationes como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y manganeso. La metodología que se siguió está descrita en la Norma NMX-F-066-S-1978.

Reactivos, aparatos y equipo

- Crisoles de porcelana a peso constante
- Pinzas para crisol
- Desecador
- Mufla
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Ácido nítrico concentrado

Procedimiento

En un crisol a peso constante se pusieron 20 g de muestra pulverizada. En vez de colocar el crisol con muestra en una parrilla para quemar lentamente el material, el método se modificó dejando toda la noche la muestra con 20 mL de ácido nítrico. Al día siguiente el crisol se llevó a la mufla para calcinarla completamente a 600 °C durante 24 horas, después de las que se dejó enfriar en la mufla y se transfirió a un desecador para que se enfriara completamente y así determinar la masa del crisol con cenizas.

Cálculos

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(P - p)}{M} \times 100$$

Donde:

P = masa del crisol con las cenizas en gramos

p = masa del crisol vacío en gramos

M = masa de la muestra en gramos

4.2.3. Grasa cruda (extracto etéreo)

Grasa cruda es el término que se emplea para referirse a la mezcla de materiales liposolubles presentes en una muestra. Éstos pueden incluir mono, di y triglicéridos, fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos libres, vitaminas liposolubles, carotenos, clorofilas, etc. Para la determinación se siguió el procedimiento descrito en la Norma NMX-F089-S-1978.

Reactivos, aparatos y equipo

- Éter etílico anhidro
- Extractor Soxhlet
- Cartuchos de extracción de tamaño adecuado para el extractor
- Reostato y manta de calentamiento
- Estufa (100-110°C) con termostato y termómetro
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Matraz de fondo plano a peso constante

Procedimiento

Se pesaron 4g de muestra seca y pulverizada en un filtro Whatman no. 42, que se dobla y se introduce en el cartucho de extracción. El cartucho se colocó dentro del extractor Soxhlet.

Se hizo pasar agua a 10°C por el refrigerante. En la parte inferior se colocó un matraz de fondo plano con 100 mL de éter etílico anhidro y se calentó hasta obtener una frecuencia de aproximadamente 2 gotas por segundo.

La extracción se efectuó por 6 horas, después de las cuales se suspendió el calentamiento, se evaporó el éter del matraz y se secó a 100°C hasta que alcanzó un peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ de grasa cruda} = \frac{P - p}{M} \times 100$$

Donde:

P = Masa en gramos del matraz con grasa

p = Masa en gramos del matraz sin grasa

M = Masa en gramos de la muestra

4.2.4. Nitrógeno total (proteínas totales)

La Norma que describe la determinación de proteínas en productos alimenticios es la NMX-F-068-S-1980. El procedimiento se basa en el método de Kjeldahl, en el cual el nitrógeno orgánico se convierte a sales de amonio, que se libera mediante la adición de una base no volátil. Después de la destilación, el amonio se determina por titulación.

Para el análisis de las muestras se hizo una modificación de la norma citada anteriormente utilizando un aparato de digestión Digesdhal para la digestión ácida de la

muestra (micro Kjeldahl) y el método de Nessler para la cuantificación del nitrógeno en un espectrómetro HACH DR/4000 como se describe a continuación.

Reactivos, aparatos y equipo

- Espectrofotómetro Hach DR/4000
- Aparato de digestión Digesdhal
- Matraces de digestión Digesdhal secos
- Columna de fraccionamiento conectada a una bomba aspiradora
- Acido sulfúrico concentrado
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Lentejas de hidróxido de sodio
- Probetas graduadas con tapón de 25 mL
- Indicador TKN
- Hidróxido de potasio 1 N
- Estabilizador mineral
- Alcohol polivinílico
- Reactivo de Nessler

Digestión Hach

Se transfirieron 0.5 g de muestra seca y pulverizada en una matraz de digestión Digesdhal. El aparato para digestión se ajustó a una temperatura de 440 °C y se encendió la bomba aspiradora. Una vez que se tuvo la temperatura deseada, al matraz con la muestra se le agregaron 4 mL de H₂SO₄ concentrado y se colocó en el aparato seguido de la columna de fraccionamiento para dejarlo ebulir por 4 minutos. Pasado este tiempo se agregaron, mediante un goteo lento, 15 mL de H₂O₂ al 30%. Después de la adición se calentó por un minuto mas para eliminar el exceso de peróxido, se sacó del calentador y se dejo enfriar a temperatura ambiente antes de remover la columna de fraccionamiento del digestor.

Una vez a temperatura ambiente, las muestras se aforaron a 25 mL con agua desionizada y el pH se ajustó a 2.5 usando lentejas de NaOH.

Se digirió una cantidad de agua igual a la de la muestra para utilizarla como blanco para el análisis.

Análisis

La cuantificación del nitrógeno total presente en las muestras se llevo a cabo en un espectrofotómetro Hach DR/4000.

Se colocaron 1 mL de muestra y 1 mL del blanco en diferentes probetas graduadas. A cada una se le adicionó una gota de indicador TKN y posteriormente gotas de KOH 1N hasta que apareció un color azul permanente. El volumen se ajustó a 20 mL con agua desionizada, se agregaron 3 gotas de estabilizador mineral a cada probeta y se mezclaron varias veces por inversión. Posteriormente se adicionaron 3 gotas de alcohol polivinílico, se mezclaron y se ajustó el volumen a 25 mL. Finalmente, se agregó 1 mL del reactivo de Nessler a cada pipeta y se esperaron 2 minutos antes de medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 460 nm, con el programa 2410 del Hach DR/4000 prediseñado para medir nitrógeno total.

Cálculos

Para obtener la concentración de nitrógeno (en partes por millón) a partir de la lectura del espectrofotómetro en cada muestra se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{ppm de N} = \frac{75 \times A}{B \times C}$$

Donde:

A= lectura del espectrofotómetro en mg/L

B= gramos de muestra utilizados para la digestión (0.5 g)

C= mililitros de la muestra digerida tomados para el análisis (1 mL)

Para calcular el porcentaje de nitrógeno en cada muestra los resultados expresados en partes por millón se multiplicaron por $1 \cdot 10^{-4}$ para expresarlos en términos de gramos de nitrógeno por cada 100 gramos de muestra.

El contenido de nitrógeno en diferentes proteínas es aproximadamente de 16% por lo que multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido por un factor de 6.25 se obtiene la cantidad de proteínas presentes en los granos de maíz.

4.2.5. Fibra cruda

Con este análisis se determinan las sustancias orgánicas libres de grasa en insolubles en medio ácido y alcalino. La metodología se encuentra descrita en la Norma NMX-Y-094-SCFI-2001. En ésta se define a la fibra cruda como la pérdida por ignición del residuo seco remanente después de la digestión de la muestra con solución de ácido sulfúrico al 1.25% e hidróxido de sodio al 1.25% bajo las condiciones específicas de la prueba.

Reactivos, aparatos y equipo

- Solución de ácido sulfúrico al 1.25%
- Solución del hidróxido de sodio al 1.25%
- Agua hirviendo
- Matraces de bola de 500 mL

- Papel filtro Whatman no. 41
- Horno de secado con control de temperatura
- Mufla
- Desecador
- Refrigerante
- Reóstato y manta de calentamiento
- Embudo Buchner
- Matraz Kitasato
- Papel filtro Whatman no. 41
- Crisol de porcelana a peso constante

Procedimiento

Se pesaron 2 g de muestra pulverizada, seca y desengrasada, se colocaron en un matraz de bola de 500 mL y se agregaron 100 mL de ácido sulfúrico al 1.25 % y perlas de ebullición. Esta mezcla se puso a ebullición con reflujo durante media hora, después de la cual la solución se filtró al vacío y se enjuagó con agua hirviendo hasta que el agua de lavado alcanzó pH neutro. El residuo se transfirió al matraz de bola y se adicionaron 100 mL de hidróxido de sodio al 1.25% y se puso a ebullición con reflujo durante media hora. Nuevamente se filtró la solución (a través de un papel filtro pesado previamente) y se enjuagó con 10 mL de ácido sulfúrico al 1.25% y luego con agua hirviendo hasta que el agua de lavado alcanzó un pH neutro. Este residuo, junto con el papel filtro, se colocó en un crisol a peso constante y se dejó secar en la estufa a 130 °C durante 2 horas. El crisol con la muestra se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Finalmente, se calcinó en la mufla durante 30 minutos a 600 °C, se dejó enfriar y se pesó.

Cálculos

El porcentaje de fibra de la muestra se obtuvo con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de Fibra} = \frac{M_1 - M_2 - \text{peso del papel}}{M} \times 100$$

Donde:

M = peso de la muestra en gramos

M₁ = peso de la muestra, el papel y el crisol después del secado en la estufa en gramos

M₂ = peso del crisol con las cenizas en gramos

4.3. Análisis de Xantofilas

4.3.1. Extracción

Reactivos, aparatos y equipo

- Metanol
- Hexano
- Hidroxitolueno butilado (BHT)
- Papel filtro Whatman no. 41
- Centrífuga

Procedimiento

El procedimiento de extracción de xantofilas empleado es una modificación del método descrito por Kurilich y Juvik (1999). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El material se recubrió de papel aluminio para mantener a las muestras en la oscuridad durante todo el proceso y se agregó hidroxitolueno butilado (BHT) al 0.1% como antioxidante a los disolventes utilizados.

Las muestras se pulverizaron hasta obtener partículas finas. Se tomaron 0.5 g de cada muestras y se dejaron en 25 mL de metanol con 0.1% de BHT en la oscuridad y con una agitación ligera durante 48 horas. Después de este tiempo las muestras se filtraron con un embudo Buchner a través de un papel filtro Whatman no. 41 y los pigmentos se transfirieron a hexano como se describe a continuación:

En tubos de centrífuga se virtieron 3 mL de hexano con 0.1% de BHT, se agregaron 3 mL del extracto metanólico y 1 mL de agua desionizada, se mezclaron con un vortex y se centrifugaron durante 5 minutos. En la capa superior queda la fracción con hexano y ésta se colocó en un vial por separado y la capa inferior se extrajo dos veces más con hexano. Las

fracciones combinadas de hexano se concentraron en un rotavapor a 40 °C y con presión reducida para poder ser reconstituidas en la fase móvil.

4.3.2. Análisis

Reactivos, Aparatos y Equipo

- Metanol grado HPLC
- Cloruro de metileno grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Tretilamina
- BHT
- Estándar de luteína
- Estándar de zeaxantina
- Cromatógrafo de líquidos
- Columna Waters Nova-Pak C₁₈ (5 µm, 4.6 *250 mm)
- Guarda columna Waters Nova-Pak C₁₈ (4 µm, 60 Å)

Procedimiento

Las muestras se reconstituyeron en 3 mL de acetonitrilo: metanol: cloruro de metileno (75:20:5), 0.05% de trietilamina y 0.1% de BHT y se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo de líquidos. Las xantofilas cuantificadas fueron luteína y zeaxantina.

El análisis de las muestras se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Líquidos VARIAN que cuenta con una bomba ternaria modelo 9012; detector de longitud de onda variable modelo 9050 y detector de fluorescencia ProStar. Se utilizó una columna Waters Nova-Pak C₁₈ (5 µm, 4.6 *250 mm). La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo: metanol: cloruro de metileno 75:20:5 (v/v/v). El flujo fue de 0.7 mL/min a 30 °C. La absorbancia se midió a 450 nm. Con estas condiciones el tiempo de retención para la luteína es de 7.503 min y para la zeaxantina de 7.932 min.

Para poder cuantificar los resultados se elaboraron curvas de calibración con estándares de luteína y zeaxantina proporcionadas por Roche México S.A. Se manejaron 5 concentraciones diferentes para cada uno, las cuales se presentan en la tabla 4.2:

Tabla 4.2. Concentraciones de luteína y zeaxantina para elaborar la curva de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

Estándar	Luteína	Zeaxantina
1	30.00	10.00
2	15.00	5.00
3	7.50	2.50
4	3.75	1.25
5	0.93	0.31

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza para determinar si había diferencias significativas en cuanto al contenido de cada pigmento en las diferentes variedades estudiadas utilizando el procedimiento ANOVA del programa para análisis estadístico SAS. Las concentraciones de compuestos fueron consideradas diferentes significativamente entre cada muestra cuando $p < 0.05$.

Con el mismo software se obtuvo la diferencia mínima significativa entre las medias realizando una prueba de Tuckey, la cual sirve para saber entre qué muestras existen estas diferencias.

Para averiguar la relación entre el contenido de pigmento y el color del maíz, la modalidad de riego y el ciclo agrícola en el que fueron cultivadas las diferentes variedades de maíz se empleo el procedimiento GLM del mismo software y también se compararon las medias con la prueba de Tukey.

4.4. Análisis de Aminoácidos

Se cuantificaron los aminoácidos lisina, isoleucina, metionina y triptofano. Los primeros 3 se extrajeron de acuerdo con el método oficial 994.12 de la AOAC para el análisis de aminoácidos en alimentos (hidrólisis ácida y preoxidación con ácido perbórico antes de la hidrólisis). Mientras que para el triptofano (hidrólisis alcalina) se siguió la metodología reportada por Stocchi, et al. (1985).

4.4.1. Hidrólisis ácida

Reactivos, aparatos y equipo

- Ácido clorhídrico 6 N
- Citrato de sodio 0.2 N pH 2.2
- Nitrógeno de alta pureza
- Estándares de lisina, metionina, isoleucina y triptofano
- Refrigerantes
- Reostatos
- Rotavapor

Procedimiento

Se pesaron 300 mg de muestra pulverizada, desengrasada y seca, se colocaron en un matraz de dos bocas de 500 mL y se agregaron 300 mL de HCl 6 N. El matraz se conectó a un refrigerante y se le hizo pasar una corriente de nitrógeno bajo la superficie del ácido. La muestra se puso a reflujo durante 24 horas manteniendo el burbujeo de nitrógeno, después de las cuales se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío a través de un papel filtro Whatman no. 2. Posteriormente, el hidrolizado se evaporó hasta sequedad en un rotavapor a 40 °C a presión reducida. El concentrado se lavó con agua y se reevaporó dos veces para eliminar el ácido, se disolvió en un buffer de citrato de sodio pH 2.2 y su volumen se ajustó a 25 mL con el mismo buffer.

Por otro lado se hidrolizó bajo las mismas condiciones un estándar que contenía 3 mg de cada aminoácido a analizar para poder calcular posteriormente su porcentaje de recuperación.

Los hidrolizados disueltos en el buffer de citrato de sodio se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

4.4.2. Oxidación con Ácido Perfórmico e Hidrólisis Ácida

Con este método los aminoácidos que contienen azufre son oxidados para poder ser liberados de las proteínas y así poder ser extraídos eficientemente mediante la hidrólisis ácida. La cisteína es oxidada a ácido cystéico y la metionina a metionina sulfona.

Reactivos, aparatos y equipo

- Ácido perfórmico (Se mezclan 72 mL de ácido fórmico al 100% con 1.5 mL de metanol y 7.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y se deja reposar a temperatura ambiente por dos horas)
- Ácido clorhídrico 6 N
- Citrato de sodio 0.2 N pH 2.2
- Estándares de lisina, isoleucina, metionina y triptofano
- Nitrógeno de alta pureza
- Refrigerantes
- Reostatos
- Rotavapor

Procedimiento

Se pesaron 300 mg de muestra pulverizada, desengrasada y seca y se colocaron en un matraz de bola con unas gotas de ácido perfórmico. La mezcla se enfrió en hielo por 30

minutos y se agregaron otros 25 mL de ácido perbromico dejándola esta vez toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se agregaron 25 mL de agua y 2 mL de ácido bromhídrico mezclando bien. La mezcla se evaporó a sequedad para eliminar el ácido en un rotavapor. Donde se recibe el ácido se colocó un poco de NaOH para neutralizarlo. Una vez concentrada la muestra se siguió la misma metodología descrita anteriormente para la hidrólisis ácida.

A un estándar con 3 mg de cada uno de los aminoácidos a cuantificar se le dio el mismo tratamiento para evaluar su porcentaje de recuperación.

4.4.3. Hidrólisis Alcalina

Como el triptofano se degrada durante la hidrólisis ácida, se recomienda la hidrólisis alcalina para extraerlo.

Reactivos, aparato y equipo

- Solución de hidróxido de sodio 4.2 M (burbujeada con nitrógeno toda la noche)
- Octanol
- Citrato de sodio 0.2 N pH 4.25
- Bomba de vacío
- Centrífuga
- Viales de vidrio para sellar al vacío
- Nitrógeno de alta pureza
- Hielo seco
- Acetona
- Estándar de triptofano

Procedimiento

Se pesaron 300 mg de muestra pulverizada, desengrasada y seca y se pusieron en un vial. Se agregaron 10 mL de hidróxido de sodio 4.2 M y 3 gotas de octanol. Esta mezcla se congeló en hielo seco, mientras que el vial se evacuó y se selló. Posteriormente se colocó en un recipiente con agua a temperatura ambiente hasta que se fundió la muestra. El vial se metió al horno a 110 °C durante 20 horas. Pasado este tiempo, se dejó enfriar y se abrió.

El hidrolizado se transfirió a un matraz lavando dos veces con 1 mL de citrato de sodio pH 4.25 y el pH se ajustó a 4.25 con ácido clorhídrico. El volumen se ajustó a 25 mL con agua, la solución se centrifugó durante 30 minutos, se filtró con un embudo Buchner a través de un papel filtro Whatman no. 41 y se guardó a 4°C hasta su análisis.

A un estándar con 10 mg de triptofano se le dio el mismo tratamiento para evaluar su porcentaje de recuperación.

4.4.4. Análisis

Todas las muestras, independientemente de su procedimiento de extracción, se derivatizaron con orto-ftalaldehído y se inyectaron para su cuantificación en el cromatógrafo de líquidos como se describe a continuación.

Materiales, reactivos y aparatos

- Solución de o-ftalaldehído (OPA) lista para su uso de Pierce
- Metanol grado HPLC
- Tetrahidrofurano grado HPLC
- Acetato de sodio
- Fosfato de sodio
- Ácido acético
- Estándar de lisina

- Estándar de isoleucina
- Estándar de metionina
- Estándar de triptofano
- Cromatógrafo de líquidos
- Columna XTerra RP₁₈ (5 μm, 4.6*250 mm)

Procedimiento

Antes de su derivatización se hizo una dilución 1:3 de los hidrolizados con buffer de citrato de sodio. De ésta se tomaron 2 μL, se mezclaron con 200 μL de la solución de OPA y se dejó reaccionar por 1 minuto antes de inyectar al HPLC.

Los aminoácidos derivatizados se separaron con una columna XTerra RP₁₈ (5 μm, 4.6*250 mm) y se detectaron por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 250 nm y una de emisión de 480 nm.

La fase móvil estaba compuesta de 2 eluyentes:

- A: Metanol al 65%
- B: Acetato de sodio 50 mM, fosfato de sodio dibásico 50 mM, 25 mM de ácido acético, 0.25 M de tetrahidrofurano y 0.49 M de metanol; pH 7.5

La separación se llevó a cabo como se describe a continuación:

Tabla 4.3. Programa de elusión para la separación de aminoácidos

Tiempo (min)	% A	Flujo
0	20	0.8
5	28	0.8
35	58	0.8
40	75	0.8
56	95	0.8
56.1	95	1.0
60	96	1.0
61	100	1.0
68	100	1.0

Para poder evaluar el porcentaje de recuperación y calcular la cantidad de aminoácidos se elaboraron curvas de calibración para lisina, isoleucina, triptofano, metionina y metionina sulfona. Las concentraciones empleadas para elaborarlas se presentan en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentración de aminoácidos para elaborar las curvas de calibración ($\mu\text{g/mL}$)

Estándar	Metionina	Triptofano	Isoleucina	Lisina	Metionina sulfona
1	0.4000	0.4000	0.4000	0.8000	0.5000
2	0.2500	0.2500	0.2500	0.5000	0.2500
3	0.1250	0.1250	0.1250	0.2500	0.1250
4	0.0625	0.0625	0.0625	0.1250	0.0625

Cálculos

El porcentaje de recuperación para cada aminoácido se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{mg de aminoácido detectados por el HPLC}}{\text{mg de aminoácido hidrolizados}} \times 100$$

Para obtener la cantidad de aminoácidos presente en cada muestra, el resultado reportado en $\mu\text{g/mL}$ por el HPLC se multiplicó por el factor de dilución empleado (7575) y por el porcentaje de recuperación de cada aminoácido.

Con estos cálculos la cantidad de cada aminoácido queda expresada en mg, pero para poder analizarlos y evaluar la calidad de las proteínas estos resultados tienen que dividirse entre la cantidad de nitrógeno proteico presente en cada muestra para obtener el contenido de aminoácidos en términos de mg de aminoácido/g de nitrógeno proteico.

Estos resultados pueden dividirse entre el contenido de cada aminoácido en la proteína patrón de la FAO (ver tabla 3.2) para obtener su puntuación química (chemical score).

Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza para determinar si había diferencias significativas en cuanto al contenido de cada aminoácido en las diferentes variedades estudiadas utilizando el procedimiento ANOVA del programa SAS. Las concentraciones de compuestos fueron consideradas diferentes significativamente entre cada muestra cuando $p < 0.05$.

Con el mismo programa se calculó la diferencia mínima significativa entre las medias realizando una prueba de Tuckey, la cual sirve para saber entre qué muestras existen estas diferencias.

Para averiguar la relación entre el contenido de aminoácidos y el color del maíz, la modalidad de riego y el ciclo agrícola en el que fueron cultivadas las diferentes variedades de maíz se empleó el procedimiento GLM y también se compararon las medias con la prueba de Tukey.