

Calidad nutricional e industrial de Maíz



Laboratorio de Calidad
Nutricional de Maíz
"Evangelina Villegas"

PROTOSCOLOS

Calidad nutricional e industrial de Maíz

Laboratorio de Calidad Nutricional
de Maíz "Evangelina Villegas"

PROTOSCOLOS

El CIMMYT —Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo— es el organismo financiado con fondos públicos líder a nivel mundial en la investigación de maíz y trigo para el desarrollo. Con sede cerca de la Ciudad de México, el CIMMYT trabaja con cientos de colaboradores a nivel mundial en el incremento sostenible de la productividad de los sistemas de cultivo de maíz y trigo, mejorando así la seguridad alimentaria global y reduciendo la pobreza. El CIMMYT es miembro del Sistema CGIAR y coordina los Programas de Investigación de MAÍZ y TRIGO del CGIAR. Para sus actividades, el CIMMYT recibe fondos de gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo y otras instituciones de los sectores público y privado.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2018. Todos los derechos reservados. Las designaciones empleadas en la presentación de los materiales incluidos en esta publicación de ninguna manera expresan la opinión del CIMMYT o de sus patrocinadores respecto a la situación legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: Palacios-Rojas, N. 2018. Calidad nutricional e industrial de Maíz: Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz “Evangelina Villegas” CDMX, México: CIMMYT.

Descriptores AGROVOC: *Zea mays*; Fitomejoramiento; Métodos fitotécnicos; Recursos genéticos; Calidad de proteína; Contenido de proteína; Métodos de aplicación; Muestreo; Molienda; Secado; Desgrase; Tamaño; Dureza; Laboratorios

Categorías AGRIS: F30 Genética vegetal y fitomejoramiento
Q04 Componentes de los alimentos

Palabras clave: CIMMYT

Clasificación Decimal Dewey: 631.5233 PAL

ISBN: 978-607-8263-78-3

Contenido

Condiciones de Trabajo para Análisis que se Realizan en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz	2
---	---

Muestreo

Muestreo	5
Muestreo para análisis de zinc	5
Muestreo para análisis de calidad de proteína	8
Muestreo para análisis de carotenoides y provitamina A	10

Preparación de la muestra

Preparación de la muestra	14
Liofilización con el equipo LABCONCO™ modelo 7755041	15
Molienda	17
Molienda con molino de discos	17
Molienda utilizando molino ciclónico	19
Molienda con molino mezclador MM400 Retsch™	20
Molienda con molino de martillos	22
Secado en estufa	24
Desgrasado de harina en equipo Soxhlet	26

Análisis físicos

Determinación de impurezas y granos dañados	29
Determinación del tamaño de grano por distribución en mallas	33
Determinación del tamaño de grano a través del peso de cien granos (PCG)	35
Determinación del tamaño de grano por medición directa con Vernier	36
Determinación de la dureza del grano de maíz a través del índice de flotación en nitrato de sodio	37
Determinación de la dureza del grano de maíz a través del índice de flotación en solución de azúcar comercial.....	39
Determinación de dureza en grano de maíz a través del peso hectolítrico	41
Determinación de estructura y dureza del grano de maíz por disección.....	42
Determinación de humedad en grano de maíz por conductividad utilizando el medidor Steinlite™.....	46
Determinación de humedad por termobalanza	48
Determinación de humedad en estufa de secado	52
Determinación de color en escala L*a*b* utilizando el colorímetro Minolta.....	54
Determinación de color por medio de la aplicación Techkon Color Catcher™	56

Análisis con Infrarrojo

Determinación del contenido de proteína, almidón, humedad y aceites en grano de trigo y maíz mediante el analizador de grano Infratec™ 1241	60
Uso del espectroscopio de infrarrojo cercano Nirsystems 6500 FOSS™ para la determinación de compuestos en harina, grano y tejido vegetal de maíz y tejido vegetal de trigo	63

Determinación de compuestos de alta energía

Determinación de extracto etéreo en equipo soxtec™	74
Extracción de grasa total por hidrólisis ácida en equipo soxcap™	77
Determinación de almidón total en harina de maíz utilizando un ensayo modificado Megazyme™	79
Determinación de amilosa en harina de maíz	83
Determinación de almidón resistente en maíz utilizando un ensayo modificado de Megazyme™	86
Determinación de azúcares solubles con antrona	90

Análisis de calidad de proteína

Determinación de nitrógeno por Technicon Autoanalyzer ii™	93
Determinación de triptófano en maíz utilizando ácido glicólico en microplaca	99
Determinación de lisina en harina de maíz	102

Análisis de micronutrientes y minerales

Cuantificación de carotenoides en harina de maíz por UPLC	108
Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante digestión ácida y su análisis a través de plasma de acoplamiento inductivo con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES)	115
Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante fluorescencia de rayos X (XRF) utilizando el equipo Oxford™ X-Supreme 8000	119
Determinación de cenizas en seco	125

Determinación de compuestos antioxidantes

Cuantificación de carotenoides totales por espectrofotometría	127
Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por capacidad de absorción de radicales libres (ORAC)	131
Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por el método de DPPH	139
Determinación de antocianinas totales en granos de maíz pigmentados	143
Cuantificación de antocianinas glicosiladas en maíz pigmentado por HPLC	146
Cuantificación de ácido <i>p</i> -coumárico y ácido ferúlico en maíz por HPLC	151
Cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles en maíz por UPLC	156

Cuadros

Cuadro 1.	Coefficiente de correlación fenotípica para hierro y zinc de una muestra sembrada en 3 localidades diferentes (n=1200 líneas de maíz) .	6
Cuadro 2.	Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad y segregación genética del material (zinc).	6
Cuadro 3.	Efecto de utilizar desgranadora metálica.	7
Cuadro 4.	Efecto de fumigar área de almacenamiento sin sellado hermético de las muestras.	8
Cuadro 5.	Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad y segregación del material genético (calidad de proteína).	8
Cuadro 6.	ANOVA, diferencias genotípicas para la acumulación de carotenoides durante la maduración del grano.	10
Cuadro 7.	Efecto de diferentes tipos de secado en los carotenoides de maíz.	11
Cuadro 8.	Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad/segregación del material genético (carotenoides y provitamina A).	11
Cuadro 9.	Material y equipos utilizados para liofilizar.	15
Cuadro 10.	Solución a problemas comunes durante al liofilizar	17
Cuadro 11.	Material y equipos utilizados en molienda con molino de discos	17
Cuadro 12.	Solución a problemas comunes	18
Cuadro 13.	Material y equipos utilizados en molienda con molino ciclónico.	19
Cuadro 14.	Solución a problemas comunes en molienda con molino ciclónico.	20
Cuadro 15.	Material y equipos utilizados en molienda con molino mezclador.	21
Cuadro 16.	Solución a problemas comunes en molienda con molino mezclador.	22
Cuadro 17.	Material y equipos utilizados en molienda con molino de martillos.	23
Cuadro 18.	Solución a problemas comunes en molienda con molino de martillos.	24
Cuadro 19.	Metodologías en las cuales debe realizarse el proceso de secado.	24
Cuadro 20.	Material y equipos utilizados durante el secado de muestras.	25
Cuadro 21.	Solución de problemas comunes durante el secado.	25
Cuadro 22.	Material y equipos utilizados durante el desgrasado de harina.	26
Cuadro 23.	Reactivos utilizados durante el desgrasado de harina.	26
Cuadro 24.	Solución a problemas comunes durante el desgrasado de harina.	28
Cuadro 25.	Material y equipos utilizados en la determinación de impurezas.	29
Cuadro 26.	Clasificación del grano con base al porcentaje de impurezas.	32
Cuadro 27.	Solución a problemas comunes durante la determinación de impurezas.	32
Cuadro 28.	Material y equipos utilizados en la determinación del tamaño de grano por distribución.	33
Cuadro 29.	Mallas necesarias y sus equivalencias de medidas.	34
Cuadro 30.	Clasificación de tamaño según la criba.	34
Cuadro 31.	Solución a problemas comunes durante la determinación de tamaño de grano por distribución.	34
Cuadro 32.	Material y equipos utilizados en la determinación del tamaño de grano a través del PCG.	35
Cuadro 33.	Clasificación de tamaño según el PCG.	35
Cuadro 34.	Solución a problemas comunes en la determinación de tamaño de grano a través del PCG.	35
Cuadro 35.	Material y equipos utilizados en la determinación de tamaño de grano por medición directa con Vernier.	36
Cuadro 36.	Solución a problemas comunes en la determinación de tamaño de grano por medición directa con Vernier.	37
Cuadro 37.	Características físicas deseadas según el uso del maíz ¹ .	37
Cuadro 38.	Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF.	38

Cuadro 39.	Reactivos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF.	38
Cuadro 40.	Clasificación del grano de maíz por su dureza.	39
Cuadro 41.	Solución a problemas comunes en la determinación de dureza de grano a través del IF.	39
Cuadro 42.	Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.....	40
Cuadro 43.	Reactivos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.....	40
Cuadro 44.	Solución a problemas comunes en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.....	40
Cuadro 45.	Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del peso hectolítrico.	41
Cuadro 46.	Clasificación de dureza según peso hectolítrico.	42
Cuadro 47.	Solución a problemas comunes en la determinación de dureza a través del peso hectolítrico.	42
Cuadro 48.	Material y equipos utilizados en la determinación de estructura y dureza de grano por disección.....	43
Cuadro 49.	Solución a problemas comunes en la determinación de estructura y dureza de grano por disección.....	45
Cuadro 50.	Material y equipos utilizados en la determinación de humedad con Steinlite.	46
Cuadro 51.	Solución a problemas comunes en la determinación de humedad con Steinlite.	48
Cuadro 52.	Material y equipos utilizados en la determinación de humedad por termobalanza.	48
Cuadro 53.	Parámetros programados en la termobalanza HB432-S.	50
Cuadro 54.	Solución a problemas comunes en la determinación de humedad por termobalanza.....	51
Cuadro 55.	Material y equipos utilizados en la determinación de humedad en estufa de secado.	52
Cuadro 56.	Solución a problemas comunes en la determinación de humedad en estufa de secado.....	53
Cuadro 57.	Material y equipos utilizados en la determinación de color con colorímetro Minolta.	54
Cuadro 58.	Solución a problemas comunes en el uso del colorímetro Minolta.	56
Cuadro 59.	Material y equipos utilizados en la determinación de color utilizando aplicación de celular.....	56
Cuadro 60.	Intervalos para maíz blanco en colorímetro Minolta y su equivalente en tarjeta.	59
Cuadro 61.	Clasificación de amarillos en b de acuerdo a la escala Lab.	59
Cuadro 62.	Solución a problemas comunes en la determinación de color utilizando aplicación de celular.	59
Cuadro 63.	Material y equipos utilizados con el analizador Infratec.....	60
Cuadro 64.	Solución a problemas comunes en el uso del analizador Infratec.....	63
Cuadro 65.	Material y equipos utilizados con el NIRS.	64
Cuadro 66.	Comparativo de tiempo y costo.....	71
Cuadro 67.	Solución a problemas comunes durante el uso del NIRS.	73
Cuadro 68.	Material y equipos utilizados en la determinación de extracto etéreo.....	75
Cuadro 69.	Reactivos utilizados en la determinación de extracto etéreo.....	75
Cuadro 70.	Solución a problemas comunes en la determinación de extracto etéreo.....	76
Cuadro 71.	Programación de variables en el equipo.	76
Cuadro 72.	Material y equipos utilizados en la determinación de grasa total.....	77
Cuadro 73.	Reactivos utilizados en la determinación de grasa total.....	77
Cuadro 74.	Solución a problemas comunes en la determinación de grasa total.	79
Cuadro 75.	Material y equipos utilizados en la determinación de almidón total.....	79
Cuadro 76.	Reactivos utilizados en la determinación de almidón total.	80
Cuadro 77.	Tiempo y velocidad para la agitación de la microplaca.....	82
Cuadro 78.	Curva de calibración para determinación de almidón total.	82
Cuadro 79.	Solución a problemas comunes en la determinación de almidón total.	82
Cuadro 80.	Material y equipos utilizados en la determinación de amilosa.	83
Cuadro 81.	Reactivos utilizados en la determinación de amilosa.	83
Cuadro 82.	Curva de calibración para el análisis de amilosa.....	85

Cuadro 83.	Solución a problemas comunes en la determinación de amilosa.	85
Cuadro 84.	Material y equipos utilizados en la determinación de almidón resistente.....	86
Cuadro 85.	Reactivos utilizados en la determinación de almidón resistente.....	87
Cuadro 86.	Solución a problemas comunes en la determinación de almidón resistente.....	89
Cuadro 87.	Material y equipos utilizados en la determinación de azúcares solubles.....	90
Cuadro 88.	Reactivos utilizados en la determinación de almidón resistente.....	90
Cuadro 89.	Preparación de curva estándar (para 5 mL por tubo).	92
Cuadro 90.	Solución a problemas comunes en la determinación de azúcares solubles.....	92
Cuadro 91.	Material y equipos utilizados en la determinación de nitrógeno.....	94
Cuadro 92.	Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno.....	94
Cuadro 93.	Solución a problemas comunes en la determinación de nitrógeno.....	98
Cuadro 94.	Material y equipos utilizados en la determinación de triptófano.....	99
Cuadro 95.	Reactivos utilizados en la determinación de triptófano.....	99
Cuadro 96.	Elaboración de curva estándar de triptófano.....	101
Cuadro 97.	Criterios para considerar QPM.....	101
Cuadro 98.	Escalamiento del método.....	101
Cuadro 99.	Solución a problemas comunes en la determinación de triptófano.....	102
Cuadro 100.	Material y equipos utilizados en la determinación de lisina.....	103
Cuadro 101.	Reactivos utilizados en la determinación de lisina.....	104
Cuadro 102.	Curva de calibración de lisina.....	106
Cuadro 103.	Preparación de la curva de calibración para lisina.....	106
Cuadro 104.	Método escalado para determinación de lisina.....	106
Cuadro 105.	Solución de problemas en la determinación de lisina.....	105
Cuadro 106.	Material y equipos utilizados en la cuantificación de carotenoides por UPLC.....	109
Cuadro 107.	Reactivos utilizados en la cuantificación de carotenoides por UPLC.....	110
Cuadro 108.	Sistema gradiente para el análisis de carotenos por UPLC.....	109
Cuadro 109.	Concentraciones y absorbancias de los estándares después de la extracción con hexano (solución stock).....	111
Cuadro 110.	Concentraciones y absorbancias de cada uno de los estándares después de la evaporación y reconstitución con metanol:1,2-dicloroetano.....	111
Cuadro 111.	Datos necesarios para la construcción de la curva de calibración del b-caroteno.....	112
Cuadro 112.	Solución a problemas comunes en la cuantificación de carotenoides por UPLC.....	114
Cuadro 113.	Material y equipos utilizados en la determinación de hierro y zinc en ICP-OES.....	115
Cuadro 114.	Reactivos utilizados en la determinación de hierro y zinc en ICP-OES.....	116
Cuadro 115.	Secuencia de digestión.....	117
Cuadro 116.	Preparación de curva estándar.....	117
Cuadro 117.	Datos de presión de los elementos requeridos.....	117
Cuadro 118.	Material y equipos utilizados en la determinación de hierro y zinc mediante XRF.....	119
Cuadro 119.	Comparativo en la determinación de Fe y Zn para 40 muestras*.....	124
Cuadro 120.	Solución a problemas comunes en la determinación de hierro y zinc mediante XRF.....	124
Cuadro 121.	Material y equipos utilizados en la determinación de cenizas.....	125
Cuadro 122.	Solución a problemas comunes en la determinación de cenizas.....	126
Cuadro 123.	Material y equipo utilizados en la cuantificación de carotenoides totales.....	128
Cuadro 124.	Reactivos utilizados en la cuantificación de carotenoides totales.....	128
Cuadro 125.	Solución a problemas comunes en la cuantificación de carotenos totales.....	131
Cuadro 126.	Material y equipo utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.....	131
Cuadro 127.	Reactivos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.....	132
Cuadro 128.	Concentraciones de la curva de calibración.....	135
Cuadro 129.	Solución a problemas comunes en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.....	139

Cuadro 130. Material y equipos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.	140
Cuadro 131. Reactivos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.	140
Cuadro 132. Preparación de la curva de DPPH y concentraciones.	141
Cuadro 133. Preparación de las concentraciones de ácido ascórbico.	141
Cuadro 134. Solución a problemas comunes en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.....	142
Cuadro 135. Material y equipos utilizados en la determinación de antocianinas totales.	143
Cuadro 136. Reactivos utilizados en la determinación de antocianinas totales.	143
Cuadro 137. Curva estándar para antocianinas totales.....	145
Cuadro 138. Solución a problemas comunes en la determinación de antocianinas totales.	145
Cuadro 139. Material y equipos utilizados en la cuantificación de antocianinas por UPLC.....	146
Cuadro 140. Reactivos utilizados en la cuantificación de antocianinas por UPLC.	147
Cuadro 141. Sistema gradiente para el análisis de antocianinas glicosiladas por HPLC.	147
Cuadro 142. Preparación de la curva de calibración y concentración obtenida.....	148
Cuadro 143. Área bajo la curva de cianidina 3-glicosido.....	148
Cuadro 144. Tiempo de retención para cianidina 3-glicosido.	148
Cuadro 145. Solución a problemas comunes en la cuantificación de antocianinas por UPLC.	150
Cuadro 146. Material y equipos utilizados en la cuantificación de ácido p-coumárico y ácido ferúlico.	151
Cuadro 147. Reactivos utilizados en la cuantificación de ácido p-coumárico y ácido ferúlico.....	152
Cuadro 148. Sistema gradiente para el análisis de ácido p-coumárico y ácido ferúlico por HPLC.....	153
Cuadro 149. Preparación de la curva de calibración y concentración obtenida.	153
Cuadro 150. Solución a problemas comunes en la cuantificación de ácido p-coumárico y ácido ferúlico.....	155
Cuadro 151. Material y equipos utilizados en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.....	156
Cuadro 152. Reactivos utilizados en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.....	157
Cuadro 153. Sistema gradiente para el análisis de tocoferoles y tocotrienoles por UPLC.	158
Cuadro 154. Concentración y absorbancia de los estándares después de su preparación (stock)	158
Cuadro 155. Concentración y absorbancia de los estándares después de la dilución (Solución 1).....	159
Cuadro 156. Solución a problemas comunes en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.....	161

Figuras

Figura 1.	Error analítico total.	5
Figura 2.	Autopolinizaciones en maíz.	6
Figura 3.	Recolección de las mazorcas.	6
Figura 4.	Desgrane manual de las mazorcas	6
Figura 5.	Método de cuarteo para la obtención de una muestra representativa.	7
Figura 6.	Comparación de métodos (ICP-OES y XRF).	7
Figura 7.	Comparación de métodos para el análisis de calidad proteica de maíz (método químicos y NIRS).	9
Figura 8.	Evaluación de la calidad proteica de maíz (triptófano, lisina y proteína).	9
Figura 9.	Cambio en la proporción de carotenoides totales (TC) y carotenoides con actividad de provitamina A.	10
Figura 10.	Distintos métodos de secado de maíz.	11
Figura 11.	Metodologías para análisis de carotenos en maíz.	12
Figura 12.	Comparación entre UPLC y NIRS para análisis de provitamina A en maíz.	12
Figura 13.	Efecto del tiempo de almacenamiento en la retención de carotenoides con actividad de provitamina A (ProA). En donde: TAS, temperatura ambiente en subtrópico; TAVA, temperatura ambiente en Valles Altos.	13
Figura 14.	Empacando muestra de maíz.	13
Figura 15.	Bolsas adecuadas para almacenar y transportar maíz para determinación de contenido de carotenoides.	13
Figura 16.	Magnitud de errores en diferentes etapas del proceso de análisis.	14
Figura 17.	Liofilizador LABCONCO Mod. 7755041.	15
Figura 18.	Diagrama de flujo para el uso del liofilizador.	15
Figura 19.	Vista lateral del equipo.	15
Figura 20.	Manifold y base para contenedor.	16
Figura 21.	Posición de las válvulas. Dirección de la pestaña con relación al conector de la manguera.	16
Figura 22.	Panel de control.	16
Figura 23.	Ubicación de la manguera para drenar.	16
Figura 24.	Molino de discos. a) Parte externa; b) Parte interna.	17
Figura 25.	Selector de tamaño de partícula.	18
Figura 26.	a) Vaciado del grano; b) Colocación del sobre; c) Dispensador cerrado.	18
Figura 27.	Limpieza del molino.	18
Figura 28.	a) Descripción general del molino ciclónico; b) Rotor con aspas; c) Vista interna de la tapa.	19
Figura 29.	Colocación de la malla de 0.5 mm de diámetro.	19
Figura 30.	Encendido del molino.	20
Figura 31.	Molienda de la muestra.	20
Figura 32.	a) Descripción frontal del molino de bolas MM 400, b) Descripción trasera del molino de bolas MM400.	20
Figura 33.	a) Contenedores de circonio, b) Contenedores de acero inoxidable.	21
Figura 34.	Muestra en tubos de plástico.	21
Figura 35.	a) Colocación de la bola de molienda, b) Colocación de la muestra.	21
Figura 36.	a) Posición de contenedores, b) Ajuste, c) Seguro.	21
Figura 37.	Configurando frecuencia y tiempo de molienda.	21
Figura 38.	a) Muestra en papel, b) Muestra de regreso en el tubo.	22
Figura 39.	Molino de martillos a) parte externa, b) parte interna.	22
Figura 40.	a) Colocación de la malla, b) Sujeción de la malla en molino.	23

Figura 41.	Contenedor de harina.....	23
Figura 42.	Perilla en opción "ON".....	23
Figura 43.	a) Interruptor de voltaje, b) perilla de seguridad de los martillos, c) Encendido del molino.	23
Figura 44.	a) Vaciado de muestra en tolva, b) Vaciado de muestra en molino.....	24
Figura 45.	Diagrama de flujo para el secado en estufa.	25
Figura 46.	Acondicionamiento de estufa.	25
Figura 47.	a) Gradilla de metal, b) Recipiente de madera.....	25
Figura 48.	Muestras al interior de la estufa.	25
Figura 49.	Sistema de desgrasado Soxhlet™.	26
Figura 50.	Diagrama de flujo para el desgrasado de harina.....	26
Figura 51.	Dimensiones del papel filtro.	27
Figura 52.	Procedimiento para formar los cartuchos.	27
Figura 53.	Elaboración de cartuchos.....	27
Figura 55.	Colocación de las muestras en la trampa Soxhlet.	27
Figura 54.	Identificación de la muestra y vaciado dentro del cartucho.	27
Figura 56.	Sistema de desgrasado Soxhlet.	27
Figura 57.	Secado de las muestras.	28
Figura 58.	Diagrama de flujo para la determinación de impurezas y granos dañados.	30
Figura 59.	Pesado de la muestra.....	30
Figura 60.	Apilado de las cribas para la determinación de impurezas.	30
Figura 61.	Vaciado de la muestra a las cribas.....	30
Figura 62.	Cribado manual de la muestra.....	30
Figura 63.	Materia diferente al grano de maíz que las cribas no separaron.	30
Figura 64.	Insectos y tamo cribados.	31
Figura 65.	Granos quebrados.....	31
Figura 66.	Granos manchados.....	31
Figura 67.	Granos contaminados por hongos.	32
Figura 68.	Granos dañados por insectos.....	32
Figura 69.	Diagrama de flujo de la determinación del tamaño de grano por distribución.....	33
Figura 70.	Ajuste de balanza en cero.....	33
Figura 71.	Colocación de la muestra.	34
Figura 72.	Tamizado de la muestra.....	34
Figura 73.	Diagrama de flujo para determinación del tamaño de grano a través del PCG.	35
Figura 74.	Diagrama de flujo para la determinación del tamaño de grano por medición directa.....	36
Figura 75.	Selección de granos.....	36
Figura 76.	Toma de medidas.	36
Figura 77.	Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del IF.....	38
Figura 78.	Granos flotantes y sumergidos. a) Muy duro, b) Intermedio, c) Muy suave.....	39
Figura 79.	Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del IF en solución de azúcar.	40
Figura 80.	Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del peso hectolítrico.	41
Figura 81.	Balanza de peso hectolítrico.....	42
Figura 82.	Estructura del grano de maíz (Figura adaptada de http://sevilla.dacsa.com/spa/mundo-maiz/caracteristicas-y-tipos-de-maiz/el-grano-del-maiz.html),	42
Figura 83.	Diagrama de flujo para la determinación de estructura y dureza de grano por disección.	44
Figura 84.	Limpieza de recipientes.	44
Figura 85.	Etiquetado de recipientes.	44
Figura 86.	Recipientes a peso constante.....	44
Figura 87.	Peso de recipientes.	44
Figura 88.	Selección de granos.....	45

Figura 89.	Granos en agua destilada.....	45
Figura 90.	Secado de recipientes.....	45
Figura 91.	Descripción del medidor de humedad Steinlite.....	46
Figura 92.	Diagrama de flujo para determinar humedad con Steinlite.....	46
Figura 93.	Ajuste automático del equipo.....	46
Figura 94.	Peso de la muestra.....	47
Figura 95.	Programación del equipo.....	47
Figura 96.	Colocación de la muestra.....	47
Figura 97.	Dosificación de la muestra.....	47
Figura 98.	Lectura de la muestra.....	47
Figura 99.	Recuperación del grano.....	47
Figura 100.	Diagrama de flujo para la determinación de humedad por termobalanza.....	48
Figura 101.	Pantalla del escritorio e icono del software LabXdirect moisture 2.2.....	48
Figura 102.	Selección del idioma de trabajo.....	49
Figura 103.	Enlace entre la termobalanza y la computadora para el registro automático de los resultados.....	49
Figura 104.	Ventana desplegada por la opción Configure el formato de los datos.....	49
Figura 105.	Selección del archivo para enviar automáticamente los resultados obtenidos.....	50
Figura 106.	Formato de registro para el contenido de humedad.....	51
Figura 107.	Diagrama de flujo para determinar humedad en estufa.....	52
Figura 108.	Pesado de las charolas de aluminio.....	52
Figura 109.	Pesado de la muestra en harina.....	53
Figura 110.	Muestra en estufa a 130 °C.....	53
Figura 111.	Colocación de la muestra seca dentro del desecador.....	53
Figura 112.	Descripción del colorímetro Minolta CR-410.....	54
Figura 113.	Diagrama de flujo para medir color.....	54
Figura 115.	1) Base de la cápsula, 2) Aro para delimitar la cantidad de muestra, 3) Cuarzo antireflejante, 4) Cabezal de la cápsula.....	55
Figura 116.	a) Base de la cápsula, b) Aro para delimitar la cantidad de muestra, c) Cuarzo anti-reflejante, d) Cabezal de la cápsula.....	55
Figura 117.	a) Toma de muestra, b) Pantalla con resultados.....	55
Figura 114.	Calibración del colorímetro.....	55
Figura 119.	Descripción de la tarjeta.....	56
Figura 118.	Color Catcher Card.....	56
Figura 120.	Diseño de la caja de muestreo.....	57
Figura 121.	Muestreador.....	57
Figura 122.	Ubicación de leds en parte interna de la caja.....	57
Figura 123.	Diagrama de flujo para la determinación de color utilizando aplicación de celular.....	57
Figura 124.	Revisión del funcionamiento de la caja de muestreo.....	57
Figura 125.	Parte inferior de la caja en donde se coloca la tarjeta y la pila.....	57
Figura 126.	Llenado de muestras.....	57
Figura 127.	Muestreo. a) Interior de caja, b) Aplicación en el Smartphone.....	57
Figura 128.	Pantalla de resultados.....	57
Figura 129.	Correlación de b en colorímetro Minolta y tarjeta color catcher.....	59
Figura 130.	Diagrama de flujo para el uso del analizador Infratec.....	61
Figura 131.	Vista frontal del equipo Infratec.....	61
Figura 132.	Vista posterior del equipo Infratec.....	61
Figura 133.	Verificación del instrumento.....	61
Figura 134.	Pantalla de análisis.....	61
Figura 135.	Seleccionar calibración.....	62
Figura 136.	Colocación de la muestra.....	62

Figura 137.	Identificación de la muestra.	62
Figura 138.	Análisis de la muestra.	62
Figura 139.	Resultados.....	62
Figura 140.	Retirando la muestra.....	63
Figura 141.	Diagrama de flujo.....	64
Figura 142.	Descripción del NIRS.....	65
Figura 143.	NIRSystems 6500. En el círculo rojo se encuentra el botón de encendido (parte posterior).	66
Figura 144.	Pantalla de inicio de ISIScan.	66
Figura 145.	Pantalla de análisis y diagnósticos que deben realizarse al equipo.....	66
Figura 146.	Check cell. a) Caja contenedora; b) vista posterior; c) vista frontal; y, d) Dentro de su caja.....	65
Figura 147.	Escaneo de la Check cell.....	67
Figura 148.	Productos que se encuentran en el equipo.	67
Figura 149.	Identificación de la muestra.	67
Figura 150.	Diagrama general del llenado de celda y escaneo en el NIRS.	68
Figura 151.	Historial de las muestras analizadas.	68
Figura 152.	Menú DIAGNOSTICS.....	69
Figura 153.	Resultados del SELF TEST.	68
Figura 154.	Resultados del Gain test; 154a, para región visible y; 154b, para región NIR.....	70
Figura 155.	Resultados de Linearize.....	70
Figura 156.	Diagnóstico de rendimiento.	71
Figura 157.	Selección de muestras.	72
Figura 158.	Menú secundario.	72
Figura 159.	Exportando datos.....	72
Figura 161.	Exportando espectros.....	73
Figura 160.	Selección del formato deseado.	73
Figura 162.	Descripción del equipo de extracción etéreo Soxtec.....	74
Figura 163.	Diagrama de flujo para determinar extracto etéreo.	75
Figura 164.	Preparación de la muestra.	75
Figura 165.	Colocación de la muestra en el equipo.....	75
Figura 166.	Colocación de vasos de aluminio para la extracción.	76
Figura 167.	Programación del panel de control.	76
Figura 168.	Panel de control sin seguro para modificar variables.	76
Figura 169.	Pesado del extracto.....	76
Figura 170.	Soxcap. a) Partes del equipo, b) Panel de control.....	77
Figura 171.	Diagrama de flujo para la extracción de grasa total en SoxCap.	78
Figura 172.	Colocación del filtro en el vial.....	78
Figura 173.	Ajuste de temperatura.	78
Figura 174.	Conexión de bomba de agua.	78
Figura 175.	Colocación del filtro con muestra.	79
Figura 176.	Diagrama de flujo para la determinación de almidón total en maíz.....	80
Figura 177.	Incubación de muestras en baño María.....	81
Figura 178.	Adición de agua y transferencia de la muestra al tubo Falcon.	81
Figura 179.	Microplaca con muestras.	81
Figura 180.	Agitación de la microplaca con muestra.....	82
Figura 181.	Diagrama de flujo para la determinación de amilosa en maíz y sus derivados.	83
Figura 182.	Muestra después de 24 h de reposo.	84
Figura 183.	Adición de agua y muestra con espuma después de la agitación.	84
Figura 184.	Adición de Lugol.	84
Figura 185.	Adición de curva y muestras a la placa.	84

Figura 186.	Lectura de placa en lector de microplaca.	84
Figura 187.	Diagrama de flujo para la determinación de almidón resistente (Hidrólisis).....	86
Figura 188.	Diagrama de flujo para la determinación de almidón resistente (Desarrollo de color).....	88
Figura 189.	Diagrama de flujo para la determinación de azúcares solubles.....	91
Figura 190.	Llenado de microplaca.	91
Figura 191.	Technicon autoanalyzer II.	93
Figura 192.	Diagrama de flujo para determinación de proteína.....	93
Figura 193.	a) Adición de la muestra catalizadora, b) Adición de ácido sulfúrico, c) Mezcla de muestra y catalizador, d) Tubos con muestra en digestor.....	93
Figura 194.	Dilución de la muestra digerida.....	96
Figura 195.	a) Gradilla de tubos con muestra, b) Tapones de tubos, c) y d) Agitación de la gradilla con tubos. ...	96
Figura 196.	a) Colocación de muestras (blanco y estándar), b) Ajuste de blanco a cero, c) Ajuste de estándar en gráfica a 70%, d) Controles para ajuste de estándar y blanco (línea base).	96
Figura 197.	a) Orden de muestras (blancos, testigos y muestras), b) Gráficas de las muestras.	97
Figura 198.	Ajuste de línea en 0.....	98
Figura 199.	Ajuste de línea en 100.....	98
Figura 200.	Ajuste de perilla de línea base.....	98
Figura 201.	Ajuste con tornillos.....	98
Figura 202.	Diagrama de flujo para determinación de triptófano.....	100
Figura 203.	Llenado de microplaca para determinación de triptófano.	100
Figura 204.	Microplaca de triptófano con color desarrollado.	101
Figura 205.	Lector de microplacas Biotek.	101
Figura 206.	Diagrama de flujo del proceso de determinación de lisina en maíz.	103
Figura 207.	Muestra hidrolizada.	103
Figura 208.	Adición de la solución de carbonatos.	103
Figura 209.	Muestra centrifugada.....	105
Figura 210.	Adición de 2 cloro 3, 5 dinitropiridina.....	105
Figura 211.	Reacción colorimétrica después de dos horas de reposo.	105
Figura 212.	Adición de ácido clorhídrico.....	105
Figura 213.	Lavado de la muestra con acetato de etilo.	105
Figura 214.	Diagrama de flujo para el análisis de carotenoides por UPLC.	109
Figura 215.	Curva de calibración para el b-caroteno.	112
Figura 216.	Cromatograma tipo de carotenoides en grano completo.	113
Figura 217.	Diagrama de flujo.	116
Figura 218.	Ubicación de líneas.....	118
Figura 219.	Posición centrada de los picos.	118
Figura 220.	Diagrama de flujo para la determinación de hierro y zinc mediante XRF.	119
Figura 221.	Descripción del XRF.....	120
Figura 222.	Descripción de la pantalla de inicio del XRF.....	120
Figura 223.	XRF Oxford™ X-Supreme 8000. El círculo rojo muestra la ubicación del botón de encendido (en la parte posterior).	121
Figura 224.	Ingreso de contraseña.	1210
Figura 225.	Contenedores de muestra.	121
Figura 226.	Colocación de la película de polipropileno.....	122
Figura 227.	Colocación de contenedores y muestra.	122
Figura 228.	Empaquetamiento de la muestra.	122
Figura 229.	Colocación de los contenedores en el muestreador.	122
Figura 230.	Posición de la llave.	122
Figura 231.	Identificación de la muestra y método.	123
Figura 232.	Inicio del análisis.	123

Figura 233. Medición en el XRF.	123
Figura 234. Resultados obtenidos.	123
Figura 235. Revisión de los resultados generados.	124
Figura 236. Diagrama de flujo para la determinación de cenizas.	125
Figura 237. Espectro visible de los extractos en hexano de: puré de tomate, jugo de tomate, concentrado de tomate y harina de maíz amarillo	127
Figura 238. Diagrama de flujo para la cuantificación de carotenos totales por espectrofotometría.	128
Figura 239. Curva de calibración para b-caroteno a 450 nm.	129
Figura 240. Diagrama de flujo para determinación de fracción hidrofílica.	133
Figura 241. Diagrama de flujo para determinación de fracción lipofílica.	133
Figura 242. Adición de cámara de agua.	134
Figura 243. Adición de curva de calibración.	134
Figura 244. Orden de vaciado de muestras en la placa.	135
Figura 245. Preparación de la placa para incubación.	135
Figura 246. Arranque del programa Pherastar.	135
Figura 247. Programación de la temperatura.	136
Figura 248. Selección de plantilla.	136
Figura 249. Programación de variables en basic parameters.	136
Figura 250. Programación de variables en layout.	136
Figura 251. Programación de variables en concentration/shaking.	137
Figura 252. Programación de variables en focus and gain adjustment.	137
Figura 253. Ajuste y lectura de la placa.	137
Figura 254. Visualización de datos.	137
Figura 255. Visualización de los ciclos en gráficas.	137
Figura 256. Visualización de los datos de todos los ciclos.	138
Figura 257. Exportar datos a Excel.	138
Figura 258. Diagrama de flujo.	140
Figura 259. Esquema del llenado de microplaca NUNC 96.	142
Figura 260. Placa después de reacción colorimétrica.	142
Figura 261. Diagrama de flujo para determinar antocianinas totales.	144
Figura 262. Colocación de muestras en hielo y agitación.	144
Figura 263. Ubicación de las muestras en la microplaca.	144
Figura 264. Diagrama de flujo para la cuantificación de antocianinas glicosiladas por HPLC.	148
Figura 265. Curva de calibración para la cianidina 3-glicósido.	149
Figura 266. Cromatograma tipo de antocianinas glicosiladas en maíz morado, a una longitud de onda de 520 nm.	149
Figura 268. Curva de calibración para el ácido ferúlico.	153
Figura 267. Diagrama de flujo para la cuantificación de ácido p-coumárico y ácido ferúlico por HPLC.	153
Figura 269. Cromatograma tipo de ácido p-coumárico y ácido ferúlico en grano completo.	154
Figura 270. Diagrama de flujo para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles por UPLC.	158
Figura 271. Curva de calibración para el a-tocoferol.	159
Figura 272. Cromatograma de tocoferoles y tocotrienoles en grano completo (Alfa TT= Alfa tocotrienol, Gamma tocoferol y Alfa tocoferol).	160

Introducción

Los análisis físicos y químicos del grano y tejido vegetal hacen parte de los esfuerzos de fenotipo en los procesos de mejoramiento y de caracterización de la diversidad genética.

El laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz “Evangalina Villegas” de CIMMYT tiene como objetivo primordial desarrollar y/o adoptar metodologías robustas y eficientes para la evaluación de los diferentes compuestos principalmente del grano de maíz.

Las metodologías varían dependiendo de la característica o del compuesto a analizar. Este manual tiene como objetivo: 1) proveer detalladamente los protocolos utilizados en nuestro laboratorio para que se convierta en una guía auto-didáctica para las personas interesadas; 2) Servir como referencia estándar en la descripción de las técnicas analíticas de calidad de maíz; 3) Actualizar los protocolos anteriormente publicados, algunos de los cuales han sido revisados y/o mejorados para mayor eficiencia en tiempo de análisis, reactivos, costos y calidad de la información obtenida.

Este manual está dividido en ocho secciones principales que incluyen información sobre el muestreo dependiendo de los análisis que se quieran realizar; preparación y acondicionamiento de las muestras; análisis físicos del grano; análisis con infrarrojo cercano; determinación de compuestos de alta energía; análisis de calidad de proteína; análisis de micronutrientes y minerales; y determinación de compuestos antioxidantes.

Todas las metodologías presentadas en este documento han sido validadas ya sea por comparación con otros métodos o mediante evaluaciones entre laboratorios.

Innumerables personas han contribuido al desarrollo de este manual, desde la estandarización de los métodos, la escritura de los procesos, la compilación de los problemas y soluciones, redacción, etc. Agradecemos a estudiantes, científicos visitantes, participantes de cursos de capacitación de metodologías, y a todos los técnicos del laboratorio por sus comentarios y aportes.

Agradecemos igualmente las contribuciones de todos los proyectos que a lo largo del tiempo han financiado trabajos de caracterización de calidad de grano de maíz, entre ellos MASAGRO, Harvest Plus y el consorcio de investigación del CGIAR MAIZE, las colaboraciones con Kellogg's, Agrobio, Fundación Haciendas del Mundo Maya, etc.

Esta compilación de las metodologías y la impresión del manual ha sido financiada por Masagro-Sagarpa, México y de CRP-MAIZE (El programa de investigación de CGIAR MAIZE recibe apoyo de los gobiernos de Australia, Bélgica, Canadá, China, Francia, India, Japón, Corea, México, Nueva Zelanda, Noruega, Suecia, Suiza, Reino Unido, Estados Unidos de América y el Banco Mundial).

Compiladores y editores:

Aide Molina-Macedo, Aldo Rosales, Luisa Cabrera-Soto, Luis Galicia-Flores, Alejandra Miranda-Piliado, Diana Carolina Franco, Natalia Palacios-Rojas.



Condiciones de Trabajo para Análisis que se Realizan en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz

El uso de guantes de nitrilo, lentes de protección, bata de laboratorio y zapatos de seguridad es obligatorio para la realización de cualquiera de los siguientes análisis. El uso del equipo de protección especial (*) es adicional a los antes mencionados, ya que, algunos análisis requieren de seguridad más especializada que otros.

Para la obtención de resultados confiables, se deben de tomar en cuenta las siguientes condiciones de trabajo para la realización de cada análisis.

Normas Generales:

- Mantener despejadas las zonas de entrada y salida del laboratorio.
- Toda persona debe conocer la ubicación de elementos y dispositivos de seguridad como duchas de emergencia, lava-ojos, extintor, etc.
- Comer y beber está prohibido.
- El uso de bata es obligatorio para evitar el contacto con sustancias químicas.
- La utilización de guantes de nitrilo, lentes de protección y zapatos de seguridad (cerrados o de tacón bajo) es indispensable para la realización de cualquier análisis.
- Evitar llevar faldas o pantalones cortos. Recoger el cabello largo.
- Los reactivos, equipos y materiales empleados deben devolverse a su lugar de almacenamiento después de usarlos; los mesones y áreas de trabajo deben permanecer limpios.
- Todos los materiales, incluyendo muestras y soluciones deben ser previamente etiquetadas o rotuladas para su preservación o uso.
- Los materiales residuales y los desechos deben depositarse en recipientes clasificados.
- Está prohibido verter al sistema de drenaje disolventes orgánicos o sustancias corrosivas.
- Cualquier producto químico presente en el lugar de trabajo debe contener la información sobre el riesgo de la sustancia o preparado (mezcla de soluciones).
- En la manipulación de sustancias tóxicas o nocivas, evitar el contacto con la piel, inhalación de vapores e ingestión.
- Está prohibido pipetear con la boca.
- Lavarse las manos antes y después de terminar cualquier procedimiento en el laboratorio.
- Se debe llevar un cuaderno de laboratorio el cual contenga un registro claro, preciso y detallado de todas las actividades y experimentos realizados durante el desarrollo de la investigación.

	Análisis	Condiciones de trabajo				Comentarios	Equipo de protección especial*
		T° ≤ 20°C	Luz normal	Luz con filtro UV	Campana de extracción		
Muestreo y preparación de la muestra	Liofilización de muestras.					El contenedor de muestras debe estar cubierto con papel aluminio para proteger de la luz a las muestras que son destinadas para análisis de ORAC, antocianinas, Vit. E y carotenos.	
	Molienda utilizando molino de discos.	•	•	•	•	Las muestras que son destinadas para análisis de ORAC, antocianinas, Vit. E y carotenos utilizar filtro para luz UV.	Protección auditiva, mascarilla para polvos.
	Molienda utilizando molino ciclónico.	•	•	•	•	Las muestras que son destinadas para análisis de ORAC, antocianinas, Vit. E y carotenos utilizar filtro para luz UV.	Protección auditiva, mascarilla para polvos.
	Molienda utilizando molino mezclador Retsch.		•	•		Las muestras que son destinadas para análisis de ORAC, antocianinas, Vit. E y carotenos utilizar filtro para luz UV.	Protección auditiva, mascarilla para polvos.
	Molienda utilizando molino de martillos.		•				Protección auditiva, mascarilla para polvos.
	Secado en estufa.		•				Guantes aislantes de calor.
Infrarrojo	Determinación del contenido de proteína, almidón, humedad y aceites en grano de trigo y grano de maíz mediante el analizador de grano Infratec™ 1241.	•	•				
	Uso del espectroscopio de infrarrojo cercano NIRSystems 6500 FOSS™ para la determinación de compuestos en harina, grano y tejido vegetal de maíz y tejido vegetal de trigo.	•	•				
Alta energía	Determinación de extracto etéreo en equipo Soxtec™.		•				Mascarilla para solventes.
	Extracción de grasa total por hidrólisis ácida en equipo SoxCap™.		•		•		Mascarilla para solventes.
	Determinación de almidón total en harina de maíz utilizando un ensayo modificado Megazyme™.		•				
	Determinación de amilosa en harina de maíz.		•				
	Determinación de almidón resistente en maíz utilizando un ensayo modificado de Megazyme™.		•				
	Determinación de azúcares solubles con antrona.		•				

	Análisis	Condiciones de trabajo				Comentarios	Equipo de protección especial*
		T° ≤ 20°C	Luz normal	Luz con filtro UV	Campana de extracción		
QPM	Determinación de nitrógeno por medio del Technicon Autoanalyzer II™.		•		•		
	Determinación de triptófano en maíz utilizando ácido glioxílico en microplaca.		•				
	Determinación de lisina en harina de maíz.		•		•		
Micronutrientes y minerales	Cuantificación de carotenoides en harina de maíz por UPLC.	•		•	•		
	Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante digestión ácida y su análisis a través de plasma de acoplamiento inductivo con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES).	•	•		•	El área de trabajo debe estar limpia y libre en lo posible de materiales metálicos que podrían ser potencial fuente de contaminación.	Guantes de nitrilo marca N-DEX.
	Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante fluorescencia de rayos X (XRF) utilizando el equipo Oxford™ X-Supreme 8000.	•	•			El área de trabajo debe estar limpia y libre en lo posible de materiales metálicos que podrían ser potencial fuente de contaminación.	
	Determinación de cenizas en seco.	•	•		•	Debido a la generación de calor y humo, se recomienda un área fresca, amplia y bien ventilada.	
Antioxidantes	Cuantificación de carotenoides totales por espectrofotometría.	•		•	•	Si las muestras no son analizadas inmediatamente después de la molienda, se deben almacenar a -80°C, para evitar la pronta degradación.	
	Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por capacidad de absorción de radicales libres (ORAC).	•		•	•	Utilizar frascos color ámbar y cubrir los tubos de trabajo con papel aluminio para evitar degradación. Si las muestras no son analizadas inmediatamente después de la molienda, se deben almacenar a -80°C, para evitar la pronta degradación.	
	Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por el método de DPPH.	•		•		Utilizar frascos color ámbar y cubrir los tubos de trabajo con papel aluminio para evitar degradación. Si las muestras no son analizadas inmediatamente después de la molienda, se deben almacenar a -80°C, para evitar la pronta degradación.	
	Determinación de antocianinas en granos de maíz pigmentados.	•		•			
	Cuantificación de antocianinas glicosiladas en maíz pigmentado por HPLC.	•		•			
	Cuantificación de ácido p-coumárico y ácido ferúlico en maíz por HPLC.						
	Cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles en maíz por UPLC.	•		•	•	Utilizar frascos color ámbar y cubrir los tubos de trabajo con papel aluminio para evitar degradación. Si las muestras no son analizadas inmediatamente después de la molienda, se deben almacenar a -80°C, para evitar la pronta degradación.	



Muestreo

Aldo Rosales, Natalia Palacios-Rojas

Muestreo

Los protocolos de muestreo y las metodologías empleadas para análisis de laboratorio, se definen según el tipo de muestra, el objetivo de dicho análisis y el presupuesto disponible. Para muestras de maíz, es importante tener en cuenta:

1. ¿Qué tipo de material se quiere analizar?
Híbridos, líneas en desarrollo, parentales, líneas mejoradas, variedades de polinización abierta o maíces criollos.
2. ¿Qué compuesto se quiere medir?
Minerales como hierro y zinc, provitamina A, aminoácidos, etc.
3. ¿Cuál es el objetivo del análisis?
Mejoramiento (¿qué etapa?), liberación de materiales, trabajo de investigación o monitoreo general.

Con esto se pretende disminuir el error de muestreo y errores durante la preparación de la muestra, los cuales contribuyen en gran medida al error analítico total (Figura 1).

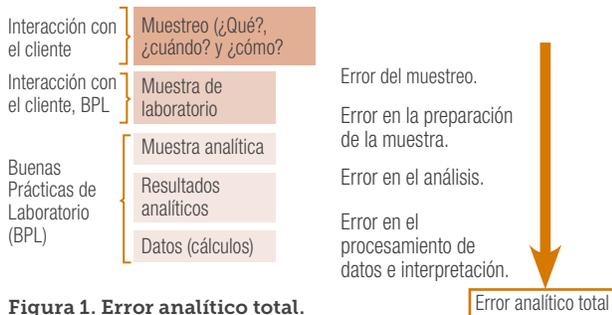


Figura 1. Error analítico total.

Muestreo para análisis de zinc

Evitar contaminación de muestras

El personal que realiza el muestreo en campo y manipula las muestras, debe comprender la importancia de evitar la contaminación. Las fuentes contaminantes más comunes en los análisis de hierro y zinc incluyen¹:

1. Suelo en el momento de cosecha.
2. Polvo en manos o equipos.
3. Productos para el cuidado de la piel (cremas).
4. Uso de equipos metálicos para desgranar mazorcas.
5. Equipo sucio u oxidado (contenedores para muestras o cuchillas de la desgranadora)
6. Contacto o mezcla accidental con otras muestras.

Efecto medio-ambiental en el contenido de zinc en grano

La correlación fenotípica para hierro y zinc en muestras de diferentes ambientes, es relativamente alta (Cuadro 1). Sin embargo, si el objetivo del análisis es determinar el contenido real de zinc, se sugiere tomar mínimo 3 muestras de diferentes localidades y documentar la fecha de siembra, la densidad de población e información analítica del suelo (contenido de minerales, pH, carbonatos, materia orgánica, descripción del suelo).

Cuadro 1. Coeficiente de correlación fenotípica para hierro y zinc de una muestra sembrada en 3 localidades diferentes (n=1200 líneas de maíz).

Localidades	2	3	1
2	1	0.6939	0.7663
3	0.5363	1	0.8613
1	0.6164	0.6861	1

Análisis del material genético

Para evitar la contaminación por polen externo, se aconseja realizar autopolinizaciones (Figura 2) o bien, el aislamiento por tiempo u espacio del material biológico. Dependiendo de la segregación y variabilidad genética, se sugiere realizar diversas autopolinizaciones en campo (Cuadro 2).



Figura 2. Autopolinizaciones en maíz.

Cuadro 2. Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad y segregación genética del material (zinc).

Tipo de material	Recomendación antes de cosecha	Cantidad requerida para análisis
Maíces criollos	50 – 100 autopolinizaciones o polinizaciones planta - planta	500 gramos
Variedades de polinización abierta	2 – 4 autopolinizaciones por surco (50 – 100 mazorcas)	500 gramos
Etapas inicial de mejoramiento (segregantes)	5 – 10 autopolinizaciones	200 gramos
Líneas mejoradas (parentales)	2 – 5 autopolinizaciones	50 gramos
Híbridos	2 – 3 autopolinizaciones	50 gramos

Protocolo para muestreo

Una vez que el grano alcanza su etapa de madurez en cosecha, las mazorcas son recolectadas sin remover las hojas que las cubren (totomoxtle) y, posteriormente,

son depositadas en una canasta o saco (Figura 3). Al momento de recolectar se recomienda:

1. No arrojar las mazorcas al piso para evitar su contacto directo con el suelo.
2. Cuando se requiera, dejar secar las mazorcas extendiéndolas al sol (sin retirar las hojas) y evitar su contacto directo con el suelo.
3. En lugares limpios y libres de superficies metálicas, remover las hojas que cubren las mazorcas y desgranarlas manualmente (Figura 4). No usar anillos, pulseras, relojes o alguna otra pieza metálica que puedan contaminar el grano.



Figura 3. Recolección de las mazorcas.



Figura 4. Desgrane manual de las mazorcas (Fotografía tomada de: <https://aprenderlachispa.com/2014/03/14/ciclos-de-la-naturaleza/comment-page-1/>).

NOTA: Al utilizar desgranadoras metálicas es posible incrementar las concentraciones de aluminio, hierro y zinc. En el Cuadro 3 se muestra la diferencia en las concentraciones para dichos metales a partir de un experimento realizado con 10 muestras desgranadas en un equipo aparentemente limpio donde fue controlado todo el proceso, así como la diferencia en lecturas cuando fueron lavadas con agua destilada.

Cuadro 3. Efecto de utilizar desgranadora metálica.

n = 10	Sin lavar	Lavadas
Aluminio (mg kg ⁻¹)	18.79 ± 7.06	1.09 ± 0.35
Hierro (mg kg ⁻¹)	11.88 ± 1.05	10.74 ± 1.64
Zinc (mg kg ⁻¹)	21.43 ± 2.34	20.11 ± 2.44

Para el desgrane manual se sugiere:

- Colectar los granos en recipientes no metálicos.
- Mezclarlos.
- Ubicarlos de manera uniforme sobre una superficie limpia.

Posteriormente, extender los granos en forma circular y dividir en cuatro partes iguales. Descartar las dos cuartas partes diametralmente opuestas y mezclar las dos partes restantes. Repetir este paso hasta obtener la cantidad de grano (muestra) requerida (Figura 5).

Finalmente, depositar los granos en bolsas de plástico, papel o de algún otro material no metálico.

Metodología para análisis de zinc en maíz

Actualmente los programas de biofortificación para Zn en maíz utilizan metodologías tanto de espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, por sus siglas en inglés) como fluorescencia de rayos X (XRF, por sus siglas en inglés). La precisión y exactitud del ICP es mayor que el XRF, siendo esta última una medición indirecta. El error en la medición por ICP se estima de ± 2 mg kg⁻¹.

La correlación entre ambas metodologías es de $R^2 \approx 0.9$ (Figura 6). Sin embargo, se sugiere analizar por ICP-OES aquellas muestras donde se buscan datos exactos, ya sea por razones de investigación, liberación de materiales o etapas avanzadas de mejoramiento. El XRF se recomienda para monitorear gran número de muestras en etapas iniciales de mejoramiento donde se pretende descartar muestras con valores bajos. Así mismo, es aceptable para corroborar o verificar algún material analizado previamente por ICP, bajo las mismas condiciones de crecimiento y muestreo. En la medida de lo posible, se recomienda analizar por ICP un 5-10 % de las muestras que se analizan por XRF, como una medida de monitoreo de las mediciones.

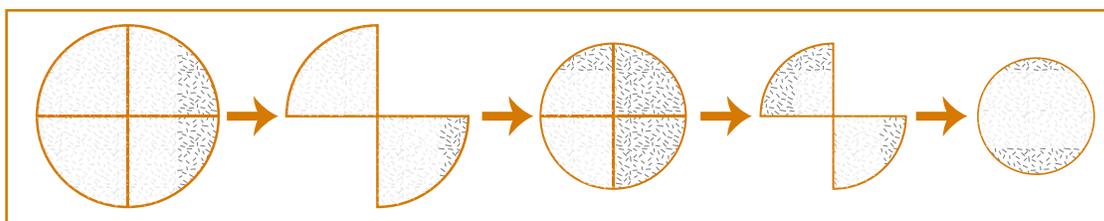


Figura 5. Método de cuarteo para la obtención de una muestra representativa.

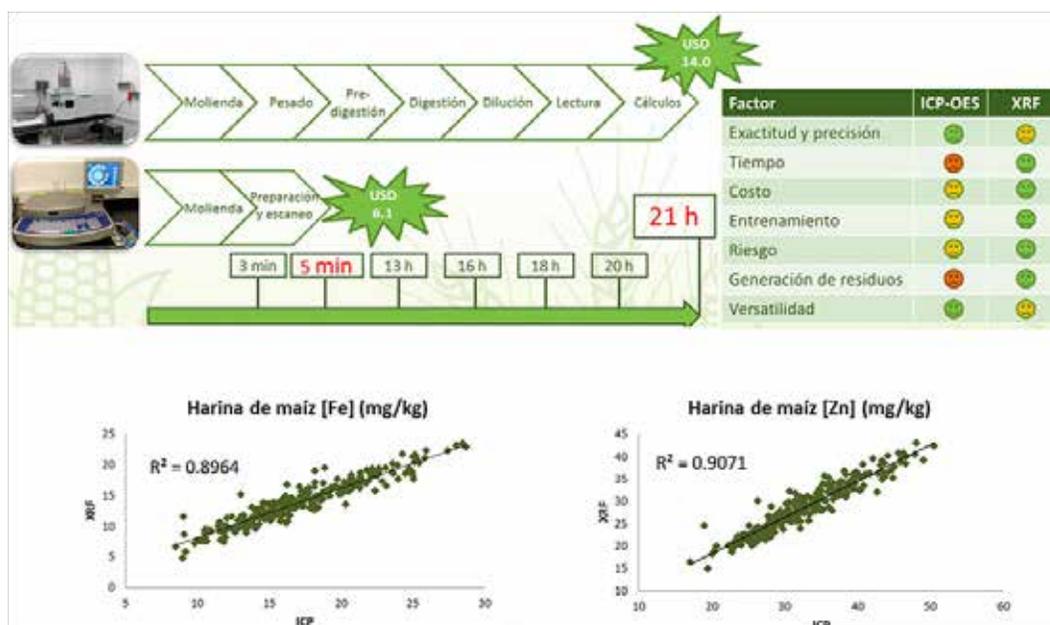


Figura 6. Comparación de métodos (ICP-OES y XRF).

Almacenamiento y transporte de muestras

Los recipientes, bolsas de papel, tubos, envolturas y cualquier equipo de tratamiento pos-cosecha, deben estar limpios y descontaminados (libres de suelo, polvo, etc). Igualmente deben cerrarse perfectamente para evitar una contaminación durante el almacenamiento o volcamiento de muestras durante el transporte. Si se utilizan sobres de papel se recomienda utilizar cinta adhesiva para sellarlos y evitar el uso de grapas o clips metálicos. Finalmente, las muestras deben ser almacenadas a temperatura ambiente en lugares secos, limpios y protegidos de plagas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de fumigar área de almacenamiento sin sellado hermético de las muestras.

n = 13	Sin fumigar	Fumigadas
Aluminio (mg kg ⁻¹)	0.00 ± 0.56	2.84 ± 1.03
Hierro (mg kg ⁻¹)	12.57 ± 2.47	14.73 ± 2.65
Zinc (mg kg ⁻¹)	18.82 ± 3.36	22.83 ± 4.10

Referencias

- (1) Stangoulis, J.; Sison, C. Protocolos de Muestreo en Cultivos para Análisis de Micronutrientes. *Monogr. Técnicas Harvest. 2008*, 20.

Muestreo para análisis de calidad de proteína

Contenido de aminoácidos e índice de calidad

La calidad proteínica está dada por el contenido de lisina y triptófano. El índice de calidad expresa la capacidad de dichos aminoácidos para formar proteína. Se recomienda monitorear no solo el contenido de aminoácidos, sino también de proteína y tener en cuenta que el contenido proteico se ve afectado por el contenido de nitrógeno en el suelo.¹

Análisis del material genético

Para evitar la contaminación por polen externo, se aconseja realizar autopolinizaciones o bien, el aislamiento por tiempo o espacio del material biológico. Dependiendo de la segregación y variabilidad genética, se sugiere realizar diversas autopolinizaciones en campo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad y segregación del material genético (calidad de proteína).

Tipo de material	Recomendación antes de cosecha	Cantidad requerida para análisis
Maíces criollos	50-100 autopolinizaciones o polinizaciones planta-planta	500 gramos
Variedades de polinización abierta	2-4 autopolinizaciones por surco (50 a 100 mazorcas)	500 gramos
Etapas inicial de mejoramiento (segregantes)	5-10 autopolinizaciones	50 gramos
Líneas mejoradas (parentales)	2-5 autopolinizaciones	50 gramos
Híbridos	2-3 autopolinizaciones	50 gramos

*Para mayor información y detalle, consultar los Protocolos para generar variedades QPM².

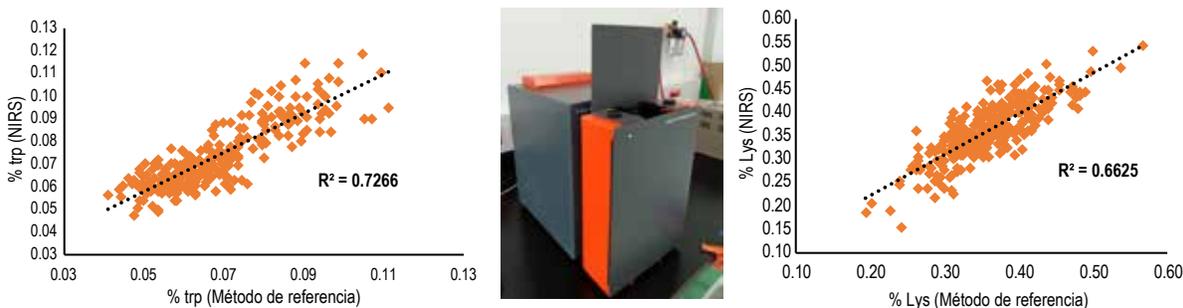
Protocolo de muestreo

Desgranar mecánica o manualmente las mazorcas. Si se realiza de manera manual, se pueden descartar los granos de los extremos. Enseguida, mezclarlos. Por último, extender los granos en forma circular y dividir en cuatro partes iguales. Descartar las dos cuartas partes diametralmente opuestas y mezclar las dos partes restantes. Repetir este paso hasta obtener la cantidad de grano (muestra) requerida (Figura 5).

Metodología para el análisis de calidad proteica de maíz

Los métodos utilizados para monitorear maíces de alta calidad proteínica se basan en la colorimetría y espectrofotometría³. El método utilizado para la determinación de triptófano es el del ácido glioxílico⁴ el cual es más preciso que el espectrofotómetro de infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés)⁵. Pese a que la correlación entre NIR y el método de ácido glioxílico es alta, el NIR es una medida indirecta y por lo tanto su exactitud es menor (Figura 7). Se recomienda el uso del NIR para el monitoreo de muestras en etapas tempranas del mejoramiento o para validar resultados obtenidos por el método químico (ácido glioxílico).

Usualmente, el monitoreo de la calidad proteínica se inicia con el análisis de triptófano y proteína y, de ser posible, con el de lisina también (Figura 8).



Etapa	Proceso	Método químico	NIRS	Costo (USD)
Preparación de la muestra	Molienda	2 min	2 min	2.1
	Desgrasado	10 h	0 h	2.1
	Hidrólisis	18 h	0 h	2.5
Análisis	Reacción química y cálculos	1 h	0 h	1.1
	Escaneo en NIRS	0 h	1 min	0.52

Figura 7. Comparación de métodos para el análisis de calidad proteica de maíz (método químicos y NIRS).

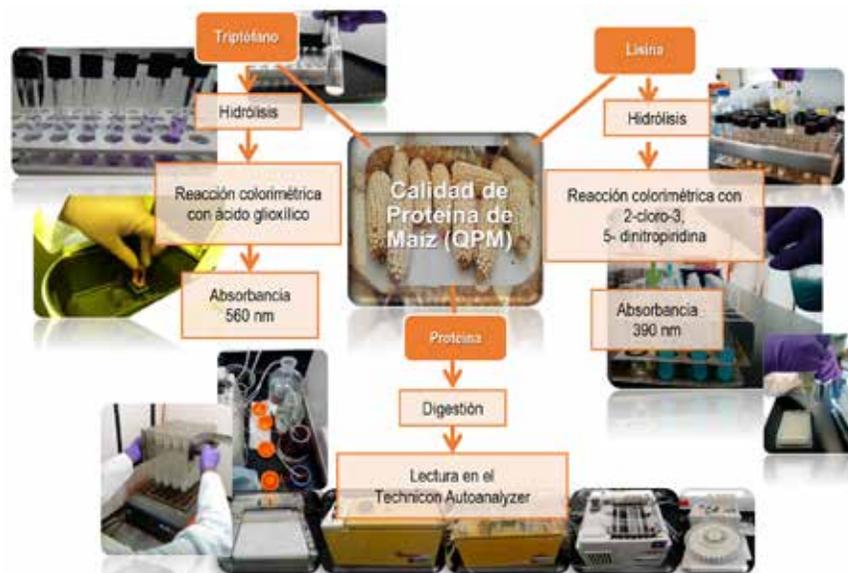


Figura 8. Evaluación de la calidad proteica de maíz (triptófano, lisina y proteína).

Almacenamiento de muestras

Almacenar en un lugar fresco, libre de plagas y en recipientes sellados para evitar la entrada de polvo y volcamiento de la muestra. Es preferible no almacenar tejidos de raíz o muestras de suelo en el mismo espacio.

Referencias

(1) Wegary, D.; Labuschagne, M. T.; Vivek, B. S. Protein quality and endosperm modification of quality protein maize (*Zea mays* L.) under two contrasting soil nitrogen environments. *F. Crop. Res.* 2011, 121 (3), 408–415.

(2) Vivek, B. S.; Krivanek, a. F.; Palacios-Rojas, N.; Twumasi-Afriyie, S.; Diallo, a. O. Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM; 2008.

(3) Galicia-Flores, L. A.; Miranda, A.; Gutiérrez, M. G.; Custodio, O.; Rosales, A.; Ruiz, N.; Surlles, R.; Palacios-Rojas, N. Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal: Protocolos de laboratorio 2012.; CIMMYT International Maize and Wheat Improvement Center: Mexico, 2012.

(4) Nurit, E.; Tiessen, A.; Pixley, K.; Palacios-Rojas, N. Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57 (16), 7233–7238.

(5) Rosales, A.; Galicia-Flores, L. A.; Oviedo, E.; Islas-Caballero, C.; Palacios-Rojas, N. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (20), 10781–10786.

Muestreo para análisis de carotenoides y provitamina A

Acumulación de carotenos durante el desarrollo de la mazorca y diferencia según genotipo

La acumulación de carotenoides en los granos de maíz ocurre durante el desarrollo del endospermo y comienza de los 10 a los 15 días después de la polinización (DDP), llegándose a un contenido máximo entre los 20 y 25 DDP, aunque esto depende de la variedad y de las condiciones ambientales (Figura 9,

cuadro 6,¹). El tipo de carotenoides también es diferente dependiendo la etapa fenológica, en la figura 9 se aprecia el porcentaje de carotenoides totales (TC) y carotenoides con actividad de provitamina A (Pro A) en diferentes días.

Por ello la importancia de cosechar las mazorcas en la misma etapa de desarrollo o documentar las fechas de siembra, floración y cosecha. También se debe registrar la humedad de la muestra al ser cosechada debido a que existe una correlación entre la humedad y la tasa de pérdida de carotenoides². Adicionalmente se recomienda expresar los resultados de concentración de los carotenos en base seca.

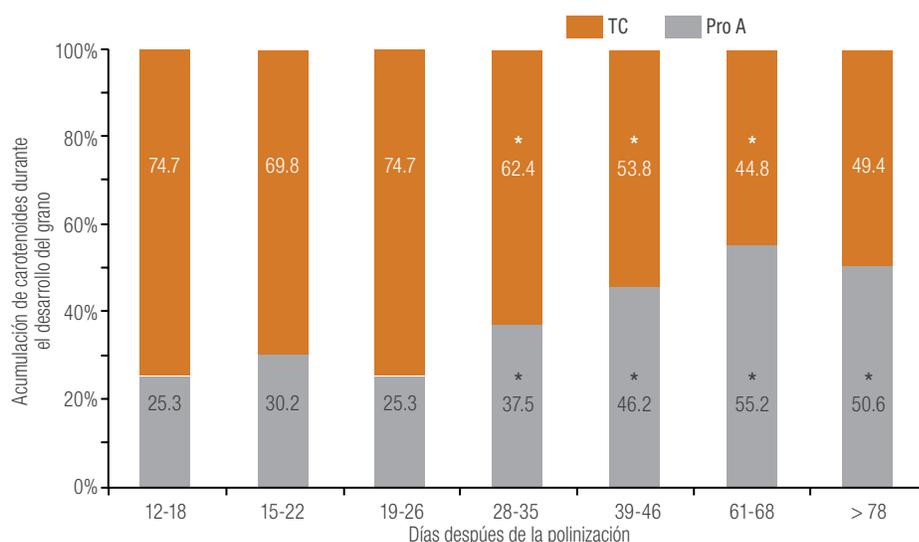


Figura 9. Cambio en la proporción de carotenoides totales (TC) y carotenoides con actividad de provitamina A.

Cuadro 6. ANOVA, diferencias genotípicas para la acumulación de carotenoides durante la maduración del grano.

Fuente	df	Cuadrático medio					
		LUT-ZEA	BCX	13-BC	BC	9-BC	Pro VA
Etapas de maduración (S)	6	147.95**	85.90**	8.40**	174.02**	4.58**	410.30**
Genotipo (G)	23	154.99**	19.07**	0.67**	14.38**	0.44**	34.32**
SxG	119	12.44**	2.54**	0.10**	2.36**	0.06**	4.85**
Error	130	7.58	1.22	0.05	1.15	0.03	2.20

En donde: LUT-ZEA, suma de luteína y zeaxantina; BCX, β -criptoxantina; 13-BC, 13- β -caroteno; BC, β -caroteno; 9-BC, 9- β -caroteno; y, pro VA, provitamina A.

Efecto del secado de grano en la concentración de carotenos



Figura 10. Distintos métodos de secado de maíz.

Cuadro 7. Efecto de diferentes tipos de secado en los carotenoides de maíz.

Tratamiento	Resultados	Referencia
90 °C	No existen diferencias significativas en el contenido de carotenos totales.	Burt et al., 2010 ³
25 °C		
Liofilización		
Mazorcas al sol	Sin cambio en el perfil de carotenos. Sin pérdidas significativas en carotenos.	Palacios-Rojas et al. 2016, sin publicar.
Granos al sol		
Mazorcas con hoja, al sol	Pérdidas en β -carotenos.	Rosales, 2014 ⁴
Grano en horno a 50 °C		

Material genético para analizar

Con el fin de evitar contaminación de polen externo, se recomienda hacer autopolinizaciones o asegurar aislamiento por tiempo o por espacio del material biológico. Dependiendo de la variabilidad/segregación del material genético, se recomienda realizar diferente número de autopolinizaciones en campo (Cuadro 8):

Cuadro 8. Número de autopolinizaciones sugeridas de acuerdo a la variabilidad/segregación del material genético (carotenoides y provitamina A).

Tipo de material	Recomendaciones antes de cosecha	Cantidad requerida para los análisis
Maíces criollos	Realizar 50 - 100 autopolinizaciones o polinizaciones planta - planta	500 g
Variedades de polinización abierta	Realizar 2 - 4 polinizaciones por surco. En lo posible cosechar 50 - 100 mazorcas	500 g
Líneas en etapas iniciales de mejoramiento (segregantes)	Realizar de 5 - 10 autopolinizaciones	100 granos
Líneas mejoradas (parentales)	Realizar de 2 - 5 autopolinizaciones	50 granos
Híbridos	Realizar de 2 - 3 autopolinizaciones	50 granos

Protocolo de muestreo

Desgranar mecánica o manualmente las mazorcas. Si se realiza de manera manual, se pueden descartar los granos de los extremos. Enseguida, mezclarlos. Por último, extender los granos en forma circular y dividir en cuatro partes iguales. Descartar las dos cuartas partes diametralmente opuestas y mezclar las dos partes restantes. Repetir este paso hasta obtener la cantidad de grano (muestra) requerida (Figura 5).

Metodologías para análisis de carotenos totales y provitaminas A en maíz

Los métodos analíticos comúnmente utilizados para monitorear el contenido total de carotenos y la cuantificación de provitaminas A en maíz están basados en espectrofotometría⁵. Para cuantificar carotenos totales se utiliza el espectrofotómetro (método tradicional y *iCheck*) y el NIRS, los cuales tienen menor exactitud, pero es bastante rápido y fácil de utilizar (Figura 11).

Según el espectro obtenido de carotenos, provitamina A y no-provitamina A presente en los granos, se recomienda el análisis por cromatografía líquida (HPLC o UPLC) para separar los diferentes compuestos. Se aconseja el uso de NIR cuando se monitorean

muestras en etapas tempranas de mejoramiento o se validan resultados previamente determinados por método químico. Recientemente, el laboratorio ha desarrollado modelos de calibración para NIRS que funcionan bien en la cuantificación de provitamina A en maíz³ (Figura 12).

Almacenamiento y transporte de muestras

Se recomienda que las muestras sean almacenadas el menor tiempo posible antes de su análisis debido a la disminución de carotenoides que se presenta durante esta etapa⁶, especialmente de los que presentan actividad de provitamina A. En la figura 13 se observa que la retención de carotenoides con actividad de provitamina A disminuye drásticamente conforme aumenta el tiempo de almacenamiento y la temperatura a la cual se almacena. Existe una influencia del genotipo en los porcentajes de retención.

Los carotenoides son altamente susceptibles a degradación oxidativa, la cual es promovida por la presencia de oxígeno, altas temperaturas, baja actividad de agua y presencia de luz, por lo que se recomienda almacenar en mazorca o en grano, por corto tiempo a la más baja temperatura posible (entre -20°C y 4°C) y en empaques que limiten la

Método	Carotenoides totales	Carotenoides ProA	Comentarios
Espectrofotometría	😊	😞	
HPLC	😊	😊	
UPLC	😊	😊	
NIRS	😊	😊	Sigue en proceso de validación
FT-IR	😊	😞	
iCheck	😊	😞	

Figura 11. Metodologías para análisis de carotenos en maíz.

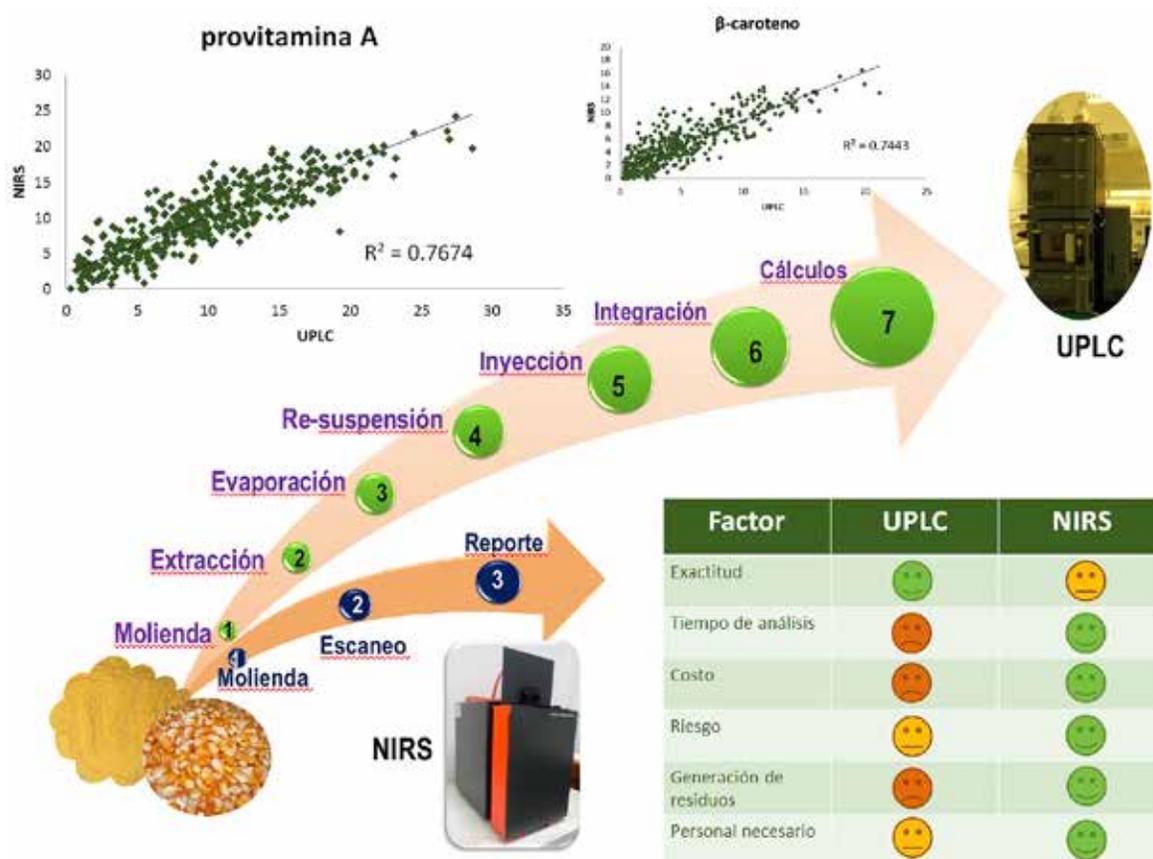


Figura 12. Comparación entre UPLC y NIRS para análisis de provitamina A en maíz.

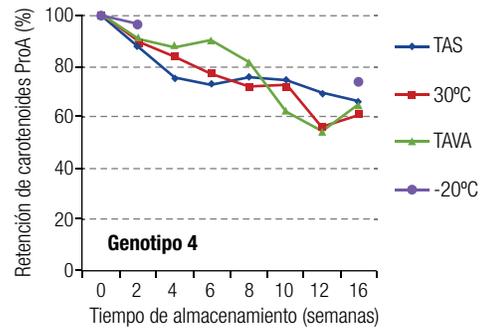
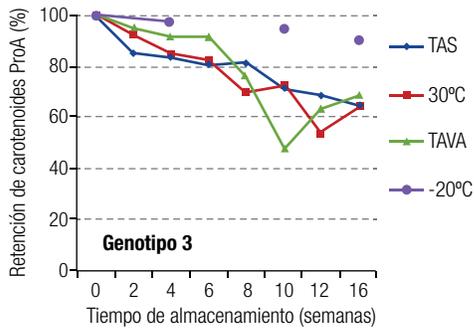
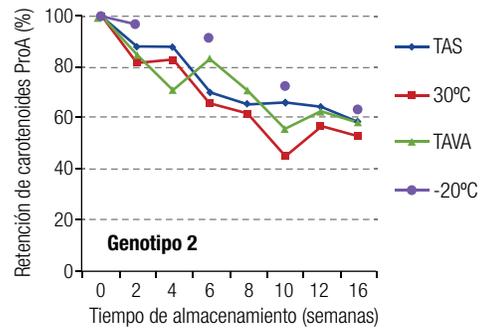
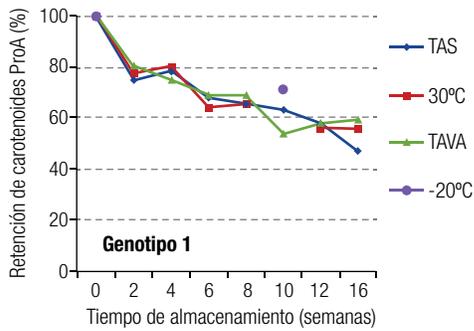


Figura 13. Efecto del tiempo de almacenamiento en la retención de carotenoides con actividad de provitamina A (ProA). En donde: TAS, temperatura ambiente en subtropical; TAVA, temperatura ambiente en Valles Altos.

disponibilidad de oxígeno y el contacto con la luz (Figura 14). Bolsas aluminizadas para empacar alimentos son ideales, sin embargo, en ocasiones son difíciles de adquirir, por lo que también se recomiendan bolsas con cierre hermético (Figura 15) empacando posteriormente en bolsas oscuras.



Figura 14. Empacando muestra de maíz.



Figura 15. Bolsas adecuadas para almacenar y transportar maíz para determinación de contenido de carotenoides.



Referencias

- (1) Wurtzel, E. T. Chapter five Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis. *Recent Adv. Phytochem.* 2004, 38 (C), 85–110.
- (2) Cardoso, W. S.; Borém, A.; Karam, D.; Rios, S. D. A.; Cristina, M.; Paes, D. Influence of the moisture at harvest and drying process of the grains on the level of carotenoids in maize (*Zea mays*). *Food Sci. Technol.* 2015, 35 (3), 481–486.
- (3) Burt, A. J.; Grainger, C. M.; Young, J. C.; Shelp, B. J.; Lee, E. A. Impact of postharvest handling on carotenoid concentration and composition in high-carotenoid maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (14), 8286–8292.
- (4) Rosales, A. Efecto del proceso de nixtamalización sobre el contenido de carotenoides en diferentes híbridos de maíz., Instituto Politécnico Nacional, 2014.
- (5) Galicia-Flores, L. A.; Miranda, A.; Gutiérrez, M. G.; Custodio, O.; Rosales, A.; Ruiz, N.; Surlles, R.; Palacios-Rojas, N. *Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal: Protocolos de laboratorio 2012.*; CIMMYT International Maize and Wheat Improvement Center: Mexico, 2012.
- (6) Ortiz, D.; Rocheford, T.; Ferruzzi, M. G. Influence of Temperature and Humidity on the Stability of Carotenoids in Biofortified Maize (*Zea mays* L.) Genotypes during Controlled Postharvest Storage. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64 (13), 2727–2736.



Preparación de la muestra

Aide Molina, Rubén Basilio y Aldo Rosales

Preparación de la muestra

La mayoría de las muestras sujetas a procesos analíticos no están listas para analizarse directamente, por lo que deben someterse antes a varios procesos, los cuales dependen del tipo de muestra, matriz y nivel de concentración del metabolito de interés. Generalmente, los análisis de trazas requieren una preparación más compleja que los análisis de compuestos mayoritarios¹.

Usualmente el procesamiento de preparación de la muestra es visto como una actividad rutinaria y no como un protocolo de análisis, sin embargo, es importante que todos los involucrados en las actividades del laboratorio tengan en cuenta que la calidad de resultados obtenidos dependerá de la adecuada preparación de muestra. Como regla general, el error durante el muestreo y la preparación de la muestra para los procedimientos analíticos son considerablemente más grandes que la metodología *per se* (Figura 16)^{2,3}. Aunque en ocasiones no se puede controlar el proceso de muestreo (ver sección de muestreo), el proceso de preparación de las muestras es responsabilidad total del laboratorio.



Figura 16. Magnitud de errores en diferentes etapas del proceso de análisis.

El objetivo de la preparación de las muestras para análisis de laboratorio es proveer, con el menor porcentaje de pérdidas, una sub-muestra libre de contaminación para ser utilizada en los protocolos y procedimientos analíticos.

Los principales procesos involucrados en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz son: liofilización, molienda, desgrasado y secado.

Referencias

- (1) Winefordner, J. D. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry.; Monographs on analytical chemistry and its applications.; 162; New Jersey., 2003.
- (2) EPA. Laboratory sample preparation. In Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols Manual (MARLAP); United States Environmental Protection Agency, 2004; pp 1-44.
- (3) Markert, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. Sci. Total Environ. 1995, 176 (1-3), 45-61.

Liofilización con el equipo LABCONCO™ modelo 7755041

Justificación

La liofilización es una técnica de secado utilizada en diferentes industrias alimentarias, farmacéuticas y biotecnológicas¹. Este proceso se ha convertido en uno de los más importantes dado que permite la preservación de compuestos sensibles a altas temperaturas, además de olores y sabores en distintos alimentos y plantas².

Fundamento

El proceso consiste en remover el agua o solvente del material o producto por medio de sublimación, lo cual ocurre cuando el hielo se convierte directamente en vapor, sin pasar por estado líquido. Para realizar éste proceso se utiliza el liofilizador Labconco (Figura 17)³.

Alcance

Se puede liofilizar cualquier tipo de material. La cantidad de muestras depende de la capacidad del equipo, cantidad y tipo de muestra. Materiales con alto porcentaje de humedad pueden requerir entre 1 día y 4 semanas de liofilización, por tanto, la muestra debe revisarse constantemente para verificar el avance del proceso.



Figura 17. Liofilizador LABCONCO Mod. 7755041.

Cuadro 9. Material y equipos utilizados para liofilizar.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Liofilizador	N/A	Labconco 7755041
Película plástica de parafina	Ancho: 2 o 4 pulgadas	Parafilm

Diagrama de flujo

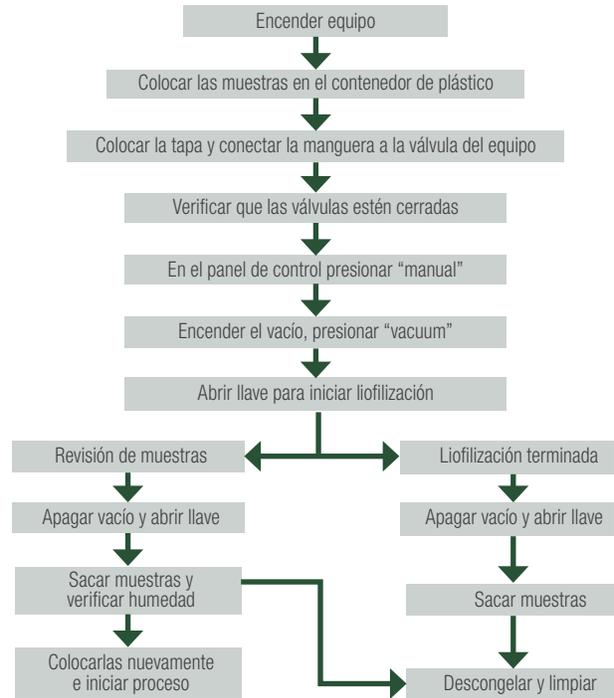


Figura 18. Diagrama de flujo para el uso del liofilizador.

Procedimiento

1. Encender el equipo con el botón que se encuentra en la parte lateral izquierda del equipo (Figura 19).

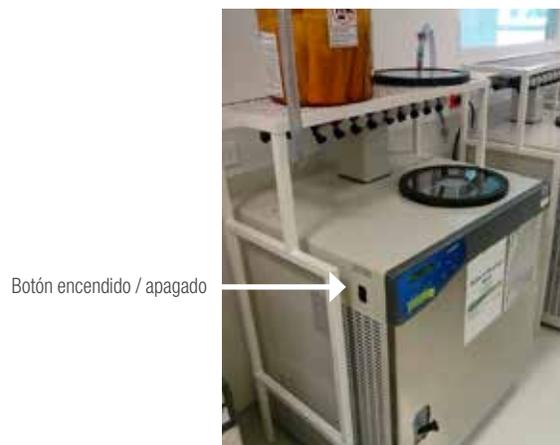


Figura 19. Vista lateral del equipo.

2. Conectar la manguera a la válvula del equipo, colocar las muestras en el contenedor y colocar la tapa (Figura 20).



Figura 20. Manifold y base para contenedor.

3. Verificar que todas las válvulas estén completamente cerradas, la pestaña debe de estar apuntando hacia el lado contrario de la conexión de la manguera, se recomienda colocar plástico parafilm entre la manguera y la boquilla de la válvula para evitar fugas de aire o que se desconecte la manguera (Figura 21).

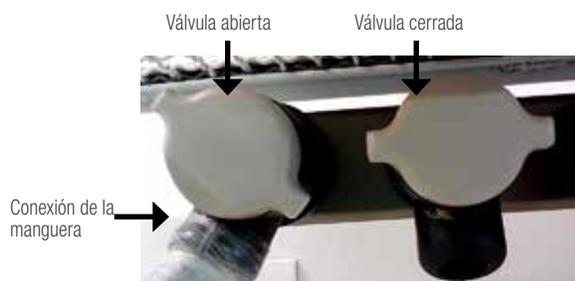


Figura 21. Posición de las válvulas. Dirección de la pestaña con relación al conector de la manguera.

4. Realizadas las conexiones, presionar el botón manual, esperar hasta que la temperatura descienda a $-50 \pm 1^\circ\text{C}$. Alcanzada la temperatura, encender el vacío presionando el botón vacuum. Abrir la válvula que esté conectada a la manguera (la pestaña debe de estar en dirección hacia la conexión de la manguera) del contenedor de muestras. La temperatura y presión de vacío inicial deben de disminuir paulatinamente, lo cual se podrá verificar en la pantalla y en las gráficas indicadoras dado que las luces van encendiendo de forma descendente, una vez que encienden todas, indica que la temperatura y la presión de vacío se mantendrán constantes (Figura 22).
5. Para revisar o retirar muestras, presionar el botón de vacío para apagarlo y cerrar la válvula donde se encuentra conectada la manguera. Esperar algunos segundos hasta que la presión del contenedor sea normal y retirar la tapa. Revisar las muestras y si están completamente secas retirar (las muestras sólidas se quebran fácilmente y las líquidas se ven porosas y no están frías) y si aún presentan humedad

regresar las muestras al contenedor, encender el vacío y abrir la válvula. Verificar que la presión disminuya. Si la presión o temperatura no disminuyen verificar que no exista demasiada agua condensada en el sistema y que la manguera de conexión de drenado estén bien sellada (Figura 23).



Figura 22. Panel de control.



Figura 23. Ubicación de la manguera para drenar.

6. Para la limpieza del equipo:
 - Sacar las muestras del contenedor.
 - Apagar el vacío y el sistema manual.
 - Presionar el botón defrost y esperar hasta que el hielo del condensador se derrita.
 - Cuando el condensador ya no tiene hielo, la función defrost se apaga automáticamente.
 - Quitar el tapón de la manguera de drenado y recuperar el agua en un recipiente.
 - Secar el área del condensador y desechar el agua de drenado.
7. Se recomienda utilizar como máximo dos contenedores de muestras por equipo, con una cantidad de material moderado, ya que la presión del equipo no es suficiente para altas cantidades.

Cuadro 10. Solución a problemas comunes durante al liofilizar

Problema	Solución
La presión del liofilizador no baja.	Verificar que el tanque del condensador no tenga agua, en caso de tenerla, drenarla. Comprobar que no haya fugas de aire entre la tapa, el contenedor y la manguera del manifold. Sellar completamente. Antes de colocar las muestras en el contenedor, esperar a que la presión baje. Un exceso de muestras puede provocar que la presión disminuya muy lentamente.

Referencias

- Misael Cortes, Edgar Herrera H., E. R. S. Optimización Experimental Del Proceso De liofilización de Uchuva adicionada con componentes activos por impregnación al vacío. *Rev. la Fac. ciencias Farm. y Aliment.* 2015, 47–56.
- Ciurzyńska, A.; Lenart, A. Freeze-Drying - Application in Food Processing and Biotechnology - A Review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2011, 61 (3), 165–171.
- Labconco. *A guide to freeze drying for the laboratory*; 2010.

Molienda

La molienda es un proceso unitario ampliamente utilizado en la industria de los alimentos y en laboratorios de análisis químicos e involucra una reducción gradual del tamaño de partícula¹. El resultado de la molienda depende de las propiedades del material biológico (dureza, forma, composición) y también de la distribución e intensidad de la tensión aplicada por el equipo utilizado².

Las partículas pequeñas tienen una mayor superficie de contacto, son más homogéneas y más fáciles de descomponer, lo cual mejora los procesos de disolución y extracción. El tamaño de partícula puede afectar significativamente la composición de la muestra en términos de homogeneidad y representatividad de la sub-muestra, lo cual se refleja en las técnicas que utilizan pequeñas cantidades de material (< 100 mg). Para obtener una sub-muestra con el tamaño de partícula adecuado, el material a analizar es sometido a un proceso de molienda, el cual representa uno de los pasos más importantes en la preparación de la muestra y es de los que más contribuye a la obtención de resultados erróneos³.

Referencias

- Shi, L.; Li, W.; Sun, J.; Qiu, Y.; Wei, X.; Luan, G.; Hu, Y.; Tatsumi, E. Grinding of maize: The effects of fine grinding on compositional, functional and physicochemical properties of maize flour. *J. Cereal Sci.* 2016, 68, 25–30.
- Baudelaire, E. D. *6 - Grinding for food powder production*; Woodhead Publishing Limited, 2013.
- Santos, W. P. C.; Hatje, V.; Lima, L. N.; Trignano, S. V.; Barros, F.; Castro, J. T.; Korn, M. G. A. Evaluation of sample preparation (grinding and sieving) of bivalves, coffee and cowpea beans for multi-element analysis. *Microchem. J.* 2008, 89 (2), 123–130.

Molienda con molino de discos

Fundamento

El molino de discos consiste en dos discos dentados ubicados de manera opuesta (Figura 24), donde uno se encuentra fijo y el otro girando a gran velocidad; el material a moler (duro o fibroso) se encuentra entre ambos discos. La molienda se logra por la fuerza de cizalla que se aplica a la muestra. El material solo permanece en la cámara de molienda hasta que se obtiene el tamaño de partícula fijado. La velocidad de alimentación es controlada manualmente¹.

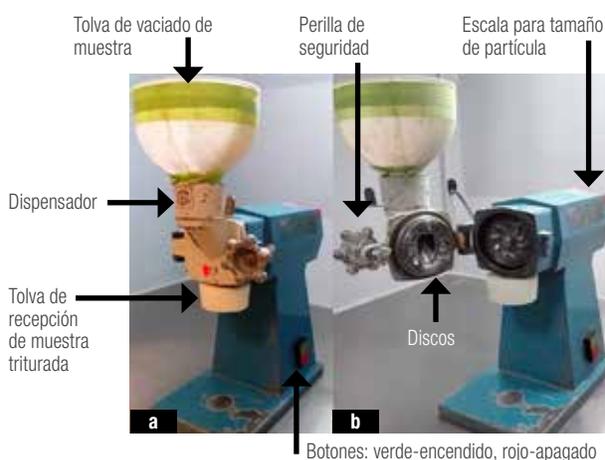


Figura 24. Molino de discos. a) Parte externa; b) Parte interna

Alcance

El molino de discos se utiliza como etapa previa a la molienda de las muestras en el molino ciclónico. El tamaño de partícula que se obtiene es aproximadamente de 1 mm de diámetro. Un técnico puede procesar hasta 200 muestras por día.

NOTA: No utilizar este molino para análisis de hierro o zinc, debido a posible contaminación.

Cuadro 11. Material y equipos utilizados en molienda con molino de discos

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Molino de discos	N/A	Falling Number Tipo 3303
Aire comprimido	Aire seco, 80 psig	N/A
Cepillos para limpieza	N/A	N/A

Procedimiento

1. Tomar al azar 30 semillas de cada muestra.
2. Seleccionar el tamaño de partícula adecuado para el análisis. Generalmente se utiliza el nivel 1 (tamaño aproximado de 1.0 mm) (Figura 25).



Figura 25. Selector de tamaño de partícula.

3. Depositar el grano en la tolva del molino y colocar el sobre de papel en la parte inferior del molino para la recepción de la harina. Verificar que el dispensador se encuentre cerrado (Figura 26).
4. Dejar caer la muestra poco a poco con ayuda del dispensador.
5. Limpiar entre cada muestra molida con aire comprimido para evitar contaminación cruzada (Figura 27).

Cuadro 12. Solución a problemas comunes

Problema	Solución
El molino se atora.	Se debe abrir el molino para retirar el grano atascado por la alta velocidad de alimentación. Se recomienda dosificar el grano lentamente.
El molino no enciende.	Verificar la corriente eléctrica y el voltaje.
Residuos de grano después de la limpieza.	Limpiar con un cepillo de cerdas de plástico.

Referencias

- (1) Markert, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *Sci. Total Environ.* 1995, 176 (1-3), 45-61.



Figura 27. Limpieza del molino.



Figura 26. a) Vaciado del grano; b) Colocación del sobre; c) Dispensador cerrado.

Molienda utilizando molino ciclónico

Fundamento

La reducción del tamaño de partícula se efectúa por el impacto y la fricción entre las aspás del rotor y la superficie del anillo que se encuentra alrededor. La muestra pasa a través de la tolva y al golpear el rotor se somete a una primera reducción. Posteriormente, la muestra es arrojada al exterior por la aceleración centrífuga y pulverizada entre el rotor y el anillo (Figura 28)¹.



Figura 28. a) Descripción general del molino ciclónico; b) Rotor con aspás; c) Vista interna de la tapa.

Alcance

Los molinos ciclónicos se utilizan para moler pequeñas cantidades y materiales en donde se analizarán compuestos que podrían ser afectados por el calor generado durante el proceso. Dado que el material se mantiene por corto tiempo en la cámara de molienda y el movimiento del rotor provoca un ciclón de aire, el efecto de la temperatura sobre la muestra es mínimo¹.

Se sugiere moler muestras previamente procesadas en el molino de discos. El tamaño de partícula de referencia es 0.5 mm, aunque puede variar en función de la malla utilizada (desde 0.25 hasta 2 mm). Un técnico con capacitación básica puede procesar hasta 100 muestras por día.

NOTA: No utilizar este molino para el análisis de hierro o zinc, debido a posible contaminación.

Cuadro 13. Material y equipos utilizados en molienda con molino ciclónico.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Molino ciclónico	N/A	FOSS Tecator Cyclotec 1093
Mallas de cribado	Diámetro de 0.5 mm	FOSS
Cepillos para limpieza	N/A	N/A
Brocha	N/A	N/A
Aire comprimido	Aire seco, 80 psig	N/A

Procedimiento

1. Colocar la malla de 0.5 mm dentro del cabezal del molino ciclónico (Figura 29).



Figura 29. Colocación de la malla de 0.5 mm de diámetro.

2. Encender el molino y tapar con la mano la parte inferior de éste para impedir la salida de aire (Figura 30).
3. Vaciar la muestra al molino sin retirar la mano de la salida de aire. Esperar que toda la muestra pase por la malla (Figura 31).
4. Limpiar entre cada muestra molida con aire comprimido, brocha y escobillones para evitar contaminación cruzada.

Cuadro 14. Solución a problemas comunes en molienda con molino ciclónico.

Problema	Solución
El molino se atora.	Se debe abrir el molino para retirar el grano atascado por la alta velocidad de alimentación. Se recomienda dosificar el grano lentamente.
El molino no enciende.	Verificar la corriente eléctrica y el voltaje.



Figura 30. Encendido del molino.



Figura 31. Molienda de la muestra.

concavidades a ambos extremos del recipiente, la combinación de impacto y fricción ocasiona un alto nivel de rompimiento de la muestra, obteniendo así, partículas extra finas (< 0.5 mm), aunque esto depende de la naturaleza de la muestra. El material es mezclado intensamente debido al movimiento de los recipientes y a la trayectoria de la bola^{1,2}.

Alcance

El molino mezclador es ideal para cantidades de muestra menores a 10 g, la pérdida de material es prácticamente cero. Se puede moler todo tipo de maíz y tejido vegetal, el tamaño de partícula obtenido es inferior a 0.5 mm, aunque esto depende del tipo de material y el tiempo de molienda. Para análisis de análisis de hierro y zinc, se deben utilizar contenedores de óxido de zirconio debido a que no causa

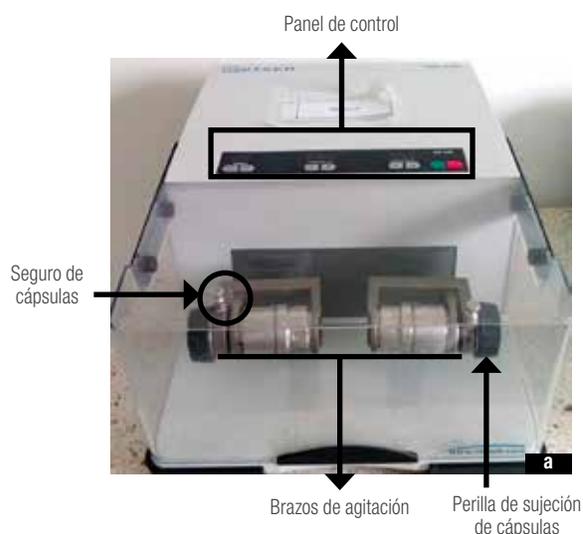


Figura 32. a) Descripción frontal del molino de bolas MM 400, b) Descripción trasera del molino de bolas MM400.

Referencias

- (1) Retsch. Cyclone Mill TWISTER <http://www.retsch.com/products/milling/rotor-mills/twister> (accessed May 19, 2016).

Molienda con molino mezclador MM400 Retsch™

Fundamento

Los recipientes de molienda de MM 400 (Figura 32), ubicados horizontalmente, realizan movimientos en forma de arco circular. La bola que se encuentran en su interior se mueve por inercia chocando con gran energía contra el material que se encuentra en las

interferencia en los resultados³⁻⁵, para otros análisis es posible utilizar contenedores de acero inoxidable (Figura 33). Un técnico con capacitación básica puede procesar 100 muestras por día.



Figura 33. a) Contenedores de circonio, b) Contenedores de acero inoxidable.

Cuadro 15. Material y equipos utilizados en molienda con molino mezclador.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Molino mezclador	N/A	MM400 Retsch
Cápsula de molienda (figura 2)	35 mL, de acero inoxidable u óxido de circonio.	Retsch
Espátula	Plástico.	N/A
Tubos de plástico tipo Falcon	15 mL	Greiner o Corning
Papel encerado	4 x 4 in	Whatman o FisherBrand
Aire comprimido	Aire seco, 80 psig	N/A

Procedimiento

1. Depositar entre 7 y 8 mL de muestra en tubos plásticos tipo Falcon de 15 mL (Figura 34).



Figura 34. Muestra en tubos de plástico.

2. Para cada contenedor, colocar una bola de molienda y posteriormente vaciar la muestra contenida en el tubo de plástico (Figura 35).

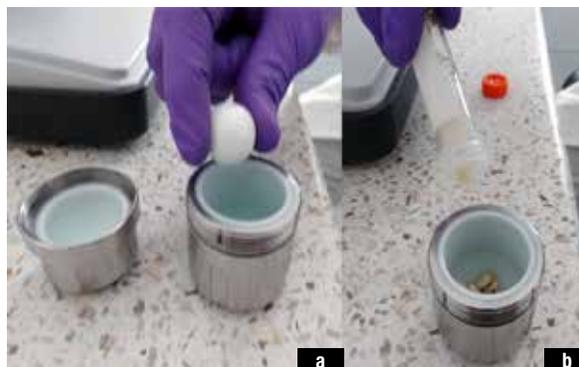


Figura 35. a) Colocación de la bola de molienda, b) Colocación de la muestra.

3. Cerrar los contenedores y colocarlos en los brazos del molino. Verificar que los contenedores estén bien ajustados y que el seguro de cada brazo esté bien ubicado (Figura 36).



Figura 36. a) Posición de contenedores, b) Ajuste, c) Seguro.

4. El tiempo y frecuencia del programa de molienda depende del tipo de muestra. Para maíz se recomienda una frecuencia de 30 golpes por segundo durante 90 segundos (Figura 37).



Figura 37. Configurando frecuencia y tiempo de molienda.

- Al finalizar el tiempo de molienda, la harina resultante se deposita en papel encerado para facilitar su depósito en el tubo contenedor (Figura 38).

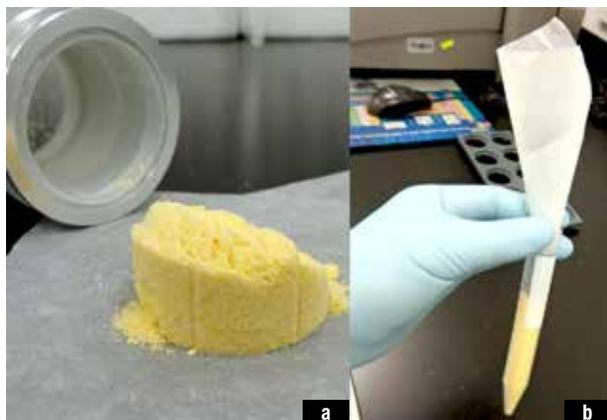


Figura 38. a) Muestra en papel, b) Muestra de regreso en el tubo.

- Limpiar los contenedores con aire comprimido. Para tejido vegetal se utiliza alcohol etílico (al 70%) para remover pigmentación de los contenedores.

Cuadro 16. Solución a problemas comunes en molienda con molino mezclador.

Problema	Solución
Las partículas resultantes son muy grandes.	Sucede frecuentemente con maíz duro, se sugiere mezclar el material con una espátula de plástico y repetir el proceso.
La frecuencia no se mantiene constante.	Verificar que el peso de los contenedores sea similar; un desbalance ocasiona daño en los brazos. De no solucionarse, contactar al proveedor local.

Referencias

- Markert, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *Sci. Total Environ.* **1995**, 176 (1–3), 45–61.
- Retsch. Molino Mezclador MM400 <http://www.retsch.es/es/productos/molienda/molinos-de-bolas/molinos-mezclador-mm-400/> (accessed May 19, 2016).
- Stangoulis, J.; Sison, C. Protocolos de Muestreo en Cultivos para Análisis de Micronutrientes. *Monogr. Técnicas Harvest.* **2008**, 20.
- Stangoulis, J. C. R. Technical aspects of zinc and iron analysis in biofortification of the staple food crop, wheat and rice. In *19th. World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*, Brisbane, Australia, 2010; pp 42–44.
- Pachón, H.; Ortiz, D. a; Araujo, C.; Blair, M. W.; Restrepo, J. Iron, zinc, and protein bioavailability proxy measures of meals prepared with nutritionally enhanced beans and maize. *J. Food Sci.* **2009**, 74 (5), H147-54.

Molienda con molino de martillos

Fundamento

El molino de martillos (Figura 39) se conforma de una boca de alimentación, una cámara de molienda y una boca de descarga. El material a moler ingresa por la boca de entrada y por gravedad cae en el interior de la cámara de molienda donde es golpeado por los martillos rotatorios de alta velocidad, esto ocurre sucesivamente hasta que alcanza un tamaño de partícula tal que le permita salir por la rejilla de la descarga. El rompimiento de la muestra ocurre por la fuerza de impacto y cizalla^{1,2}.

Alcance

Los molinos de martillos se usan para triturar y moler materiales de los que se disponga una cantidad considerable de muestra (mínimo 100 g) ya que a mayor muestra se tiene menor merma de material. Se puede procesar todo tipo de grano y tejido vegetal. El tamaño de partícula obtenido es depende del tamaño de la rejilla de salida (0.25 a 3 mm). Un técnico con capacitación básica puede procesar 200 muestras por día. NO emplear para análisis de hierro o zinc porque existe evidencia de contaminación.



Figura 39. Molino de martillos a) parte externa, b) parte interna.

Cuadro 17. Material y equipos utilizados en molienda con molino de martillos.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Molino de martillos	N/A	Christy Turner 43220 Series 3000
Malla de cribado	Orificios de 0.5 mm – 3 mm	Christy Turner
Cepillos para limpieza	N/A	N/A
Contenedor de harina	Plástico o tela	N/A
Aire comprimido	Aire seco, 80 psig	N/A

Procedimiento

1. Colocar la malla del tamaño requerido y ajustar los tornillos para sujetarla al molino (Figura 40).

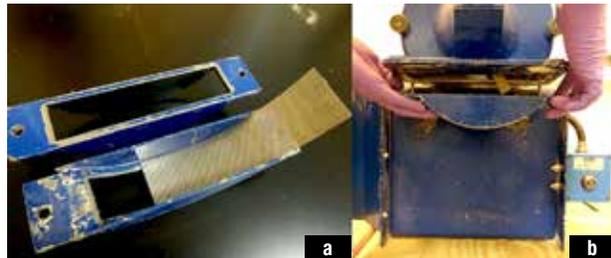


Figura 40. a) Colocación de la malla, b) Sujeción de la malla en molino.

2. Poner el recipiente contenedor de harina en la boca de salida (Figura 41).



Figura 41. Contenedor de harina.

3. Cerrar la compuerta y observar que la perilla de seguridad de la cámara de molienda quede en opción "ON" (Figura 42).



Figura 42. Perilla en opción "ON".

4. El molino requiere un voltaje de 220 V, se debe mantener aislado hasta utilizarlo. Para activar el molino, encender el interruptor de voltaje, colocar la perilla de seguridad de los martillos rotatorios en posición "ON" y presionar el botón de encendido del molino (Figura 43).

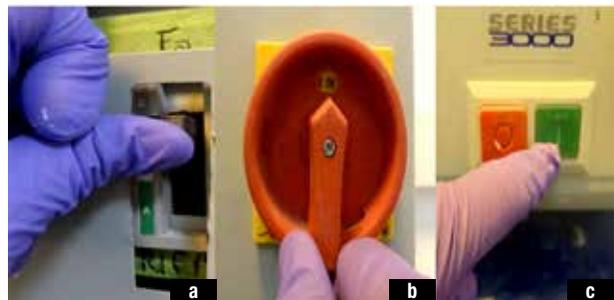


Figura 43. a) Interruptor de voltaje, b) perilla de seguridad de los martillos, c) Encendido del molino.

- Vaciar cuidadosamente la muestra en la tolva y permitir que entre al molino (Figura 44).

NOTA: Algunos fragmentos pueden regresar por la boca de alimentación proyectados a gran velocidad.

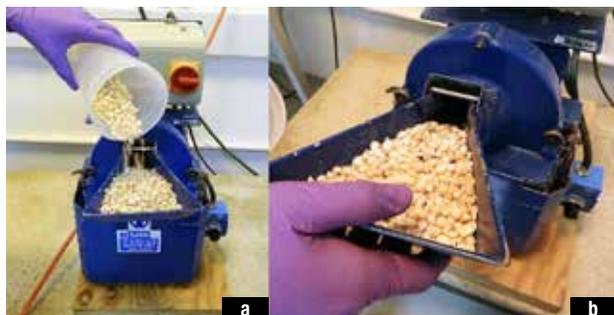


Figura 44. a) Vaciado de muestra en tolva, b) Vaciado de muestra en molino.

- Al finalizar la molienda, apagar presionando el botón rojo, retirar la caja con la muestra y limpiar el equipo con cepillo y aire comprimido.

Cuadro 18. Solución a problemas comunes en molienda con molino de martillos.

Problema	Solución
La rejilla de salida se rompe.	Las mallas con orificios pequeños son más delgadas, se sugiere hacer una pre-molienda con una malla con orificios de mayor diámetro y posteriormente utilizar la del tamaño requerido.
El molino no enciende.	Verificar que haya corriente en la línea y el voltaje sea el adecuado.
Sale demasiado polvo del molino y se recupera poca muestra.	Asegurar que la caja o bolsa utilizada para recolectar la harina selle perfectamente con la boca de descarga.

Referencias

- EPA. Laboratory sample preparation. In *Multi-Agency Radiological Laboratory Analytical Protocols Manual (MARLAP)*; United States Environmental Protection Agency, 2004; pp 1–44.
- Ingeniería, F. de. Molienda http://materias.fi.uba.ar/7202/MaterialAlumnos/06_Apunte Molienda.pdf (accessed May 19, 2016).

Secado en estufa

Justificación

Los tejidos vegetales contienen agua en dos formas: agua libre y agua ligada. El agua libre o absorbida (forma predominante), se libera con gran facilidad y es responsable de la actividad del agua. El agua ligada se encuentra combinada o absorbida y constituye el agua de cristalización en los alimentos (en los hidratos). También está ligada a moléculas de proteínas y sacáridos o absorbida sobre la superficie de partículas coloidales^{1,2}.

El propósito del secado en estufa es disminuir u homogeneizar la humedad (agua libre) en las muestras que serán sometidas a análisis fisicoquímicos para que no ocasione reacciones que interfieran con los métodos analíticos.

Fundamento

El proceso de secado en estufa se basa en la pérdida de agua a través de evaporación. Se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles³.

Alcance

Aplica para todo tipo de harina de maíz y tejido vegetal. No someter a proceso de secado aquellas muestras destinadas a análisis de carotenoides o compuestos con actividad oxidante. Se pueden procesar tantas muestras como el espacio de la estufa lo permita.

Secar las muestras antes de realizar las metodologías indicadas en el cuadro 19.

Cuadro 19. Metodologías en las cuales debe realizarse el proceso de secado.

Determinación	Tipo de muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)
Azúcares solubles, nitrógeno	Tejido vegetal de maíz o trigo	65	4
Extracto etéreo	Harina de maíz	130	1
Nitrógeno	Harina de maíz o trigo	130	1
Hierro y zinc*	Harina de maíz	65	4
Cenizas*	Harina de maíz o trigo	130	1

* Dependerá de la cantidad de muestra o elementos de interés, se sugiere determinar humedad para evitar el proceso de secado.

Cuadro 20. Material y equipos utilizados durante el secado de muestras.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne Mod. OV47525
Guantes aislantes de calor	Máxima resistencia a calor	N/A
Contenedores para sobres de muestra	Metálicos o de madera	N/A

Diagrama de flujo



Figura 45. Diagrama de flujo para el secado en estufa.

Procedimiento

1. Acondicionar la estufa a la temperatura adecuada 30 minutos antes de comenzar el proceso (Figura 46).



Figura 46. Acondicionamiento de estufa.

2. Se recomienda poner las muestras en sobres de papel y acomodarlos abiertos en gradillas metálicas o recipientes de madera (Figura 47).
3. Colocar las gradillas o recipientes con muestras en el interior de la estufa (Figura 48).
4. Transcurrido el tiempo de secado, retirar las muestras y apagar la estufa.
5. Cerrar los sobres y mantenerlos en un desecador o en una estufa a 30°C hasta su análisis.



Figura 47. a) Gradilla de metal, b) Recipiente de madera.



Figura 48. Muestras al interior de la estufa.

Cuadro 21. Solución de problemas comunes durante el secado.

Problema	Solución
La estufa no calienta.	Verificar que se haya configurado adecuadamente y, con un termómetro, comprobar que la temperatura sea la correcta.
Olor a plástico quemado.	Verificar que esté conectada debidamente y que la instalación eléctrica y el sistema eléctrico de la estufa funcionen correctamente.
La estufa no enciende.	Verificar voltaje de la instalación eléctrica y los fusibles de la estufa.

Referencias

- (1) Badui-Dergal, S. Distribución de agua en los alimentos. In *Química de los alimentos*.; Pearson: Mexico, 2013.
- (2) Serna-Saldivar, S. O. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*., 2nd ed.; AGT-EDITOR S.A.: México, D.F., 2013.
- (3) UNAM. Fundamentos y técnicas de análisis de alimentos. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/FUNDAMENTOSYTECNICASDEANALISISDEALIMENTOS_12286.pdf (accessed May 20, 2016).

Desgrasado de harina en equipo Soxhlet

Justificación

Los análisis de almidón, amilosa, proteína, lisina y triptófano, requieren el desgrasado previo de la muestra para remover compuestos que no son de interés (grasa, pectinas, pigmentos) y que interfieren en los resultados, por lo tanto, se debe realizar un lavado con solventes para lograr mayor eficiencia de extracción y cuantificación de los compuestos¹.

Fundamento

El sistema de extracción por Soxhlet (Figura 49) consiste en la colocación del solvente en un matraz de bola, al calentarse las parrillas del sistema, el solvente empieza a hacer ebullición y se evapora hasta un condensador a reflujo, éste cae sobre un recipiente que contiene los cartuchos porosos (de papel filtro) con la muestra en su interior. A causa de la condensación, el solvente va cubriendo la muestra hasta que se llena y el sistema de reflujo vuelve el solvente con el material extraído de la muestra al matraz balón. Se repite la operación hasta completar el ciclo deseado².

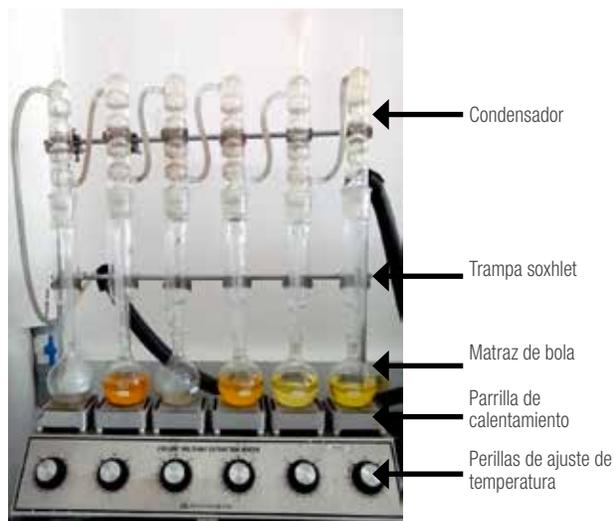


Figura 49. Sistema de desgrasado Soxhlet™.

Alcance

Se desgrasan entre 28 y 30 muestras. El número de muestras dependerá del diámetro de la trampa y de la cantidad de muestra que contenga cada cartucho.

Cuadro 22. Material y equipos utilizados durante el desgrasado de harina.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Soxhlet	Seis parrillas de calentamiento	Barnstead Lab line multi-unit extraction heater 5000
Trampa Soxhlet	N/A	Pyrex
Matraz balón	N/A	Pyrex
Condensador	N/A	Pyrex
Tubo de ensayo	10 mL	N/A
Papel filtro	10 x 10 cm	N/A
Recirculador de agua	5 - 40°C	Unichiller 010-MPC Huber
Ligas	N/A	León
Pinzas de laboratorio	N/A	N/A
Guantes aislantes de calor	N/A	N/A
Canastilla de aluminio	N/A	N/A
Campana de extracción	Mínimo 400 cfm	Safeaire o Labconco

Cuadro 23. Reactivos utilizados durante el desgrasado de harina.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Hexano	Hexano (Fermont, Cat. 06473, CAS 110-54-3).	Usar directamente.	Almacenar a temperatura ambiente. El solvente puede ser reutilizado. Cambiarlo cuando la coloración amarilla se torne oscura.

Diagrama de flujo

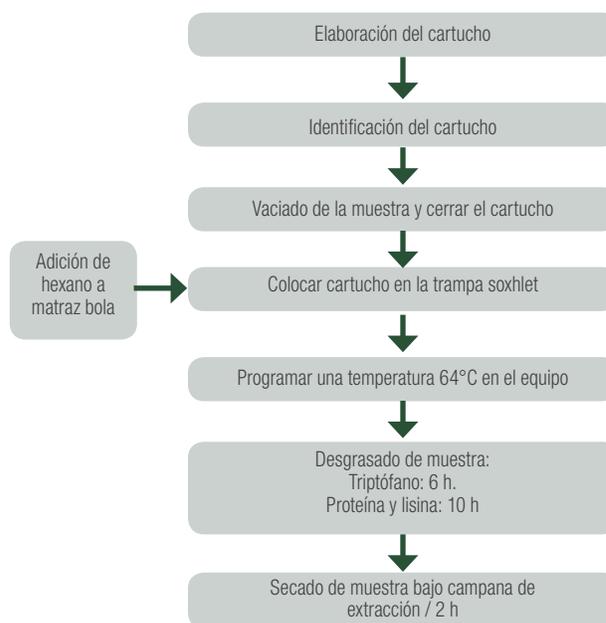


Figura 50. Diagrama de flujo para el desgrasado de harina.

Procedimiento

1. Cortar cuadros de papel filtro de 10 x 10 cm (Figura 51).



Figura 51. Dimensiones del papel filtro.

2. Enrollar el papel filtro con ayuda de un tubo de ensayo de 10 mL (Figura 52).

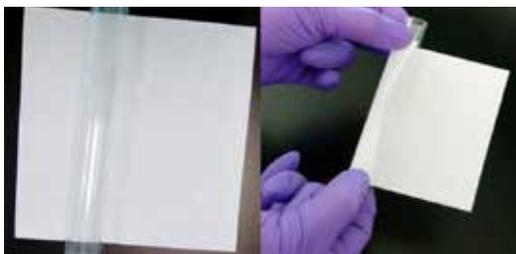


Figura 52. Procedimiento para formar los cartuchos.

3. Retirar el tubo sin desenrollar el papel. Enseguida aplanar los extremos, doblar la parte inferior y engrapar (Figura 53).



Figura 53. Elaboración de cartuchos.

4. Etiquetar los cartuchos (con lápiz) con la misma identificación del sobre de la muestra. Posteriormente vaciarla dentro del cartucho (Figura 54).



Figura 54. Identificación de la muestra y vaciado dentro del cartucho.

5. Engrapar los cartuchos y colocarlos dentro de la trampa Soxhlet. Se puede desgrasar más de una muestra sujetando los cartuchos con una liga. Colocar en la trampa Soxhlet (Figura 55).



Figura 55. Colocación de las muestras en la trampa Soxhlet.

6. Agregar 300 mL de hexano a cada matraz balón, encender el equipo Soxhlet y el recirculador, girando la perilla de temperatura hasta el nivel máximo y mantenerlo durante todo el proceso. El hexano puede reutilizarse para posteriores muestras hasta que su coloración se torne oscura. De ser así, desecharlo y cambiarlo.

NOTA: Desgrasar durante 6 horas las muestras para análisis de almidón, amilosa, triptófano y proteína y por 10 horas las muestras para determinación de lisina (Figura 56).



Figura 56. Sistema de desgrasado Soxhlet.

- Retirar los cartuchos de la trampa Soxhlet utilizando las pinzas de laboratorio y dejarlos secar dentro de la campana de extracción y en la canastilla de aluminio durante 2 horas. Transferir la harina a su sobre original hasta su análisis (Figura 57).

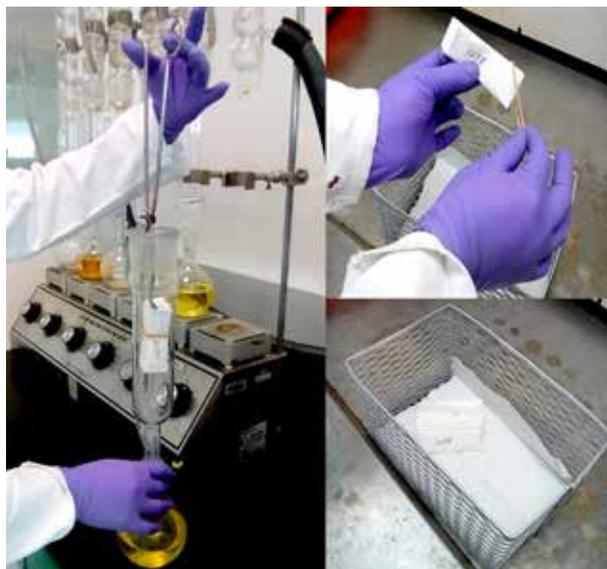


Figura 57. Secado de las muestras.

Cuadro 24. Solución a problemas comunes durante el desgrasado de harina.

Problema	Solución
El solvente no condensa.	Revisar el recirculador y que el Soxhlet se encuentra encendido.
Falta de tiempo para completar el ciclo de desgrasado.	El desgrasado puede detenerse luego de 16 h. Posteriormente solamente agregar las horas faltantes de desgrasado para completar el ciclo.

Referencias

- Quijada, M. R. G. Caracterización fisicoquímica y valoración nutricional y funcionalidad de un aislado proteico obtenido de la semilla de ebano-*Pithecellobium flexicaule* (Benth).-, Universidad Autónoma de Nuevo León., 1999.
- Núñez, C. E. Extracciones con Soxhlet. **2008**, 1–5.



Análisis físicos

Aide Molina, Alejandra Miranda, Bertha Pérez, Luisa Cabrera, Irving Rosas, Rubén Basilio, Aldo Rosales

Determinación de impurezas y granos dañados

Justificación

La calidad del grano de maíz puede resultar afectada tanto en campo (factores ambientales como la temperatura y la humedad durante el llenado del grano), como en la cosecha y pos-cosecha (secado, almacenamiento y transporte)^{1,2}, esto ocasiona granos heterogéneos, dañados, quebrados y aumento de impurezas que afectan el procesamiento del material y por tanto el precio de compra del maíz. Se denominan granos dañados a los granos enteros y sus partes que han sufrido alteraciones físicas o químicas (externas o internas), como resultado de las acciones de calor, hongos, insectos, roedores u otros agentes nocivos³.

El maíz es clasificado en distintos grados de acuerdo al porcentaje de impurezas³. Las impurezas que normalmente se encuentran en los productos agrícolas, por lo general, son fragmentos provenientes de la propia planta, como rastrojos, hojas, trozos de granos, ramas, etc. Asimismo, existen otras impurezas que no provienen de la propia planta, a las cuales se les denomina materias extrañas y que generalmente están constituidas por semillas silvestres, parte de otras plantas, además de tierra, arena, piedras, etc⁴.

El material extraño puede perjudicar el color, sabor y olor de los productos, además, el exceso de impurezas influye en forma negativa en la conservación de los productos almacenados, porque normalmente son higroscópicas y tienden a humedecer los granos, además de ser un medio favorable para el desarrollo de insectos y microorganismos. Con respecto a la

operación de las unidades almacenadoras, las impurezas afectan el rendimiento de las secadoras, dificultan el movimiento de los granos y crean una barrera para el paso del aire de secado, también constituyen un riesgo de incendio cuando quedan depositadas en el interior de las secadoras, ya que pueden entrar fácilmente en combustión^{4,5}.

Fundamento

Utilizando cribas con diferentes diámetros de orificios, consiste en la separación y cuantificación de los granos quebrados y de impurezas, así como todo material que, aunque no haya atravesado las cribas sea diferente al grano, por medio de cribas de diferentes tamaños.

Alcance

La presente metodología aplica para todo tipo de maíz.

Cuadro 25. Material y equipos utilizados en la determinación de impurezas.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 1010 g	Mettler Toledo Mod. PG1003-S
Cribas	Mallas de diámetro de 4.76 mm (0.1875 in) 2.38 mm (0.09375 in)	Tyler
Charola de fondo	N/A	Tyler
Tapa para criba	N/A	Tyler
Charolas para residuos	N/A	N/A
Vaso para pesar	Plástico de 1 L	N/A

Diagrama de flujo



Figura 58. Diagrama de flujo para la determinación de impurezas y granos dañados.

Procedimiento

Determinación de impurezas

1. Pesar 1 kg de muestra a analizar (Figura 59).



Figura 59. Pesado de la muestra.

2. Colocar la criba de diámetro de 4.76 mm sobre la criba de orificios de 2.38 mm y ésta sobre la charola de fondo (Figura 60).



Figura 60. Apilado de las cribas para la determinación de impurezas.

3. Vaciar el kg de muestra en la criba (Figura 61).

Figura 61. Vaciado de la muestra a las cribas.



4. Tapar la criba y agitar manualmente con movimientos oscilatorios y circulares durante 1 minuto (Figura 62).



Figura 62. Cribado manual de la muestra.

5. Separar manualmente aquel material que no haya atravesado la criba de 4.76 mm y que sea diferente del grano de maíz. Colocarlo en la charola de residuos (impurezas) (Figura 63).



Figura 63. Materia diferente al grano de maíz que las cribas no separaron.

6. Separar manualmente aquel material que no haya atravesado la criba de 2.38 mm y que sea diferente del grano de maíz. Colocarlo en la charola de residuos (impurezas).
7. Revisar en la charola de fondo la presencia de insectos o excretas. Separarlos y colocarlos en la charola de residuos (impurezas) (Figura 64).



Figura 64. Insectos y tamo cribados.

8. Pesar en conjunto el material separado en los puntos 5 y 6 y el contenido de la charola de fondo.
9. Calcular el porcentaje de impurezas:

$$\% \text{ impurezas} = \frac{(\text{peso de las impurezas (g)})}{(1,000 \text{ g})} \times 100$$

Determinación de granos quebrados

Granos quebrados: Es el material cuyo tamaño es inferior al 50 % del grano completo y que pasa a través de la malla con orificios redondos de 4.76 mm (12/64 de pulgada) y queda retenida en la criba con orificios redondos de 2.38 mm (6/64 de pulgada) (Figura 65).

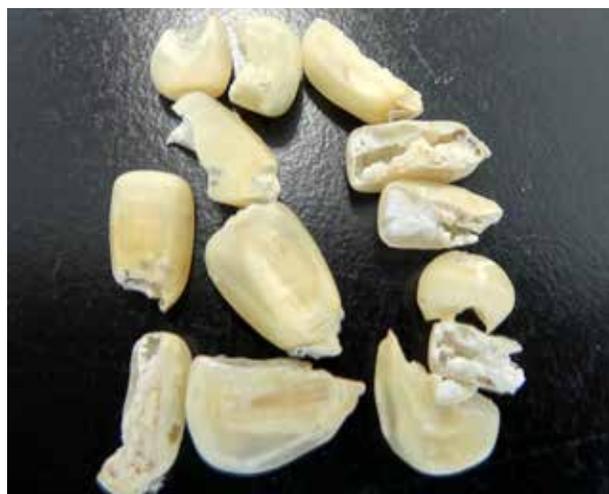


Figura 65. Granos quebrados.

10. Seleccionar los granos partidos y retenidos en la criba de 2.38 mm y colocarlos en una charola para residuos (granos quebrados).
11. Pesar los granos quebrados.
12. Calcular el porcentaje de granos quebrados de la siguiente manera:

$$\% \text{ granos quebrados} = \frac{\text{peso de granos quebrados (g)}}{1,000 \text{ g}} \times 100$$

Determinación de otros daños

Granos dañados por calor: Son granos que presentan una coloración café obscura/negra, ya sea en la totalidad del grano o solo en el germen, originada por el calentamiento o mal almacenamiento del material. Presentan alta actividad enzimática y cambios significativos en el almidón y proteína, lo cual no es deseable en la mayoría de los procesos industriales^{1,3} (Figura 66).



Figura 66. Granos manchados.

Granos dañados por hongos: Son granos que presentan afectación parcial o total en la superficie (pericarpio), en el germen o en el resto del grano (endospermo) a causa del desarrollo de hongos de campo o de almacén. Dicha afectación se caracteriza por la coloración azul, negra, verde, naranja o amarilla y la apariencia lamosa o algodonosa (Figura 67).

La presencia de hongos con potentes sistemas enzimáticos propicia que los granos pierdan gradualmente su textura, desarrollen una alta acidez a causa del desdoblamiento de triglicéridos en ácidos grasos libres y generen olores indeseables.



Figura 67. Granos contaminados por hongos.

Granos dañados por insectos: Son granos que presentan perforaciones originadas por insectos de campo o almacén a consecuencia de su uso como alimento para el insecto o como sitio para ovoparasitar (Figura 68).

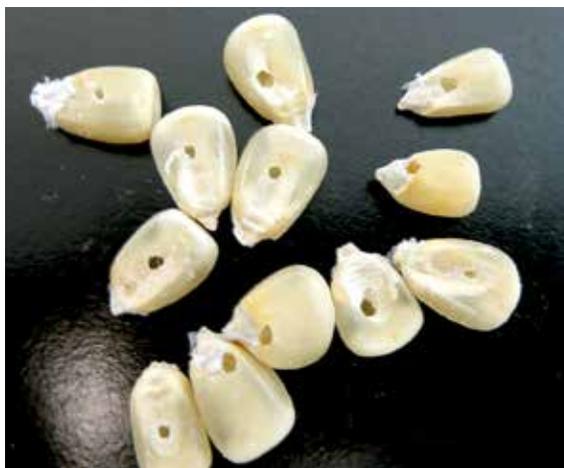


Figura 68. Granos dañados por insectos.

Granos dañados por roedores: Son granos que presentan mordiscos de roedores.

Granos dañados por condiciones climatológicas (otros daños): Son daños producidos por las condiciones climatológicas (lluvias, granizadas o sequías), dando como resultado granos chupados, germinados, manchados y podridos.

Granos germinados: Los granos pueden germinar en el campo o en el almacén siempre y cuando existan las condiciones de humedad y temperatura adecuada. Los granos germinados tienen una alta cantidad de almidón dañado, azúcares solubles y acidez como consecuencia de la actividad amilolítica y lipolítica ocasionadas por el proceso fisiológico de respiración y germinación. Al igual que los granos dañados por calor, estos granos producen harinas con muy mala funcionalidad³.

13. Extender sobre una superficie limpia el maíz utilizado en las determinaciones de impurezas y granos quebrados.
14. Seleccionar los granos manchados, podridos, chupados, picados, germinados y con evidencia de daños por roedores.
15. Colocarlos en una charola para residuos (otros daños).
16. Pesar el contenido de la charola.
17. Calcular el porcentaje de otros daños de la siguiente manera:

$$\% \text{ otros daños} = \frac{\text{peso de material con otros daños (g)}}{1,000 \text{ g}} \times 100$$

De acuerdo a la norma NMX-FF-034/1-SCFI-2002¹ y con base al porcentaje de impurezas y granos dañados, el maíz se clasifica en los siguientes grados de calidad (Cuadro 26):

Cuadro 26. Clasificación del grano con base al porcentaje de impurezas.

Parámetro	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Impurezas (% máximo)	2	2.5	3
Granos quebrados (% máximo)	3	3.5	4
Suma de daños (% máximo)	5	7	10

Cuadro 27. Solución a problemas comunes durante la determinación de impurezas.

Problema	Solución
Granos quebrados presentan más de un daño.	Clasificarlos como granos quebrados, esto no afecta el resultado de la suma de daños.

Referencias

- (1) INTA. Calidad del grano de maíz http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/suplementacion/80-grano_maiz.pdf.
- (2) Hernández, C.; Rodríguez, Y.; Niño, Z.; Pérez, S. Efecto del almacenamiento de granos de maíz (*Zea mays*) sobre la calidad del aceite extraído. *Inf. Tecnol.* 2009, 20 (4), 21–30.
- (3) NMX-FF-034/1-SCFI-. PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE 1 : MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA; Secretaría de Economía: México, 2002; p 18.
- (4) Martín Teixeira, M. Limpieza de los granos. In *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural.*; FAO: Santiago, Chile, 1993.
- (5) Serna-Saldivar, S. O. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales.*, 2nd ed.; AGT-EDITOR S.A.: México, D.F., 2013.

Determinación del tamaño de grano por distribución en mallas

Justificación

Los granos de maíz varían en forma y tamaño debido a diferencias genotípicas o a la colocación del grano en la mazorca. Esta heterogeneidad se puede explicar por la competencia existente durante el desarrollo del grano o la susceptibilidad al estrés debido a una posición desfavorable en la mazorca¹. Los factores ambientales también influyen en esta característica, en especial la temperatura, ya que temperaturas altas aceleran el crecimiento del grano pero disminuyen el tiempo de llenado del mismo y por tanto disminuyen también su peso y tamaño².

El tamaño de grano es una variable de interés para el procesamiento debido al impacto que esto tiene en el grado de cocimiento y absorción de agua. Granos de una misma dureza, aunque de tamaño grande, alcanzan un menor cocimiento que granos pequeños en el mismo tiempo.

Las industrias requieren maíces con una uniformidad de tamaño y forma de grano de al menos 85 % para que el cocimiento pueda ser uniforme³. La industria de harina nixtamalizada requiere maíces de tamaño mediano, en tanto que la industria de la masa y tortilla se favorece también con granos de este tamaño o menores, que se hidratan más fácilmente que los grandes y que favorece el rendimiento de los productos que comercializan que son de humedad elevada⁴.

Fundamento

La técnica de distribución de grano, clasifica el tamaño de grano de maíz con base en el porcentaje de grano retenido en cada criba, granos más grandes no atraviesan cribas inferiores a su tamaño.

Alcance

La presente metodología permite clasificar el tamaño de grano de todo tipo de maíz en grande, muy grande, mediano y pequeño.

Cuadro 28. Material y equipos utilizados en la determinación del tamaño de grano por distribución.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 1010 g	Mettler Toledo Mod. PG1003-S
Cribas	Ver cuadro 1.	Seedburo
Charola de fondo	N/A	Seedburo
Vaso para pesar	Plástico de 1 L.	N/A
Charolas para pesar el material de cada criba	N/A	N/A

Diagrama de flujo



Figura 69. Diagrama de flujo de la determinación del tamaño de grano por distribución.

Procedimiento

1. Asegurar que el maíz se encuentra a temperatura ambiente. Se recomienda utilizar maíz limpio, para lo cual, se puede llevar a cabo el procedimiento para determinar impurezas y posteriormente el presente protocolo.
2. Etiquetar los contenedores con el número de muestra y el número de malla.
3. Ajustar la balanza a cero haciendo la tara correspondiente (Figura 70).



Figura 70. Ajuste de balanza en cero.

- Pesar 1,000 g de grano de maíz.
- Colocar una criba sobre otra en el siguiente orden ascendente: bandeja de fondo, malla 18, malla 20, malla 22 y malla 24.

Cuadro 29. Mallas necesarias y sus equivalencias de medidas.

Malla	Pulgadas	Centímetros
Número 24	24/64 - 0.375	0.9525
Número 22	22/64 - 0.3437	0.8731
Número 20	20/64 - 0.3125	0.7938
Número 18	18/64 - 0.2812	0.7142

- Colocar la muestra de maíz sobre la malla 24 (Figura 71).

Figura 71. Colocación de la muestra.



- Tamizar durante un minuto, intercalando movimientos circulares, de izquierda a derecha, adelante y atrás, procurando hacerlo con la misma intensidad (Figura 72).



Figura 72. Tamizado de la muestra.

- Colocar los granos retenidos de cada malla en el recipiente correspondiente.
- Pesar los granos y calcular el porcentaje retenido en cada malla mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ malla } 24 = \frac{\text{gramos de grano retenidos en malla } 20 \times 100}{1,000 \text{ g}}$$

- Clasificar el tamaño de grano de acuerdo con el siguiente cuadro, al menos el 85% de los granos deben quedar retenidos en un tamaño de malla específico:

Cuadro 30. Clasificación de tamaño según la criba.

Criba	Tamaño
Número 24	Muy grande
Número 22	Grande
Número 20	Mediano
Número 18	Pequeño

Cuadro 31. Solución a problemas comunes durante la determinación de tamaño de grano por distribución.

Problema	Solución
No existe una criba que haya retenido el 85% de los granos.	Tomar el dato de la criba en donde se haya retenido el mayor porcentaje.
Existe una gran cantidad de impurezas.	Limpiar el maíz a través del procedimiento utilizado para determinar impurezas y posteriormente determinar el tamaño de grano.

Referencias

- Kim, T. H.; Hampton, J. G.; Opara, L. U.; Hardacre, A. K.; Mackay, B. R. Effects of maize grain size, shape and hardness on drying rate and the occurrence of stress cracks. *J. Sci. Food Agric.* 2002, 82 (10), 1232–1239.
- Vázquez-Carrillo, G.; Santiago-Ramos, D.; Salinas-Moreno, Y.; Rojas-Martínez, I.; Arellano-Vázquez, J. L.; Velázquez-Cardelas, G. A.; Espinosa-Calderón, A. Interacción genotipo-ambiente y calidad de grano y tortilla de híbridos de maíz en Valles Altos de Tlaxcala, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 2012, 35 (3), 229–237.
- Salinas-Moreno, Y.; Vázquez-Carrillo, G. *Metodologías de análisis de calidad nixtamalera-tortillera en maíz*; Folleto Técnico; 24; Chapingo, Edo. de México, 2006.
- Salinas-Moreno, Y.; Gómez-Montiel, N. O.; Cervantes-Martínez, J. E.; Sierra-Macias, M.; Palafox-Caballero, A.; Betanzos-Mendoza, E.; Coutiño-Estrada, B. Calidad nixtamalera y tortillera en maíces del trópico húmedo y sub-húmedo de México. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 2010, 1 (4), 509–523.
- Mauricio-Sánchez, R. A.; Figueroa-Cárdenas, J. D. D.; Taba, S.; Reyes-Vega, M. de la L.; Rincón-Sánchez, F.; Mendoza-Galván, A. Caracterización de accesiones de maíz por calidad de grano y tortilla. *Rev. Bras. Milho e Sorgo* 2004, 27 (3), 213–222.

Determinación del tamaño de grano a través del peso de cien granos (PCG)

Justificación

Una medida rápida y fácil que permite estimar el tamaño de grano es el peso de cien granos. Es el método más utilizado, referenciado y, por tanto, una característica importante para los productores de harina¹⁻⁵.

Fundamento

El peso de cien granos (PCG) es un indicador del tamaño del grano, un bajo peso corresponde a una muestra con gran porcentaje de granos pequeños y por el contrario, un peso alto se obtiene cuando los granos son grandes⁶.

Alcance

La presente metodología permite estimar el tamaño de grano de todo tipo de maíz en grande, mediano y pequeño.

Cuadro 32. Material y equipos utilizados en la determinación del tamaño de grano a través del PCG.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo MS204S.
Sobres de papel	5 x 8.5 cm	N/A
Charolas para pesar.	N/A	N/A

Diagrama de flujo



Figura 73. Diagrama de flujo para determinación del tamaño de grano a través del PCG.

Procedimiento

1. Seleccionar 100 granos sanos de cada muestra y registrar su peso (se recomienda hacerlo por duplicado).
2. Pesar los 100 granos.
3. De acuerdo con Salinas-Moreno et al. (2010), los granos pueden clasificarse de la siguiente manera según su peso (Cuadro 33):

Cuadro 33. Clasificación de tamaño según el PCG.

Peso de cien granos (g)	Tamaño
> 38 g	Grandes
33 – 38 g	Medianos
< 33 g	Pequeños

Cuadro 34. Solución a problemas comunes en la determinación de tamaño de grano a través del PCG.

Problema	Solución
Los valores obtenidos entre repeticiones son muy diferentes.	Se recomienda homogenizar correctamente el material a evaluar y repetir el procedimiento. Para comprobar resultados se recomienda tomar una lectura adicional.

Referencias

- (1) Salinas-Moreno, Y.; Martínez-Bustos, F.; Soto-Hernández, M.; Ortega-Paczk, R.; Arellano-Vázquez, J. L. Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia* 2003, 37 (6), 617–628.
- (2) Salinas-Moreno, Y.; Gómez-Montiel, N. O.; Cervantes-Martínez, J. E.; Sierra-Macias, M.; Palafox-Caballero, A.; Betanzos-Mendoza, E.; Coutiño-Estrada, B. Calidad nixtamalera y tortillera en maíces del trópico húmedo y sub-húmedo de México. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 2010, 1 (4), 509–523.
- (3) Salinas-Moreno, Y.; Pérez-Alonso, J. J.; Vázquez-Carrillo, G.; Aragón-Cuevas, F.; Velázquez-Cardelas, G. A. Antocianinas y actividad antioxidante en maíces (*Zea mays* L.) de las razas chalqueño, elotes cónicos y bolitas. *Agrociencia* 2012, 46 (7), 693–706.
- (4) Agama-Acevedo, E.; Salinas-Moreno, Y.; Pacheco-Vargas, G.; Bello-Pérez, L. A. Características físicas y químicas de dos razas de maíz azul: morfología del almidón. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 2011, 2 (3), 317–329.
- (5) Vázquez-Carrillo, G.; Santiago-Ramos, D.; Salinas-Moreno, Y.; Rojas-Martínez, I.; Arellano-Vázquez, J. L.; Velázquez-Cardelas, G. A.; Espinosa-Calderón, A. Interacción genotipo-ambiente y calidad de grano y tortilla de híbridos de maíz en Valles Altos de Tlaxcala, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 2012, 35 (3), 229–237.
- (6) Billeb de Sinibaldi, A. C.; Bressani, R. Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. *ALAN* 2001, 51 (1), 86–94.

Determinación del tamaño de grano por medición directa con Vernier

Justificación

Los granos varían en forma y tamaño debido a diferencias genotípicas. La heterogeneidad se puede explicar por la competencia durante el desarrollo del grano o susceptibilidad al estrés¹. En ocasiones existen limitaciones por la cantidad de grano disponible y se tiene que realizar una medición directa. El no contar con las cribas también influye en la decisión de utilizar esta metodología. En diversos artículos científicos es el dato reportado y también la CONABIO sugiere realizarlo de este modo en las colectas de maíz²⁻⁴.

Fundamento

Con la medida directa del grano, ancho y espesor de los granos, se puede hacer un estimado sobre la criba en la cual serían retenidos.

Alcance

La presente metodología aplica para todo tipo de maíz.

Cuadro 35. Material y equipos utilizados en la determinación de tamaño de grano por medición directa con Vernier.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Vernier electrónico	0 – 1 in, resolución de 0.00005 in	Mitutoyo Spi

Diagrama de flujo



Figura 74. Diagrama de flujo para la determinación del tamaño de grano por medición directa.

Procedimiento

1. Seleccionar 10 granos sanos de cada muestra (Figura 75).

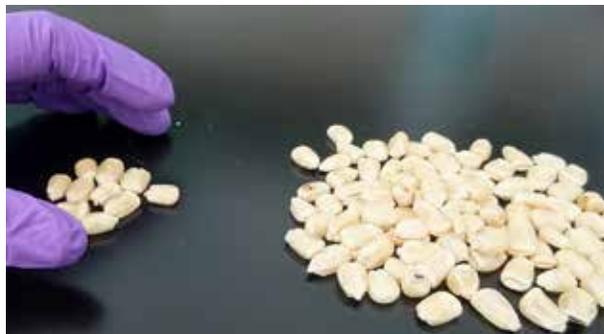


Figura 75. Selección de granos.

2. Medir el largo, ancho y grosor (espesor) de cada grano (Figura 76).

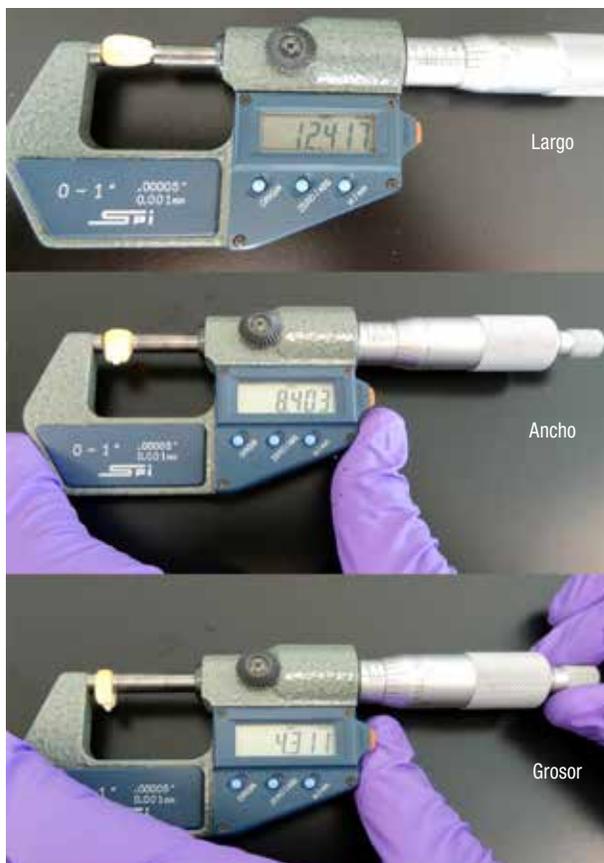


Figura 76. Toma de medidas.

3. Registrar las medidas, calcular el promedio y la desviación estándar, a menor valor de la desviación estándar, el grano es más homogéneo.

Cuadro 36. Solución a problemas comunes en la determinación de tamaño de grano por medición directa con Vernier.

Problema	Solución
La desviación estándar es muy grande.	Esto se debe a granos muy heterogéneos, se recomienda incrementar el número de granos medidos a 20.

Referencias

- (1) Kim TH, Hampton JG, Opara LU, Hardacre AK, Mackay BR. Effects of maize grain size, shape and hardness on drying rate and the occurrence of stress cracks. *J Sci Food Agric.* 2002;82(10):1232-1239. doi:10.1002/jsfa.1166.
- (2) Antuna-Grijalva O, Rodríguez-Herrera SA, Arámbula-Villa G, et al. Calidad nixtamalera y tortillera en maíces criollos de México. *Rev Fitotec Mex.* 2008;31(No. Esp. 3):23-27.
- (3) Mauricio-Sánchez RA, Figueroa-Cárdenas JDD, Taba S, Reyes-Vega M de la L, Rincón-Sánchez F, Mendoza-Galván A. Caracterización de accesiones de maíz por calidad de grano y tortilla. *Rev Bras Milho e Sorgo.* 2004;27(3):213-222.
- (4) Rincón-Sánchez F. *Guía Práctica Para La Descripción Preliminar de Colectas de Maíz.* México, D.F.; 2015.

Determinación de la dureza del grano de maíz a través del índice de flotación en nitrato de sodio

Justificación

La dureza del grano de maíz se define como la fuerza necesaria para romperlo y contribuye a otorgarle resistencia mecánica, propiedad que determina la integridad del grano durante las operaciones de cosecha y post-cosecha, sin embargo, también es el parámetro que determina esencialmente la capacidad del grano para absorber y retener agua durante las diferentes etapas del proceso de cocción, especialmente durante la nixtamalización. Los maíces denominados suaves se hidratan mejor que los duros, es decir, absorben mayor cantidad de agua debido a que los gránulos de almidón son más fácilmente alcanzados por el líquido^{1,2}.

Las industrias y mercados buscan diversas características de dureza y parámetros físicos para la elaboración de alimentos (Cuadro 37), tal es el caso de la industria de la molienda seca requiere materia prima de grano duro o muy duro, para obtener fracciones de

los tamaños adecuados a las distintas aplicaciones. La industria tortillera necesita conocer este parámetro para dar el tiempo de cocción adecuado al maíz al momento de nixtamalizar y prefiere granos de intermedios a duros^{3,4}.

Cuadro 37. Características físicas deseadas según el uso del maíz¹.

Uso	Características físicas deseadas
Tortillas	Granos duros o semiduros. Valores intermedios-altos de peso de cien granos (PCG). Valores intermedios-bajos de gravedad específica (Peso hectolítrico). Valores altos de capacidad de absorción de agua, alto rendimiento de tortilla, baja pérdida de peso y baja resistencia al corte.
Atoles	Granos muy suaves y harinosos (con alto porcentaje de endospermo suave), lo que contribuye al desarrollo de viscosidad. Valores altos de peso de cien granos (PCG). Valores bajos de gravedad específica. Valores altos de capacidad de absorción de agua.
Palomitas	Granos pequeños, cristalinos, muy duros y con altos valores de gravedad específica. Valores bajos de capacidad de absorción de agua. Valores altos de volumen de expansión. Tiempos cortos de reventado.
Pinoles	Granos de baja dureza. Valores intermedios de gravedad específica y peso de cien granos (PCG). Valores bajos de capacidad de absorción de agua.
Pozoles	Granos suaves y harinosos (con alto porcentaje de endospermo suave), de preferencia grandes. Valores altos de peso de cien granos (PCG). Valores bajos de gravedad específica. Valores altos de capacidad de absorción de agua. Tiempos cortos de cocción para el reventado del grano. Valores altos de capacidad de expansión.

¹ Cuadro adaptado de Fernández-Suárez et al. (2013)⁵.

Fundamento

El índice de flotación (IF) se basa en el número de granos que flotan en una solución de densidad específica (1.25 g mL⁻¹), ya que los granos suaves contienen una mayor cantidad de aire en el endospermo y flotan más que los granos duros. Dado que el porcentaje de humedad de las muestras influye significativamente en el resultado, se recomienda que sea homogénea entre las muestras a evaluar (aproximadamente 12%)⁶.

Alcance

Con esta metodología es posible determinar la dureza de todo tipo de granos de maíz, permitiendo su clasificación en granos muy suaves, suaves, intermedios, duros y muy duros, asignando un tiempo de cocción durante el proceso de nixtamalización en función de dicha dureza⁷.

Cuadro 38. Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo MS204S.
Balanza analítica	Capacidad máxima 1010 g	Mettler Toledo Mod. PG1003-S
Espátula.	N/A	N/A
Vasos de precipitados.	30 y 1000 mL	Pyrex
Matraz volumétrico	1000 mL	Pyrex
Picnómetro a peso constante	Secar en una estufa a 40°C por lo menos 2 horas antes de la determinación de la densidad de la solución.	Brand
Papel absorbente	N/A	N/A
Cuchara con perforaciones	N/A	N/A
Colador de plástico	N/A	N/A

Cuadro 39. Reactivos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Nitrato de sodio al 41%, densidad 1.25 g mL ⁻¹	Nitrato de sodio > 99% (Reasol, Cat. R5594, CAS 7631-99-4).	Ver preparación en el procedimiento.	Se prepara una vez a la semana. Verificar la densidad cada que vez que se va a utilizar. Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente bien tapado para evitar evaporación. Un volumen de 500 mL es suficiente para determinar el índice de flotación de 10 muestras de maíz por duplicado. Utilizar respirador de polvos y alejarlo de cualquier fuente de ignición.
Agua desionizada	La conductividad debe ser de máximo 0.05 µS cm ⁻¹ a 25°C.		

Diagrama de flujo



Figura 77. Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del IF.

Procedimiento

Preparación de la solución de nitrato de sodio al 41 %

1. Pesar 415 g de nitrato de sodio.
2. Agregar 500 mL de agua desionizada en un vaso de precipitado de 1 L, agregar el nitrato de sodio poco a poco y disolver con ayuda de una barra magnética y parilla de agitación.

3. Trasvasar la solución al matraz volumétrico de 1 L. Enjuagar el vaso con agua desionizada y mezclar el agua de lavado en el matraz con la solución.
4. Aforar a 1 L con agua desionizada.

Ajuste de la densidad de la solución

5. Pesar el picnómetro vacío (ρ_v) y registrar el peso.
6. Adicionar agua desionizada al picnómetro (ρ_a), evitando la formación de burbujas y registrar el peso.
7. Desechar el agua desionizada y enjuagar el picnómetro con un poco de solución de nitrato de sodio 41%.
8. Adicionar solución de nitrato al picnómetro (ρ_s), evitando la formación de burbujas, pesar el picnómetro con la solución y registrar el valor.
9. Calcular la densidad de la solución utilizando la siguiente formula:

$$\rho = \frac{\rho_s - \rho_v}{\rho_a - \rho_v}$$

Si la densidad (ρ) es 1.250 ± 0.001 (1.251 o 1.249) mg mL⁻¹, la solución está lista para realizar el índice de flotación. De lo contrario se procede a ajustarla.

Determinación del índice de flotación

10. Seleccionar 100 granos sanos de cada muestra y registrar su peso (Peso de Cien Granos (PCG)), para mayor detalle, ver sección de Tamaño de grano).
11. Adicionar 500 mL de la solución de nitrato en un vaso de precipitado de 1 L.
12. Verter los 100 granos en la solución y agitar 3 veces a la derecha y 3 veces a la izquierda con ayuda de un agitador de vidrio.
13. Dejar reposar 30 segundos para que los granos floten o se vayan al fondo (Figura 78).

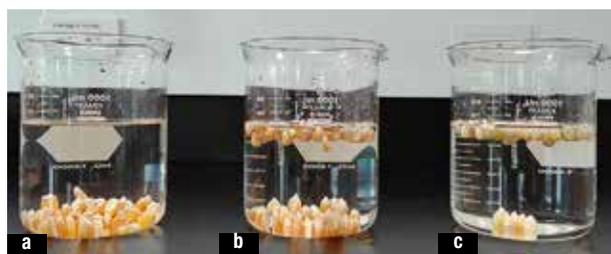


Figura 78. Granos flotantes y sumergidos. a) Muy duro, b) Intermedio, c) Muy suave.

14. Retirar los granos flotantes con ayuda de una cuchara con perforaciones, depositarlos en un colador y cuantificarlos.
15. Determinar la dureza de la muestra de acuerdo al cuadro 40.

Cuadro 40. Clasificación del grano de maíz por su dureza.

Granos flotantes	Dureza
0-12	Muy duro
13-37	Duro
38-62	Intermedio
63-87	Suave
88-100	Muy suave

Cuadro 41. Solución a problemas comunes en la determinación de dureza de grano a través del IF.

Problema	Solución
No se logra obtener la densidad adecuada.	Asegurar que el agua que se utiliza sea la correcta y se encuentre a temperatura ambiente. Asegurar que el picnómetro funcione correctamente. Verificar que la balanza funcione adecuadamente.

Referencias

- (1) Watson, S. A. Description, development, structure, and composition of the corn kernel. In *Corn: Chemistry and Technology*; White, P. J., Johnson, L. A., Eds.; Association of Cereal Chemists, Inc.: St. Paul, Minn., USA, 2003; pp 69–106.

- (2) Salinas-Moreno, Y.; Aguilar-Modesto, L. Efecto de la dureza del grano de maíz (*Zea mays* L.) sobre el rendimiento y calidad de la tortilla. *Ing. Agrícola y Biosist.* 2010, 2 (1), 5–11.
- (3) Robutti, J.; Borras, F.; Ferrer, M.; Percibaldi, M.; Knutson, C. A. Evaluation of quality factors in Argentine maize races. *Cereal Chem.* 2000, 77, 24–26.
- (4) Salinas-Moreno, Y.; Gómez-Montiel, N. O.; Cervantes-Martínez, J. E.; Sierra-Macias, M.; Palafox-Caballero, A.; Betanzos-Mendoza, E.; Coutiño-Estrada, B. Calidad nixtamalera y tortillera en maíces del trópico húmedo y sub-húmedo de México. *Rev. Mex. Ciencias Agrícolas* 2010, 1 (4), 509–523.
- (5) Fernández-Suárez, R.; Morales-Chávez, L. A.; Gálvez-Mariscal, A. Importancia de los maíces nativos de México en la dieta nacional. Una revisión indispensable. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, 36 (3-A), 275–283.
- (6) Salinas-Moreno, Y.; Vázquez-Carrillo, G. *Metodologías de análisis de calidad nixtamalera-tortillera en maíz*; Folleto Técnico; 24; Chapingo, Edo. de México, 2006.
- (7) NMX-FF-034/1-SCFI-. *PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE I : MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA*; Secretaría de Economía: México, 2002; p 18.

Determinación de la dureza del grano de maíz a través del índice de flotación en solución de azúcar comercial

Justificación

Debido a la necesidad de determinar la dureza del grano mediante el índice de flotación, se realizó una modificación al método oficial, reemplazando el nitrato de sodio por azúcar comercial.

Fundamento

Una solución de azúcar con la misma densidad que la solución de nitrato de sodio al 41 % brinda resultados similares al método oficial. Es decir, el número de granos flotantes en la solución depende directamente de la densidad de éstos respecto a la densidad de la solución (entre más duro el tipo de maíz menor es el valor de índice de flotación).

Alcance

Con esta metodología es posible determinar la dureza de todo tipo de granos de maíz, permitiendo su clasificación en granos muy suaves, suaves, intermedios, duros y muy duros, asignando un tiempo de cocción durante el proceso de nixtamalización en función de dicha dureza¹.

Cuadro 42. Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Báscula	Resolución de 1 g	Torrey
Espátula	N/A	N/A
Vasos transparentes	Vidrio o plástico de 1 L	N/A
Papel absorbente	N/A	N/A
Cuchara con perforaciones	N/A	N/A
Colador de plástico	N/A	N/A

Cuadro 43. Reactivos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución de azúcar al 67 % y densidad 1.25 kg L ⁻¹	<p>Azúcar refinada marca Aurrera.</p> <p><i>Si se utiliza azúcar de otra marca, contactar previamente al Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz.</i></p>	Ver procedimiento.	<p>Preparar nueva solución cada que se vaya a utilizar.</p> <p>No almacenar por más de tres días.</p> <p>Un volumen de 500 mL es suficiente para determinar el índice de flotación de 20 muestras de maíz por duplicado.</p>
Agua purificada	Utilizar agua de la marca Epura o Bonafont.		Debe estar a temperatura ambiente (25°C).

Diagrama de flujo



Figura 79. Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del IF en solución de azúcar.

Procedimiento

Preparación de la solución de azúcar al 67 %

1. Agregar un litro de agua purificada en una botella vacía de 1.5 L. Marcar con una línea el volumen ocupado y retirar el agua.
2. Pesar 670 g de azúcar refinada y depositarla en la botella previamente marcada..
3. En la botella con azúcar, adicionar agua purificada hasta la marca realizada, cerrarla y agitar vigorosamente para disolver el azúcar. El volumen del líquido disminuirá debido a la incorporación del azúcar en el agua, por lo que será necesario agregar otra vez agua hasta la marca y agitar nuevamente para homogenizar la solución. Una vez disuelta el azúcar, el volumen total de la solución será de 1 L exactamente.

Determinación del índice de flotación

4. Seleccionar 100 granos (sanos y completos) de cada muestra y registrar su peso (peso de cien granos).
5. Adicionar 500 mL de la solución de azúcar en un recipiente transparente de 1 L.
6. Vaciar los 100 granos a la solución y agitar (3 veces a la derecha y 3 veces a la izquierda) con ayuda de una cuchara.
7. Dejar reposar la solución por 1 minuto para que los granos floten o se sumerjan.
8. Retirar los granos flotantes con una cuchara y depositarlos en un colador. Contarlos.
9. Determinar la dureza de la muestra de acuerdo a la clasificación del Cuadro 40.

Cuadro 44. Solución a problemas comunes en la determinación de dureza de grano a través del IF en solución de azúcar.

Problema	Solución
No se logra obtener la densidad adecuada.	El agua debe estar a temperatura ambiente. Verificar que la balanza funcione adecuadamente. Disolver el azúcar lentamente.

Referencias

- (1) NMX-FF-034/1-SCFI-. PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE 1 : MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA; Secretaría de Economía: México, 2002; p 18.

Determinación de dureza en grano de maíz a través del peso hectolítrico

Justificación

El peso hectolítrico (masa hectolítrica, gravedad específica, peso específico o densidad aparente) es un parámetro exigido por la norma mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002¹ debido a que es un factor relacionado con la dureza, susceptibilidad a ruptura, rendimientos de molienda, velocidad de secado, condiciones generales del grano y resistencia al desarrollo de hongos². Los granos más densos tienen menos probabilidad de ser dañados por insectos y mejores posibilidades de soportar el manejo durante el almacenamiento y comercialización³.

Fundamento

El peso hectolítrico se fundamenta en determinar el peso del grano contenido en un volumen de un litro^{2,4}.

Alcance

Se puede determinar la dureza de todo tipo de grano de maíz (blanco, amarillo, rojo o pigmentado), permitiendo su clasificación en materiales suaves, intermedios y duros, asignando un tiempo de cocción durante el proceso de nixtamalización en función de dicha dureza¹. Es una variación del método de la norma oficial que brinda resultados similares. Un técnico con capacitación básica puede evaluar 100 muestras por día.

Cuadro 45. Material y equipos utilizados en la determinación de dureza de grano a través del peso hectolítrico.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Báscula	Capacidad de 5 kg, resolución de 1 g	Torrey
Espátula de madera	N/A	N/A
Recipiente de 1 L	De acrílico o acero inoxidable, el litro debe ser exacto, calibrar y verificar con agua desionizada.	N/A

Diagrama de flujo

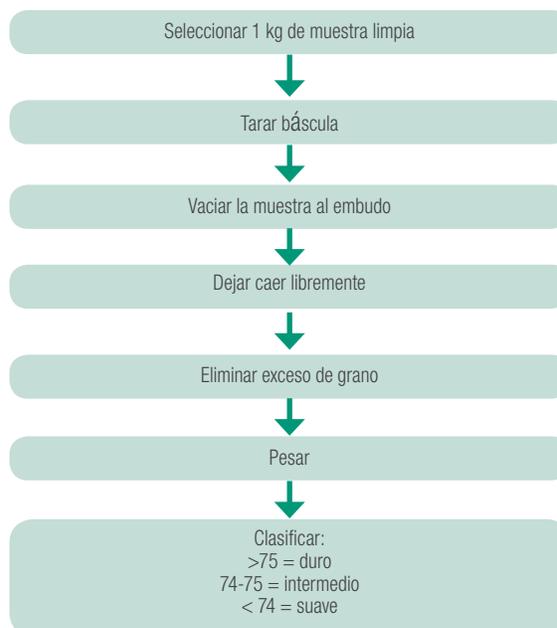


Figura 80. Diagrama de flujo para la determinación de dureza a través del peso hectolítrico.

Procedimiento

1. El material empleado debe estar libre de impurezas, por lo que se sugiere utilizar previamente el método de determinación de impurezas para eliminar materiales extraños, granos dañados, tierra, etc.
2. Ajustar la balanza a cero (tara con el recipiente de 1 L).
3. Con ayuda de un embudo, dejar caer libremente el maíz sobre el recipiente de 1 L hasta que se desborde.

NOTA: La distancia de la cual se deja caer el maíz es de 20 cm. Se sugiere elaborar una balanza de peso hectolítrico (Figura 81).

4. Eliminar el exceso de grano del recipiente con una espátula, rasando en zig-zag.
5. Pesar el recipiente con el grano (unidades en kg) y multiplicar por 10 para expresar el resultado en kg hL⁻¹.

El maíz blanco destinado a la elaboración de tortillas de maíz y productos de maíz nixtamalizados de calidad comercial (NMX-FF-034/1-SCFI-2002) debe tener una densidad mínima de 74 kg hL⁻¹, equivalente a dureza intermedia (cuadro 46)⁵.

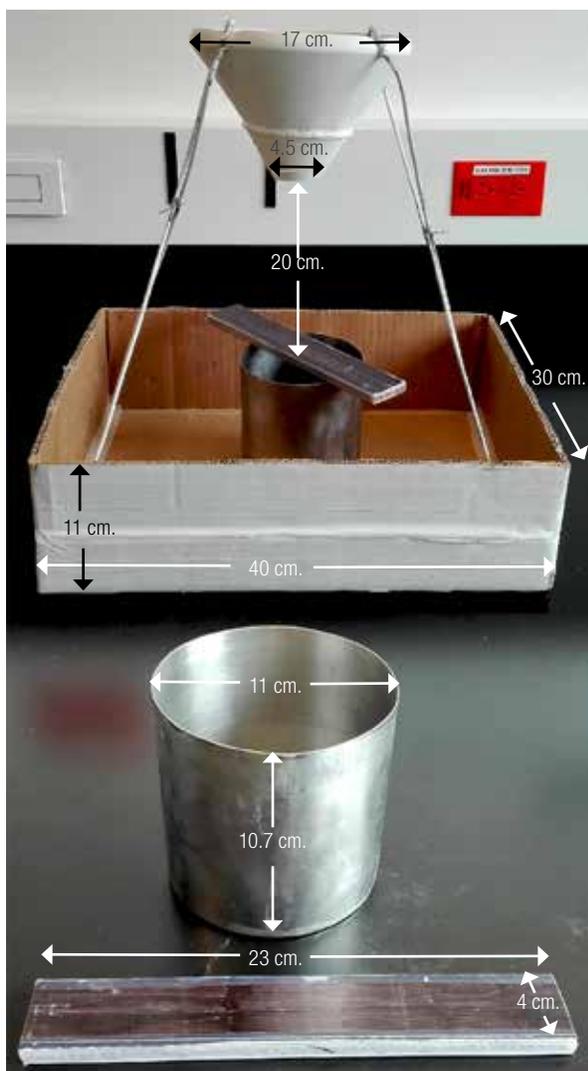


Figura 81. Balanza de peso hectolítrico.

Cuadro 46. Clasificación de dureza según peso hectolítrico.

Peso hectolítrico kg hL ⁻¹	Dureza
> 75	Duro
74 - 75	Intermedio
< 74	Suave

Cuadro 47. Solución a problemas comunes en la determinación de dureza a través del peso hectolítrico.

Problema	Solución
La semilla es muy grande y el embudo se tapa.	Vaciar menos cantidad de muestra.
El valor es más alto que se muestra en la clasificación.	Verificar que la báscula este en ceros.
No se retira todo el excedente	Hacer 3 cortes con una superficie plana en zig-zag

Referencias

- (1) NMX-FF-034/1-SCFI-. *PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - CEREALES – PARTE I : MAÍZ BLANCO PARA PROCESO ALCALINO PARA TORTILLAS DE MAÍZ Y PRODUCTOS DE MAÍZ NIXTAMALIZADO - ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA*; Secretaría de Economía: México, 2002; p 18.
- (2) Salinas-Moreno, Y.; Vázquez-Carrillo, G. *Metodologías de análisis de calidad nixtamalera-tortillera en maíz*; Folleto Técnico; 24; Chapingo, Edo. de México, 2006.
- (3) Serna-Saldivar, S. O. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales.*, 2nd ed.; AGT-EDITOR S.A.: México, D.F., 2013.
- (4) Mauricio-Sánchez, R. A.; Figueroa-Cárdenas, J. D. D.; Taba, S.; Reyes-Vega, M. de la L.; Rincón-Sánchez, F.; Mendoza-Galván, A. Caracterización de accesiones de maíz por calidad de grano y tortilla. *Rev. Bras. Milho e Sorgo* 2004, 27 (3), 213–222.
- (5) Salinas-Moreno, Y.; Aguilar-Modesto, L. Efecto de la dureza del grano de maíz (*Zea mays* L.) sobre el rendimiento y calidad de la tortilla. *Ing. Agrícola y Biosist.* 2010, 2 (1), 5–11.

Determinación de estructura y dureza del grano de maíz por disección

Justificación

Las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano son: pericarpio o salvado (5-6 %), endospermo (82-83%), germen o embrión (10-11%), y la piloriza, pico o pedicelo (0.8-1.0 %)¹ (Figura 82).

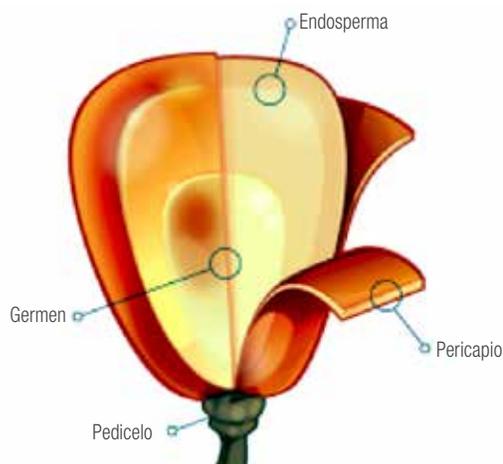


Figura 82. Estructura del grano de maíz (Figura adaptada de <http://sevilla.dacsa.com/spa/mundo-maiz/caracteristicas-y-tipos-de-maiz/el-grano-del-maiz.html>).

El pericarpio es una película compuesta por células muertas de forma tubular², es la parte estructural más externa del grano, cuyo espesor es de 60 a 80 μm , formado por un tejido denso y maleable compuesto aproximadamente de 77.7 % fibra, 9.1 % proteína, 7.3 % almidón, 1 % grasa y 4.4 % de otras sustancias.

El pedicelo está compuesto de haces vasculares que terminan en la porción basal del pericarpio y consta de una capa exterior de abscisión que sella la punta del grano maduro con la que se encuentra unido al olote. A esta capa le sigue una serie de células parenquimatosas en forma de estrellas, ligadas por sus puntas, formando una estructura frágil y porosa, conectada con la capa de células cruzadas del pericarpio. Esta estructura es responsable de la absorción de líquidos del pedicelo al pericarpio³.

El porcentaje de pedicelo en el grano de maíz es relevante en la industria de la masa-tortilla y harinas nixtamalizadas, ya que esta estructura está compuesta de lignina, la cual no se hidroliza con el álcali de la nixtamalización y adquiere una tonalidad oscura que afecta la apariencia de la tortilla, a mayor porcentaje, habrá mayor abundancia de puntos negros en la superficie.

El endospermo está compuesto por células alargadas con paredes delgadas de material celulósico, empaquetadas con gránulos de almidón (entre 5 a 30 μm) sumergidos en una matriz proteínica (almidón-proteína). El endospermo está compuesto de dos regiones: una harinosa y otra vítrea. La región harinosa del endospermo es caracterizada por gránulos grandes y casi redondos de almidón, están débilmente empaquetados y asociados a una matriz proteínica delgada y con muchos espacios de aire entre ellos⁴. El endospermo vítreo tiene células y gránulos de almidón pequeños, adquieren estructura poligonal y están fuertemente empaquetados por una matriz de proteínas sin espacios de aire entre los gránulos⁵.

La dureza del maíz está determinada especialmente por la relación entre el endospermo vítreo y harinoso. El maíz de endospermo vítreo, así como las variedades de maíz cristalino y reventador, tienen granos duros, en tanto que las variedades de maíz amiláceas y harinosas tienen granos blandos⁶.

El germen de maíz es un componente con un alto contenido de grasa (15 a 30%), proteína (10 a 18%) y sales minerales, funciona como un órgano o almacén de nutrientes y hormonas que son movilizados por enzimas sintetizadas durante la etapa inicial de germinación³.

La industria de la harina nixtamalizada requiere bajos porcentajes de germen para prevenir problemas de rancidez durante el almacenamiento.

Fundamento

A través de la disección se pueden determinar los porcentajes de las distintas estructuras que conforman el maíz.

Alcance

Se puede determinar la estructura y dureza de todo tipo de grano de maíz (blanco, amarillo, rojo o pigmentado). Un técnico con capacitación media puede diseccionar hasta 20 muestras por día.

Cuadro 48. Material y equipos utilizados en la determinación de estructura y dureza de grano por disección.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo MS204S.
Bisturí	N/A	N/A
Navajas para bisturí	No. 11	Hergom
Guantes de nitrilo	Libres de polvo	Kimberly-Clark KC 500
Vaso de precipitados	50 mL	Pyrex
Pinzas de disección	N/A	N/A
Recipientes de aluminio	N/A	N/A
Desecador	N/A	N/A
Papel absorbente	N/A	N/A
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne Mod. OV47525
Paños de papel libres de pelusa	N/A	Kimwipes

Diagrama de flujo

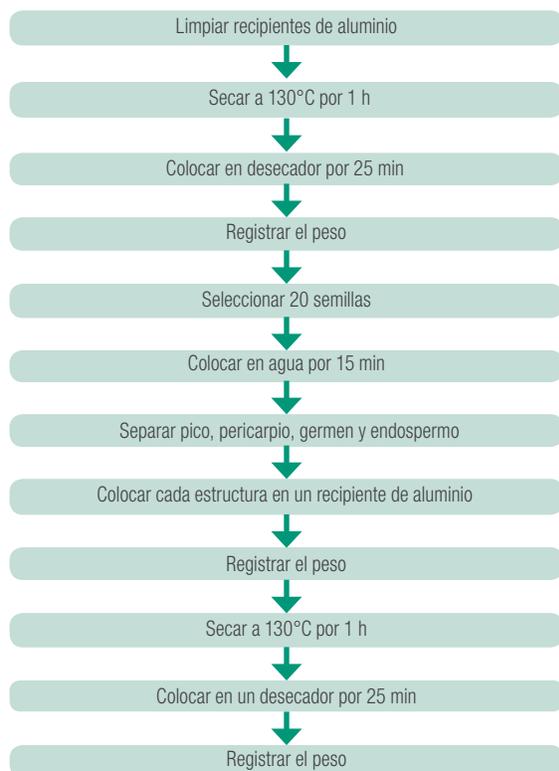


Figura 83. Diagrama de flujo para la determinación de estructura y dureza de grano por disección.

Procedimiento

Preparación de los recipientes de aluminio

1. Preparar 5 recipientes de aluminio para cada muestra de la siguiente manera:
 - a. Limpiar con alcohol etílico y papel sin pelusas (Figura 84).

NOTA: A partir de este paso los recipientes solo deben ser manipulados con pinzas o guantes.



Figura 84. Limpieza de recipientes.

- b. Etiquetar con marcador permanente, colocando el número de laboratorio y la estructura del grano que contendrá (pico, pericarpio, germen, endospermo vítreo y endospermo harinoso, figura 85).



Figura 85. Etiquetado de recipientes.

- c. Determinar el peso seco de los recipientes; para esto, se colocan dentro de una estufa de incubación a 130 °C durante una hora (Figura 86), posteriormente se dejan enfriar en un desecador durante 20 minutos y se registra su peso (Figura 87).



Figura 86. Recipientes a peso constante.



Figura 87. Peso de recipientes.

Disección

2. Seleccionar 20 granos al azar, sanos y completos. Pesar (Figura 88).

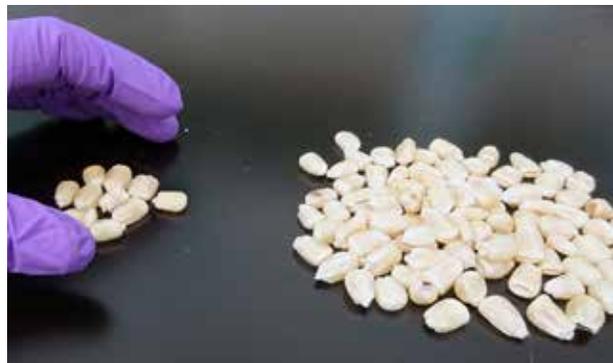


Figura 88. Selección de granos.

3. Colocar los granos en agua durante 15 minutos, utilizar preferentemente agua destilada tibia (Figura 89).

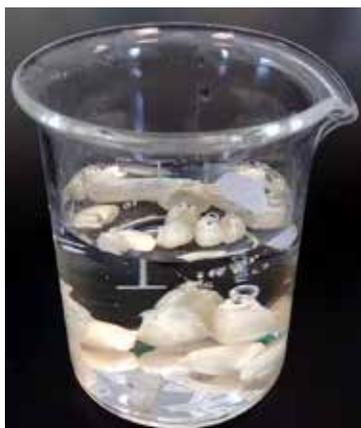


Figura 89. Granos en agua destilada.

4. Separar cada uno de las estructuras del grano (pico, pericarpio, germen, endospermo vítreo y endospermo harinoso) y colocarlos en el recipiente correspondiente.
5. Pesar cada recipiente y registrar el peso correspondiente.
6. Secar los recipientes con el tejido a 130°C durante una hora (Figura 90).



Figura 90. Secado de recipientes.

7. Colocar los recipientes en un desecador durante 20 minutos.
8. Registrar el peso de cada recipiente.
9. Calcular el porcentaje de cada tejido:
 - a. Sumar el peso seco de todas las estructuras.
 - b. Aplicar la siguiente fórmula para cada estructura:

Cuadro 49. Solución a problemas comunes en la determinación de estructura y dureza de grano por disección.

Problema	Solución
No se puede separar el pericarpio.	Dejar más tiempo remojando en agua (granos duros aprox. 20 min).
El maíz se deshace.	Dejar menos tiempo en agua (granos harinosos aprox. 10 min).

Referencias

- (1) Singh, N.; Singh, S.; Shevkani, K. Maize : Composition , Bioactive Constituents, and Unleavened Bread. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*; Preddy, V., Watson, R., Eds.; Elsevier Inc., 2011; pp 89–99.
- (2) Bartolo-Pérez, P.; Peña, J. L.; Cruz-Orea, A.; Calderón, A. Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. *Superf. y vacío 1999*, 8 (64), 64–68.
- (3) Jackson, D. S.; Shandera, J. R. Corn wet milling: Separation, Chemistry and Technology. *Adv. Food Nutr. Res. 1995*, 38, 271–297.
- (4) Mu-forster, C.; Wasserman, B. P. Surface Localization of Zein Storage Proteins in Starch Granules from Maize Endosperm. *Plant Physiol. 1998*, 116 (4), 1563–1571.
- (5) INTA. Calidad del grano de maíz http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/suplementacion/80-grano_maiz.pdf.
- (6) Véles-Medina, J. J. Caracterización de tostadas elaboradas con maíces pigmentados y diferentes métodos de nixtamalización., CICATA-Instituto Politécnico Nacional, 2004.

Determinación de humedad en grano de maíz por conductividad utilizando el medidor Steinlite™

Justificación

La humedad es uno de los factores que afecta el almacenamiento del maíz, ya que es la responsable de que ocurran diferentes reacciones, ya sean del tipo biológicas o bioquímicas¹, tales como crecimiento de hongos, germinación del grano, calidad del grano que se ve disminuida al reducir su viabilidad², entre otros, provocando que la cadena de productor-industria-consumidor se vea afectada por el mal manejo de almacenamiento en cualquiera de éstas tres áreas, por lo que es importante un control de la humedad desde el inicio del almacenamiento del grano.

Fundamento

El determinador de humedad utiliza el principio de capacitancia, se basa en la relación que existe entre el contenido de agua en el grano y su constante dieléctrica. La muestra es colocada en la tolva de muestreo (Figura 91) y cae en medio de dos placas paralelas que tienen alrededor de 5 cm de separación (éstas placas están separadas por un aislador que en este caso es aire), una vez que va cayendo la muestra el aire se va desplazando, por lo que las placas detectan el cambio en las características eléctricas del condensador a causa de las características dieléctricas del grano, cuantificando de ésta manera su contenido de agua. Cabe mencionar que este equipo está programado para medir alrededor de 500 tipos de semillas³.

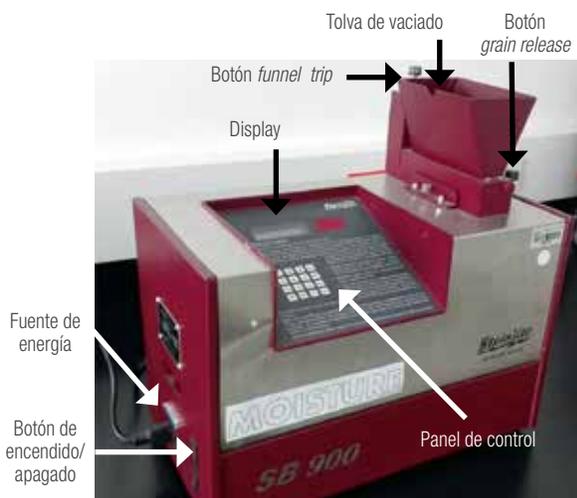


Figura 91. Descripción del medidor de humedad Steinlite.

Alcance

Aplica para todo tipo de maíz. Un técnico con capacitación básica puede analizar 20 muestras en una hora.

Cuadro 50. Material y equipos utilizados en la determinación de humedad con Steinlite.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 1010 g	Mettler Toledo Mod. PG1003-S
Medidor de humedad	N/A	Steinlite SB900
Charola para pesar	N/A	N/A

Diagrama de flujo



Figura 92. Diagrama de flujo para determinar humedad con Steinlite.

Procedimiento

1. Encender el equipo 30 minutos antes de su uso. Al momento de encenderlo se realiza un ajuste automático (*Balancing*), lo cual se aprecia en la pantalla (Figura 93).

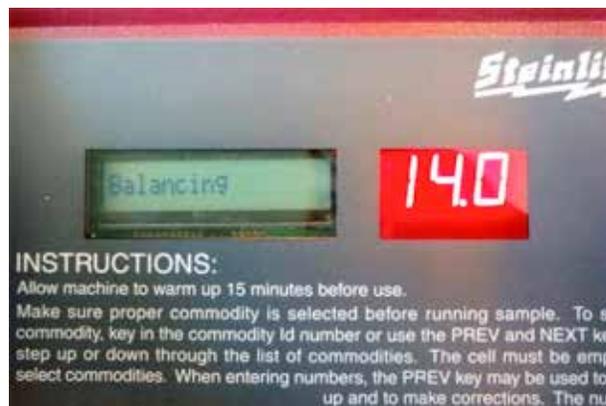


Figura 93. Ajuste automático del equipo.

2. Pesar 250 g de semilla de maíz (Figura 94).



Figura 94. Peso de la muestra.

3. Transcurridos los 30 minutos, en pantalla se despliega la opción *Select commodity*, indicar el código para maíz establecido en la tabla de *Commodity sections* para el lector de humedad Steinlite. Con ayuda del teclado ingresar el código 139, inmediatamente en la pantalla aparecerá la leyenda *100 CORN* indicando que ha sido programado para maíz (Figura 95).

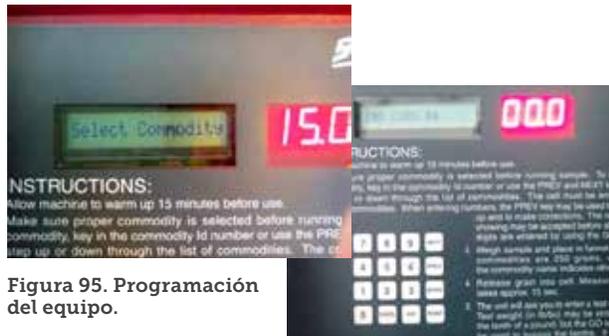


Figura 95. Programación del equipo.

4. Una vez programado el equipo, agregar los 250 g de maíz en la tolva del equipo como se muestra en la figura 96.



Figura 96. Colocación de la muestra.

5. Presionar el botón *funnel trip* para permitir que la muestra pase al contenedor de placas (Figura 97).



Figura 97. Dosificación de la muestra.

6. Presionar el botón *GO* y esperar 15 segundos para que el equipo realice la lectura. En pantalla se muestra el porcentaje de humedad del grano (pantalla roja) así como su temperatura en grados Fahrenheit (Figura 98).



Figura 98. Lectura de la muestra.

7. Presionar el botón *grain release* para recuperar el grano del equipo, el cual se deposita en la caja contenedora (Figura 99). El grano puede ser utilizado para otros análisis posteriormente.



Figura 99. Recuperación del grano.

Cuadro 51. Solución a problemas comunes en la determinación de humedad con Steinlite.

Problema	Solución
En la pantalla del equipo aparece la leyenda <i>can't balance</i> .	El tiempo de calentamiento del equipo no fue el adecuado: - Se recomienda esperar más tiempo. - Apagar el equipo y encenderlo nuevamente.

Referencias

- (1) Rashid, S.; Kurt, R.; Carl, B. Effects of Deterioration Parameters on Storage of Maize: A Review. *J. Nat. Sci. Res.* 2013, 3 (9), 2224–3186.
- (2) Volenik, M.; Rozman, V.; Kalinovic, I.; Liska, A.; Kiš, D.; Šimic, B. Influence of Relative Humidity and Temperature on the Changes in Grain Moisture in Stored Soybean and Maize. *Agric. Consp. Sci.* 2007, 72 (3), 215–219.
- (3) Steinlite. *Steinlite SB 900*.

Determinación de humedad por termobalanza

Justificación

El contenido de humedad determina la proporción real en que se encuentran los nutrientes en el grano de maíz. Existen diversos métodos para determinar la humedad, sin embargo, el uso de la termobalanza es una alternativa rápida, sencilla y útil, particularmente cuando la cantidad de muestra no es suficiente para determinar la humedad por el método gravimétrico^{1,2}.

Fundamento

La termobalanza trabaja según el principio termo-gravimétrico, es decir, el contenido de humedad se basa en la pérdida de peso mediante el calentamiento. Al inicio de la medición el analizador de humedad determina el peso de la muestra, luego la muestra se calienta rápidamente con la unidad de calentamiento halógena integrada y la humedad se evapora. Durante la desecación, el equipo calcula continuamente el peso de la muestra y visualiza la pérdida de humedad. Una vez concluida la desecación el resultado final es el contenido de humedad o materia seca de la muestra³.

Alcance

La termobalanza sirve para determinar el contenido de humedad en harina de maíz blanco, amarillo o de color, cuya cantidad disponible sea menor a 3 g. Se puede analizar entre 45 y 50 muestras en un periodo de 7 h.

Cuadro 52. Material y equipos utilizados en la determinación de humedad por termobalanza.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Pincel o brocha pequeña	N/A	N/A
Espátula metálica	N/A	N/A
Plato de muestras de aluminio	90 mm de diámetro	Mettler Toledo, HA-D90
Analizador halógeno de humedad	N/A	Mettler Toledo, HB-43S

Diagrama de flujo

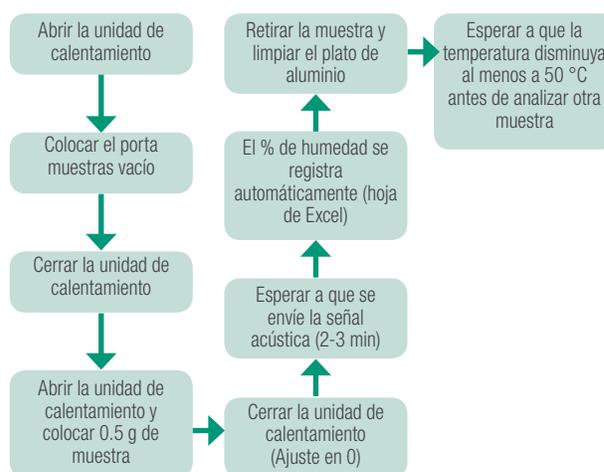


Figura 100. Diagrama de flujo para la determinación de humedad por termobalanza.

Procedimiento

Antes de iniciar con la determinación de humedad en las muestras, se debe encender la termobalanza al menos 30 minutos previos al análisis. Posteriormente, se realizan los siguientes pasos:

1. Seleccionar el icono de *LabXdirect moisture 2.2* (Figura 101).



Figura 101. Pantalla del escritorio e icono del software *LabXdirect moisture 2.2*.

2. En la ventana “*Seleccione un idioma*”, elegir la opción *Español* y dar click sobre el botón “*Siguiente*” (Figura 102).
3. En la siguiente ventana “*Configure el instrumento*”, buscar la opción *Estado* y dar un click sobre el botón *Unión de Prueba*. Una vez seleccionado, el

campo de *Estado* cambiará de *Abierto* a *Conectado*. Con esto se enlaza la termobalanza y la computadora. Enseguida seleccionar el botón “*Siguiente*” (Figura 103).

4. Posteriormente, en la ventana “*Configure el formato de los datos*”, únicamente pulsar “*Siguiente*” para continuar (Figura 104).

Figura 102. Selección del idioma de trabajo.

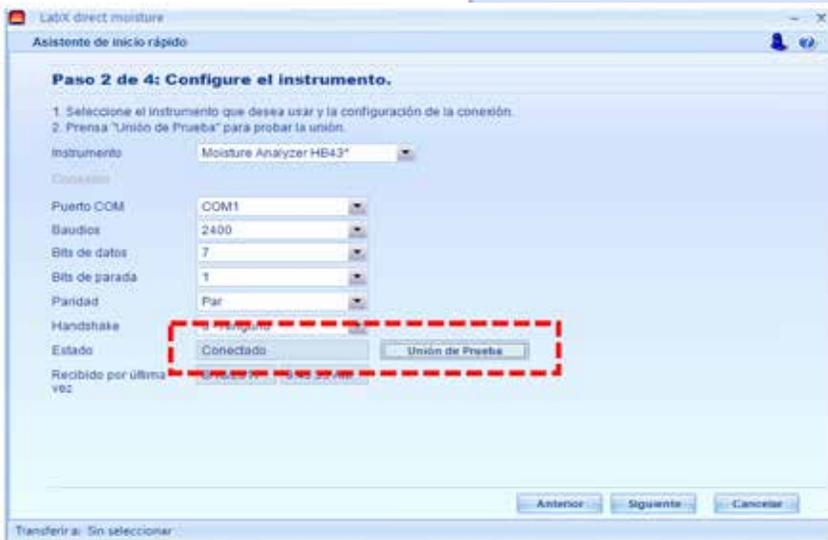
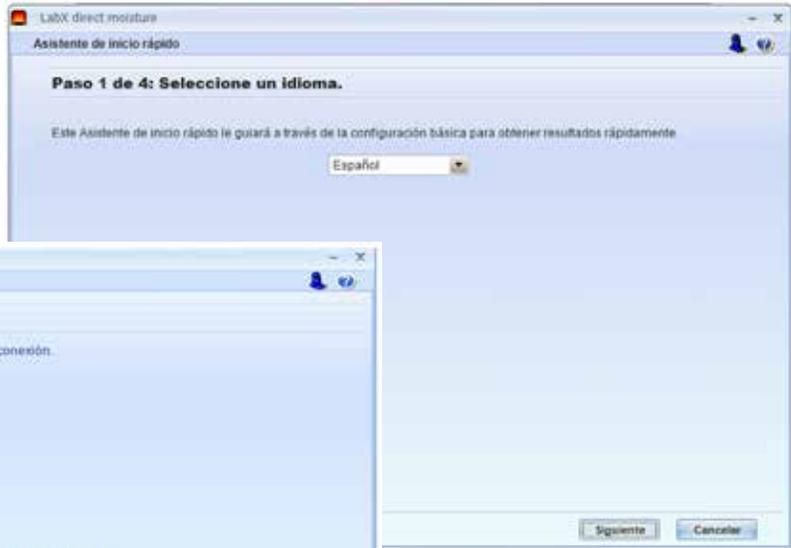


Figura 103. Enlace entre la termobalanza y la computadora para el registro automático de los resultados.

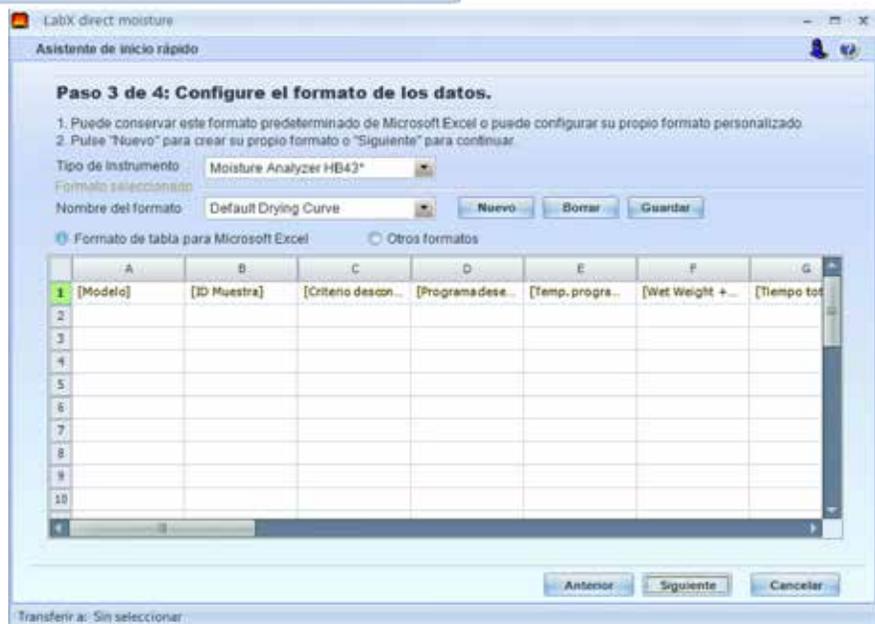


Figura 104. Ventana desplegada por la opción *Configure el formato de los datos*.

- Finalmente, en la ventana “Escoja una transferencia”, seleccionar la opción *Abrir archivo* y elegir el archivo de destino (Figura 105). Pulsar el botón *Aplicar*.
- Comenzar con la determinación de humedad, siguiendo los pasos descritos en el diagrama de flujo. Los parámetros pre-definidos para la determinación de humedad se indican en el Cuadro 53.

Cuadro 53. Parámetros programados en la termobalanza HB432-S.

Peso de la muestra	0.5 g
Temperatura	150°C
Criterio de desconexión	4
Programa de secado	Estándar
Tiempo (min)	2-3

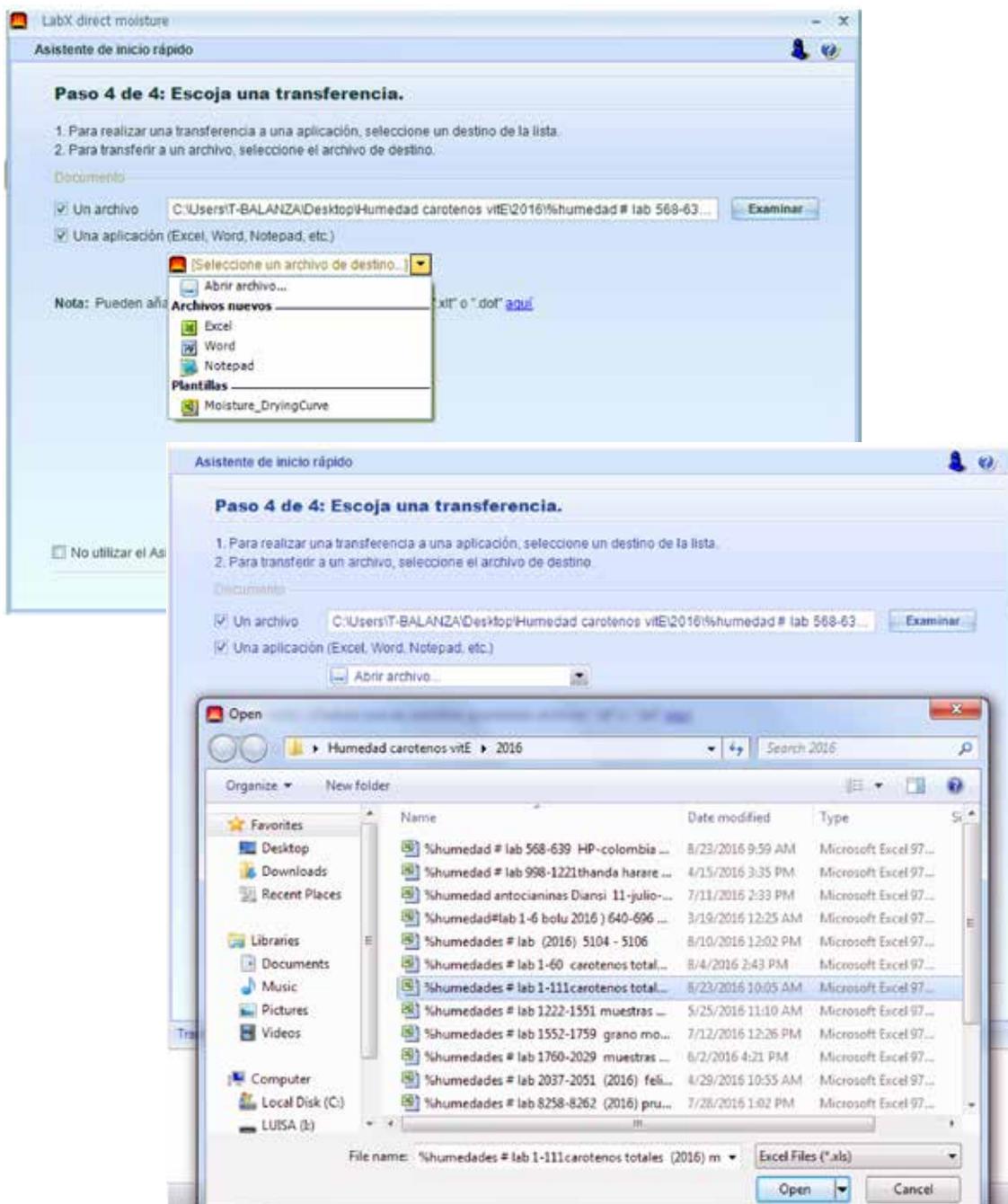


Figura 105. Selección del archivo para enviar automáticamente los resultados obtenidos.

7. Registrar los valores obtenidos siguiendo el formato de la Figura 106.

Cuadro 54. Solución a problemas comunes en la determinación de humedad por termobalanza.

Problema	Solución
El equipo tarda más de 10 minutos para realizar la determinación.	Liofilizar la muestra, puesto que puede contener un alto porcentaje de humedad.
Variación en los resultados	Cambiar el plato por uno nuevo, ya que puede estar desgastado o pandeado a causa del calor generado. Distribuir la muestra homogéneamente sobre el plato. Elegir un espacio de trabajo donde las variaciones por temperatura y humedad relativa sean mínimas.

Referencias

- Fennema, R. O. Química de alimentos. Ed. Acribia S. A. 2ª Edición. Zaragoza, España. **2000**, 59-64.
- NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de humedad (Método rápido de la termobalanza). Foods. Determination of moisture (Thermobalance rapid method).
- Mettler Toledo. Analizador de humedad HB43-S. Instrucciones de manejo. **2011**, 70 p.
- Mettler Toledo. Determinación de la humedad mediante el analizador halógeno de humedad. Guía práctica. **2011**, 45 p.
- Mettler Toledo. Analizador de humedad HB43-S. Métodos de aplicación. **2011**, 11 p.

no.lab	peso.g	03/agosto/2016	tiempo	humedad
10	fecula de maiz 0.516		0:03:39	0.453 g -12.21 %MC
11	fecula de maiz 0.519		0:03:11	0.459 g -11.56 %MC
12	fecula de maiz 0.516		0:02:51	0.456 g -11.63 %MC
13	1 0.521		0:03:16	0.467 g -10.54 %MC
14	2	no hay muestra		
15	3 0.506		0:04:14	0.461 g -9.07 %MC
16	4 0.507		0:03:11	0.451 g -10.52 %MC
17	5 0.511		0:03:24	0.458 g -10.20 %MC
18	6 0.506		0:02:54	0.447 g -11.49 %MC
19	7 0.505		0:03:19	0.448 g -11.29 %MC
20	8	no hay muestra		
21	9 0.518		0:02:53	0.459 g -11.22 %MC
22	10 0.508		0:03:19	0.450 g -11.42 %MC
23	11 0.514		0:03:08	0.457 g -11.09 %MC
24	12 0.521		0:03:11	0.466 g -10.38 %MC
25	13 0.508		0:03:39	0.454 g -10.63 %MC
26	14 0.513		0:03:56	0.457 g -10.92 %MC
27	15 0.539		0:02:43	0.482 g -10.41 %MC
28	16 0.511		0:03:00	0.457 g -10.39 %MC

Figura 106. Formato de registro para el contenido de humedad.

Determinación de humedad en estufa de secado

Justificación

La determinación del contenido de humedad permite no solo la cuantificación de compuestos de manera exacta^{1,2}, sino también contribuye en el almacenamiento adecuado de las semillas y la limitación del crecimiento de hongos o microorganismos que afectan la calidad del producto.

Fundamento

Para la determinación de humedad mediante el secado, la muestra en harina se pesa y es secada dentro de una estufa bajo condiciones específicas de tiempo y temperatura. La pérdida de peso ocurrida durante el proceso es utilizada para calcular el contenido de humedad³.

Alcance

Este método es aplicable en harina, granos y productos alimenticios⁴.

Cuadro 55. Material y equipos utilizados en la determinación de humedad en estufa de secado.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo AG135
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne OV47525
Charolas de aluminio	A peso constante	N/A
Pinzas de disección	N/A	N/A
Desecador	N/A	N/A
Sílice para sellar desecador	N/A	N/A

Diagrama de flujo

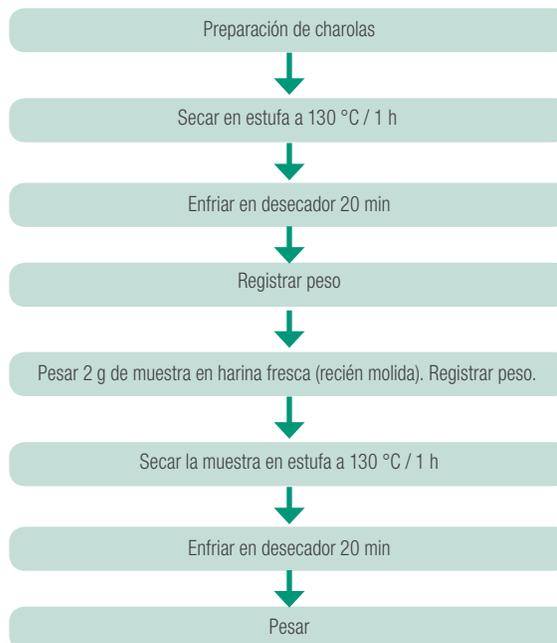


Figura 107. Diagrama de flujo para determinar humedad en estufa.

Procedimiento

1. Limpiar perfectamente con alcohol, las charolas de aluminio.
2. Identificar las charolas con marcador indeleble.
3. Secar en estufa a 130°C durante 1 h.
4. Retirar las charolas de la estufa y colocarlas dentro de un desecador para su enfriamiento (aproximadamente 20 min).
5. Pesar las charolas vacías y registrar su peso (Figura 108). No tocar las charolas con las manos, puesto que se encuentran a peso constante.



Figura 108. Pesado de las charolas de aluminio.

6. Pesar alrededor de 2 g de muestra recién molida en las charolas a peso constante y registrar el peso de la caja vacía más la muestra de harina (Figura 109).

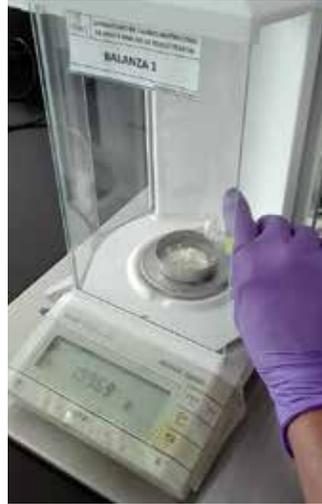


Figura 109. Pesado de la muestra en harina.

7. Secar la muestra en la estufa a 130 °C durante 1 hora (Figura 110).



Figura 110. Muestra en estufa a 130 °C.

8. Con las pinzas de disección, retirar de la estufa las charolas con la muestra seca y colocarlas dentro de un desecador durante 20 minutos (Figura 111).

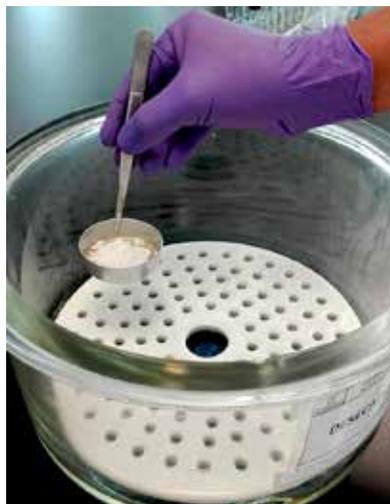


Figura 111. Colocación de la muestra seca dentro del desecador.

9. Pesar las charolas con la muestra seca y registrar peso.
10. Obtener el porcentaje de humedad de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = 100 \frac{(MS \times 100)}{MH}$$

Dónde:

MH = (Peso de la caja vacía + Muestra húmeda) – (Peso de la caja vacía)

MS = (Peso de la caja vacía + Muestra seca) – (Peso de la caja vacía)

Cuadro 56. Solución a problemas comunes en la determinación de humedad en estufa de secado.

Problema	Solución
El porcentaje de humedad no coincide con los controles.	No saturar la estufa de charolas con muestra. La charola no está a peso constante. No se utilizaron guantes, lo que provocó transferencia de humedad a los materiales utilizados.

Referencias

- (1) Volenik, M.; Rozman, V.; Kalinovic, I.; Liska, A.; Kiš, D.; Šimic, B. Influence of Relative Humidity and Temperature on the Changes in Grain Moisture in Stored Soybean and Maize. *Agric. Conspec. Sci.* 2007, 72 (3), 215–219.
- (2) Thiex, N.; Richardson, C. R. Challenges in measuring moisture content of feeds The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Challenges in measuring moisture content of feeds. *J. Anim. Sci.* 2003, 81, 3255–3266.
- (3) Nielsen, S. *Compositional analysis of foods, part II.*, Fourth edi.; Springer: West Lafayette, IN, USA., 2010.
- (4) AOAC, I. Moisture air oven method, drying at 135°C. Method 930.15. *Off. Methods Anal. AOAC Int.* 1999.

Determinación de color en escala $L^*a^*b^*$ utilizando el colorímetro Minolta

Fundamento

El color es una percepción humana de la luz reflejada por un objeto. Se trata de una apreciación, que depende de cómo nuestros ojos detectan la luz reflejada y de cómo nuestro cerebro la procesa. Está afectado por el objeto, el área, fondo, superficie, brillo y temperatura. Se lo define entonces como una respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina¹.

En las frutas y vegetales el color se debe principalmente a tres familias de pigmentos: clorofilas, carotenoides y antocianinas, que son los responsables de la coloración verde, amarilla-roja, azul-violeta respectivamente².

Justificación

El primer acercamiento del consumidor al alimento es por su color, ya que lo relaciona con la aceptación o rechazo. En algunos alimentos el color es el resultado conjunto de sus características físicas y sus compuestos pigmentantes. A simple vista se puede hacer una evaluación de un color, pero la percepción en cada persona es diferente, por lo que la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), desarrolló un sistema basado en la fuente de iluminación estándar y un observador estándar, sobre el que se construyó un sistema tricromático basado en la percepción del ojo humano: rojo, verde y azul y tres parámetros: L^* = luminosidad, a^* = rojo a verde y b^* = amarillo a azul³, este es el principio utilizado para el colorímetro Minolta (Figura 112).



Figura 112. Descripción del colorímetro Minolta CR-410.

Alcance

Es posible analizar 30 - 40 muestras de grano o harina (0.5 mm) en una hora. Es compatible con cualquier tipo de maíz, así como sus derivados.

Material y equipo

Cuadro 57. Material y equipos utilizados en la determinación de color con colorímetro Minolta.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelos
Colorímetro	Instrumento para evaluar color con superficies dispares o de variación de color	Minolta CR-410
Cápsula de muestreo	Para materiales granulares	1829-751
Vidrio de cuarzo	Sin reflectancia	1829-752
Plato de calibración		1849-702

Diagrama de flujo



Figura 113. Diagrama de flujo para medir color.

Procedimiento

1. Conectar a una fuente de energía y encender el equipo.
2. Calibración del equipo: colocar el colorímetro sobre el mosaico blanco de calibración, presionar el botón CAL y posteriormente el botón de lectura, automáticamente el equipo hará la calibración (se podrán ver tres disparos de luz) de acuerdo a valores predeterminados, en la pantalla aparecerá la leyenda *NOW CALIBRATING* (Figura 114) y al término de la calibración, se mostrará la pantalla principal con los datos de la última lectura.

Se recomienda realizar la calibración cada vez que se va a utilizar el equipo.



Figura 114. Calibración del colorímetro.

3. Colocar el aro sobre la base de la cápsula, adicionar la muestra (harina o grano) dentro del aro, sobre la muestra colocar el cuarzo y finalmente colocar el cabezal de la cápsula (Figura 115). Asegurarse de que la muestra no sobrepase la capacidad máxima del aro para que el cuarzo y el cabezal queden empalmados. La cápsula armada debe de quedar fija (Figura 116).



Figura 115. 1) Base de la cápsula, 2) Aro para delimitar la cantidad de muestra, 3) Cuarzo antirreflejante, 4) Cabezal de la cápsula.

4. Colocar el colorímetro sobre la cápsula con la muestra y presionar el botón de lectura (Figura 117a).
5. En la pantalla aparecerán los valores obtenidos para L^* , a^* y b^* (Figura 117b).
6. Registrar los valores.



Figura 116. a) Base de la cápsula, b) Aro para delimitar la cantidad de muestra, c) Cuarzo anti-reflejante, d) Cabezal de la cápsula.



Figura 117. a) Toma de muestra, b) Pantalla con resultados.

7. Se recomienda hacer el análisis por triplicado utilizando diferentes submuestras, así como la misma cantidad. Reportar el promedio de los tres valores.
8. Utilizar aire comprimido o papel (que no deje residuos) para la limpieza de la cápsula.

Expresión de resultados

- **L^*** : Es la luminosidad de la muestra que va de blanco, pasando por las tonalidades de grises hasta llegar a negro, siendo poco luminoso los valores cercanos a 0 (negro) y siendo muy luminosos los valores cercanos a 100 (blanco).
- **a^*** : Indica las tonalidades de verde a rojo, valores negativos indican verde y valores positivos rojo, la intensidad de cada tonalidad dependerá del lugar en donde se ubiquen: valores más cercanos a 0 la tonalidad es baja, valores cercanos a -100 o +100 la tonalidad es alta.

- **b***: Indica las tonalidades de azul a amarillo, valores negativos indican azul y valores positivos amarillo, la intensidad de cada tonalidad dependerá del lugar en donde se ubiquen: valores más cercanos a 0 la tonalidad es baja, valores cercanos a -100 o +100 la tonalidad es alta.

Cuadro 58. Solución a problemas comunes en el uso del colorímetro Minolta.

Problema	Solución
Los datos no son repetibles.	Homogenizar la submuestra. Asegurarse de que se está suministrando la misma cantidad de muestra. Verificar que la cápsula esté bien armada. Verificar que el cuarzo está limpio.

Referencias

- (1) Delmoro, J.; Muñoz, D.; Nadal, V.; Pranzetti, V. El color en los alimentos: Determinación de color en mieles. *Invenio 2010*, 13 (25), 145–152.
- (2) Mínguez Mosquera, M. I.; Pérez Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales. *Agroscic 2005*, 2–7.
- (3) Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.

Determinación de color por medio de la aplicación Techkon Color Catcher™

Justificación

Debido al elevado costo de los colorímetros, es necesario encontrar alternativas económicas y portátiles, que puedan ser utilizadas por técnicos, agricultores y procesadores.

Fundamento

En algunos alimentos el color es el resultado conjunto de sus características físicas y sus compuestos pigmentante. En frutas y vegetales el color se debe principalmente a tres familias de pigmentos: clorofilas, carotenoides y antocianinas, que son los responsables de la coloración verde, amarilla-roja, azul-violeta respectivamente². Para la cuantificación de color existen diferentes equipos, como el colorímetro, en el Laboratorio de Calidad de Maíz tratando de optimizar costos y hacer más accesible esta metodología, se

cuenta con una tarjeta para medir color (Figura 118) que funciona con una aplicación para celular, la cual tienen una buena correlación comparando los resultados con equipos especializados.

Alcance

Éste método permite analizar de 40 a 60 muestras por hora con la colaboración de 2 personas capacitadas y es compatible con cualquier variedad de maíz y sus derivados, además de cualquier otro material.



Figura 118. Color Catcher Card.

Cuadro 59. Material y equipos utilizados en la determinación de color utilizando aplicación de celular.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Tarjeta de color ¹	N/A	Color Catcher Techkon
Celular	Smartphone con la aplicación Color Catcher Techkon ²	N/A
Pila de litio	3 V	Steren, tipo botón
Leds	Blanco ultra	Steren
Muestreador ³	N/A	N/A
Caja de lectura ³	N/A	N/A

¹ La tarjeta tiene una dimensión de 8.5 x 5 cm, en la parte central tiene un orificio que es donde se coloca la muestra para poder cuantificar color. En las esquinas tiene 4 códigos que deben ser visibles al momento de colocar la cámara y la muestra, para que la tarjeta pueda ser detectada y la muestra cuantificada (Figura 119).

² La aplicación para el smartphone se descarga con el nombre: Techkon Color Catcher.

³ El muestreador y la caja de muestreo fueron elaborados por técnicos del laboratorio de calidad de maíz con el fin de que sirvan de apoyo para obtener mediciones más precisas, por lo que el diseño que se muestra es como recomendamos que se utilice, pero cada usuario puede adaptarse conforme a sus posibilidades siempre y cuando cumpla con las condiciones de luz y distancia entre la muestra y el Smartphone (Figuras 120, 121 y 122).



Figura 119. Descripción de la tarjeta.

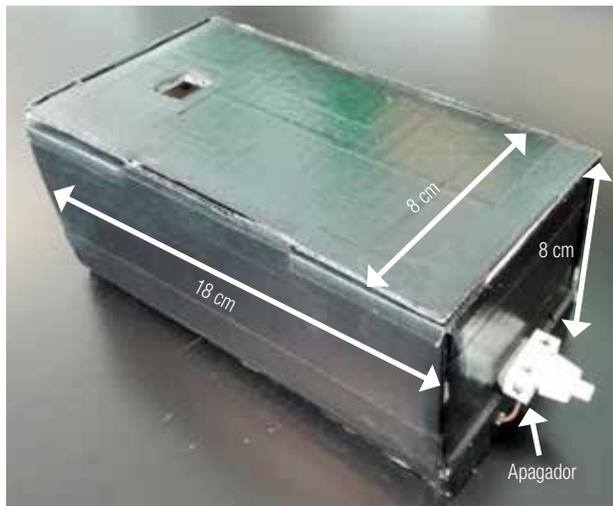


Figura 120. Diseño de la caja de muestreo.

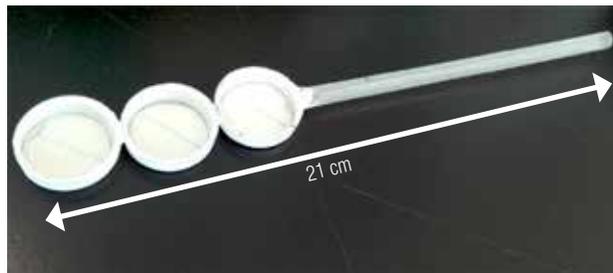


Figura 121. Muestreador.

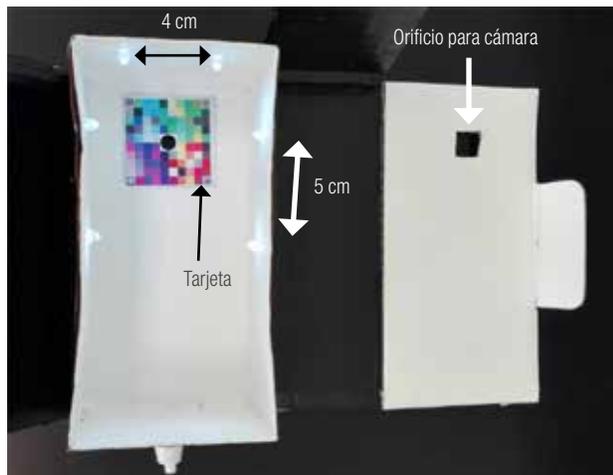


Figura 122. Ubicación de leds en parte interna de la caja.

Diagrama de flujo



Figura 123. Diagrama de flujo para la determinación de color utilizando aplicación de celular.

Procedimiento

1. Colocar en la caja el Smartphone y la tarjeta antes de tomar las lecturas. Verificar que las luces enciendan correctamente (Figura 124) y que la cámara esté enfocada para poder detectar los códigos de la tarjeta.



Figura 124. Revisión del funcionamiento de la caja de muestreo.



Figura 125. Parte inferior de la caja en donde se coloca la tarjeta y la pila.

2. Vaciar la harina en las 3 charolas del muestreador, lo cual permite obtener las lecturas por triplicado en un solo proceso. Los pozos deben quedar llenos en su totalidad y con la superficie de harina lisa (Figura 126).



Figura 126. Llenado de muestras.

3. Insertar el muestreador en la caja y en el celular abrir la aplicación Color Catcher (Figura 127).

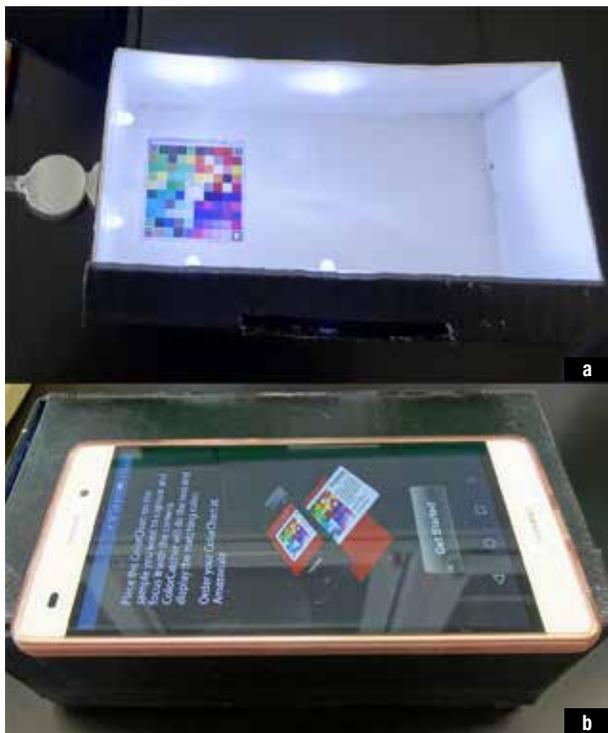


Figura 127. Muestreo. a) Interior de caja, b) Aplicación en el Smartphone.

4. Presionar el botón *Get Started* para iniciar la medición. Repetir para cada pozo. Los resultados aparecen en pantalla en escala Lab (Figura 128).



Figura 128. Pantalla de resultados.

Expresión de resultados

- **L***: Es la luminosidad de la muestra que va de blanco, pasando por las tonalidades de grises hasta llegar a negro, siendo poco luminoso los valores cercanos a 0 (negro) y siendo muy luminosos los valores cercanos a 100 (blanco).
- **a***: Indica las tonalidades de verde a rojo, valores negativos indican verde y valores positivos rojo, la intensidad de cada tonalidad dependerá del lugar en donde se ubiquen: valores más cercanos a 0 la tonalidad es baja, valores cercanos a -100 o +100 la tonalidad es alta.
- **b***: Indica las tonalidades de azul a amarillo, valores negativos indican azul y valores positivos amarillo, la intensidad de cada tonalidad dependerá del lugar en donde se ubiquen: valores más cercanos a 0 la tonalidad es baja, valores cercanos a -100 o +100 la tonalidad es alta.

Validación del método

Esta aplicación puede servir para evaluar granos en tonalidad blanca y amarilla, los principales que se utilizan en la elaboración de tortillas o productos derivados de maíz.

Para tener confiabilidad en el uso de la tarjeta alternativa para medir color, se presenta un cuadro (Cuadro 60) de intervalos para clasificar maíces blancos de acuerdo a la calidad de color requerida para su procesamiento y una correlación de maíces amarillos (Cuadro 61), ambos entre un colorímetro Minolta y la tarjeta Color Catcher.

Cuadro 60. Intervalos para maíz blanco en colorímetro Minolta y su equivalente en tarjeta.

	Escala	Minolta	Tarjeta
L	Promedio	91.62	85.01
	Intervalo	89.14 - 96.04	81.60 - 87.10
a	Promedio	-0.09	-3.21
	Intervalo	-0.45 - 0.25	-4.40 - 3.60
b	Promedio	9.92	7.35
	Intervalo	8.98 - 11.50	6.10 - 8.10

Para el caso de los maíces amarillos, de acuerdo a la tonalidad, se hizo la clasificación entre maíces amarillos claros, medio e intensos dando como equivalencia los valores mostrados en el cuadro 59 en cada uno de los equipos, así como el valor ideal (promedio) para cada una de las tonalidades.

Cuadro 61. Clasificación de amarillos en b de acuerdo a la escala Lab.

	Clasificación	Minolta	Tarjeta
Claro	Promedio	26.17	26.23
	Intervalo	21.31 - 28.59	18.10 - 29.73
Medio	Promedio	30.43	33.60
	Intervalo	28.71 - 31.94	30.03 - 39.10
Intenso	Promedio	34.19	43.74
	Intervalo	32.13 - 37.80	40.67 - 52.47

La figura 129 muestra la correlación ($r^2 = 0.77$) entre ambos equipos, de un total de 50 muestras. De acuerdo al principio de cada equipo, la correlación obtenida es aceptable, tomando en cuenta las opciones de uso de la tarjeta (controlando iluminación y distancia entre la tarjeta y el smartphone) para garantizar los resultados.

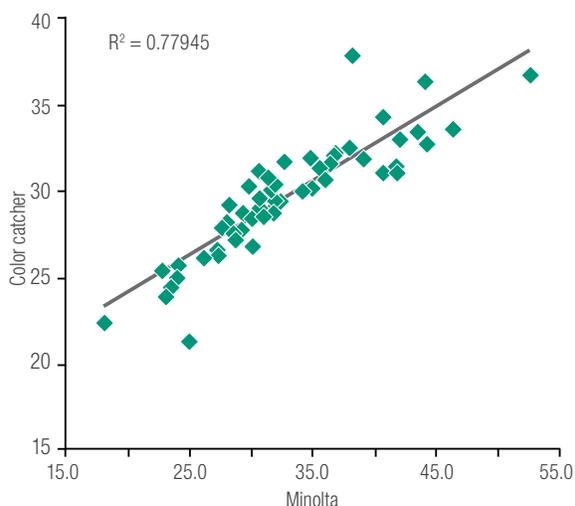


Figura 129. Correlación de b en colorímetro Minolta y tarjeta color catcher.

Para cuantificar color es posible utilizar ambos equipos utilizando la tabla de equivalencias y así poder determinar la calidad de color de grano que se requiere de acuerdo al uso final que se le va a dar.

Cuadro 62. Solución a problemas comunes en la determinación de color utilizando aplicación de celular.

Problema	Solución
El smartphone no toma la lectura del color de la muestra.	Verificar que el smartphone está detectando los códigos de la tarjeta.
Las lecturas de una misma muestra no son repetitivas.	Se recomienda hacer mínimo 3 repeticiones por muestra y al final calcular el promedio de las lecturas. Las condiciones de lectura deben ser las mismas, controlar iluminación, distancia y cantidad de muestra.

Referencias

- (1) Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- (2) Mínguez Mosquera, M. I.; Pérez Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples "colorantes" naturales. *Agroscic* 2005, 2-7.



Analisis con infrarrojo

Rubén Basilio, Aldo Rosales

Determinación del contenido de proteína, almidón, humedad y aceites en grano de trigo y maíz mediante el analizador de grano Infratec™ 1241

Justificación

La caracterización física y química de granos de trigo y maíz son fundamentales en programas de mejoramiento, sin embargo, existen limitaciones en la mayoría de los análisis químicos debido a su costo y tiempo, por lo que es necesario adoptar o adaptar metodologías adecuadas, económicas y rápidas^{1,2}. Una alternativa es el uso de la espectroscopia en el infrarrojo cercano, la cual es una tecnología no destructiva que permite estimar el contenido de compuestos en materiales biológicos³.

Fundamento

El analizador Infratec™ 1241 emplea el análisis por infrarrojo cercano en el modo de transmisión (NIT), el cual es el método de infrarrojo más antiguo y sencillo.

La técnica combina la espectroscopia y las matemáticas para estimar la cantidad de moléculas orgánicas de manera indirecta con base en la absorción de radiación infrarroja en longitudes de onda específicas (en enlaces OH-, NH-, CH- o SH) a medida que pasa a través de una muestra¹. El Infratec utiliza un rango de longitud de onda de entre 570 y 1100 nm^{4,5}.

Alcance

Se puede estimar el contenido de proteína, almidón, humedad y aceites en todo tipo de granos de trigo y para granos de maíz blanco o amarillo⁴. Para maíz con otra pigmentación (azul o rojo), se deben verificar los resultados obtenidos mediante métodos químicos tradicionales. Un técnico con capacitación básica puede procesar 240 muestras por día.

Cuadro 63. Material y equipos utilizados con el analizador Infratec.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Analizador de granos	N/A	FOSS, Infratec 1241
Recipiente contenedor de granos	Vaso de plástico o vidrio, 1 L	N/A
Cepillo y brocha	Cerdas suaves	N/A
Aire comprimido	Presión mínima de 60 psig	N/A

Diagrama de flujo



Figura 130. Diagrama de flujo para el uso del analizador Infratec.

Descripción del equipo



Figura 131. Vista frontal del equipo Infratec.



Figura 132. Vista posterior del equipo Infratec.

Procedimiento

1. Encender el equipo, en automático comienzan una serie de pruebas con las que se verifica que funcionen correctamente las siguientes partes:
 - a) Monocromador
 - b) Detector
 - c) Sensor de ambiente
 - d) Unidad de medición
 - e) Sistema de difracción
 - f) Lámpara

Posteriormente, el equipo analiza la estabilidad del ambiente y la longitud de onda. Al finalizar cada prueba, el resultado es desplegado en pantalla (Figura 133).

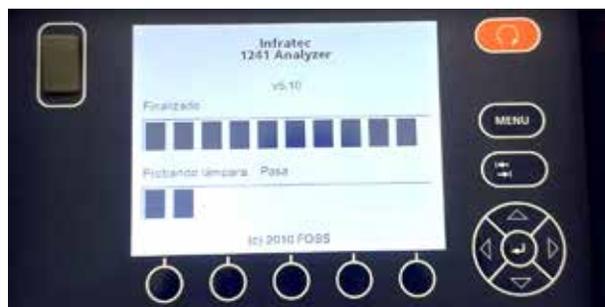


Figura 133. Verificación del instrumento.

2. Al finalizar las pruebas, se muestra la pantalla de análisis (Figura 134).



Figura 134. Pantalla de análisis.

3. El instrumento se manipula a través de los botones de control. Se debe presionar el botón que se ubica bajo la opción: SELECCIÓN DE CALIBRACION (marcado en un círculo rojo de la figura 134), lo cual despliega en pantalla las opciones mostradas en la figura 135. Se debe seleccionar la opción *CO261107 Corn*, la cual corresponde a la calibración para maíz o la opción *WH000003 Wheat* si se analiza trigo.

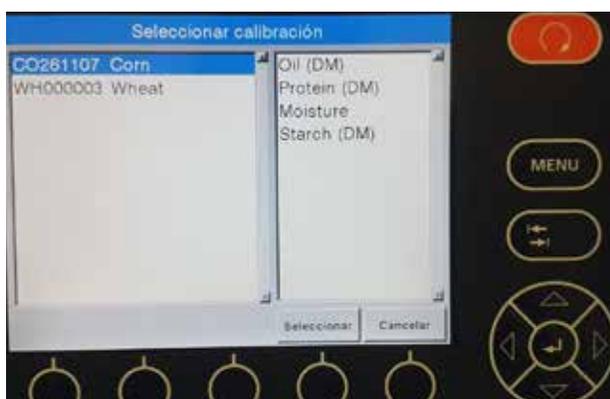


Figura 135. Seleccionar calibración.

4. Seleccionada la calibración, se procede a colocar la muestra (aproximadamente 400 g) en la tolva (Figura 136) y se presiona el botón de análisis (rectángulo rojo de la figura 134).



Figura 136. Colocación de la muestra.

5. El equipo solicita el nombre de la muestra (Figura 137), el operador proporciona la información utilizando el teclado.



Figura 137. Identificación de la muestra.

6. El equipo realiza 5 lecturas de la muestra, para lo cual, deja caer 5 sub-muestras de los granos de maíz o trigo ubicados en la tolva al depósito de vaciado, el avance del análisis se muestra en pantalla (Figura 138).



Figura 138. Análisis de la muestra.

7. Al finalizar el análisis, el equipo vacía el grano remanente de la tolva y muestra los resultados en pantalla (Figura 139).



Figura 139. Resultados.

8. Finalmente, se retira el depósito de vaciado de la muestra (Figura 140) y se regresa a su recipiente. El equipo queda listo para repetir la secuencia con otra muestra. NOTA: Si la muestra presenta demasiadas impurezas, se sugiere limpiar entre cada muestra con aire comprimido.



Figura 140. Retirando la muestra.

Cuadro 64. Solución a problemas comunes en el uso del analizador Infratec.

Problema	Solución
El equipo indica que la muestra es insuficiente para las 5 lecturas.	Colocar en la tolva el material que haya sido vaciado al depósito contenedor y oprimir: continuar.
El resultado mostrado en pantalla menciona: Muestra anómala.	Algunas muestras pueden ser anómalas debido al color o tamaño del grano, se sugiere realizar métodos químicos para estas determinaciones.

Referencias

- (1) Rosales, A.; Galicia-Flores, L. A.; Oviedo, E.; Islas-Caballero, C.; Palacios-Rojas, N. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (20), 10781–10786.
- (2) Blakeney, A. B.; Flinn, P. C. Determination of non-starch polysaccharides in cereal grains with near-infrared reflectance spectroscopy. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49 (6), 546–550.
- (3) Baye, T. M.; Pearson, T. C.; Settles, a. M. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 2006, 43 (2), 236–243.
- (4) FOSS. Infratec™ 1241 para Análisis de Granos y Harina. 2007.
- (5) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Wiley, 2004; Vol. 8.

Uso del espectroscopio de infrarrojo cercano Nirsystems 6500 FOSS™ para la determinación de compuestos en harina, grano y tejido vegetal de maíz y tejido vegetal de trigo

Justificación

La caracterización física y química de los granos es fundamental en cualquier programa de mejoramiento. Los análisis químicos son los métodos de referencia para determinar la composición de los granos y semillas, sin embargo, son destructivos y requieren una gran cantidad de material; además, son costosos y necesitan de tiempo de proceso, especialmente cuando se requiere analizar una gran cantidad de muestras (usualmente en la primeras etapas del mejoramiento)^{1,2}. Por tanto, es necesaria la aplicación de nuevas tecnologías que aumenten la eficiencia en la medición de las características de interés y proporcionen información relevante para la toma de decisiones en los programas de mejoramiento en un menor tiempo y costo³.

Fundamento

El NIR se fundamenta en la quimiometría, es decir, la aplicación de las matemáticas a la química analítica. Esta técnica combina la espectroscopia, la estadística y la computación y genera modelos matemáticos que relacionan la composición química (presencia de grupos químicos activos) con cambios de energía en la región correspondiente al rango infrarrojo cercano (longitudes de onda entre 800 y 2500 nm)⁴.

Para lograr esto, la muestra analizada es bombardeada con rayos NIR de diferentes longitudes de onda. Por cada longitud de onda, algunos rayos serán absorbidos por uniones químicas específicas (-OH, -NH, -CH o -SH) y otros serán diseminados y reflejados por otras, este proceso es generalmente conocido como reflectancia NIR. Los rayos esparcidos o reflejados de cada longitud de onda son concentrados dentro de una célula de medición para obtener el espectro de la muestra, el cual es único para cada tipo de material. Un espectro NIR es el resultado de las condiciones físicas del instrumento y la muestra. Parámetros como la geometría del instrumento, el tamaño de la partícula, la forma y distribución, índices de refracción, etc., son muy importantes en la medición de los espectros^{2,4,5}.

Las ventajas de esta técnica como herramienta de análisis cuantitativo y cualitativo son:

- a) No es destructiva ni invasiva.
- b) La preparación de la muestra es sencilla y la medida se realiza con rapidez.
- c) El análisis presenta un bajo costo.
- d) Permite la determinación de varios analitos de la muestra sin tener que seguir un procedimiento analítico diferente para cada uno de ellos. Esta posibilidad implica invertir mucho tiempo en el desarrollo de las calibraciones.
- e) Es posible determinar parámetros no químicos de una muestra, puesto que con frecuencia los espectros NIR están afectados por parámetros físicos.

Sin embargo, como toda técnica, presenta algunos inconvenientes:

- a) El costo del equipo.
- b) La complejidad de la señal NIR obliga a aplicar técnicas quimiométricas que permitan modelar los datos para identificar y cuantificar muestras problema.
- c) La preparación de las calibraciones no es sencilla, ya que es necesario disponer de un número significativo de muestras de las cuales se tenga el dato químico confiable y que presenten variaciones esperadas en muestras problema.
- d) No es posible analizar muestras problema que presenten una variabilidad (física o química) no contemplada en la calibración.
- e) Presenta dificultades en la transferencia de calibraciones entre diferentes instrumentos, ya que pequeñas diferencias entre ellos pueden dar lugar a errores importantes en los resultados, lo que hace necesario preparar un calibrado en cada instrumento.

Alcance

Un técnico con entrenamiento básico puede procesar hasta 350 muestras por día.

El equipo que se encuentra en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz cuenta con calibraciones para determinar los siguientes compuestos:

- a) En harina de maíz:
 - a. Proteína
 - b. Triptófano
 - c. Lisina
 - d. Carotenoides (Carotenos totales, carotenos con actividad de provitamina A)
 - e. Antocianinas totales

- b) En grano de maíz:
 - a. Proteína
 - b. Color
- c) En tejido vegetal de maíz:
 - a. Cenizas
 - b. Fibra (IVTD, NDF, ADF, ADL).
- d) En tejido vegetal de trigo:
 - a. Azúcares solubles

El programa utilizado es ISIScan versión 4.5.0.14017.

Cuadro 65. Material y equipos utilizados con el NIRS.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Espectroscopia infrarrojo	N/A	FOSS, NIRS 6500
Celda de chequeo	Rectangular	FOSS, 52181T
Celdas de lectura	Rectangulares ¼ para tejido vegetal, circulares para harina	FOSS Transport ¼ Cup FOSS Mini Sample Cup
Celdas de lectura	Presión mínima de 60 psig	N/A
Brocha	Pelos de camello	FOSS
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne OV47525
Paños limpiadores sin pelusa	N/A	Kimwipes
Aire comprimido	Mínimo 60 psig	N/A

Diagrama de flujo



Figura 141. Diagrama de flujo.

Descripción general del instrumento

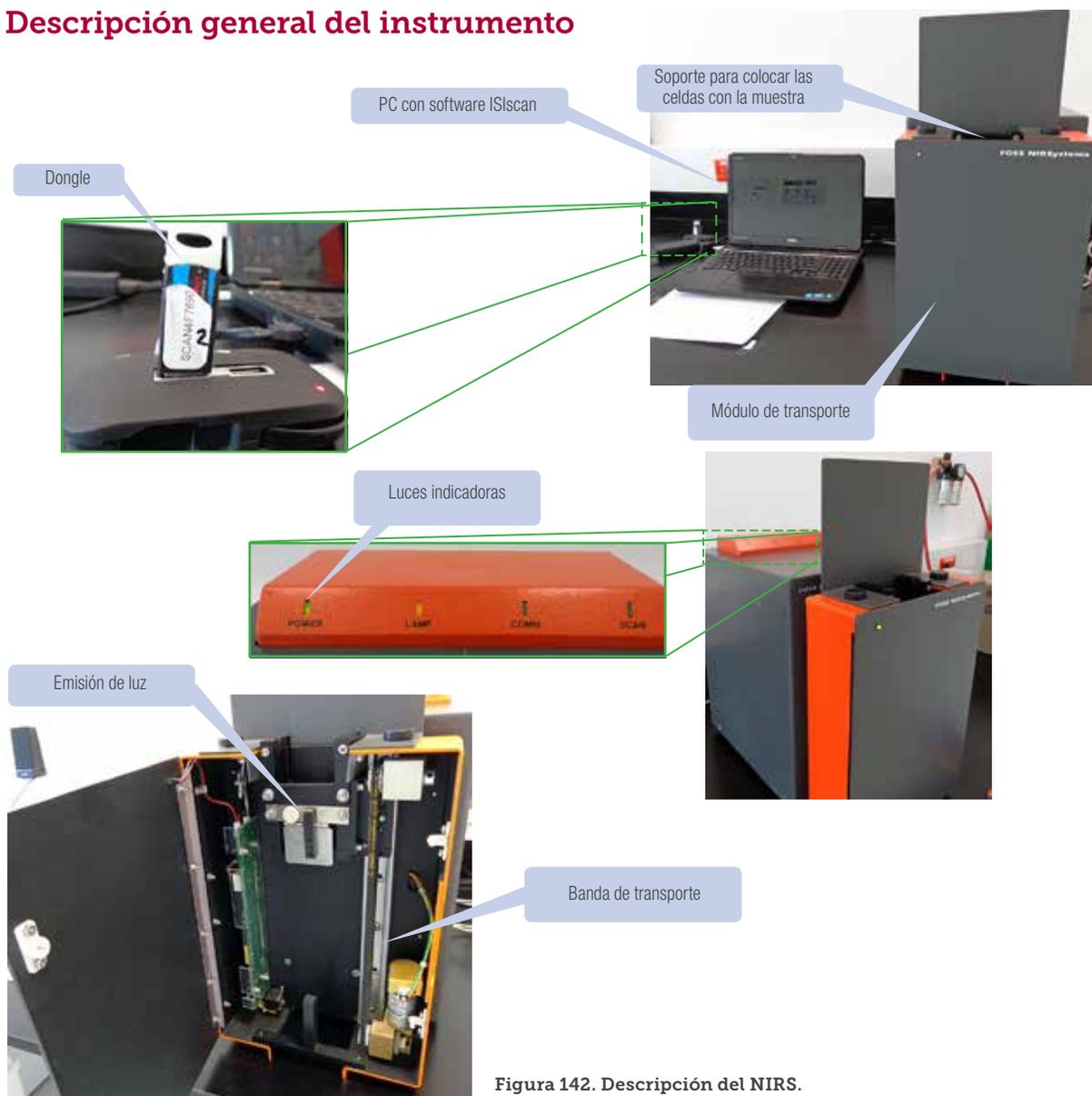


Figura 142. Descripción del NIRS.

Procedimiento

Acondicionamiento de las muestras

1. Las muestras de tejido vegetal deben secarse a 70°C durante al menos una hora; en harina y grano de maíz la muestra se escanea sin secarla. Debe procurarse que la humedad sea similar entre las muestras analizadas y las empleadas al realizar la calibración.
2. La harina de maíz no se desgrasa.
3. La muestra debe ser suficiente para cubrir el cristal de la celda, siendo lo óptimo de 2 a 4 g para tejido vegetal y harina, y de 4 a 6 g para granos de maíz.

Acondicionamiento del equipo

4. Encender el equipo, el botón de encendido se encuentra en la parte posterior derecha del equipo (Figura 143).
5. Al encender el equipo, la luz indicadora *POWER* se activa (Ver diagrama general del instrumento). A continuación, se debe encender la computadora que controla al equipo y buscar el icono del programa *ISIScan* para iniciar el programa:
6. Se despliega la pantalla de inicio, se debe seleccionar el usuario e introducir la contraseña si es necesario (Figura 144).

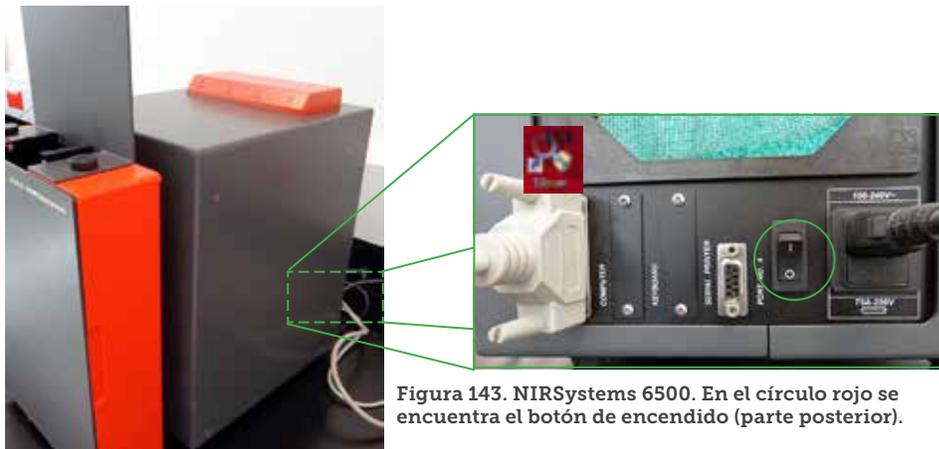


Figura 143. NIRSystems 6500. En el círculo rojo se encuentra el botón de encendido (parte posterior).

7. A continuación, es desplegada la pantalla de análisis (Figura 145). Antes de iniciar con cualquier lectura de muestra, se debe verificar el buen funcionamiento del instrumento mediante una serie de diagnósticos (ver la sección: Diagnósticos).
8. Realizados los *DIAGNOSTICOS*, se debe escanear la *Check Cell* (Figura 146), prueba de rutina que debe realizarse al inicio de cada jornada laboral y cuyo propósito conocer la predicción del equipo

con el paso del tiempo. Los valores de la *Check Cell* sirven para comparar los resultados del escaneo de esta prueba contra los escaneos pasados, si los valores son aceptables, se puede asumir que el instrumento no ha tenido cambios en las predicciones. Para su análisis, se debe dar



Figura 144. Pantalla de inicio de ISIScan.



Figura 146. Check cell. a) Caja contenedora; b) vista posterior; c) vista frontal; y, d) Dentro de su caja.

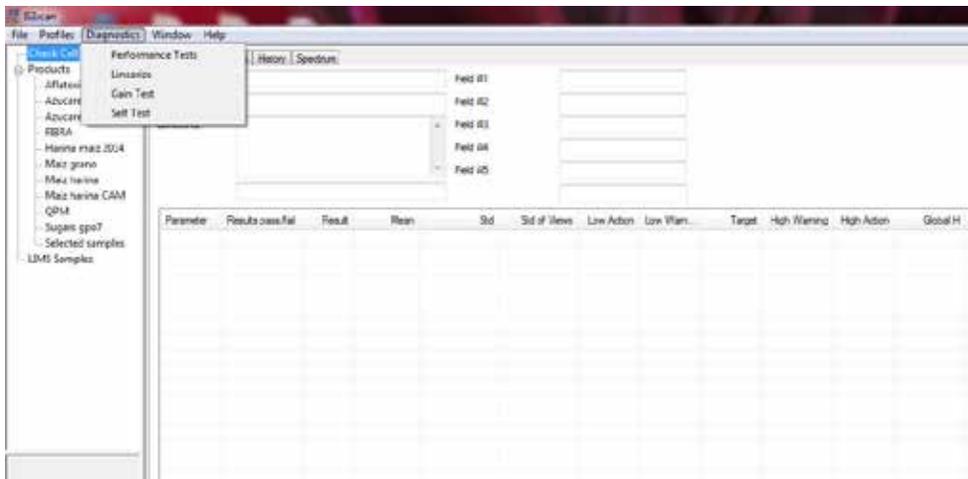


Figura 145. Pantalla de análisis y diagnósticos que deben realizarse al equipo.

doble clic sobre *CHECK CELL* o un clic simple y presionar el botón *SCAN* (Figura 147). Al finalizar el escaneo los valores obtenidos se despliegan en pantalla.

NOTA: Los valores esperados se encuentran impresos en la parte posterior de la celda, sin embargo, los valores que se deben considerar son los que se van generando en el historial.

9. Una vez que se han realizado los diagnósticos y se ha escaneado la *check cell* verificando que los resultados indican el correcto funcionamiento del equipo, se procede a seleccionar el tipo de análisis que se va a realizar. El instrumento ya está configurado con diversos *PRODUCTOS* (Figura 148), cada uno con características establecidas, de los cuales los que se utilizan para análisis de rutina son:
 - a) Maiz harina (Harina de maíz).
 - b) Maiz grano (Grano de maíz).
 - c) FIBRA (Tejido vegetal de maíz).
 - d) Azucares trigo (Tejido vegetal de trigo).

En cada configuración del *PRODUCTO* se establece el modelo de predicción a utilizar y el tipo de celda necesaria (para mayor información, consultar el manual de usuario del programa WinISI™). Las celdas que contendrán la muestra pueden ser de varios tipos, sin embargo, las que se prefieren utilizar en el MNQ Lab son la celda Rectangular ¼ para tejido vegetal y grano y la celda circular para harina. La cantidad de muestra necesaria para ambas celdas es de mínimo 1 gramo, siendo lo óptimo de 2 a 4 g para tejido vegetal y harina, y de 4 a 6 g para granos de maíz. Aunque la cantidad de muestra no influye en el resultado mientras se cubra la superficie de la celda, se recomienda que sea homogénea desde la elaboración de la calibración hasta el análisis de rutina.

Escaneo de las muestras

10. Hacer doble clic en el producto que se va a utilizar y proporcionar la información de la muestra en el cuadro correspondiente (Figura 149).
11. La muestra a analizar se debe colocar en la celda correspondiente, la cual debe encontrarse limpia, se recomienda utilizar aire comprimido y manipularlas usando guantes. Colocada la muestra, se tapa la celda (cada celda tiene una tapa específica) y se limpia nuevamente la superficie de cristal para remover partículas de polvo. La celda se coloca en el compartimiento de transporte en el NIRS y se da clic en la opción *COLLECT* (Figura 149) para comenzar el escaneo. Identificar los contenedores con un número, evitará confusiones al momento de analizar las muestras.
12. El equipo escanea la muestra, almacena la información automáticamente (valor estimado del

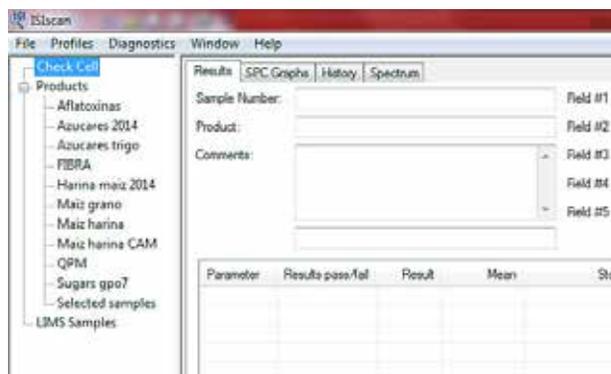


Figura 148. Productos que se encuentran en el equipo.

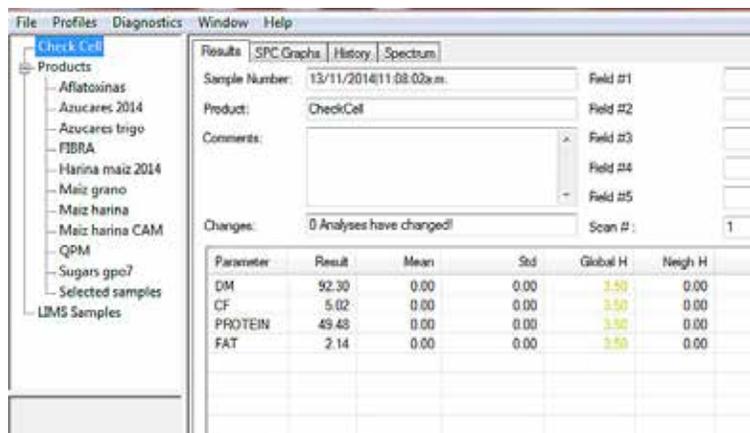


Figura 147. Escaneo de la *Check cell*.



Figura 149. Identificación de la muestra.

compuesto y el espectro obtenido) y despliega el cuadro de la figura 149, aumentando la numeración de manera consecutiva para escanear la siguiente muestra, por lo que basta hacer doble clic para comenzar el análisis o modificar la identificación y clic en *COLLECT*. En algunos productos, es posible observar el valor obtenido en el historial (*HISTORY*) y en todos aparece la fecha y hora de escaneo (Figura 151).

13. La muestra escaneada debe ser regresada a su recipiente contenedor y los resultados se exportan a un archivo de Excel o archivo con extensión .nir (*espectro*) para ser analizados posteriormente (Ver sección Obtención de Resultados).

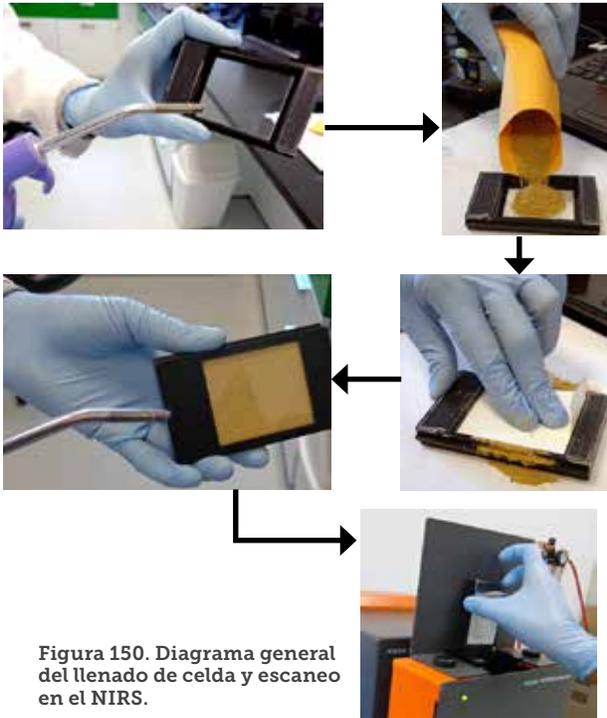


Figura 150. Diagrama general del llenado de celda y escaneo en el NIRS.

14. El apagado del equipo se hace cerrando primero el programa *IS/scan*, esto desplegará un cuadro de diálogo que pregunta si se desea apagar la lámpara, se debe indicar que sí haciendo clic en *YES*. Posteriormente, se debe presionar el botón de apagado del instrumento (Figura 142).

Diagnósticos

Los equipos NIR cuentan con varias pruebas que pueden determinar las condiciones en las que se encuentra el equipo, en el NIRS 6500 FOSS™ se realizan las siguientes:

- a) Diagnósticos avanzados. Son realizados para configurar después de algún cambio de módulo, cambio de lámpara, reparación del instrumento y al iniciar la jornada laboral:
 - a. Wavelength linearization.
 - b. Gain test.
 - c. Self test.
- b) Diagnósticos de rutina. Deben ser realizados de manera programada y son el primer indicador para detectar algún malfuncionamiento del equipo:
 - a. Performance test.
 - b. Check cell.

A continuación, se describen brevemente los diagnósticos en el orden en el que deben ser realizados y la manera de efectuarlos en el equipo.

En la pantalla del programa *IS/scan*, se encuentra en la barra de menú la opción *DIAGNOSTICS*, al hacer clic, se despliega la lista de diagnósticos a realizar (Figura 152).

Self test: Realiza pruebas electrónicas de la tarjeta madre y circuitos eléctricos del instrumento, es una prueba general de los componentes electrónicos del

#	S	L	CS	GP	D...	Sample No	Date	...	Prod Code	Prod Name	Azucares trigo
15			H		0...	9927	05/11/2014 12:42:01	...	2014	Azucares 2014	20.6
14			H		0...	9928	05/11/2014 12:42:59	...	2014	Azucares 2014	15.0
13			H		0...	9929	05/11/2014 12:43:58	...	2014	Azucares 2014	11.5
12			H		0...	9930	05/11/2014 12:44:57	...	2014	Azucares 2014	14.3
11			H		0...	9931	05/11/2014 02:08:28	...	2014	Azucares 2014	20.0
10			H		0...	9932	05/11/2014 02:09:27	...	2014	Azucares 2014	17.4
9			H		0...	9933	05/11/2014 02:10:40	...	2014	Azucares 2014	11.8
8			H		0...	9934	05/11/2014 02:11:39	...	2014	Azucares 2014	10.0
7			H		0...	9935	05/11/2014 02:13:35	...	2014	Azucares 2014	15.6
6			H		0...	9936	05/11/2014 02:14:35	...	2014	Azucares 2014	14.7
5			H		0...	9937	05/11/2014 02:15:41	...	2014	Azucares 2014	14.2
4			H		0...	9938	05/11/2014 02:16:41	...	2014	Azucares 2014	14.3
3			H		0...	9939	05/11/2014 02:17:43	...	2014	Azucares 2014	12.4
2			H		0...	9940	05/11/2014 02:18:58	...	2014	Azucares 2014	18.6
1			H		0...	9941	05/11/2014 02:20:07	...	2014	Azucares 2014	16.1

Figura 151. Historial de las muestras analizadas.

instrumento. Para llevarlos a cabo, se debe seleccionar la opción *SELF TEST* en el menú *DIAGNOSTICS*. Los resultados aparecerán desplegados en pantalla (Figura 153).

Cada elemento analizado debe dar por resultado *PASS*, lo que significa que pasó la prueba. El resultado *N/A* indica que no aplica para el instrumento. Cuando aparece la palabra *FAIL*, significa que existe algún problema y se debe reiniciar el sistema, si el problema persiste, contactar al servicio técnico de FOSS. Usualmente *INSTRUMENT FAN* da como resultado *FAIL* cuando el instrumento lleva menos de una hora encendido y la lámpara aun no genera el calor suficiente para activar el ventilador, por lo que se recomienda realizar este diagnóstico una hora después de encender la lámpara del equipo.

Gain test: Mide la respuesta del detector a la fuente de luz. Con este diagnóstico se puede detectar fácilmente si la lámpara o el regulador de la misma presentan algún daño. También muestra la respuesta del detector de voltaje. El diagnóstico debe realizarse para la región visible (Figura 154a) y para la región NIR (Figura 154b).

Para realizar el diagnóstico, se debe seleccionar la opción *GAIN TEST* del menú *DIAGNOSTICS*. En la

pantalla desplegada se debe seleccionar la región a analizar (visible –VIS- o infrarroja –NIR-). Se inicia haciendo clic en la opción *RUN*. Los resultados se muestran en pantalla (Figuras 154a y 154b), el detector de voltaje despliega una barra verde cuando se encuentra en el intervalo aceptable (2.3 – 5.7 volts), cuando la barra aparece en rojo, indica una falla de la lámpara y debe ser sustituida.

El valor de ganancia *GAIN* del detector visible (VIS) debe dar un valor de 80 o superior, mientras que el detector infrarrojo (NIR) debe estar entre 1 y 10.

Linearize: Es un diagnóstico que utiliza estándares internos espectroscópicos de longitud de onda para alinear el monocromador (los estándares utilizados son el poliestireno –región NIR- y el didimio –región visible-). Una alineación apropiada genera predicciones precisas y transferencias de calibraciones consistentes.

El diagnóstico se realiza haciendo clic en *LINEARIZE* en el menú *DIAGNOSTICS* (Figura 152). Posteriormente, se da clic en la opción *RUN*, se realiza seleccionando la región VIS y después la región NIRS. Los resultados obtenidos (Figura 155) dan información sobre la intensidad de determinados picos de los estándares

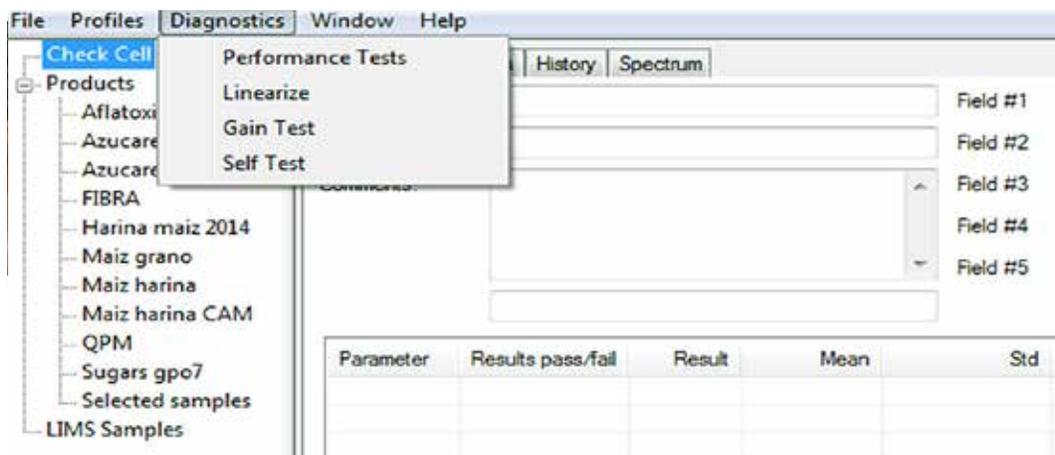


Figura 152. Menú *DIAGNOSTICS*.

Results

Test Description	Pass/Fail	Messages
Power Supply	PASS	Model 2 lamp configuration installed
Lamp Regulator	PASS	
Lamp Filament Short	PASS	
15 Volt Power Supply	PASS	
Instrument Fan	PASS	
Grating Circuitry	N/A	Version 2 motherboard: test does not apply
Reflectance Amp-20...	PASS	
Transmission Amp-20...	N/A	Amp is missing or failing: -0.004 V
Reflectance Amp	PASS	VIS PASS, NIR PASS
Transmission Amp	N/A	Amp is missing or failing: -0.004 V

Figura 153. Resultados del *SELF TEST*.

internos (los valores obtenidos y los esperados) y los valores de constantes que el equipo utiliza para comparar las mediciones previas con las actuales. El valor del *RATIO* se sugiere que sea 1.000 ± 0.001 .

Performance test: Este diagnóstico es un análisis muy robusto y completo sobre el rendimiento del instrumento. Combina pruebas de exactitud de longitud de onda, precisión y exactitud del ancho de banda y análisis de ruido. Todas estas pruebas se realizan y reportan de manera automática al correr el diagnóstico, para ello, se debe seleccionar la opción *LINEARIZE* del menú *DIAGNOSTICS*.

El número de ciclos que se recomienda es de 10. Se da clic en *RUN* (Figura 156a) y el análisis comienza (Figura 156b). En aproximadamente 15 minutos el diagnóstico concluye y despliega los resultados obtenidos (Figura 156c). Se evalúan 4 aspectos: Longitud de onda, ancho de banda y ruido en la región visible e infrarroja. Si la palabra *PASS* aparece enseguida del nombre de cada análisis, el instrumento está trabajando correctamente, en caso contrario se debe llamar al servicio técnico de FOSS.

Se debe poner especial atención en las pruebas de ruido (Figura 156d). Es importante mencionar, que se debe colocar una celda o portaceldas en el compartimiento de transporte del instrumento durante la realización de este diagnóstico, ya que la luz del medio ambiente puede interpretarse como “ruido” cuando se analiza la región visible y entonces aparece la palabra *FAIL*.

Obtención de resultados

Existen dos formas de obtener los resultados, una es a partir de un archivo de Excel, texto o pdf, y la otra, obteniendo un archivo .nir, el cual contiene el espectro obtenido de la muestra y puede ser procesado en el programa WinISI™ para obtener un valor utilizando algún modelo de predicción o para ser empleado en la elaboración de nuevas ecuaciones.

En ambos casos, lo primero que se debe hacer, es seleccionar con el mouse o el teclado las muestras de



Figura 154. Resultados del Gain test; 154a, para región visible y; 154b, para región NIR.

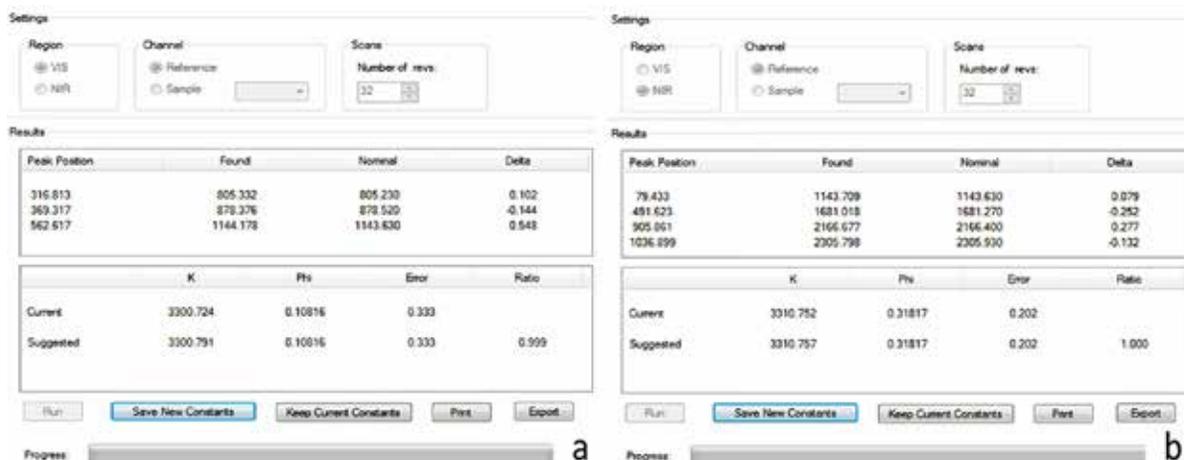


Figura 155. Resultados de Linearize.

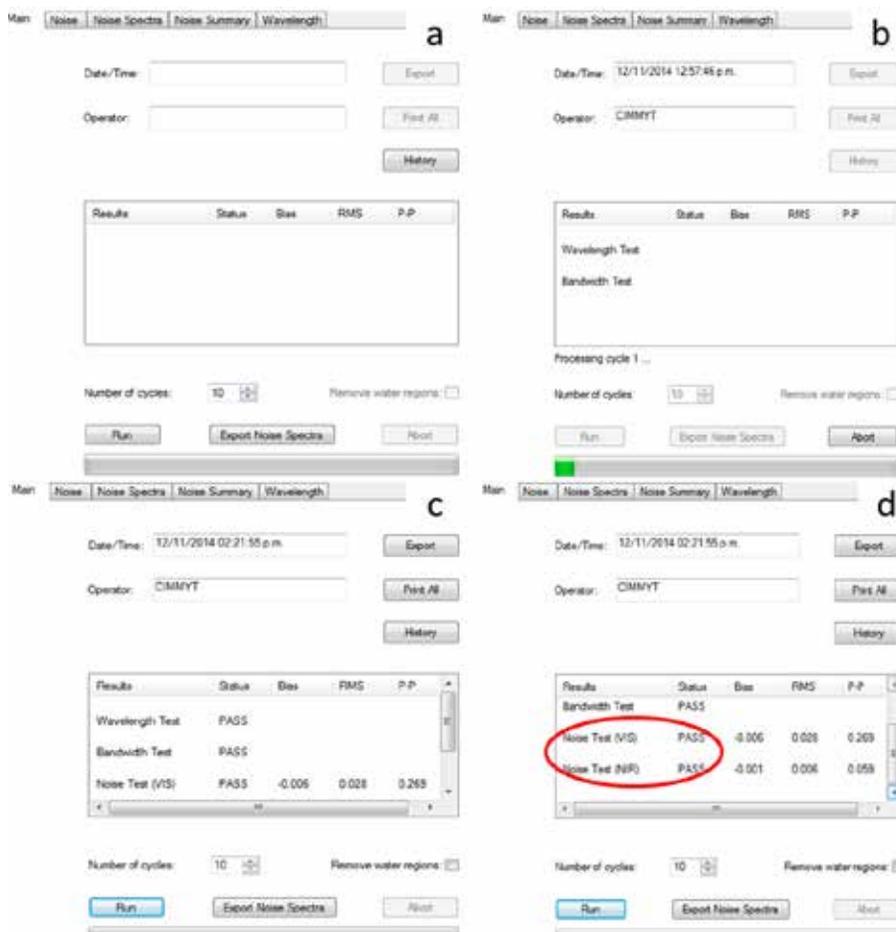


Figura 156. Diagnóstico de rendimiento.

interés (Figura 157). Posteriormente, se da clic derecho sobre las muestras seleccionadas para desplegar un menú secundario (Figura 158) y se debe seleccionar la opción *SELECT SAMPLES*.

Después, en el menú que aparece desplegado a la izquierda del programa, se da clic derecho sobre la opción *SELECTED SAMPLES* y se posiciona el puntero del mouse en la opción *EXPORT* (Figura 159).

Para exportar resultados en archivo Excel, de texto o pdf: seleccionar la opción *EXPORT DATA* (Figura 159) y seleccionar el formato deseado en el menú desplegado (Figura 160). El archivo generado se abre automáticamente y podrá ser guardado.

Para exportar resultados en archivo .nir: seleccionar la opción *EXPORT NIR/CAL* (Figura 159). Se despliega un menú (Figura 161), en donde se nombra el archivo y ubicación de almacenamiento, haciendo clic en el recuadro que tiene tres puntos (círculo rojo de la figura 161).

El tratamiento de los espectros y obtención de calibraciones se aborda en el manual de usuario del programa WiniSI™.

Se recomienda analizar por duplicado el 10 % de las muestras seleccionadas de manera aleatoria y las muestras con los valores más altos y bajos del grupo.

Para modificar las calibraciones o realizar nuevas, consultar al personal del laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz.

Cuadro comparativo en la determinación de triptófano para 36 muestras*:

Cuadro 66. Comparativo de tiempo y costo.

Proceso	Costo unitario (\$ USD)		Tiempo	
	Ac. glioxilico	NIRS	Ac. glioxilico	NIRS
Molienda	2.2	2.2	40 min	40 min
Desgrasado	2.2	0	6 h	---
Pesado	0	0	40 min	---
Hidrólisis	0	0	16 h	---
Reacción colorimétrica	2.0	0	5 h	---
Escaneo	0	0.6	---	40 min
Lectura en microplaca	1.7	0	2 min	---
Total	8.1	2.8	28 h 22 min	1 h 20 min

* Precios del 2017 en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz, CIMMYT. Se estimó el tiempo para 36 muestras dado que son las que pueden someterse a hidrólisis y lectura en una microplaca.

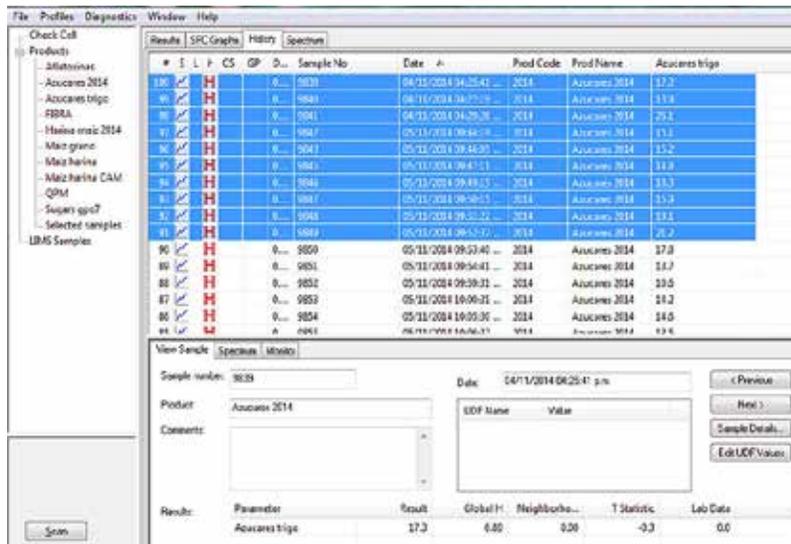


Figura 157. Selección de muestras.

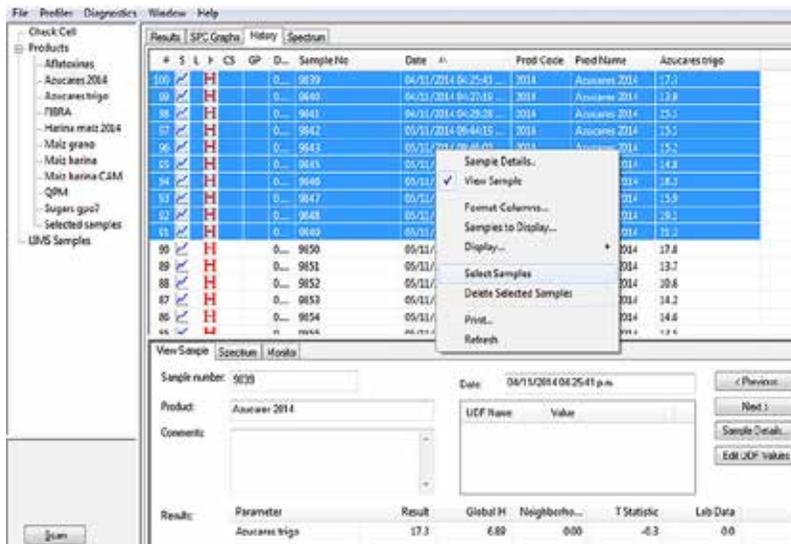


Figura 158. Menú secundario.

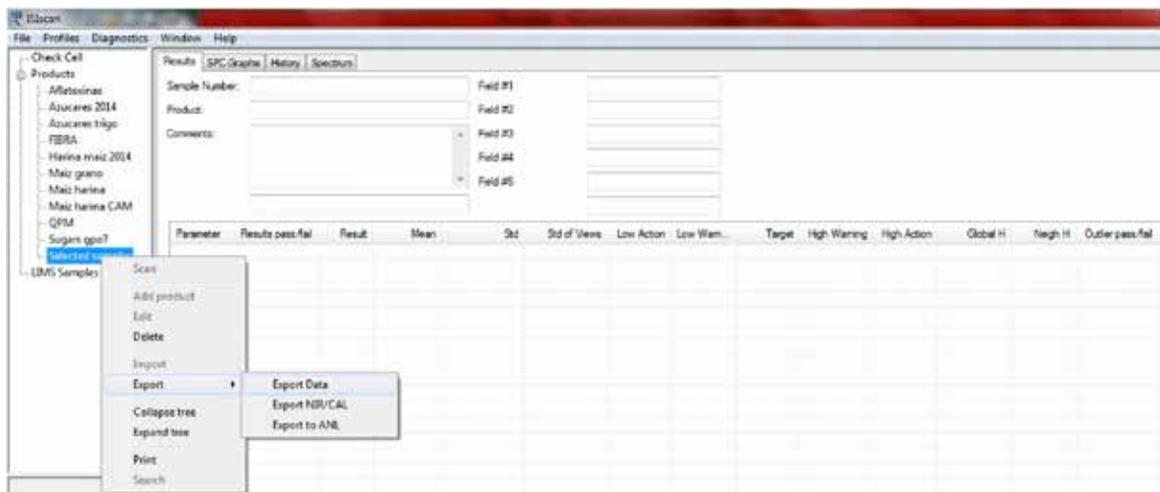


Figura 159. Exportando datos.

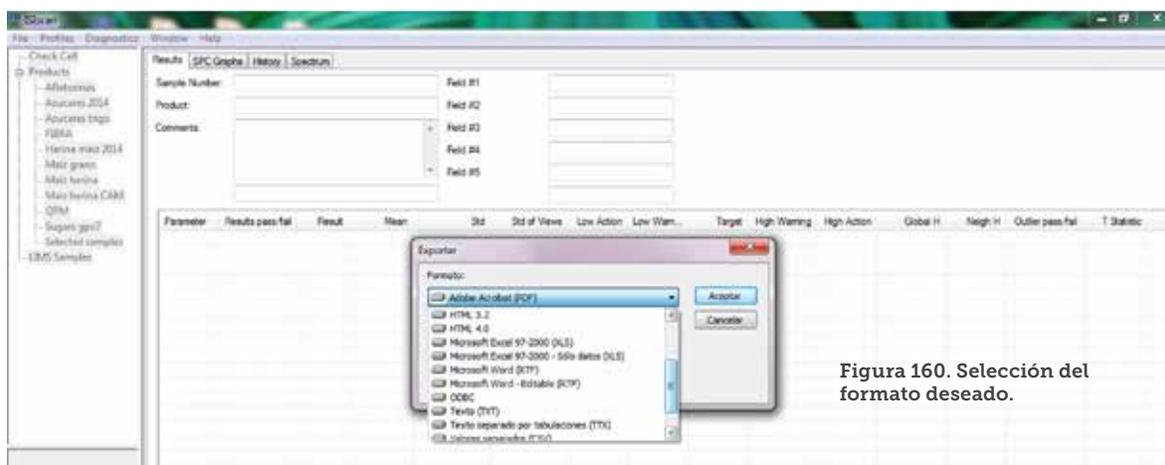


Figura 160. Selección del formato deseado.

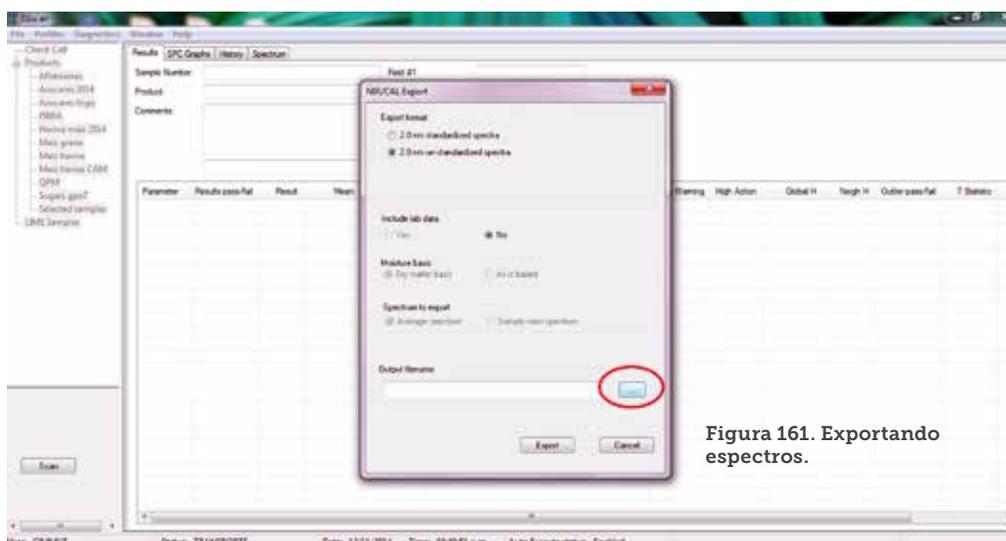


Figura 161. Exportando espectros.

Cuadro 67. Solución a problemas comunes durante el uso del NIRS.

Problema	Solución
El programa ISIScan se cierra sin razón.	En algunas ocasiones el programa se cierra o manda algún error indicando que debe reiniciarse, esto debido a que se satura la memoria RAM de la computadora. Lo ideal es incrementar la RAM, sin embargo, basta con reiniciar el programa para continuar trabajando.
La computadora no detecta al equipo.	Se debe probar conectando a otros puertos USB disponibles y verificar que el dongle se encuentra colocado adecuadamente.

Referencias

- (1) Baye, T. M.; Pearson, T. C.; Settles, a. M. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 2006, 43 (2), 236–243.
- (2) Rosales, A.; Galicia-Flores, L. A.; Oviedo, E.; Islas-Caballero, C.; Palacios-Rojas, N. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (20), 10781–10786.
- (3) Montes, J. M.; Utz, H. F.; Schipprack, W.; Kusterer, B.; Muminovic, J.; Paul, C.; Melchinger, a. E. Near-infrared spectroscopy on combine harvesters to measure maize grain dry matter content and quality parameters. *Plant Breed.* 2006, 125 (6), 591–595.
- (4) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Wiley, 2004; Vol. 8.
- (5) Cabrera-Bosquet, L.; Sánchez, C.; Rosales, A.; Palacios-Rojas, N.; Araus, J. L. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) assessment of $\delta(18)O$ and nitrogen and ash contents for improved yield potential and drought adaptation in maize. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (2), 467–474.



Determinación de compuestos de alta energía

Miguel Bojorges, Luis Galicia, Daniel Díaz, Aldo Rosales, Aide Molina

Determinación de extracto etéreo en equipo SOXTEC™

Justificación

Los lípidos son consideradas macronutrientes necesarios en el suministro de energía, además, proporcionan ácidos grasos esenciales (vitaminas, hormonas, pigmentos, entre otros²) y facilitan la absorción de vitaminas liposolubles¹. También intervienen en varias funciones del organismo, cumpliendo alguna actividad biológica o como parte estructural de membranas celulares y de sistemas de transporte de diversos nutrimentos. Por lo anterior, es importante conocer el porcentaje de grasa que contienen los alimentos para mantener una dieta saludable.

Fundamento

La extracción con solventes es utilizada para aislar materia soluble de diferentes materiales como cereales, comida, forrajes, suelo, entre otros. La extracción en Soxtec (Figura 162) está basada en el principio Soxhlet, la cual ha sido probada y automatizada obteniendo buenos resultados tanto en reproducibilidad y eficiencia. La muestra es secada y pesada para posteriormente hacer la extracción del extracto etéreo con un solvente. La muestra se somete a ebullición con el solvente, después el equipo realiza un lavado y elimina el exceso de solvente. Finalmente se recupera el extracto³.

Alcance

Se pueden analizar entre 24 y 30 muestras por día, el procedimiento aplica a cualquier tipo de maíz y otros materiales (dependiendo su composición deben de modificarse las variables de programación del equipo).



Figura 162. Descripción del equipo de extracción etéreo Soxtec.

Cuadro 68. Material y equipos utilizados en la determinación de extracto etéreo.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Equipo Soxtec	6 plazas	FOSS, Soxtec 2050
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo AG135
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne OV47525
Vasos de aluminio	A peso constante	FOSS, Cat. 10007510
Desecador	N/A	N/A
Silíce para sellar desecador	N/A	N/A
Dedales de celulosa	N/A	FOSS, Cat. 15220030
Algodón	Desgrasado	N/A

Cuadro 69. Reactivos utilizados en la determinación de extracto etéreo.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Éter de petróleo	Éter de petróleo (Sigma Aldrich, Cat. 184519, CAS 8032-32-4).	Usar directamente.	Utilizar mascarilla para solventes y guantes.

Diagrama de flujo

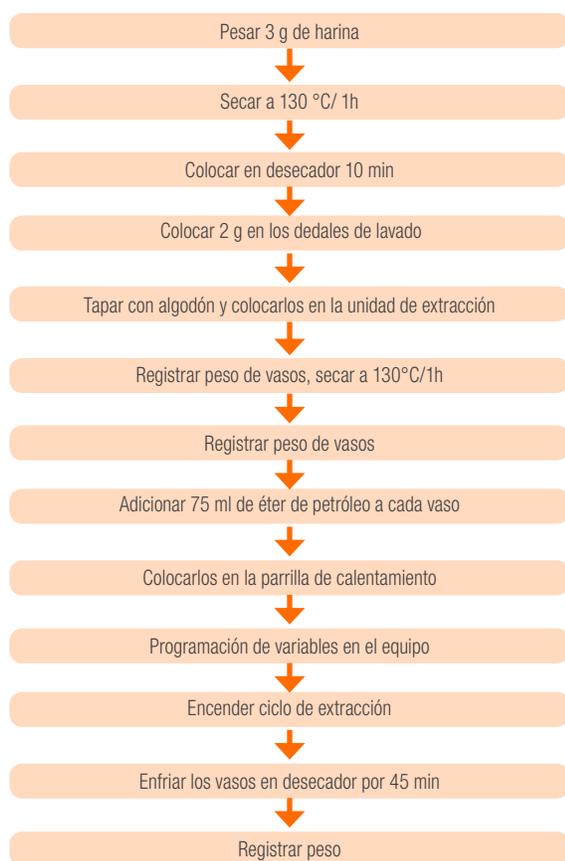


Figura 163. Diagrama de flujo para determinar extracto etéreo.

Procedimiento

1. Pesar 3 g de harina. Secar a 130°C por una hora. Incluir una muestra testigo por cada ciclo (cada ciclo tiene capacidad para 5 muestras y una muestra testigo). Enfriar en desecador durante 10 minutos.

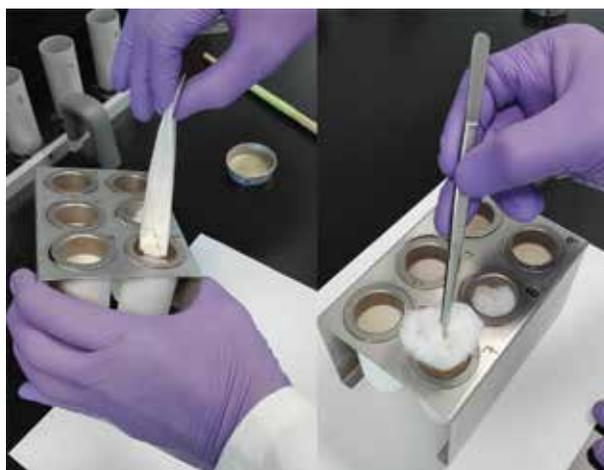


Figura 164. Preparación de la muestra.

2. Pesar 2 g de muestra seca, agregar a los dedales de lavado y cubrir con una capa de algodón cada muestra (Figura 164). Colocarlos en la unidad de extracción del Soxtec (Figura 165).



Figura 165. Colocación de la muestra en el equipo.

3. Pesar los vasos de aluminio y secar a 130°C por una hora, transcurrido el tiempo, pesar nuevamente y registrar el peso. A cada vaso adicionarle 75 mL de éter de petróleo y colocarlos en la parrilla de calentamiento del Soxtec (Figura 166).
4. Previamente programar el equipo con las siguientes condiciones (Cuadro 70, Figura 167):



Figura 166. Colocación de vasos de aluminio para la extracción.

Cuadro 70. Programación de variables en el equipo.

Variable	Temperatura y tiempo
Tiempo y temperatura de ebullición	25 min / 135 °C
Tiempo de enjuague	20 min
Tiempo de recuperación	10 min
Tiempo de secado	5 min



Figura 167. Programación del panel de control.

El equipo tiene una llave de seguridad para mantener las variables fijas, si se necesita modificar algún parámetro, se debe quitar el seguro y configurar en el panel de control (Figura 168).



Figura 168. Panel de control sin seguro para modificar variables.

- Encender el ciclo de extracción. Mientras está en proceso, verificar que el sistema de enfriamiento funciona correctamente.
- Terminado el ciclo, enfriar los vasos de aluminio a temperatura ambiente por 45 min (Figura 169).



Figura 169. Pesado del extracto.

- Registrar peso y realizar el cálculo de porcentaje de extracto etéreo (EE).

Cálculo de porcentaje de extracto etéreo

$$\% \text{ EE} = \frac{(\text{peso vaso} + \text{grasa}) - \text{peso vaso}}{\text{peso muestra}} * 100$$

Cuadro 71. Solución a problemas comunes en la determinación de extracto etéreo.

Problema	Solución
El equipo se detuvo y emite sonido de alarma.	Verificar que el agua esté recirculando.
El porcentaje de extracto etéreo del testigo es bajo.	Verificar que las variables programadas sean correctas. Si la extracción no funciona con las variables previamente programadas, aumentar el tiempo de ebullición o enjuague.

Referencias

- FAO. *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos*; 2008.
- Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- Anderson, S. Soxtec: Its principles and applications. *Oil Extr. Anal. issue Comp. Stud.* 2004, No. 1, 10–24.

Extracción de grasa total por hidrólisis ácida en equipo SOXCAP™

Justificación

Los lípidos son considerados macronutrientes necesarios en el suministro de energía, además, proporcionan ácidos grasos esenciales (vitaminas, hormonas, pigmentos, entre otros²) y facilitan la absorción de vitaminas liposolubles¹. También intervienen en varias funciones del organismo, cumpliendo alguna actividad biológica o como parte estructural de membranas celulares y de sistemas de transporte de diversos nutrimentos. Por lo anterior, es importante conocer el porcentaje de grasa que contienen los alimentos para mantener una dieta saludable.

Fundamento

La grasa cruda es un conjunto de compuestos insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos (éter de petróleo o etanol). Los constituyentes principales de la grasa cruda son triglicéridos y ácidos grasos libres, sin embargo, en algunos tipos de muestras están en forma de lipoproteínas, liposacáridos o sales metálicas y los disolventes no son capaces de romper estas uniones, por lo que se utiliza una hidrólisis con ácido clorhídrico para transformar estos lípidos en formas extraíbles³.
 NOTA: Para el desarrollo de este procedimiento, se retoma la técnica elaborada por el equipo de FOSS basada en la norma mexicana NMX-F-427-1982: *Determinación de grasa, utilizando el equipo SoxCap™*, la cual permite analizar 6 muestras en un mismo medio sin riesgo de contaminación (Figura 170).

Alcance

Es posible analizar entre 24 y 30 muestras por día y es compatible con cualquier tipo de maíz y otros materiales (dependiendo su composición, deben de modificarse las variables de programación en el equipo).

Cuadro 72. Material y equipos utilizados en la determinación de grasa total.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Equipo Soxtec	6 plazas.	FOSS, Soxtec 2050
Equipo Soxcap	N/A	FOSS, Soxcap 2047
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG135
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne OV47525
Vasos de aluminio	A peso constante	FOSS, Cat. 10007510
Desecador	N/A	N/A
Sílice para sellar desecador	N/A	N/A
Dedales de celulosa	N/A	FOSS, Cat. 15220030
Algodón	Desgrasado	N/A
Viales para hidrólisis	N/A	FOSS, Cat. 10012378
Filtros para hidrólisis	N/A	FOSS, Cat. 10012381

Cuadro 73. Reactivos utilizados en la determinación de grasa total.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Ácido clorhídrico 4N	Ácido clorhídrico (JT Baker, Cat.9535-05, CAS 7647-0-0).	Mezclar 333.12 ml de HCl con agua destilada hasta completar un volumen de 1L.	Preparar la solución en campana de extracción.
Éter de petróleo	Éter de petróleo (Sigma Aldrich, Cat. 184519, CAS 8032-32-4).	Usar directamente.	Utilizar mascarilla para solventes.

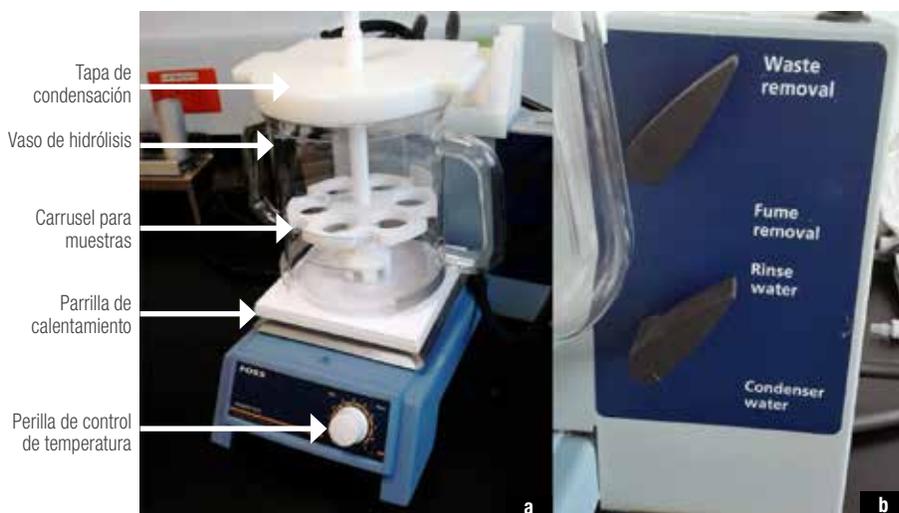


Figura 170. Soxcap. a) Partes del equipo, b) Panel de control.

Diagrama de flujo



Figura 171. Diagrama de flujo para la extracción de grasa total en SoxCap.

Procedimiento

Hidrólisis ácida

1. Pesar 3 g de harina en charolas de aluminio y secar a 130°C por una hora.
2. Colocar los filtros en los viales (Figura 172) y adicionar 2 g de harina seca. Colocar los viales en el carrusel para hidrólisis. Incluir una muestra testigo por cada ciclo.

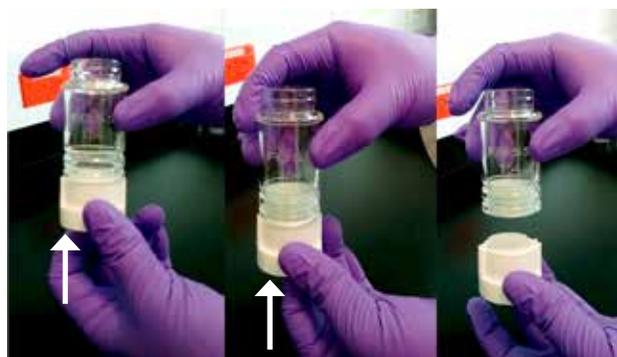


Figura 172. Colocación del filtro en el vial.

3. Dentro de la campana de extracción, adicionar 800 mL de HCl 4N al vaso de hidrólisis y sumergir el carrusel con las muestras.
4. Encender la parrilla de calentamiento. Girar la perilla hasta el número 8 (Figura 173) y dejar 15 min (tiempo en el que el ácido llega a ebullición).



Figura 173. Ajuste de temperatura.

5. Una vez que el ácido está en ebullición, girar la perilla hasta el número 6 y mantener a ebullición por 60 min. Conforme avanza el tiempo, el ácido y la muestra adquieren una tonalidad color café oscuro a negro.
6. Apagar la parrilla y sin retirar el carrusel con los viales, extraer la solución de hidrólisis del vaso con ayuda de una manguera y una perilla de extracción.
7. En el panel de control girar la perilla superior del equipo en modo *fume removal* y la perilla inferior en *rinse water* (enjuague). Conectar la manguera de *rinse water* a una bomba de circulación de agua (Figura 174) y agregar 1 L de agua destilada al vaso (hasta la marca) y con ayuda de una manguera y una perilla de extracción retirarla, esto sirve como enjuague para remover el ácido de la muestra.
NOTA: Evitar que el agua caiga directamente sobre la muestra. Repetir el proceso de enjuague de 5 a 6 veces y con tiras indicadoras verificar que el pH sea 7.

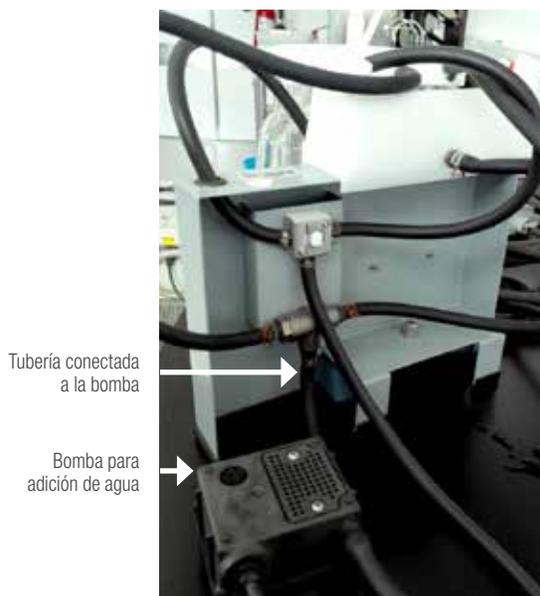


Figura 174. Conexión de bomba de agua.

- Retirar los viales del vaso de hidrólisis y colocarlos en el carrusel de secado. Con ayuda de una espátula poner el filtro en posición vertical, colocar algodón en la parte superior e inferior del filtro (Figura 175). Secar en estufa de secado por 16 h (toda la noche) a 60°C.



Figura 175. Colocación del filtro con muestra.

Extracción de grasa con solvente

- Continuar con el protocolo *Determinación de extracto etéreo en equipo Soxtec*.

Cuadro 74. Solución a problemas comunes en la determinación de grasa total.

Problema	Solución
El pH después de 5 lavados sigue siendo bajo.	Continuar con los lavados hasta tener un pH de 7.
El equipo se detiene y emite un sonido de alarma.	Verificar que el agua esté recirculando.
El porcentaje de extracto etéreo del testigo es bajo.	Verificar que las variables programadas sean correctas. Si la extracción no funciona con las variables previamente programadas, aumentar el tiempo de ebullición o enjuague.

Referencias

- FAO. *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos*; 2008.
- Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- Anderson, S. Soxtec: Its principles and applications. *Oil Extr. Anal. issue Comp. Stud.* 2004, No. 1, 10–24.

Determinación de almidón total en harina de maíz utilizando un ensayo modificado Megazyme™

Justificación

Los carbohidratos son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza y los más consumidos por los seres humanos; se originan como producto de la fotosíntesis y son los principales compuestos químicos que almacenan la energía del sol. El almidón está compuesto de largas cadenas lineales no ramificadas de α -1,4-D-glucosa (amilosa) y largas cadenas ramificadas de 1,4- α -D y 1,6- α -D-glucosa (amilopectina)¹. Se puede encontrar como reserva energética en cereales, tubérculos y algunas frutas y su importancia radica en el aporte calórico (4 kcal g⁻¹) en los sistemas biológicos².

Fundamento

La completa solubilización del almidón se hace por medio de una reacción térmica-enzimática con α -amilasa, seguida de una hidrólisis con amiloglucosidasa³. Una vez obtenidas las glucosas (unidad mínima del almidón), la reacción colorimétrica se realiza utilizando el reactivo antrona diluido en una solución de ácido sulfúrico; el color que se observa al término de la reacción es entre azul y verde^{4,5}.

Alcance

Este método permite analizar 52 muestras por día y es aplicable a todo tipo de maíz y sus derivados.

Cuadro 75. Material y equipos utilizados en la determinación de almidón total.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Baño María	100 °C	Scorpion Scientific
Baño María	100 °C	Thelco Precision Scientific Co. 13-Y-11
Centrífuga	Para tubos cónicos de 50 mL	Allegra X-12
Agitador de microplacas	Para 4 placas	Cole-Parmer, 2020T4
Incubadora de microplacas	N/A	ThermoStat Plus
Micropipetas	20-200 μ L, 100-1000 μ L y 0.5-5 mL	Eppendorf
Pipeta multicanal	20-300 μ L	Eppendorf Research Pro
Lector de microplacas	N/A	Quant BioTek
Microplacas	Con 96 pozos	NUNC
Tubos de vidrio	10 mL	Pyrex
Tubos de plástico Falcon	50 mL	Corning
Cinta adhesiva de aluminio	5 cm de ancho	3M

Cuadro 76. Reactivos utilizados en la determinación de almidón total.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Buffer MOPS 50 mM (pH 7.0)	MOPS minimum 99.5 % Tritation (Sigma Aldrich, Cat. M 1254-20G, CAS 1132-61-2). Cloruro de calcio dihidratado 99 % (Sigma Aldrich, Cat. C3881, CAS 10035-04-8)	Disolver 10.46 mg de MOPS en 900 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.0 con aproximadamente 28 mL de hidróxido de sodio 1 M. Agregar 0.74 g de cloruro de calcio y disolver. Ajustar el volumen a 1 L.	Almacenar a 4 °C.
Solución amortiguadora de acetato de sodio 200 mM, pH 4.5	Ácido acético glacial (Sigma Aldrich, Cat. A-6283-250ML, CAS 64-19-7)	Diluir 11.4 mL de ácido acético glacial en 900 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 4.5 con aproximadamente 50 mL de hidróxido de sodio 2 M.	Almacenar a 4 °C.
α -amilasa (30 mL, 100 U mL ⁻¹)	α -amilasa (Sigma Aldrich, Cat. 10070, CAS 9000-90-2)	Disolver 61 mg de α -amilasa en 30 mL del buffer MOPS.	Preparar diariamente. Mezclar en vórtex antes de su uso.
Amiloglucosidasa (2 mL, 200 U mL ⁻¹)	Amiloglucosidasa (Sigma Aldrich, Cat. 10115, CAS 9001-37-0)	Disolver 5 mg de amiloglucosidasa en 2 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio.	Preparar diariamente.
Ácido sulfúrico concentrado	Ácido sulfúrico (Merck, Cat. 1.00732.2500, CAS. 7664-93-9).	Usar directamente.	Almacenar en oscuridad.
Reactivo de antrona	Antrona (Merck, Cat. 1.01468.0010, CAS. 90-44-8)	Una hora antes de su uso, pesar 100 mg de antrona y disolver en 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta cantidad es suficiente para 5 placas.	Preparar diariamente en matraz aforado. Proteger de la luz.
Solución concentrada de glucosa (0.5 mg mL ⁻¹)	Glucosa (Sigma Aldrich, Cat. G8270, CAS 492-62-6)	Antes de preparar la solución, secar la glucosa por 1 hora a 105 °C. Disolver 50 mg de glucosa en 100 mL de agua desionizada.	Preparar diariamente en matraz aforado. Mezclar perfectamente antes de su uso.
Etanol al 80 %	Etanol (Merck, Cat. 1.100983.2500, CAS. 64-17-5)	Mezclar 80 mL de etanol con 20 mL de agua desionizada.	

Diagrama de flujo

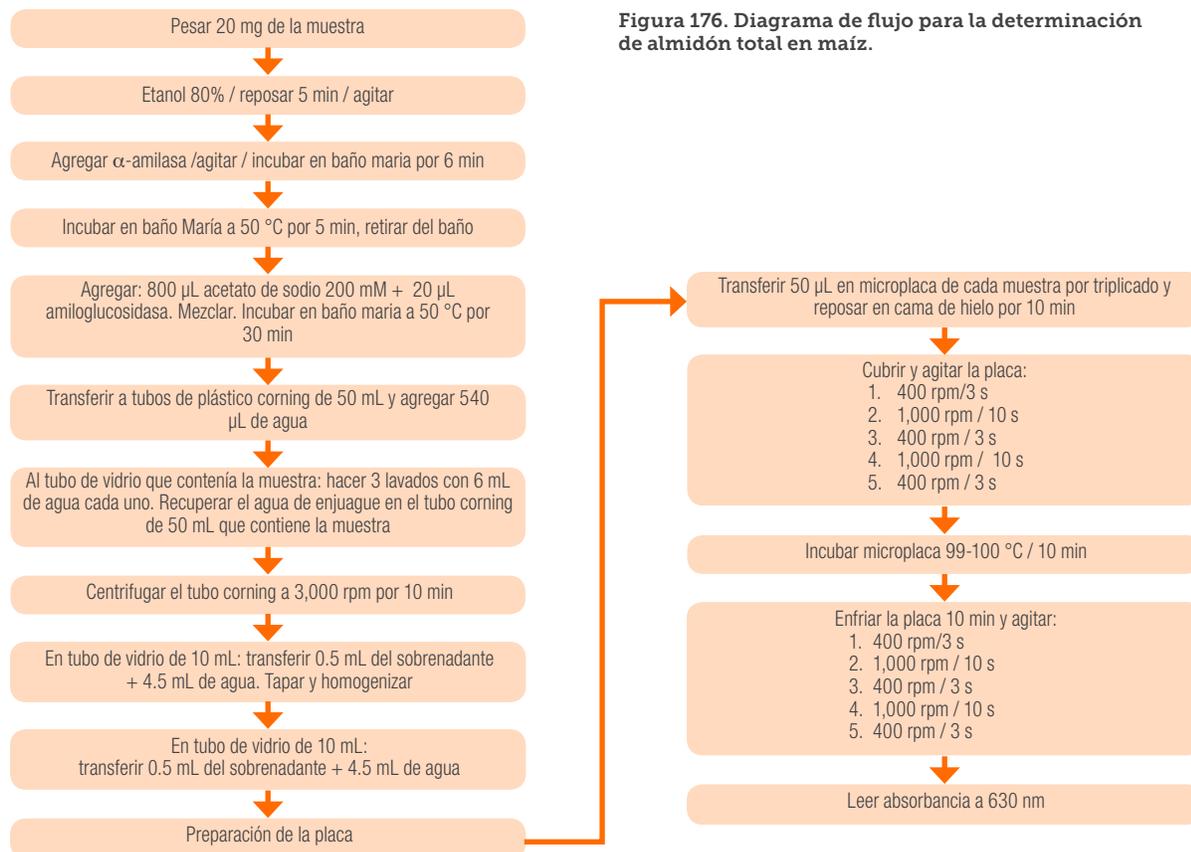


Figura 176. Diagrama de flujo para la determinación de almidón total en maíz.

Procedimiento

Hidrólisis

1. Pesar 20 mg de muestra en tubos de vidrio de 20 mL, asegurándose de que la harina quede depositada en el fondo del tubo. Incluir dos tubos con el estándar de almidón por cada gradilla a analizar.
2. Adicionar 40 μL de etanol al 80 %. Reposar 5 min y mezclar en vórtex.
3. Adicionar 600 μL de α -amilasa y mezclar en vórtex.
4. Incubar en baño María con agua en ebullición durante 6 min, pero mezclando en vórtex cada 2 minutos (Figura 177).



Figura 177. Incubación de muestras en baño María.

5. Colocar los tubos en baño María a 50°C por 5 min. Retirar los tubos del baño y adicionar 800 μL de amortiguador acetato de sodio 200 mM y 20 μL de amilogucosidasa. Mezclar en vórtex e incubar nuevamente en baño María a 50°C durante 30 min.
6. Agregar 6 mL de agua desionizada a los tubos de vidrio; mezclar en vórtex y transferir el contenido a los tubos de plástico Falcon (Figura 178). Repetir este paso 2 veces más. Agregar 540 μL de agua desionizada para completar un volumen final de 20 mL de solución.
7. Centrifugar los tubos a 3000 rpm durante 10 minutos. En caso de haber partículas flotando, centrifugar nuevamente.
8. Transferir 0.5 mL del sobrenadante a un tubo de vidrio de 10 mL y agregar 4.5 mL de agua desionizada. Tapar los tubos y homogenizar en vórtex.
NOTA: En este paso se puede detener el proceso por no más de 24 h, tapando los tubos y dejándolos en un lugar fresco y seco.



Figura 178. Adición de agua y transferencia de la muestra al tubo Falcon.

Reacción colorimétrica

9. Transferir 50 μL de alícuota a una microplaca de 96 pozos. El orden de las alícuotas en la placa será el siguiente: en la primera fila adicionar cada punto de la curva (por duplicado); posteriormente los dos testigos (por triplicado) y enseguida las muestras (por triplicado) (Figura 179). Al término del llenado de la placa, colocarla sobre una cama de hielo durante 10 minutos.

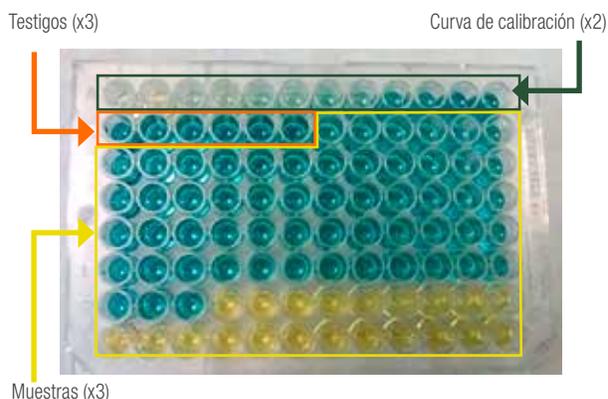


Figura 179. Microplaca con muestras.

10. Transcurrido el tiempo y aún sobre la cama de hielo, agregar 100 μL de la solución de antrona con una pipeta digital multicanal, asegurando que se transfiera toda la solución, ya que la alta viscosidad de la solución en ocasiones dificulta el procedimiento (se sugiere emplear la técnica de "pipeteo reverso" y consultar el instructivo de la pipeta para dispensar el líquido lo más lento posible).
11. Cubrir las microplacas con cinta de aluminio adhesiva y homogenizar en un agitador de placas (Figura 180) con las especificaciones indicadas en el Cuadro 77.

Cuadro 77. Tiempo y velocidad para la agitación de la microplaca.

Tiempo (seg)	Velocidad (rpm)
5	400
10	1000
5	400
10	1000
5	400
Apagar	0

12. Incubar la microplaca a 100°C durante 10 minutos.



Figura 180. Agitación de la microplaca con muestra.

13. En un congelador, enfriar las placas durante 10 min. Transcurrido el tiempo, agitar la microplaca a la velocidad y tiempo indicados en el Cuadro 75. Al término de esta operación, retirar la placa del agitador.
14. Leer la absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas.

Curva de calibración

15. A partir de la solución concentrada de glucosa (0.5 mg mL⁻¹), preparar en tubos de vidrio de 10 mL las diluciones indicadas en el Cuadro 78:

Cuadro 78. Curva de calibración para determinación de almidón total.

Tubo	Sol. concentrada de glucosa [0.5 mg mL ⁻¹] (mL)	Agua desionizada (mL)	Buffer de acetato de sodio (mL)	Volumen total (mL)	Concentración final de glucosa [mg mL ⁻¹] (mL)
1	0.000	9.750	0.250	10	0.000
2	0.250	9.500	0.250	10	0.0125
3	0.500	9.250	0.250	10	0.0250
4	0.750	9.000	0.250	10	0.0375
5	1.500	8.250	0.250	10	0.0750
6	2.000	7.750	0.250	10	0.1000

16. Transferir por duplicado, 50 µL de cada tubo a los pozos de la primera fila de la microplaca. Seguir los pasos 9 a 14 del análisis de muestras.

Cálculo del porcentaje de almidón total

17. Construir una gráfica de regresión lineal, relacionando las concentraciones de la curva de calibración con el promedio de las absorbancias obtenidas.
18. Para obtener la concentración de glucosa, utilizar la ecuación para una línea recta y despejar X:

$$x = \frac{Y}{m}$$

Dónde:

Y = Absorbancia de la muestra menos la absorbancia del blanco.

m = pendiente

Calcular la concentración de almidón total con la siguiente ecuación:

$$\% AT = \frac{X \cdot df \cdot v \cdot hf}{W} \times 100$$

Dónde:

% AT = Porcentaje de almidón total.

X = Concentración de glucosa (mg mL⁻¹).

Df = Factor de dilución (por ejemplo: 10 para una dilución 1:9).

v = volumen total del proceso (20 mL).

hf = Factor de hidrólisis de almidón (0.9).

W = Peso de la muestra (20 mg).

Cuadro 79. Solución a problemas comunes en la determinación de almidón total.

Problema	Solución
Formación de grumos y la solución no es homogénea en la extracción.	Verificar que el baño María tiene suficiente agua para que la muestra no se desplace hacia la parte superior del tubo, ya que esto afecta la eficiencia de la extracción.
Desarrollo de color deficiente.	Verificar la fecha de caducidad de los reactivos. Preparar nuevas soluciones de reactivos.

Referencias

- Hall, M. B. Determination of starch, including maltoligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J. AOAC Int.* 2009, 92 (1), 42–49.
- Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- American Association of Cereal Chemist. *Total starch assay procedure (Megazyme amyloglucosidase/α-amylase)*; Volume II; 1999.
- Grande F., Utrera A., D. O. J. C. *La reacción de la antrona en la determinación de los hidratos de carbono.*; 1953; Vol. 1.
- Burgueño, J. Meroni, G. Técnica de la calibración para la determinación de carbohidratos solubles por desarrollo de color con antrona en ácido sulfúrico. *Inf. tecnológica 2000 2000*, 11, 59–63.

Determinación de amilosa en harina de maíz

Justificación

El almidón está formado por dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$, por su parte, la amilopectina está formada por enlaces α -D-(1,6) localizados cada 15-25 unidades lineales de glucosa. En general, el almidón contiene aproximadamente de 17-27% de amilosa, siendo el resto amilopectina. La proporción de estos compuestos está regida por factores genéticos típicos de cada cereal¹ e influye en gran medida en las propiedades fisicoquímicas, tecnológicas y nutricionales del almidón^{2,3}

Fundamento

La amilosa se determina por la reacción entre α -1,4-glucanos y el yodo para formar un complejo azul, que posteriormente es leído en un espectrofotómetro^{4,5}.

Cuadro 80. Material y equipos utilizados en la determinación de amilosa.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica.	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo, MS04S.
Agitador horizontal.	N/A	Eberbach.
Micropipeta.	100 – 1000 μ L.	Eppendorf.
Dispensador.	2 – 10 mL.	Brinkmann.
Lector de microplacas.	N/A	Quant BioTek.
Microplacas.	96 pozos.	NUNC.
Tubos tipo Falcon.	50 mL	Corning.

Cuadro 81. Reactivos utilizados en la determinación de amilosa.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol 95%.	Etanol (Merck, Cat. 1.100983.2500, CAS 64-17-5).	Usar directamente.	
Hidróxido de Sodio (NaOH) 1 M.	Hidróxido de sodio (JT Baker, Cat. 3722-05, CAS 1310-73-2).	Disolver 4 g de NaOH en agua desionizada y aforar a 100 mL.	
Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 M.	Hidróxido de sodio 1M.	Diluir 10 mL de NaOH 1 M, aforando con agua a 100 mL.	
Ácido acético 1 M.	Ácido acético glacial (Sigma Aldrich, Cat. A-6283, CAS 64-19-7).	En un matraz aforado, mezclar 5.67 mL de ácido acético y aforar a 100 mL con agua desionizada.	
Solución Lugol.	Yoduro de potasio (JT Baker, Cat. 3162, CAS 7681-11-0). Yodo (Sigma Aldrich, Cat. 207772, CAS 7553-56-2:12).	Disolver 2 g de KI en 50 mL de agua desionizada hasta formar una solución espesa. Agregar 0.2 g de I ₂ y disolver perfectamente. Aforar con agua desionizada a 100 mL en un matraz aforado.	Preparar diariamente. Proteger de la luz. Preparar la cantidad requerida para las muestras a analizar en un día.
Estándar de amilosa 1 mg mL ⁻¹ .	Amilosa de papa tipo III (Sigma Aldrich, Cat. A0512, CAS. 9005-82-7).	Agregar 100 mg de amilosa en un matraz aforado de 100 mL y adicionar 1 mL de etanol 95% deslizando por las paredes del matraz. Agregar 9 mL de NaOH 1 M y dejar reposar la mezcla de 20 a 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, ajustar el volumen a 100 mL con agua desionizada.	No agitar al momento de la adición del etanol y NaOH.

Alcance

La técnica aplica para todo tipo de maíz y sus derivados. Un técnico capacitado puede analizar 76 muestras por día.

Diagrama de flujo

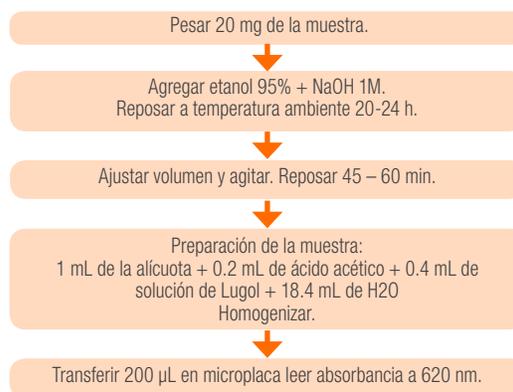


Figura 181. Diagrama de flujo para la determinación de amilosa en maíz y sus derivados.

Procedimiento

Hidrólisis

1. Pesar 20 mg de harina en tubos Corning de 50 mL.
2. Incluir dos tubos con los estándares de amilosa al inicio de cada gradilla.
3. Agregar 0.2 mL de etanol 95% deslizando por las paredes del tubo.

- Adicionar 1.8 mL de NaOH 1 M deslizándolo por las paredes del tubo. Reposar a temperatura ambiente de 20 a 24 h (Figura 182).

NOTA: No agitar los tubos.

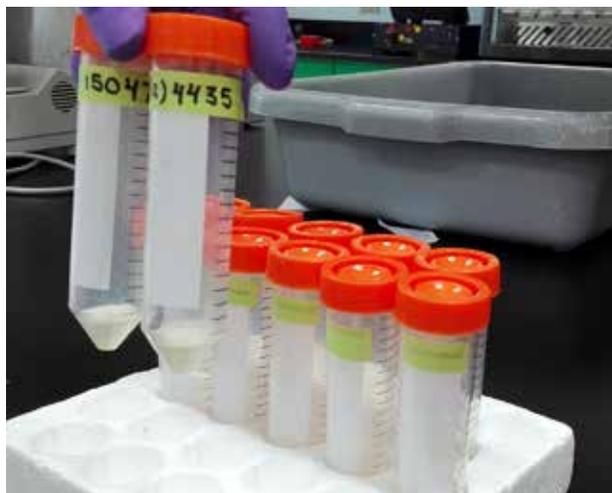


Figura 182. Muestra después de 24 h de reposo.

- Transcurrido el tiempo, agregar 18 mL de agua desionizada hasta completar un volumen de 20 mL y agitar los tubos en el agitador horizontal Eberbach durante 1 min. Dejar reposar los tubos de 45 a 60 minutos para disminuir la cantidad de espuma que se forma durante la agitación (Figura 183).



Figura 183. Adición de agua y muestra con espuma después de la agitación.

Desarrollo de color

- Transferir 1 mL de muestra a un tubo Corning de 50 mL.
- Agregar 0.2 mL de ácido acético 1 M.
- Adicionar 0.4 mL de la solución de Lugol y agregar 18.4 mL de agua desionizada para completar un volumen de 20 mL (Figura 184).



Figura 184. Adición de Lugol.

- Agitar las muestras en el agitador horizontal Eberbach por 1 minuto y dejar reposar 20 minutos para el desarrollo de color. Al terminar el tiempo de reposo no agitar las muestras.

Lectura en microplaca

- Transferir 200 μ L de cada muestra (por duplicado) a una placa NUNC de 96 pozos. Se debe iniciar con la curva de calibración (por duplicado), posteriormente con los testigos (por duplicado) y finalmente con las muestras (Figura 185).

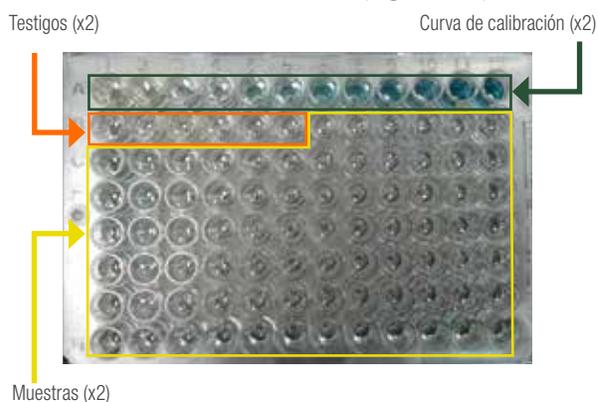


Figura 185. Adición de curva y muestras a la placa.

- Tomar lectura de la placa en lector de placas a 620 nm (Figura 186).



Figura 186. Lectura de placa en lector de microplaca.

Preparación de la curva de calibración

Se recomienda preparar la curva de calibración y las muestras al mismo tiempo para disminuir el tiempo de análisis y hacer la reacción colorimétrica simultáneamente.

12. En tubos Corning de 50 mL, preparar las diluciones indicadas en el Cuadro 82:

Cuadro 82. Curva de calibración para el análisis de amilosa.

Tubo	Sol. Concentrada de amilosa 1mg mL ⁻¹ (mL)	Ácido acético 1 Mol mL ⁻¹ (mL)	Solución de Yodo de Lugol (mL)	NaOH M (mL)	Agua desionizada (mL)	Volumen final (mL)
1	0	0.2	0.4	1	18.04	20
2	0.2	0.04	0.08	0	19.68	20
3	0.4	0.08	0.16	0	19.36	20
4	0.6	0.12	0.24	0	19.04	20
5	0.8	0.16	0.32	0	18.72	20
6	1.0	0.20	0.40	0	18.40	20

13. Transferir 200 µL de cada punto de la curva a tubos Corning de 50 mL y desarrollar la reacción colorimétrica siguiendo los pasos 8 a 12 de la preparación de las muestras.

NOTA: La curva de calibración se hace por cada grupo de muestras analizadas en un día.

Cálculo del porcentaje de amilosa

14. Realizar una gráfica de regresión lineal correlacionando las concentraciones de la curva de calibración con el promedio de las absorbancias obtenidas. Incluir las líneas de tendencia: intersección y pendiente.
15. Utilizar la ecuación obtenida de la regresión lineal y despejar X.
16. Sustituir los valores de las absorbancias corregidas en Y.

$$x = \frac{Y - a}{m}$$

Dónde:

X = Cantidad de amilosa.

Y = Absorbancia corregida (absorbancia de la muestra menos el blanco).

a = Intersección.

m = pendiente.

17. Calcular el porcentaje de amilosa con la siguiente fórmula:

$$\% AM = (x \times d) \times \left(\frac{100}{w} \right)$$

Dónde:

% AM = Porcentaje de amilosa.

x = Cantidad de amilosa.

d = Factor de dilución (Volumen final de la dilución, ejemplo 20 mL en la reacción colorimétrica).

w = Peso inicial de la muestra.

Cuadro 83. Solución a problemas comunes en la determinación de amilosa.

Problema	Solución
Desarrollo de color ineficiente.	Verificar la fecha de caducidad de los reactivos. Preparar reactivos nuevos.

Referencias

- (1) Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- (2) Mahmood, T.; Turner, M. A.; Stoddard, F. L. Comparison of methods for colorimetric amylose determination in cereal grains. *Starch/Staerke* **2007**, 59 (8), 357–365.
- (3) Zhu, T.; Jackson, D. S.; Wehling, R. L.; Geera, B. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. *Cereal Chem.* **2008**, 85 (1), 51–58.
- (4) Knutson, C. a; Grove, M. J. Rapid method for estimation of amylose in maize starches. *Cereal Chemistry*. 1994, pp 469–471.
- (5) Knutson, C. A. Evaluation of variations in amylose–iodine absorbance spectra. *Carbohydr. Polym.* **2000**, 42 (1), 65–72.

Determinación de almidón resistente en maíz utilizando un ensayo modificado de Megazyme™

Justificación

El almidón resistente es la fracción del almidón que no se hidroliza por las enzimas en el intestino delgado, sino que ingresa en el intestino grueso donde es parcial o totalmente fermentado. Es considerado uno de los componentes de la fibra dietética total, por esta razón los alimentos que contienen almidón resistente pueden ayudar a modular el índice glicémico, controlando la diabetes, los niveles de colesterol en plasma y el peso, lo cual reduce el riesgo de numerosas enfermedades metabólicas¹⁻³.

Cabe resaltar que al cocinar y recalentar los productos de maíz es posible acelerar o frenar la formación de almidón resistente en los alimentos, lo cual tiene efecto en la digestibilidad del almidón, por lo que dietas altas en almidón resistente pueden contribuir a la disminución de enfermedades crónicas y metabólicas⁴⁻⁶.

Fundamento

Las muestras son incubadas con α -amilasa y amiloglucosidasa (AMG) durante 16 horas a 37°C en un baño de agua con agitación; durante este tiempo, el almidón no resistente es solubilizado e hidrolizado a D-glucosa debido a la acción combinada de las dos enzimas. La reacción termina con la adición de etanol, el almidón resistente es recuperado como un sedimento después de centrifugar y remover el líquido por decantación. El sedimento es disuelto en KOH 2M agitando vigorosamente en un baño de hielo. La solución resultante es neutralizada con una solución amortiguadora de acetato y el almidón es hidrolizado cuantitativamente a glucosa por la AMG. La D-glucosa es medida con el reactivo GOPOD (glucosa oxidasa/ peroxidasa), que es una medida del contenido de almidón resistente en la muestra. Es posible determinar la cantidad de almidón no resistente (almidón solubilizado) agrupando el sobrenadante original y el de los lavados, midiendo el contenido de glucosa con GOPOD®.

Alcance

El método se puede utilizar con todo tipo de harina de maíz. Un técnico calificado puede procesar 55 muestras en dos días.

Cuadro 84. Material y equipos utilizados en la determinación de almidón resistente.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica.	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo, AE160.
Agitador.	Tipo vórtex.	Genie-2.
Barras magnéticas.	5 x 15 mm	N/A
Baño María.	Con agitador horizontal.	Scorpion Scientific, A50651.
Potenciometro.	N/A	OAKTON pH 510 Series.
Centrífuga.	Para tubos cónicos de 50 mL.	Allegra, x-12.
Temporizador digital.	N/A	Sper Scientific, 810015.
Espectrofotómetro.	UV/Visible	Beckman Coulter, DU 530.
Micropipetas.	20 – 200 μ L, 100 – 1000 μ L y 0.5 – 5 mL	Eppendorf.
Matraz volumétrico.	100 mL	Pyrex.
Lector de microplacas.	N/A	Quant BioTek.
Microplacas.	96 pozos.	NUNC.
Tubos de vidrio con tapón de rosca.	16 x 125 mm	Pyrex.
Gradilla para tubos de vidrio.	Para 72 tubos.	N/A
Charola de plástico.	Del tamaño de la gradilla.	N/A
Tubos tipo Falcon.	50 mL	Corning.

Diagrama de flujo

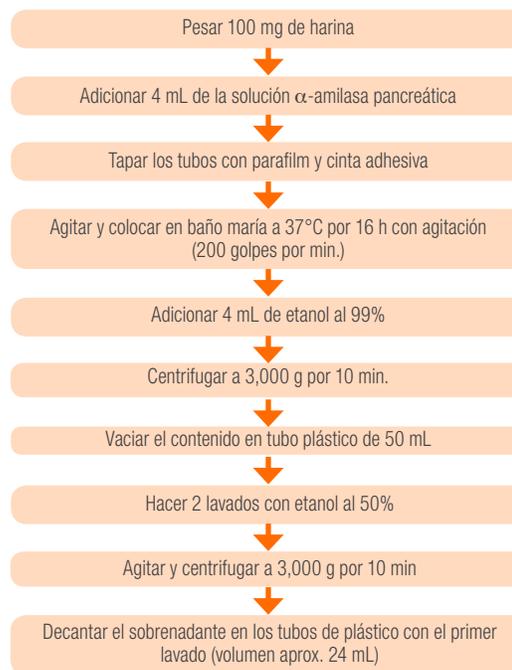


Figura 187. Diagrama de flujo para la determinación de almidón resistente (Hidrólisis).

Cuadro 85. Reactivos utilizados en la determinación de almidón resistente.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol al 99% v/v	Etanol con una pureza del 99%. (Merck, Cat. 1.00983.2500, CAS 64-17-5).		Mantener a temperatura ambiente. Se mantiene estable por 2 años.
Etanol al 50% v/v	Etanol con una pureza del 99% (Merck, Cat. 1.00983.2500, CAS 64-17-5).	Mezclar 500 mL de agua destilada con 500 mL de etanol en un matraz de un litro y almacenar en un frasco con tapa de rosca.	Mantener a temperatura ambiente. Se mantiene estable por 2 años.
Hidróxido de sodio (NaOH 4M)	Hidróxido de sodio en perlas (JT Baker, Cat. 3722-05, CAS 1310-73-2).	Colocar 900 mL de agua desionizada y un agitador magnético en un matraz aforado. Colocar el matraz en un recipiente con hielo y sobre una parrilla de agitación. Adicionar 160 gramos de NaOH y disolver mediante agitación utilizando la parrilla. Aforar a un litro y almacenar en un recipiente sellado.	Estable más de 2 años a temperatura ambiente. Es importante disolver en hielo para disminuir la reacción exotérmica que se lleva a cabo cuando se agrega el NaOH al agua.
Acetato de sodio (1.2 M, pH 3.8)	Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, Cat. A-6283-100, CAS 64-19-7). Hidróxido de sodio 4 M.	Agregar 69.6 mL de ácido glacial (1.05 g mL ⁻¹) a 800 mL de agua desionizada en un matraz aforado y ajustar el pH a 3.8 utilizando la solución de hidróxido de sodio 4 M. Ajustar el volumen a 1 litro con agua desionizada.	Estable por 12 meses a temperatura ambiente. Se necesitan aproximadamente 37.5 mL de la solución de hidróxido de sodio para ajustar el pH.
Acetato de sodio (100 mM, pH 4.5)	Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich Cat. A-6283-100, CAS 64-19-7). Hidróxido de sodio 4 M.	Agregar 5.8 mL de ácido acético glacial a 900 mL de agua desionizada en un matraz aforado y ajustar el pH a 4.5 utilizando la solución de hidróxido de sodio 4 M. Ajustar el volumen a 1 litro con agua desionizada.	Estable por 12 meses a temperatura ambiente. Se necesitan aproximadamente 12.5 mL de la solución de hidróxido de sodio para ajustar el pH.
Hidróxido de Potasio (KOH 2M)	Hidróxido de potasio en perlas (Merck, Cat. 1.05033.1000, CAS 1310-58-3)	Colocar 900 mL de agua desionizada y un agitador magnético en un matraz aforado. Colocar el matraz en un recipiente con hielo y sobre una parrilla de agitación. Adicionar 112.2 gramos de KOH y disolver mediante agitación utilizando la parrilla. Aforar a un litro y almacenar en un recipiente sellado.	Estable más de 2 años a temperatura ambiente. Es importante disolver en hielo para disminuir la reacción exotérmica que se lleva a cabo cuando se agrega el KOH al agua.
Maleato de sodio (100 mM, pH 6.0, 0.02 % w/v de azida de sodio).	Ácido maleico (Sigma, Cat. M0375, CAS 110-16-7). Cloruro de calcio dihidratado (Sigma, Cat. C-3881, CAS 10035-04-8), Azida de sodio (Química Mayer Ensayo 99%, CAS 26628-22-8), Hidróxido de sodio 4 M.	En un matraz aforado, disolver 23.2 g de ácido maleico en 1.6 L de agua desionizada y ajustar el pH a 6.0 con la solución de hidróxido de sodio 4M. Agregar 0.74 g de cloruro de calcio dihidratado y 0.4 g de azida de sodio. Ajustar el volumen a 2 litros.	Estable por 12 meses a temperatura ambiente. Se necesitan aproximadamente 75 mL de la solución de hidróxido de sodio para ajustar el pH.
GOPOD	GOPOD (reactivo amortiguador): Tampón fosfato de potasio (1M, pH 7.4), ácido p-hidroxibenzoico (0.22M) y azida de sodio (0.4 % w/v). Solución 3 del kit de Megazyme. GOPOD (reactivo de enzimas): Glucosa oxidasa (>12,000 U) además peroxidasa (>650 U) y 4-aminoantipirina (80 mg) en forma de polvo liofilizado.	Diluir todo el contenido de GOPOD (reactivo amortiguador) en 1 litro de agua desionizada y disolver el contenido de GOPOD (reactivo de enzimas) con la solución preparada. Tapar el frasco y proteger de la luz (se sugiere utilizar frasco ámbar o cubrirlo con papel aluminio).	Estable por más de 3 años a 4°C. Manipular con precaución extrema dado que la azida de sodio se trata de una sustancia muy tóxica. Estable por más de 5 años a -20°C.
Dilución AMG (300 U mL ⁻¹)	AMG (3,300 U mL ⁻¹) y solución de maleato de sodio (100 mM, pH 6.0)	Diluir 2 mL de AMG en 22 mL de la solución amortiguadora de maleato de sodio. Dividir en alícuotas de 5 mL y almacenar en tubos cónicos de plástico.	Estable a la congelación y descongelación repetida durante 5 años a -20°C.
D-glucosa estándar	D-glucosa solución estándar (5 mL, 1.0 mg mL ⁻¹) en 0.2% (w/v) de ácido benzoico.	Forma parte del kit de Megazyme, lista para utilizarse.	Estable durante más de 5 años a temperatura ambiente.
α-Amilasa pancreática.	α-Amilasa pancreática (Pancreatina, 10 g, 3 Cerafa U mg ⁻¹)	Forma parte del kit de Megazyme, lista para utilizarse.	Estable por más de 3 años a -20°C.
AMG (3,300 U mL ⁻¹)	Amiloglucosidasa [12 mL, 3,300 U mL ⁻¹ en almidón soluble (o 200 U mL ⁻¹ en p-nitrofenil β-maltosido)] a pH 4.5 y 40°C. La solución AMG debe estar esencialmente libre de niveles detectables de D-glucosa libre.	Forma parte del kit de Megazyme, lista para utilizarse. También puede adquirirse de manera independiente del kit.	Estable por más de 3 años a 4°C.
Solución [α-Amilasa Pancreática+ Dilución AMG (300 U mL ⁻¹)]	α-Amilasa pancreática y dilución AMG (300 U mL ⁻¹)	Esta preparación depende del número de muestras a analizar. Para analizar 55 muestras, se deben suspender 2.2 g de α-Amilasa Pancreática en 220 mL de Maleato de Sodio (100 mM, pH 6.0) y agitar con una barra magnética durante 5 minutos. Enseguida adicionar 2.2 ml de la Dilución AMG (300 U mL ⁻¹) y agitar bien durante 3 minutos. Centrifugar a más de 1,500 gravedades durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante con precaución en un nuevo recipiente.	Preparar esta solución el mismo día que se va a emplear.

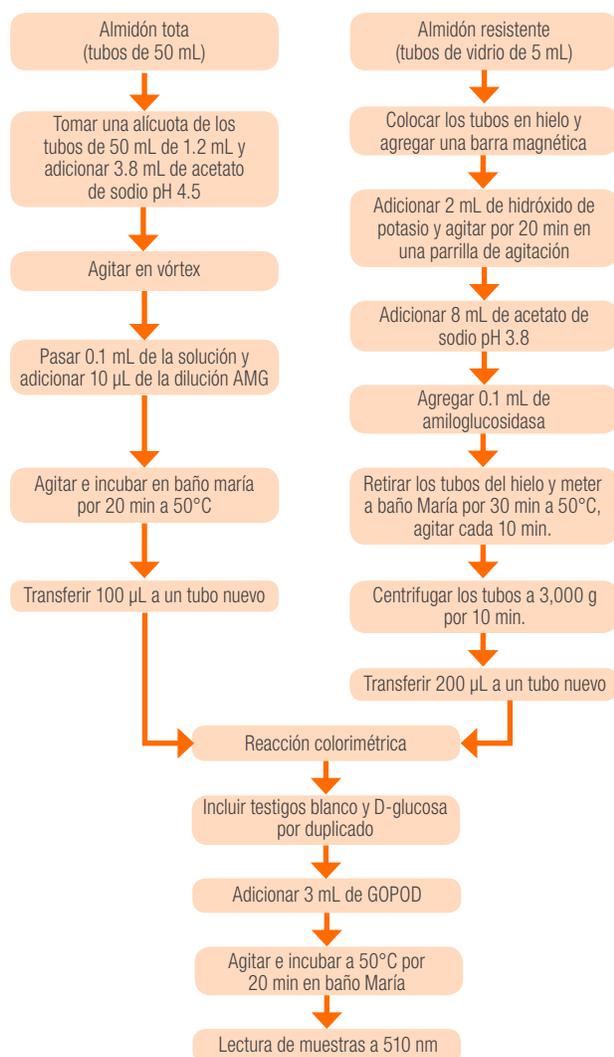


Figura 188. Diagrama de flujo para la determinación de almidón resistente (Desarrollo de color).

Procedimiento

Hidrólisis de las muestras

1. Pesar 100 mg de la muestra a analizar, incluyendo muestras testigo por duplicado. Se sugiere utilizar hojuelas de maíz comercial, fécula de maíz u hojuelas de puré de papa.
2. Añadir a cada tubo 4 mL de la solución enzimática (α -amilasa pancreática y AMG).
3. Cubrir herméticamente los tubos con parafilm y cinta adhesiva (*masking tape*). Agitar los tubos en vórtex colocarlos horizontalmente en baño María.
4. Incubar los tubos a baño María con agitación durante 16 h a 37°C (100 movimientos por minuto en cada sentido, total de 200).

5. Retirar los tubos del baño y eliminar el exceso de agua.
6. Añadir 4 mL de etanol al 99% a cada tubo y agitar en vórtex.
7. Tapar los tubos y centrifugar a 1500 g durante 10 minutos.
8. Decantar cuidadosamente el sobrenadante en tubos cónicos de plástico de 50 mL.
9. Adicionar 8 mL de etanol al 50% a cada tubo, tapar y agitar en vórtex.
10. Centrifugar nuevamente como en el paso 7 y decantar el sobrenadante en los tubos de 50 mL previamente utilizados.
11. Repetir pasos 9 y 10, al finalizar se obtiene un volumen aproximado de 24 mL.

Medición de almidón resistente

12. Agregar a cada tubo una barra magnética (5 x 15 mm) y 2 mL de KOH. Sobre una parrilla de agitación magnética, colocar los tubos en un baño de hielo y agitar durante 20 minutos para resuspender los sedimentos.
13. Retirar los tubos del baño de hielo y agregar a cada uno 8 mL de acetato de sodio (1.2 mM, pH 3.8), 0.1 mL de AMG (3300 U mL⁻¹) y mezclar en vórtex.
14. Tapar los tubos e incubar a baño María durante 30 minutos a 50°C, agitando en vórtex cada 10 minutos.
15. Terminada la incubación, centrifugar los tubos a 1500 g durante 10 minutos.
16. Transferir 0.2 mL del sobrenadante de cada muestra a tubos de vidrio previamente identificados.

Medición de almidón no resistente

17. Colocar una alícuota de 1.2 mL del conjunto de sobrenadantes (pasos 8 al 11) en tubos de vidrio previamente etiquetados, adicionar 3.8 mL de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5) y mezclar en vórtex.
- NOTA: El protocolo de Megazyme menciona que los sobrenadantes deben combinarse (24 mL totales) y completar el volumen a 100 mL con acetato de sodio, sin embargo, para facilitar la determinación, se realizaron varias pruebas y se estableció que los volúmenes indicados arrojan los mismos resultados y se utiliza menor cantidad de materiales.

18. Transferir 0.1 mL de la solución resultante en el punto anterior en tubos de vidrio con rosca, adicionar 10 µL de la dilución de AMG (300 U mL⁻¹) y agitar en vórtex.
19. Incubar durante 20 minutos a 50 °C a baño María.

Desarrollo de color

20. Preparar previamente dos tubos con 0.1 mL de acetato de sodio (100 mM, pH 4.5), los cuales servirán como blancos.
21. En otro par de tubos, adicionar 0.1 mL del estándar de D-glucosa (1 mg mL⁻¹).
22. Adicionar 3 mL del reactivo GOPOD a todas las muestras (almidón resistente, almidón no resistente, testigos, blancos y estándar de glucosa) y agitar en vórtex.
23. Incubar las muestras en baño María durante 20 minutos a 50°C.
24. Retirar los tubos del baño y dejar enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
25. Medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 510 nm tomando como línea base agua desionizada y posteriormente los blancos (punto 20).

Cálculos

La fórmula que se emplea para determinar el porcentaje de almidón en la muestra es:

$$\%AR = Abs \times Factor \times Constante \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{PM} \times 0.9$$

Dónde:

%AR = Porcentaje de almidón resistente.

Abs = Absorbancia de la muestra.

$$Factor = \frac{100}{Absorbancia\ promedio\ del\ estándar\ de\ glucosa}$$

$$Constante = \frac{Volumen\ del\ extracto\ (mL)}{Volumen\ de\ la\ alicuota\ (mL)}$$

PM = Peso de la muestra (mg).

0.9 = Factor para convertir la D-glucosa libre a anhidro-D-glucosa, como ocurre en el almidón.

NOTAS IMPORTANTES:

- El resultado está dado en base húmeda.
- % AR puede cambiar a % de AT (almidón total) para el cálculo respectivo.
- El volumen del extracto para almidón resistente es de 10.3 mL y el de la alicuota es de 0.2 mL, sin embargo, esto puede variar de acuerdo al tipo de muestra y a la cantidad de almidón resistente que contenga (ver manual Megazyme para información detallada).
- El volumen del extracto para almidón total se considera de 100 mL y la alicuota es de 0.1 mL (Ver NOTA del punto 17).
- La absorbancia de los blancos debe ser menor a 0.015 tomando agua desionizada como línea base.

Cuadro 86. Solución a problemas comunes en la determinación de almidón resistente.

Problema	Solución
Formación de cristales en el reactivo amortiguador GOPOD.	Mantener la solución a temperatura ambiente durante 20 minutos y agitar manualmente para disolver los cristales. Uso de guantes obligatorio en este paso.
Exceso de burbujas al agregar KOH y agitar para resuspender los sedimentos.	Dejar reposar la solución durante 10 minutos, asegurar que la agitación no es agresiva, no usar vórtex.
El sedimento no se resuspende en KOH.	La agitación es muy baja, se debe incrementar.

Referencias

- Alsaffar, A. A. Effect of food processing on the resistant starch content of cereals and cereal products - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, 46 (3), 455–462.
- Leszczynski, W. Resistant starch – classification, structure, production. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2004**, 13 (54), 37–50.
- Murphy, M. M.; Douglass, J. S.; Birkett, A. Resistant Starch Intakes in the United States. *J. Am. Diet. Assoc.* **2008**, 108 (1), 67–78.
- García-Rosas, M.; Bello-Pérez, L. A.; Yee-Madeira, H.; Ramos, G.; Flores-Morales, A.; Mora-Escobedo, R. Resistant Starch Content and Structural Changes in Maize (Zea mays) Tortillas During Storage. *Starch - Stärke* **2009**, 61 (7), 414–421.
- Rendón-Villalobos, R.; Bello-Pérez, L. A.; Osorio-Díaz, P.; Tovar, J.; Paredes-López, O. Effect of Storage Time on In Vitro Digestibility and Resistant Starch Content of Nixtamal, Masa, and Tortilla. *Cereal Chem.* **2002**, 79 (3), 340–344.
- Thiemeier, H.; Hollmann, J.; Neese, U.; Lindhauer, M. Structural and morphological factors influencing the quantification of resistant starch II in starches of different botanical origin. *Carbohydr. Polym.* **2005**, 61 (1), 72–79.
- Díaz-Mora, D. Cuantificación de almidón resistente en maíces criollos., Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla., 2012.
- Megazyme. *Resistant starch.*; Assay procedure; K-RSTAR 10/15; Ireland, 2015; Vol. K-RSTAR 10.

Determinación de azúcares solubles con antrona

Justificación

Los azúcares solubles, comúnmente definidos mono y disacáridos, tienen un rol fundamental en el control del metabolismo, estructura, crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, intervienen en la osmorregulación controlando el potencial de agua y el potencial osmótico en las células. Recientemente se han estudiado sus funciones como agentes quelantes del ion Na^+ , su papel en la tolerancia a bajas temperaturas y como protectores contra el estrés oxidativo¹⁻³.

Fundamento

El método de la antrona se basa en la reacción que produce este compuesto (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) al combinarse con la conformación furfural de los carbohidratos (los cuales se someten a un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado) para colorear un hemiacetal, que se determina espectrofotométricamente a 630 nm^{4,5}.

Alcance

Aplica a tejido vegetal de trigo y maíz. Utilizar harina de granos como trigo y maíz dificulta el análisis por el alto contenido de almidón. Un técnico calificado puede procesar 62 muestras por día.

Cuadro 87. Material y equipos utilizados en la determinación de azúcares solubles.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AE160
Estufa de secado	N/A	Barnstead Thermolyne, OV47525
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2.
Baño María	70°C	Thelco Precision Scientific Co. 13-Y-11
Centrífuga	Para tubos cónicos de 50 mL	Allegra, x-12
Agitador de microplacas	De 4 plazas	Cole-Parmer, 2020T4
Incubadora de microplacas	N/A	ThermoStat Plus
Cinta adhesiva de aluminio	5 cm de ancho	3 M
Micropipetas	100 – 1000 μL y 0.5 – 5 mL	Eppendorf.
Campana de extracción	Mínimo 500 cfm	Safeaire o Labconco
Frasco de vidrio ámbar	50 mL	Pyrex
Lector de microplacas	N/A	Quant BioTek
Microplacas	96 pozos	NUNC
Pipeta digital multicanal	20 – 300 μL	Eppendorf Research Pro
Tubos tipo Falcon	15 mL	Corning
Gradilla para tubos tipo Falcon	Para 50 tubos	Corning
Charola para agua con hielo	Plástico preferentemente	N/A

Cuadro 88. Reactivos utilizados en la determinación de almidón resistente.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Agua desionizada			Se recomienda utilizar agua con una conductividad menor a 0.05 μS .
Ácido sulfúrico 95 - 97%	Ácido sulfúrico (Merck, Cat. 1.00732.2500, CAS 7664-93-9).		Manipular en campana de extracción.
Reactivo antrona	Antrona (Merck, Cat. 1.01468.0010, CAS 90-44-8)	Una hora antes de usar, pesar 100 mg del reactivo antrona y disolver en 50 mL de ácido sulfúrico concentrado grado analítico.	Preparar una hora antes de utilizar. Proteger de la luz (en frasco de vidrio ámbar), mantener en hielo o en refrigeración.
Solución 1: Solución concentrada de sacarosa (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) Solución 2: Solución concentrada de sacarosa (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sacarosa (Sigma, Cat. 84097, CAS 57-50-1)	Secar la sacarosa durante 1 hora a 105°C. Solución 1: Disolver 25 mg de sacarosa en 250 mL de agua desionizada. Solución 2: Colocar 30 mL de la solución 1 en un matraz aforado de 100 mL y aforar con agua desionizada.	Preparar semanalmente y almacenar a 4°C. Agitar muy bien en el vórtex antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Diagrama de flujo

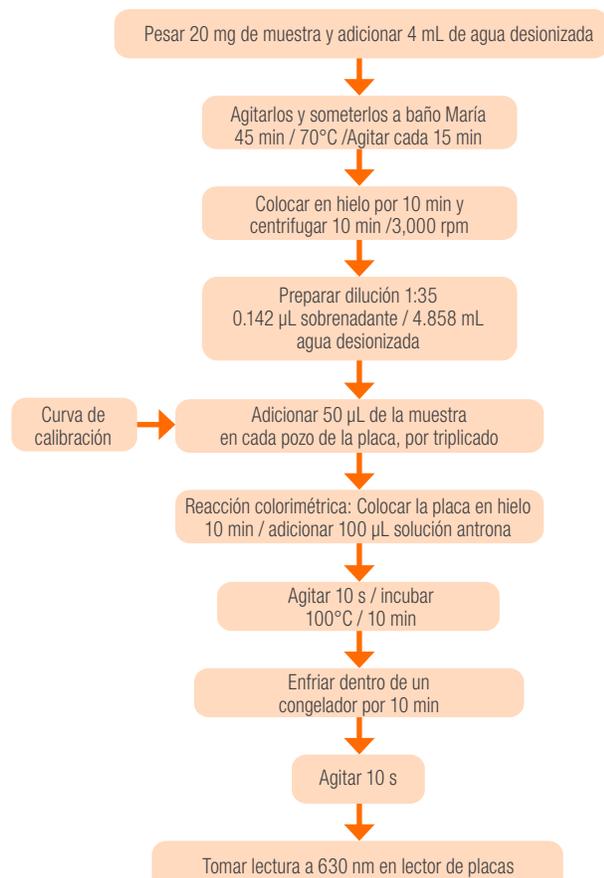


Figura 189. Diagrama de flujo para la determinación de azúcares solubles.

Procedimiento

Secado

1. Secar las muestras de tejido durante 4 horas a 60°C.

Extracción

2. Pesar 20 mg de muestra seca en tubos tipo Falcon de 15 mL. Se recomienda hacerlo por duplicado.
3. Añadir 4 mL de agua desionizada a cada tubo, inmediatamente cerrarlos y agitarlos en vórtex.
4. Colocar los tubos en una gradilla y someterlos a baño María durante 45 minutos a 70°C, agitar los tubos en vórtex cada 15 minutos.
5. Al terminar la incubación, colocar los tubos en agua con hielo durante 10 minutos.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm.

7. Preparar una dilución 1:35 con el sobrenadante de cada tubo; para esto, en un tubo tipo Falcon de 15 mL se agregan 142 µL del sobrenadante y se adicionan 4.858 mL de agua desionizada.

NOTA: El tipo de dilución 1:35 se sugiere para todo tipo de tejido vegetal, sin embargo, en algunas ocasiones es necesario hacer diluciones en otras proporciones (generalmente 1:10 o 1:20).

Lectura de muestras en el espectrofotómetro

8. De cada dilución, tomar 50 µL y transferirlos cuidadosamente a la microplaca (realizarlo por triplicado).
9. Colocar la microplaca sobre hielo durante 10 minutos.
10. Agregar a cada pozo 100 µL de la solución de antrona con una pipeta digital multicanal, asegurando que se transfiera toda la solución ya que la alta viscosidad de la solución en ocasiones dificulta el procedimiento (se sugiere emplear la técnica de "pipeteo reverso" y consultar el instructivo de la pipeta para dispensar el líquido lo más lento posible).
11. Siempre incluir, por duplicado, una curva estándar y muestras control (testigos) con valores conocidos (Figura 190).

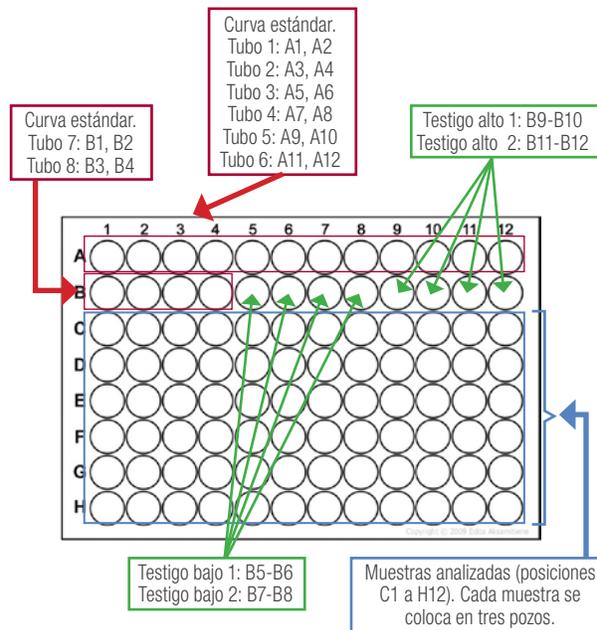


Figura 190. Llenado de microplaca.

12. Cubrir la microplaca con cinta adhesiva de aluminio y colocarla en el agitador de placas durante 10 segundos a 400 rpm y, posteriormente a 1000 rpm durante 10 segundos para homogenizar la solución de cada pozo.

13. Incubar la microplaca a 100°C durante 10 minutos.
14. Enfriar la microplaca en hielo o dentro de un congelador durante 10 minutos.
15. Repetir paso 12 para precipitar todo el líquido en los pozos.
16. Leer a 630 nm en el lector de microplacas.

Curva estándar

17. En tubos de vidrio de 10 mL, preparar por día diluciones de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 40 y 60 µg mL⁻¹ (Cuadro 87). Agitar vigorosamente en el vórtex antes de utilizarlas.

Cuadro 89. Preparación de curva estándar (para 5 mL por tubo).

Tubo	Volumen a agregar en el tubo (mL)			Concentración de sacarosa en el tubo (µg mL ⁻¹)
	Solución concentrada de sacarosa [30 mg mL ⁻¹]	Solución concentrada de sacarosa [100 mg mL ⁻¹]	Agua desionizada	
1	0	0	5	0
2	1	0	4	6
3	2	0	3	12
4	3	0	2	18
5	4	0	1	24
6	5	0	0	30
7	0	2	3	40
8	0	3	2	60

Cálculos

18. Para cada microplaca, determinar el coeficiente de correlación y la pendiente de la curva estándar (El RSQ mínimo debe ser de 0.990).
19. Calcular la absorbancia promedio de los blancos (*Abs blanco*).
20. Calcular la absorbancia promedio de los testigos y de cada muestra (*Abs muestra*).
21. Restar la absorbancia promedio de los blancos a la absorbancia promedio de los testigos y muestras (*Abs corregida*).
22. Calcular la cantidad equivalente de sacarosa en la muestras y testigos con la siguiente fórmula:

$$\text{Sacarosa (\%)} = \frac{\text{Abs corregida}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{Volumen de hidrólisis (mL)}}{\text{Cantidad de muestra (mg)}} \times 100$$

Para el presente protocolo, el volumen de la hidrólisis es de 4 mL y la cantidad de muestra es de 20 mg.

Cuadro 90. Solución a problemas comunes en la determinación de azúcares solubles.

Problema	Solución
No hay desarrollo de color en la reacción	Probar con otro lote de reactivos colorimétricos.
Existen cambios en los valores del factor de la curva/ mediciones de OD para la curva estándar de sacarosa.	Garantizar la calidad de la curva de sacarosa. Asegurar la calidad del ácido sulfúrico. Garantizar la calidad de todos los reactivos. Preparar nuevos. Asegurar que todas las cantidades de reactivos están apropiadamente medidas.
La OD para el blanco de Antrona es muy alta (el valor debe estar en un rango de 0.045-0.06)	Asegurar que el reactivo de Antrona está siendo preparado adecuadamente usando ácido sulfúrico no oxidado. Preparar otro reactivo colorimétrico. Preparar el reactivo de Antrona utilizando otro lote de ácido sulfúrico.
Bajos valores de las muestras de control.	Garantizar que la extracción de las muestras se hace debidamente: <ol style="list-style-type: none"> a. Asegurar que después de la extracción de las muestras, no hay partículas en la pared del tubo. Si es así, agitar la muestra en vórtex y centrifugarla nuevamente durante 10 minutos. a. Asegurar que la extracción se haga a 60-70°C. b. Garantizar la calidad y cantidad de los reactivos utilizados. Garantizar la calidad de la curva de sacarosa: asegurar que la solución concentrada de sacarosa está debidamente disuelta antes de realizar las diluciones. Asegurar la calidad y precisión de las diluciones.
Las mediciones de OD varían demasiado entre repeticiones.	Garantizar la exactitud en el pesado de las muestras. Asegurar que las muestras han sido enfriadas antes de leerlas. Garantizar un buen pipeteo.

Referencias

- (1) Yuanyuan, M.; Yali, Z.; Jiang, L.; Hongbo, S. Roles of plant soluble sugars and their responses to plant cold stress. *J. Biotechnol.* **2010**, 8 (10), 2004–2010.
- (2) Couée, I.; Sulmon, C.; Gouesbet, G.; El Amrani, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* **2006**, 57 (3), 449–459.
- (3) Boriboonsakset, T.; Theerawitaya, C.; Pichakum, A.; Cha-Um, S.; Takabe, T.; Kirdmanee, C. Expression levels of some starch metabolism related genes in flag leaf of two contrasting rice genotypes exposed to salt stress. *Aust. J. Crop Sci.* **2012**, 6 (11), 1579–1586.
- (4) Bailey, R. W. The reaction of pentoses with anthrone. *Biochem. J.* **1958**, 68 (4), 669–672.
- (5) Shettar, M. R. Use of Anthrone Reaction for Determination of Carbohydrates in the Presence of Serum Protein. *Anal. Chem.* **1952**, 24 (11), 1844–1846.



Análisis de calidad de proteína

Jorge González, Miguel Bojorges, Irving Rosas, Rubén Basilio, Luis Galicia, Aide Molina

Determinación de nitrógeno por Technicon Autoanalyzer ii™

Justificación

Las proteínas son esenciales en los sistemas biológicos con funciones estructurales, de transporte, motilidad, defensa, reconocimiento, almacenamiento y la función catalítica que llevan a cabo las enzimas. Poseen propiedades nutricionales y de sus componentes se obtienen moléculas nitrogenadas que permiten conservar la estructura y el crecimiento de quien las consume. Así mismo, son ingredientes de diversos alimentos, y por sus propiedades funcionales ayudan a establecer la estructura y propiedades finales de estos productos¹.

Fundamento

La determinación de nitrógeno se basa en un método colorimétrico en el cual se forma un compuesto de color verde esmeralda por la reacción de amoníaco, salicilato de sodio, nitroprusiato de sodio e hipoclorito de sodio en un medio alcalino (pH de 12.8-13.0.) La mezcla de amoníaco – salicilato es leída a 660 nm². Como referencia se utiliza el método industrial #334-74, 1977 desarrollado para el autoanalizador Technicon II (Figura 191).

Alcance

El método aplica para todo tipo de maíz, cereales, alimentos y otros materiales (modificar variables como el peso de la muestra o el factor asignado para dicho material en el cálculo final). Dos técnicos capacitados pueden analizar de 70 a 80 muestras por día.

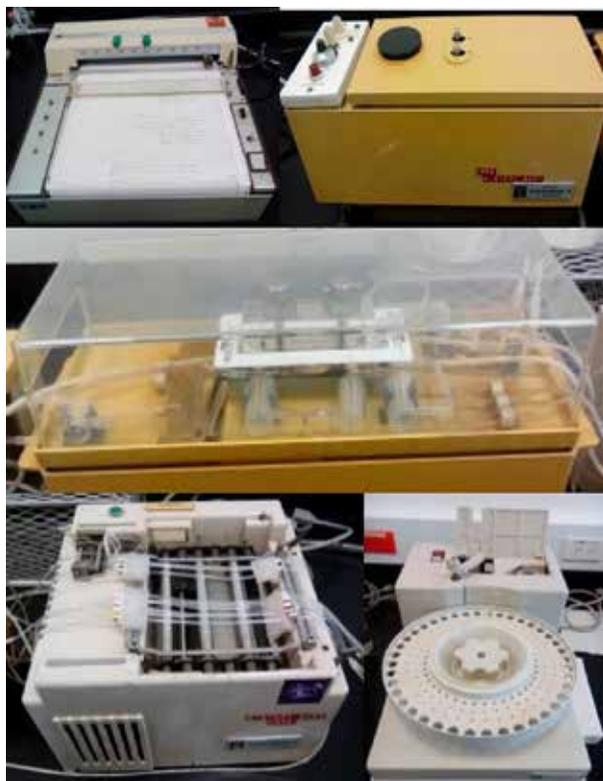


Figura 191. Technicon autoanalyzer II.

Cuadro 91. Material y equipos utilizados en la determinación de nitrógeno.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Campana de extracción	Mínimo 500 cfm	Safeaire o Labconco
Digestor	Para 40 tubos	FOSS 2040
Autoanalizador	N/A	Technicon Autoanalyzer II
Micropipeta	100 – 1000 µL	Eppendorf
Tubos para digestión	75 mL con línea de aforo	Thomas SC
Tubos de vidrio	10 mL	Pyrex
Frascos de vidrio	250, 500 y 1000 mL	Pyrex
Cápsulas para muestreo	2 mL	FOSS

Cuadro 92. Reactivos utilizados en la determinación de nitrógeno.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico (JT Baker, Cat. B5991-18, CAS 7664-93-9).	Usar directamente.	Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla catalítica	Sulfato de Potasio (Merck, Cat. 1.05153, CAS 7778-80-5). Selenio negro (JT Baker, Cat. 1.07714, CAS 7782-49-2).	Homogenizar en polvo: 1 kg de Sulfato de potasio (K_2SO_4) y 5 g de Selenio (Se_2).	Almacenar a temperatura ambiente. Utilizar bajo campana de extracción.
Reactivo 1: Fosfato de sodio/ Hidróxido de sodio	Fosfato de Sodio Anhidro (JT Baker, Cat. 3828, CAS 7558-79-4). Hidróxido de sodio (JT Baker, Cat. 3722-05, CAS. 1310-73-2).	Disolver 35.5 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en 300 mL de agua desionizada y mezclar, a la solución agregar 10 g de NaOH y ajustar a 500 mL. Disolver.	Almacenar a temperatura ambiente. El fosfato de sodio empieza a disolverse cuando se agrega el NaOH.
Reactivo 2: Tartrato de sodio y potasio 0.71M	Tartrato de sodio y de potasio tetrahidratado (Mallinckrodt, Cat. 2367, CAS 6381-59-5).	Disolver 100 g de tartrato de sodio y de potasio en 500 mL de agua desionizada.	Almacenar a temperatura ambiente.
Reactivo 3: Hidróxido de Sodio (NaOH) 5 M	Hidróxido de sodio (JT Baker, Cat. 3722-05, CAS 1310-73-2).	Disolver en baño de hielo 100 g de NaOH en 500 mL de agua desionizada.	Almacenar a temperatura ambiente.
Brij 35	Brij 35 purificado (Pierce, Cat. 20806).	Usar directamente.	
Reactivo 4: Buffer de trabajo		Para 2 L de buffer mezclar en el siguiente orden: 400 mL del reactivo 1, 500 mL del reactivo 2, 500 mL del reactivo 3 y agregar 1 g de Brij 35. Ajustar a 2 L con agua. desionizada.	Almacenar máximo 15 días a temperatura ambiente, protegido de la luz.
Reactivo 5: Salicilato de Sodio/ Nitroprusiato de sodio	Salicilato de sodio (Sigma Aldrich, Cat. S3007, CAS 54-21-7). Nitroprusiato de sodio dihidratado (Merck, Cat. 1.06541, CAS 13755-38-9).	Disolver 300 g de salicilato de sodio en 400 mL de agua desionizada hasta formar una mezcla espesa, a la solución agregar 600 mg de nitroprusiato de sodio. Adicionar 1 g de Brij 35 y ajustar el volumen a 2 L.	Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz. Esperar 5 min antes de conectarlo al flujo de la bomba con los demás reactivos.
Reactivo 6: Cloruro de sodio/ Ácido sulfúrico	Cloruro de sodio (JT Baker, Cat. 3624-05, CAS 7647-14-5). Ácido sulfúrico (JT Baker, Cat. B5991-18, CAS 7664-93-9).	Disolver 200 g de cloruro de sodio en 600 mL de agua desionizada, agregar 15 mL de ácido sulfúrico y ajustar a 2 L. Agregar 2 g de Brij 35.	Almacenar a temperatura ambiente.
Hipoclorito de Sodio 6%	Hipoclorito de sodio (Marca comercial Cloralex).	Mezclar 6 mL de hipoclorito de sodio con agua desionizada y ajustar a 100 mL.	Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.
Sulfato de amonio	Sulfato de amonio granular (JT Baker, Cat. 0792-01, CAS 7793-20-2).	Disolver 1.17 g en 250 mL de agua desionizada.	Almacenar a 4°C.
Estándar Sulfato de amonio 0.02 mg mL ⁻¹		De la solución de sulfato de amonio tomar 2 mL y aforar a 100 mL con la solución de los blancos de la gradilla.	

Diagrama de flujo

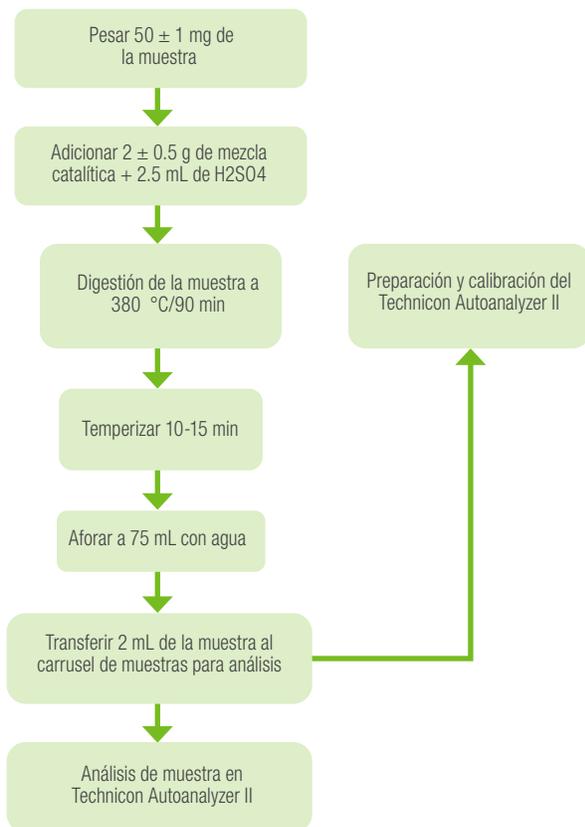


Figura 192. Diagrama de flujo para determinación de proteína.

Procedimiento

Digestión de la muestra

1. Pesar 50 ± 1 mg de la muestra molida y desgrasada. Agregar a un tubo de digestión de 75 mL (asegurar que la muestra llegue al fondo del tubo).
2. Por cada gradilla de muestras, incluir al inicio dos tubos sin muestra (utilizados como blancos) y dos testigos (valor conocido de nitrógeno) por duplicado.
3. Agregar a cada tubo 2 ± 0.5 g de la mezcla catalítica (Figura 193a).
4. Adicionar 2.5 mL de H_2SO_4 concentrado (Figura 193b).

NOTA: Al adicionar el ácido, verificar que baje por las paredes del tubo arrastrando los residuos de mezcla catalítica y muestra que hayan quedado adheridos a las paredes (Figura 193c).

5. Colocar los tubos en el digestor precalentado a $380^\circ C$. Digerir las muestras durante 90 minutos (Figura 193d).
6. Quitar la rejilla con los tubos de digestión y temperar de 10 a 15 min para evitar cristalización de la muestra. La muestra después de la digestión debe de ser totalmente transparente.
7. Adicionar agua destilada hasta la mitad del tubo y agitar en vórtex para diluir perfectamente la muestra. Una vez homogenizada, aforar (75 mL en total) con agua destilada (Figura 194).
8. Colocar la tapa de soporte de los tubos, asegurar que está completamente fija. Cerrar los tubos con un tapón de hule y sujetar la gradilla de los mangos y homogenizar invirtiéndolos 30 veces o hasta que la solución esté completamente homogenizada (Figura 195).
9. Transferir 2 mL de la solución a las cápsulas de muestreo y colocarlas en el carrusel para muestras del analizador Technicon.
10. Colocar las muestras en el siguiente orden (Figura 196):
 - 6 cápsulas con el blanco de la digestión.
 - 4 cápsulas con la muestra estándar de sulfato de amonio 0.02 mg mL^{-1} .
 - 2 cápsulas con el blanco de la digestión.
 - 2 cápsulas con los testigos por duplicado.
 - Colocar una cápsula por muestra.

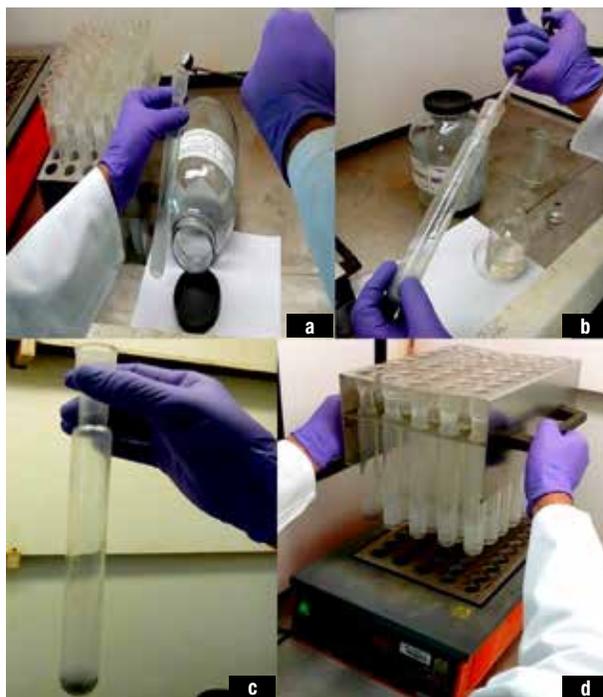


Figura 193. a) Adición de la muestra catalizadora, b) Adición de ácido sulfúrico, c) Mezcla de muestra y catalizador, d) Tubos con muestra en digestor.



Figura 194. Dilución de la muestra digerida.



Figura 195. a) Gradilla de tubos con muestra, b) Tapones de tubos, c) y d) Agitación de la gradilla con tubos.

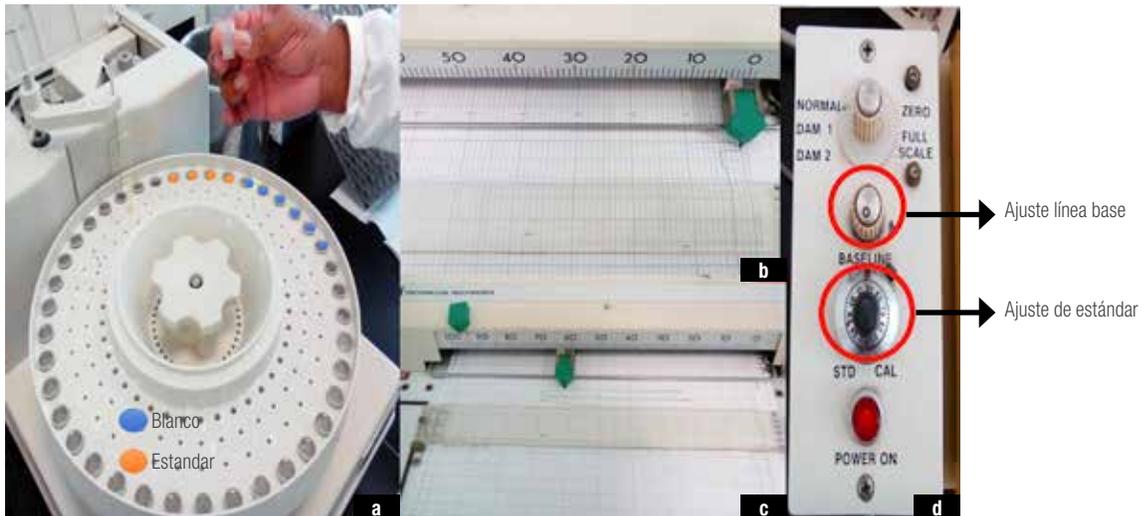


Figura 196. a) Colocación de muestras (blanco y estándar), b) Ajuste de blanco a cero, c) Ajuste de estándar en gráfica a 70%, d) Controles para ajuste de estándar y blanco (línea base).

Análisis de la muestra en el Technicon Autoanalyzer II

11. Verificar que los reactivos (reactivo 4, 5, 6 e hipoclorito de sodio 6%), líneas (roja, negra, gris, amarilla, naranja) y complementos (ácido sulfúrico y agua para enjuague de líneas y aguja) estén disponibles para utilizar el equipo.
12. Encender la bomba de flujo del equipo y hacer un lavado de las líneas con agua destilada. Circular agua por las líneas alrededor de 5 min.
13. Para realizar la reacción colorimétrica en el equipo, colocar las soluciones en cada línea: Reactivo 4 – línea naranja, reactivo 6 – línea roja, hipoclorito de sodio 6% - línea amarilla o naranja, líneas conectada a la trampa de ácido sulfúrico – línea negra y, agua de enjuague de la aguja para tomar muestras – línea gris.
NOTA: Conectar la línea del reactivo 5, transcurridos 5 minutos de la circulación de los reactivos en las líneas con el fin de evitar que se formen sales y tapen los ductos de las líneas.
14. Procesar las primeras 6 cápsulas con el blanco de la digestión y con la perilla de ajuste de línea base (figura 194d) ajustar la aguja a 0. La hoja de impresión de gráficas está rotulada con las unidades de 0 a 100% con intervalos de 10 en 10. En este caso la aguja se debe de ajustar a la línea que corresponde al 0, la cual debe de ser continua.
15. Procesar las 4 cápsulas con la muestra estándar de sulfato de amonio 0.02 mg mL^{-1} y ajustar el pico a 70% con el control de ajuste de estándar (Figura 196d).
16. Dejar dos espacios sin cápsulas y procesar la gradilla: 2 blancos, 4 testigos y las muestras (Figura 197a).
17. Al finalizar el análisis, circular agua destilada en las líneas por alrededor de 20 min. Se inicia por retirar la línea del reactivo 5, dejar circular por 5 min y posteriormente colocar las 3 líneas restantes de los otros reactivos en el agua desionizada para terminar el lavado.

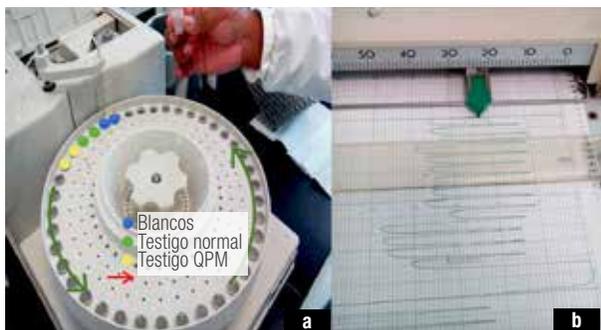


Figura 197. a) Orden de muestras (blancos, testigos y muestras), b) Gráficas de las muestras.

Cálculos para determinación de porcentaje de nitrógeno

1. Calcular la cantidad de nitrógeno amoniacal presente en la dilución:

$$N_2 \text{ (mg)} = \frac{\% T \times 0.02 \text{ mg mL}^{-1}}{70\%} \times 75 \text{ mL}$$

Dónde:

%T = Porcentaje del valor de transmitancia de la muestra en la gráfica.

0.02 mg mL^{-1} = Concentración del estándar sulfato de amonio.

70% = Porcentaje de transmitancia del estándar sulfato de amonio 0.02 mg mL^{-1} en la gráfica.

75 mL = Volumen final de la dilución de la muestra.

2. Calcular el porcentaje de nitrógeno amoniacal de la muestra:

$$\% N_2 = \frac{N_2 \text{ (mg)}}{W} \times 100 \%$$

Dónde:

$N_2 \text{ (mg)}$ = Concentración de nitrógeno amoniacal de la dilución.

W = Peso inicial de la muestra.

El equipo fue calibrado para que una transmitancia del 70% sea equivalente a una concentración de 0.02 mg mL^{-1} del estándar de sulfato de amonio, lo cual permite obtener gráficas definidas para los porcentajes de nitrógeno que normalmente se encuentran en maíz.

Cálculo para la determinación del porcentaje de proteína

La cantidad de proteína se determina mediante el factor asignado para maíz ³:

$$\% \text{ Proteína} = \% N \times 6.25$$

Dónde:

% N_2 = Porcentaje de Nitrógeno obtenido en el cálculo anterior.

6.25 = Factor asignado para el maíz.

Calibración / ajuste de equipo

Este ajuste se realiza cada vez que se preparan nuevos reactivos.

- En el panel de controles, colocar el apuntador en zero y con la perilla de calibración mover poco a poco la aguja de la impresora y situar la línea exactamente en la línea de 0 (Figura 198).



Figura 198. Ajuste de línea en 0.

- Una vez que la línea está en 0, colocar el apuntador en *full scale* y con la perilla de calibración mover poco a poco hasta la línea de 100 (Figura 199).



Figura 199. Ajuste de línea en 100.

- Una vez que se ajustó el intervalo en el que se va a trabajar (0 a 100), girar la perilla del apuntador en *normal* y ajustar la perilla de línea base de la siguiente forma: La perilla de línea base tiene la capacidad para girar 10 vueltas en total, se debe de girar hasta el límite. A continuación, se dan 5 vueltas y se deja inmóvil (Figura 200).

Cuadro 93. Solución a problemas comunes en la determinación de nitrógeno.

Problema	Solución
La línea base es demasiado alta o variable.	Comprobar que todos los reactivos estén siendo bombeados en el sistema. Verificar la preparación y caducidad de los reactivos. Preparar reactivos nuevos.
Cambios en los valores de muestras para verificación.	Pesar correctamente las muestras. Asegurarse de que la digestión se hizo correctamente. Verificar la preparación y caducidad de los reactivos. Preparar reactivos nuevos.
La solución de la digestión es turbia.	Asegurarse de que la muestra y la mezcla catalizadora estén en el fondo del tubo. Al agregar el ácido sulfúrico, hacerlo cuidadosamente y hacer que resbale por las paredes del tubo para que arrastre los residuos de muestra y de mezcla catalítica que pudieron haber quedado en el tubo.
Manchas negras/ amarillas en la solución de digestión.	Revisar la temperatura del bloque de digestión. Verificar que los pozos de digestión estén limpios. Aumentar 20 min al tiempo de digestión.
Después de la digestión la muestra se cristalizó.	No dejar que pasen más de 5 h después de la digestión para diluir la muestra. Poner la muestra en el digester a 100°C por 10 min.



Figura 200. Ajuste de perilla de línea base.

- Cerrar completamente los tornillos A y B. Con el tornillo B manipular la aguja y ajustarla a la línea base de 0 (los movimientos con los tornillos son muy sensibles, ser cuidadoso). Ahora con el tornillo A, subir poco a poco la aguja a la línea en 50, y nuevamente con el tornillo B, regresar a la línea de 0 (el tornillo B queda ligeramente alto que el tornillo A, figura 201).

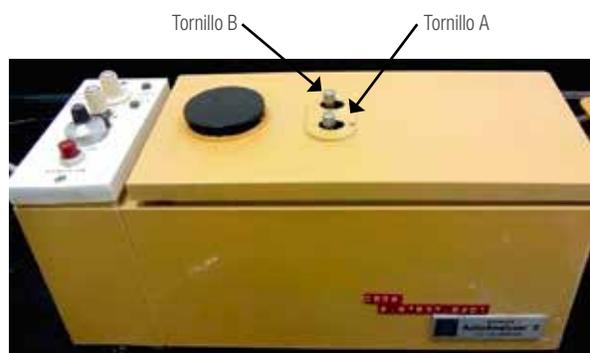


Figura 201. Ajuste con tornillos.

Referencias

- (1) Badui Dergal, S. *Química de los alimentos*; 2006.
- (2) Technicon Industrial Systems. *Technicon Autoanalyzer II, Operation manual*; 1977.
- (3) Mariotti, F.; Tomé, D.; Mirand, P. P. Converting nitrogen into protein--beyond 6.25 and Jones' factors. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48* (2), 177–184.

Determinación de triptófano en maíz utilizando ácido glioxílico en microplaca

Justificación

El maíz es un alimento básico, sin embargo, carece de triptófano, un aminoácido esencial, por lo que constituye una fuente insuficiente de proteína, por esta razón, se han desarrollado líneas mejoradas de maíz, denominadas QPM (Quality Protein Maize por sus siglas en inglés), las cuales tienen el gen *opaque 2*, junto con genes modificadores, que confieren mayores niveles de lisina y triptófano, lo cual ha mejorado el estado nutricional de grupos vulnerables cuyo alimento básico es el maíz y que no pueden comprar alimentos ricos en proteínas para suplementar su dieta. Los materiales QPM deben ser monitoreados durante el mejoramiento. El triptófano sirve como parámetro común para evaluar la calidad nutritiva de la proteína¹⁻⁶.

Fundamento

El grupo indólico del triptófano reacciona con ácido glioxílico en presencia de ácido sulfúrico concentrado y trazas de cloruro férrico (sustancia oxidante) dando un complejo de color púrpura⁷⁻⁹.

Cuadro 94. Material y equipos utilizados en la determinación de triptófano.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg.	Mettler Toledo, AG135
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Microtubos	1.5 mL	Eppendorf
Microplacas	96 pozos	NUNC
Cinta adhesiva de aluminio	5 cm de aluminio	3M
Estufa de incubación	N/A	Barnstead Thermolyne, OV47525
Matraz Erlenmeyer	1 L	Pyrex
Micropipetas	20 – 200 µL y 100 – 1000 µL	Eppendorf
Matraz aforado	500 mL	Pyrex
Lector de microplacas	N/A	Quant BioTek
Agitador de microplacas	De 4 plazas	Cole-Parmer, 2020T4
Tubos de vidrio	10 mL	Pyrex

Cuadro 95. Reactivos utilizados en la determinación de triptófano.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución de acetato 0.1 M. $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Acetato de sodio trihidratado (JT Baker, Cat. 3460, CAS 127-09-3).	Disolver 13.53 g de acetato de sodio en un litro de agua desionizada. Ajustar el pH a 7.	Estable varias semanas si se mantiene a 4°C.
Solución de papaína 1 mg mL ⁻¹	Papaína (Proteoferm 0.10 MCU, Laboratorios MIXIM, CAS 9001-73-4).	Disolver 40 mg de papaína en 40 mL de la solución de acetato de sodio a temperatura ambiente.	Preparar una cantidad mayor a la requerida. Preparar la solución cada vez que se utilice. Asegurarse que el acetato de sodio este a temperatura ambiente. Asegurarse de que el polvo de papaína esté completamente disuelto.
Reactivo A: Ácido sulfúrico 30 N	Ácido sulfúrico (JT Baker, Cat. B5991-18 CAS 7664-93-9).	Colocar un matraz aforado de 1000 mL en hielo y adicionar 166.7 mL de agua desionizada. Lenta y cuidadosamente, agregar 833.3 mL de ácido sulfúrico (96 %) y aforar con agua desionizada.	Preparar en campana de extracción.
Reactivo B: Ácido sulfúrico 7 N	Ácido sulfúrico (JT Baker, Cat. B5991-18, CAS 7664-93-9).	En un matraz aforado de 150 mL, mezclar al mismo tiempo 35 mL de ácido sulfúrico 30 N con 115 mL de agua desionizada y aforar con agua desionizada.	Preparar en campana de extracción.
Reactivo C: Ácido glioxílico 0.1 M	Ácido glioxílico monohidratado (Sigma-Aldrich, Cat. G10601, CAS 563-96-2).	En un matraz aforado de 100 mL, disolver 0.94 g de ácido glioxílico en 50 mL de H_2SO_4 7N. Aforar a 100 mL con la misma solución.	Preparar diariamente. El ácido glioxílico en polvo debe almacenarse en un desecador.
Reactivo D: Cloruro férrico 1.8 mM	Cloruro férrico hexahidratado (Sigma-Aldrich, Cat. F2877-100G, CAS 10025-77-1).	Disolver 0.05 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL del reactivo C en un matraz volumétrico.	Preparar diariamente. Asegurar que se disuelva completamente. El FeCl_3 es altamente higroscópico, por lo que es necesario almacenarlo en un desecador.
Reactivo E: Reactivo colorimétrico	Reactivo A y D	Una hora antes, preparar una mezcla en una proporción 1:1 de los reactivos A y D, dependiendo de las muestras que se vayan a analizar.	Preparar diariamente. Proteger de la luz y del oxígeno; usar un frasco color ámbar.
Solución concentrada de triptófano (100 µg/mL)	DL-Triptófano (Merck, Cat. 1.08375.0025, CAS 54-12-6)	Disolver, con ayuda de un agitador magnético, 10 mg de DL-Triptófano en 100 mL de agua desionizada.	El triptófano en polvo debe almacenarse en un desecador. Preparar cada semana y almacenar a 4°C. Agitar muy bien antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Diagrama de flujo



Figura 202. Diagrama de flujo para determinación de triptófano.

Alcance

El presente método es aplicable a todo tipo de maíz. Un técnico calificado puede procesar hasta 90 muestras por día (análisis por duplicado).

Procedimiento

Hidrólisis de las muestras

1. Rotular tubos eppendorf de 1.5 mL y pesar 30 mg de harina desgrasada de cada muestra. Es importante desgrasar la harina de maíz para mejorar la precisión y la reproducibilidad de los resultados. Cuando no se desgrasan las muestras, se detecta, en promedio, un 0.8% menos de triptófano con este protocolo. Por microplaca se deben incluir dos blancos y testigos de maíz normal y QPM por duplicado. Cada placa debe realizarse por duplicado.
2. Agregar en cada tubo 1.125 mL de la solución de papaína, cerrarlos herméticamente para evitar evaporación durante la incubación.
3. Agitar los tubos en vortex y colocarlos en la estufa de incubación a 65°C durante 16 horas. Las muestras deben ser agitadas trascurrida la primera hora de incubación y una hora antes de terminarla.
4. Transcurridas las 16 h, sacar los tubos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.

5. Agitar los tubos en vortex y centrifugarlos a 14000 rpm durante 5 minutos. Asegurar que no haya partículas en el sobrenadante, si esto ocurre, centrifugar nuevamente.

Reacción colorimétrica

6. Transferir 50 µL del sobrenadante de cada muestra en los pozos de la microplaca (Figura 203).

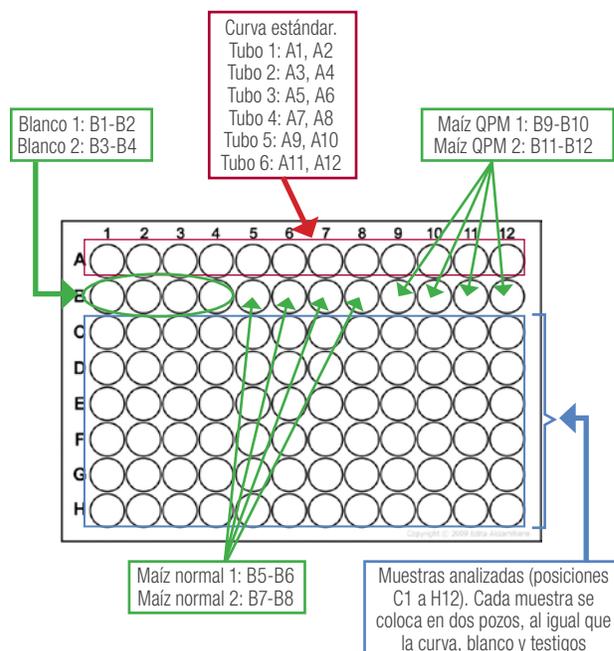


Figura 203. Llenado de microplaca para determinación de triptófano.

7. Agregar 150 µL de la mezcla E (reactivo colorimétrico) en cada pozo. De ser posible, utilizar una pipeta multicanal, esto facilita el proceso y disminuye la variación de los resultados dado que hay menor evaporación del líquido presente en cada pozo.
8. Cubrir la placa con cinta de aluminio y agitarla en el agitador Cole-Parmer de la siguiente manera:
 - a. 1000 rpm durante 10 segundos.
 - b. 400 rpm durante 10 segundos.
 - c. 1000 rpm durante 10 segundos.
9. Colocar la placa en la estufa de incubación a 64°C durante 30 minutos para el desarrollo de color.
10. Sacar la microplaca de la estufa y dejarla reposar a temperatura ambiente durante 25 minutos.
11. Retirar la cinta de aluminio (en la figura 204 se aprecia el desarrollo de color) y leer la absorbancia a 560 nm en el espectrofotómetro de placas (Figura 205).

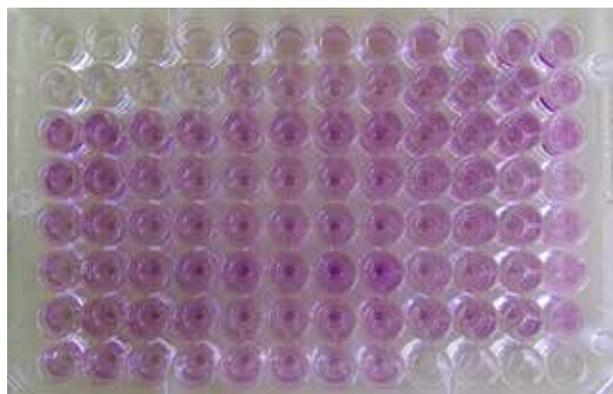


Figura 204. Microplaca de triptófano con color desarrollado.



Figura 205. Lector de microplacas Biotek.

Curva estándar

- Preparar una solución de trp a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua desionizada: Pesar 10 mg de DL-trp y colocarlos en un matraz aforado de 100 mL, agregar 50 mL de agua desionizada y agitar manualmente de 15 a 20 minutos para disolver. Cuando el DL-trp se ha disuelto, se afora a 100 mL con agua desionizada.
- En tubos de vidrio de 10 mL, preparar las diluciones de la solución de trp a 0, 10, 15, 20, 25 y $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de acuerdo al Cuadro 96 y agitar en el vortex para homogeneizar.

Cuadro 96. Elaboración de curva estándar de triptófano.

No. de tubo	Solución concentrada de trp [$100 \mu\text{g mL}^{-1}$] (mL)	Acetato de sodio 0.1 N, pH 7.0 (mL)	Volumen total (mL)	Concentración trp [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
1	0.00	5.00	5	0.0
2	0.50	4.50	5	10.0
3	0.75	4.25	5	15.0
4	1.00	4.00	5	20.0
5	1.25	3.75	5	25.0
6	1.50	3.50	5	30.0

Cálculos

- Para cada microplaca, determinar el coeficiente de correlación y la pendiente de la curva estándar (El RSQ mínimo debe ser de 0.990).
- Calcular la absorbancia promedio de los blancos (Abs blanco).
- Calcular la absorbancia promedio de los testigos y de cada muestra (Abs muestra).
- Restar la absorbancia promedio de los blancos a la absorbancia promedio de los testigos y muestras (Abs corregida).
- Calcular el porcentaje de triptófano en la muestras y testigos con la siguiente fórmula:

$$\%trp = \frac{\text{Abs corregida}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{Volumen de hidrólisis (mL)}}{\text{Cantidad de muestra } (\mu\text{g})} \times 01$$

Para el presente protocolo, el volumen de hidrólisis es de 1.125 mL y la cantidad de muestra es de 30 μg .

NOTA: El resultado obtenido se refiere a la cantidad de trp presente a la muestra y NO al porcentaje del mismo en la proteína.

- Si se cuenta con el dato de proteína de la muestra, se puede calcular el Índice de Calidad de Proteína (representa la proporción de trp en la proteína) de la siguiente manera:

$$IC = \frac{\% trp}{\%proteina} * 100$$

Se utiliza el criterio del Cuadro 97 para considerar QPM a una muestra:

Cuadro 97. Criterios para considerar QPM.

Criterio	Grano entero	Endospermo
Trp (%)	> 0.075	> 0.070
IC	> 0.8	> 0.7

Si no se cuenta con lector de microplacas es posible obtener los resultados a través del método de escalamiento, utilizando la siguiente metodología (Cuadro 98):

Cuadro 98. Escalamiento del método.

Muestra/Reactivo	Método normal	Cantidad sugerida en método escalado
Harina desgrasada	30 mg	80 mg
Solución de papaina	1.125 mL	3 mL
Hidrolizado	50 μL	1 mL
Reactivo colorimétrico	150 μL	3 mL

Cuadro 99. Solución a problemas comunes en la determinación de triptófano.

Problema	Solución
No hay desarrollo de color en la reacción.	Probar otro lote del reactivo colorimétrico. Verificar la calidad de todos los reactivos. Verificar que la temperatura de la estufa de incubación sea la correcta.
La DO del blanco de papaína es demasiado alta o baja (menor a 0.035 o mayor a 0.050).	Comprobar que se está usando la cantidad correcta de papaína. Usar otro lote de papaína.
Los valores de la curva estándar son diferentes a los esperados.	Preparar nuevamente la solución de trp. Preparar nueva solución de papaína. Verificar que la estufa de incubación proporcione la temperatura adecuada.
Las muestras testigo dan valores diferentes a los esperados.	Comprobar que las muestras hayan sido desgrasadas correctamente. Verificar que el tamaño de partícula de la muestra sea homogéneo y adecuado (menor a 0.5 mm). Homogenizar las muestras antes de pesarlas.
Existe demasiada variabilidad de resultados siendo la misma muestra.	Verificar que la placa este limpia. Verificar que las micropipetas se encuentren calibradas. Comprobar que las balanzas se encuentren calibradas. Verificar que el tamaño de partícula de la muestra sea homogéneo y adecuado (menor a 0.5 mm). Comprobar que la muestra se haya desgrasado durante al menos 6 horas.
La papaína no se disuelve	Verificar la calidad y temperatura del agua (el agua debe estar a temperatura ambiente) o la solución de acetato (dependiendo el caso). Comprobar que la papaína sea la correcta.

Referencias

- (1) Vivek, B. S.; Krivanek, A. F.; Palacios-Rojas, N.; Twumasi-Afryie, S.; Diallo, A. O. *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM*; 2008.
- (2) Braham, J. E.; Bressani, R.; Guzman, M. A. Effect of lysine and tryptophan supplementation on nicotinic acid metabolism in pigs given raw or lime-treated corn diets. *Metabolism* **1966**, *15* (6), 548–556.
- (3) Krivanek, A. F.; De Groot, H.; Gunaratna, N. S.; Diallo, A. O.; Friesen, D. Breeding and disseminating quality protein maize (QPM) for Africa. *African J. Biotechnol.* **2007**, *6* (4), 312–324.
- (4) Ortega-Alemán, E. del C.; Coulson-Romero, A. J.; Ordoñez-Argueta, L. I.; Pachón, H. Efectos de la ingesta de maíz de alta calidad de proteína (QPM) versus maíz convencional en el crecimiento y la morbilidad de niños nicaragüenses desnutridos de 1 a 5 años de edad. *ALAN* **2008**, *58* (4), 377–385.
- (5) Shewry, P. R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* **2007**, *46* (3), 239–250.
- (6) Rosales, A.; Galicia-Flores, L. A.; Oviedo, E.; Islas-Caballero, C.; Palacios-Rojas, N. Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for protein, tryptophan, and lysine evaluation in quality protein maize (QPM) breeding programs. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (20), 10781–10786.
- (7) Dakin, H. D. The glyoxilic acid reaction for tryptophan, indol, and skatol. *J. Biol. Chem.* **1907**, *2*, 289–296.
- (8) Horn, M. J.; Jones, D. B. A rapid colorimetric method for the determination of tryptophane in proteins and foods. *J. Biol. Chem.* **1945**.
- (9) Nurit, E.; Tiessen, A.; Pixley, K.; Palacios-Rojas, N. Reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (16), 7233–7238.

Determinación de lisina en harina de maíz

Justificación

La lisina pertenece al grupo de aminoácidos esenciales, es decir, que el organismo humano no la sintetiza por sí mismo, por lo que se necesita adquirir de otros alimentos. El maíz cuenta con una baja concentración de lisina, pero por el consumo diario que se le da en diferentes platillos es posible adquirir una buena proporción y de ésta forma alcanzar la dosis recomendable¹. La lisina tiene diferentes funciones biológicas entre ellas la síntesis de tejidos conectivos en huesos, piel, colágeno y elastina, síntesis de carnitina y la conversión resultante de los ácidos grasos a energía, mantiene el sistema inmune saludable, específicamente la actividad antiviral².

Fundamento

El procedimiento colorimétrico para la cuantificación de lisina se divide en dos etapas. La primera consiste en la protección del grupo α -amino de la cadena de lisina por reacción con el cobre, el cual, también bloquea el grupo amino de los péptidos de bajo peso molecular presentes en el hidrolizado y la segunda etapa consiste en la reacción colorimétrica con el 2 cloro 3, 5 dinitropiridina del grupo Y-dinitropiridil que se determina espectroscópicamente a 390 nm^{3,4}.

Alcance

Es posible analizar hasta 80 muestras por día con la colaboración de 2 técnicos calificados. El método es compatible con cualquier variedad de maíz y otros tipos de materiales que dependiendo su composición deben de modificarse algunas variables.

Cuadro 100. Material y equipos utilizados en la determinación de lisina.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Estufa de incubación	65°C	Thelco Incubator, 51221122
Micropipeta	20-200, 100-1000, 500-5000 µL	Eppendorf
Campana de extracción	Mínimo 500 cfm	Safeaire o Labconco
Centrífuga	3000 rpm.	Centrifuge, 49370X
Potenciómetro	Buffer de calibración pH 4, 7 y 10	Oakton, 2700
Espectrofotómetro	400 nm	Beckman, DU6
Lector de microplacas	400 nm	Bio Tek uQuant
Tubos tipo falcón con tapa	5 mL	N/A
Tubos de vidrio	5 y 10 mL	Pyrex o Kimax
Tapones de hule	#4	N/A
Barra magnética octagonal	N/A	Bel-Art

Diagrama de flujo

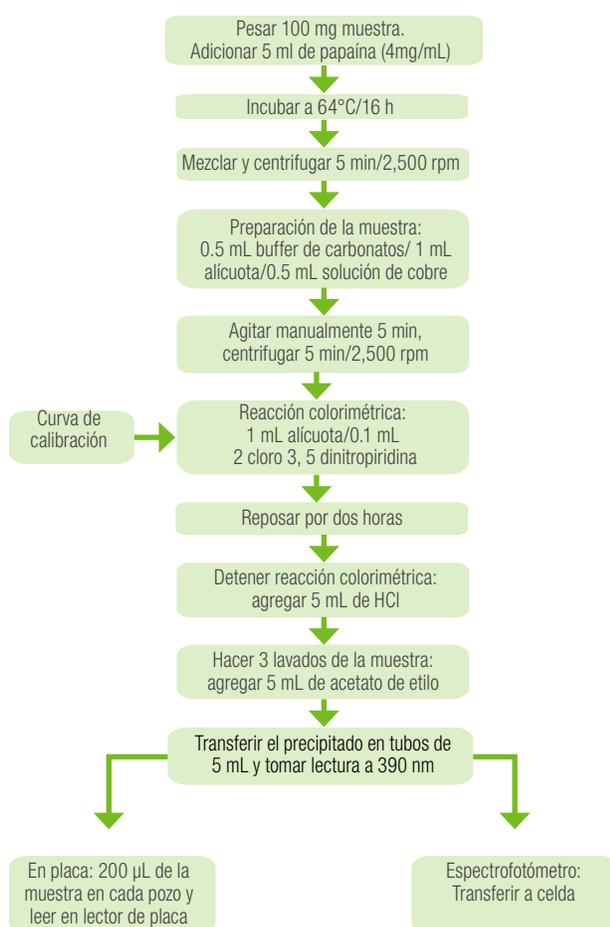


Figura 206. Diagrama de flujo del proceso de determinación de lisina en maíz.

Procedimiento

1. Pesar 100 mg de harina de maíz desgrasada en tubos falcón de 5 mL con tapa, incluir dos blancos y 2 testigos por duplicado (Normal y QPM).
2. Agregar 5 mL de papaína 4 mg mL⁻¹. Mezclar en vortex e incubar por 16 h a 64°C. Mezclar en vortex transcurrida la primera hora y una hora antes de cumplir el periodo de incubación (Figura 207).



Figura 207. Muestra hidrolizada.

3. Transcurrido el tiempo, agitar en vórtex y centrifugar a 2500 rpm por 5 min (centrifugar nuevamente en caso de que aún se tengan partículas de harina en el sobrenadante).
4. En tubos de vidrio de 5 mL agregar en el siguiente orden: 0.5 mL de buffer de carbonatos, 1 mL de alícuota y 0.5 mL de fosfato de cobre (Figura 208).



Figura 208. Adición de la solución de carbonatos.

Cuadro 101. Reactivos utilizados en la determinación de lisina.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución amortiguadora de fosfatos 0.03M, pH 7.4	Fosfato de Sodio dibásico anhidro (JT Baker, Cat. 3828, CAS 7558-79-4). Fosfato de potasio monobásico (JT Baker, Cat. 3246, CAS 7778-77-0).	Para 1000 mL de solución: Disolver 3.19 g de fosfato de sodio en 300 mL de agua destilada. Disolver 1.04 g de fosfato de potasio en 300 mL de agua destilada. Mezclar las soluciones y aforar a un litro. Ajustar pH con HCl.	Almacenar a 4°C.
Papaína 4 mg mL ⁻¹	Papaína (Proteoferm 0.10 MCU, Laboratorios MIXIM, CAS 9001-73-4).	Para 30 tubos: Disolver completamente 800 mg de papaína en 200 mL de la solución amortiguadora de fosfatos.	Preparar solo la cantidad requerida para las muestras a analizar en un día. No almacenar ni reutilizar la solución.
Papaína 5 mg mL ⁻¹	Papaína (Proteoferm 0.10 MCU, Laboratorios MIXIM, CAS 9001-73-4).	Disolver completamente 125 mg de papaína en 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos.	Preparar solo la cantidad requerida para los 5 puntos de la curva de calibración. No almacenar la solución.
Solución amortiguadora de carbonatos 0.6 M, pH 9	Carbonato de Sodio anhidro (JT Baker, Cat. 3602, CAS 497-19-8). Bicarbonato de Sodio (JT Baker, Cat. 3506-05, CAS 144-55-8).	Para 600 mL: Disolver 6.36 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua. En 500 mL de agua destilada disolver 25.2 g de bicarbonato de sodio. Mezclar las soluciones y ajustar el pH.	Almacenar a 4°C.
Solución buffer de boratos 0.05M, pH 9	Borato de Sodio decahidratado (Sigma Aldrich, Cat. S-9640, CAS 1303-96-4).	Para 1000 mL: Disolver 19.07 mL de borato de sodio en 1000 mL de agua desionizada. Ajustar el pH.	Almacenar a 4°C.
Suspensión de fosfato de cobre	Cloruro Cúprico Dihidratado cristal (JT Baker, Cat. 1792-01, CAS 10125-13-0). Fosfato de Sodio tribásico dodecahidratado (JT Baker, Cat. 3836, CAS 1010189-0).	En un matraz aforado de 100 mL agregar 2.8 g de cloruro cúprico y disolver con agua desionizada. En 200 mL de agua desionizada disolver 13.6 g de fosfato de sodio tribásico. Mezclar las soluciones y mantener en agitación por 1 h. Dividir el volumen en 8 tubos para centrifuga (aprox. 37.5 mL por tubo), centrifugar a 2500 rpm por 5 min. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet tres veces con 15 mL de la solución de borato de sodio (cada vez con 15 mL) descartando el sobrenadante. Resuspender el pellet en 10 mL de la solución de boratos, mezclar bien y almacenar la solución.	Almacenar a 4°C.
Ácido clorhídrico 1.2N (HCl)	Ácido clorhídrico (JT Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0).	Para 1000 mL: En un matraz volumétrico agregar 600 mL de agua Millipore y adicionarle poco a poco 172 mL de HCl 37%. Una vez que está a temperatura ambiente aforar a 1 L.	Preparar en campana de extracción. Almacenar a temperatura ambiente. Estable por varias semanas.
Acetato de etilo	Acetato de etilo 99.9% (JT Baker, Cat. 9280, CAS 141-78-6).	Usar directamente.	
Solución 2-cloro-3, 5-dinitropiridina 3% en metanol	2-cloro-3, 5-dinitropiridina (Merck, Cat. 8141340001, CAS 2578-45-2). Metanol (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS. 67-56-1).	Disolver completamente 240 mg de 2 cloro 3, 5 dinitropiridina en 8 mL de metanol.	Preparar diariamente. Preparar solo la cantidad necesaria para analizar muestras en un día. Tomar en cuenta la cantidad para la curva de calibración. Proteger de la luz.
Mezcla de aminoácidos	DL- aminoácidos (Sigma Aldrich, Cat. LAA21-1KT, CAS: Cisteína: 52-89-1. Metionina: 63-68-3. Prolina: 147-85-3. Histidina: 5934-29-2. Alanina: 56-41-7. Isoleucina: 73-32-5. Treonina: 72-19-5. Tirosina: 60-18-4. Glicina: 56-40-6. Fenilalanina: 63-91-2. Valina: 72-18-4. Arginina: 1119-34-2. Serina: 56-45-1. Acido aspártico: 56-84-8. Leucina: 61-90-5. Acido glutámico: 56-86-0).	Pesar las siguientes cantidades: 20 mg de cisteína, 20 mg de metionina, 20 mg de prolina, 30 mg de histidina, 30 mg de alanina, 30 mg de isoleucina, 30 mg de treonina, 30 mg de tirosina, 40 mg de glicina, 40 mg de fenilalanina, 40 mg de valina, 50 mg de arginina, 50 mg de serina, 60 mg de ácido aspártico, 80 mg de leucina, 300 mg de ácido glutámico. Homogenizar la mezcla. De esta mezcla pesar 100 mg y disolverla completamente en 10 ml de la solución amortiguadora de carbonatos.	Almacenar la mezcla en polvo a 4°C. Preparar la cantidad necesaria para la curva de calibración. No almacenar la solución.
Solución concentrada de lisina (1000 µg mL ⁻¹)	L-lisina monoclóhidrato (Sigma Aldrich, Cat. L5626, CAS 657-27-2).	En un matraz aforado de 100 mL, disolver con el buffer de carbonatos 100 mg de lisina.	Preparar cada semana y almacenar a 4°C.

5. Agitar los tubos en la gradilla manualmente con movimientos constantes por 5 min (al ritmo de tocar maracas). Centrifugar a 2500 rpm por 5 min (Figura 209).



Figura 209. Muestra centrifugada.

6. En tubos de vidrio de 20 mL, transferir 1 mL del sobrenadante y adicionar 0.1 mL de 2 cloro 3, 5 dinitropiridina (Figura 210).



Figura 210. Adición de 2 cloro 3, 5 dinitropiridina.

7. Tapar los tubos y agitarlos en la gradilla manualmente. Dejar reposar por 2 h en ausencia de luz. Agitar manualmente cada 30 min (Figura 211).



Figura 211. Reacción colorimétrica después de dos horas de reposo.

8. Al completar las dos horas, adicionar 5 mL de HCl 1.2 N a cada tubo. Mezclar en vortex (Figura 212).

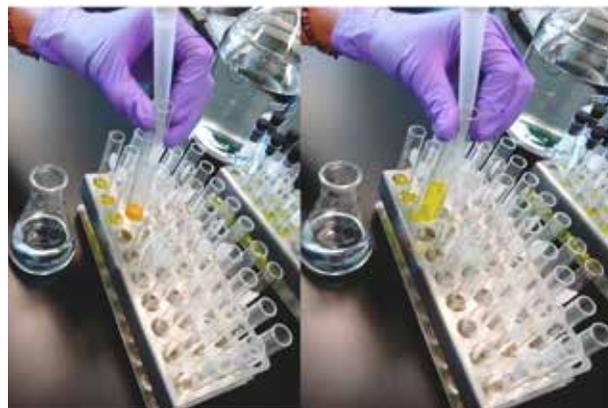


Figura 212. Adición de ácido clorhídrico.

9. A cada tubo agregar 5 mL de acetato de etilo, colocar un tapón de hule (verificar que quede bien tapado) y mezclar la solución invirtiendo los tubos 10 veces.
10. Retirar el sobrenadante con ayuda de una pipeta y descartarlo. Al momento de la absorción del acetato de etilo, tener cuidado de no tomar parte del precipitado (Figura 213).

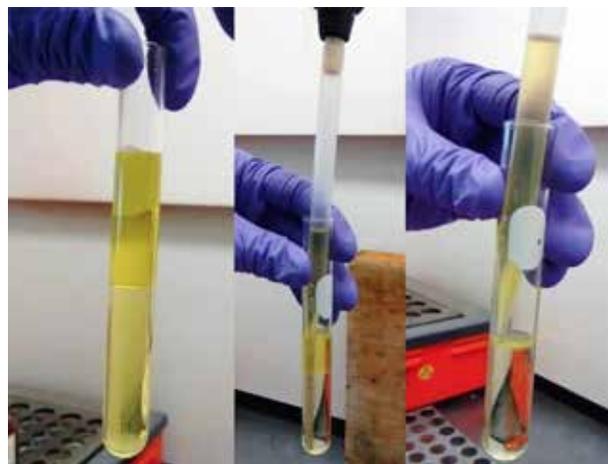


Figura 213. Lavado de la muestra con acetato de etilo.

11. Repetir los pasos 9 y 10 dos veces más. En total deben de ser 3 lavados con acetato de etilo.
12. Tomar lectura en:

Lector de microplaca

En la primera fila transferir 0.2 mL de la curva de calibración (por duplicado) y posteriormente transferir 0.2 mL de las muestras por duplicado en placas NUNC de 96 pozos y tomar lectura en lector de placas a una longitud de onda de 390 nm.

Espectrofotómetro

Ajustar el equipo con los blancos y tomar lectura de cada muestra a 390 nm.

Preparación de la curva de calibración

Preparar una curva de calibración de lisina diluida en buffer de fosfatos en las siguientes proporciones:

Cuadro 102. Curva de calibración de lisina.

Tubo	Solución Lisina 1000 µg Lys mL ⁻¹ (mL)	Solución Carbonatos (mL)	Sol. Papaina 5 mg mL ⁻¹ (mL)	Concentración final lisina
1	0.0	2.0	8	0
2	0.5	1.5	8	50
3	1.0	1.0	8	100
4	1.5	0.5	8	150
5	2.0	0.0	8	200

13. Una vez que se tienen los tubos con las concentraciones de lisina, transferir a tubos de vidrio en las siguientes proporciones:

Cuadro 103. Preparación de la curva de calibración para lisina.

Tubo	Mezcla de aminoácidos en solución amortiguadora de carbonatos 0.6 M pH 9.0 (mL)	Concentración con papaina 5 µg Lys mL ⁻¹ (mL)	Suspensión de fosfato de cobre (mL)
1	0.5	1.0	0.5
2	0.5	1.0	0.5
3	0.5	1.0	0.5
4	0.5	1.0	0.5
5	0.5	1.0	0.5

14. Repetir pasos 5 a 12 del procedimiento para determinación de lisina.

Cálculo de porcentaje de lisina

15. Realizar una gráfica de regresión lineal, correlacionando las concentraciones de la curva de calibración con el promedio de las absorbancias obtenidas. Incluir las líneas de tendencia: intersección y pendiente.

16. Porcentaje de lisina:

$$\% \text{ Lys} = FC \times \text{Abs Net}$$

Dónde:

Abs Net = Absorbancia de la muestra menos el blanco.

FC = Factor curva.

$$FC = \frac{(vi/wi)}{\text{pendiente}} \times 100$$

Dónde:

vi = Volumen inicial de la hidrólisis en mL.

wi = Peso inicial de la muestra en µg.

pendiente = Se obtiene a partir de la ecuación lineal.

Es posible hacer la determinación de lisinas escalando el método de acuerdo a las siguientes cantidades:

Cuadro 104. Método escalado para determinación de lisina.

Muestra/Reactivo	Método normal	Cantidad sugerida en método escalado
Harina desgrasada	100 mg	100 mg
Solución de papaina 4mg/g	5 mL	5 mL
Buffer de carbonatos	0.5 mL	125 µL
Alícuota	1 mL	250 µL
Solución de cobre	0.5 mL	125 µL
Alícuota	1 mL	250 µL
2 cloro 3, 5 dinitropiridina	0.1 mL	25 µL
Ácido clorhídrico	5 mL	1.250 mL
Acetato de etilo	5 mL	300 µL

Cuadro 105. Solución de problemas en la determinación de lisina.

Problema	Solución
No hay reacción colorimétrica.	Analizar con reactivos nuevos. Verificar la calidad de los reactivos. Verificar la temperatura de incubación.
La absorbancia de los blancos es alta o baja.	Verificar la cantidad de papaina que se agregó a la solución. Utilizar papaina nueva.
Los valores de los controles son bajos.	Verificar que la hidrólisis de las muestras se hizo correctamente: a) Después de la centrifugación hay partículas de muestra en las paredes del tubo. Mezclar y centrifugar nuevamente. b) Verificar que la incubación se hizo con las condiciones correctas (64 °C por 16 h). Verificar la calidad y cantidad de los reactivos utilizados. Verificar la calidad de la curva estándar de lisina. a) La solución de lisina se disolvió correctamente antes de hacer la dilución. b) Mezclar perfectamente la solución de lisina antes de hacer las diluciones. c) Preparar una nueva solución madre de lisina.
La absorbancia entre duplicados tiene una desviación muy amplia.	Verificar el peso exacto de las muestras. Verificar que los duplicados se hicieron con los mismos reactivos. Verificar que las muestras están a temperatura ambiente antes de tomar lectura. Ajustar nuevamente el espectrofotómetro a cero y verificar que es estable para leer las muestras.
La papaina no se disuelve.	Verificar que la solución buffer está a temperatura ambiente.

Referencias

- (1) Levetin, E.; McMahon, K. Human Nutrition. *Plants Soc.* **2008**.
- (2) Alternative Medicine Review. L-Lysine. **2007**, 12 (2), 169–172.
- (3) Tsai C.Y., Hansel L.W., Nelson, O. E. A colorimetric method of screening maize seeds for lysine content. American Association of Cereal Chemists 1972.
- (4) Villegas, E.; Mertz, E. T.; Internacional, C.; Maiz, D. E. M. D. E. Métodos químicos usados en el CIMMYT para determinar la calidad de la proteína del maíz. **1971**, No. 20.

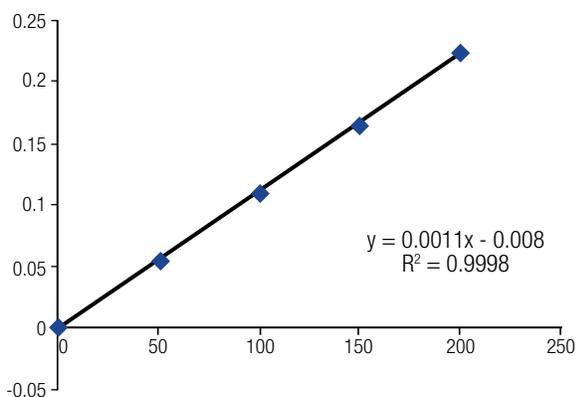
Anexo 1

Ejemplo de cálculos para la determinación de lisina

1. En un cuadro colocar las concentraciones de la curva de calibración y las absorbancias obtenidas en su muestreo. Calcular el promedio y después el promedio neto restando el blanco a cada muestra.

[] LYSINE	ABS A	ABS B	AVERAGE	AVERAGE NET
0	0.147	0.140	0.1435	0.000
50	0.198	0.199	0.1985	0.055
100	0.253	0.255	0.254	0.110
150	0.309	0.309	0.309	0.165
200	0.368	0.368	0.368	0.224

2. Con la tabla anterior hacer la gráfica de correlación lineal, relacionando las concentraciones de lisina contra el promedio neto. Agregar la ecuación lineal y la correlación.



3. Cálculo para obtener el factor de la curva. Este factor se obtiene dividiendo el volumen inicial de la hidrólisis en mL entre el peso inicial de la muestra en μg , el cociente es multiplicado por 100 y el producto se divide entre la pendiente (de la ecuación lineal):

$$FC = \frac{\left(\frac{5 \text{ ml}}{100,000 \mu\text{g}}\right)}{0.0011} \times 100$$

$$FC = \frac{0.005}{0.0011} \times 100$$

$$FC = 4.5454$$

4. Para el control de resultados, hacer una tabla que incluya la identificación o número de muestra, absorbancia del valor A y B y el promedio neto de estos valores (resultado de la resta de la absorbancia del blanco menos la absorbancia de cada muestra) y el porcentaje de lisina (se multiplica la absorbancia neta de cada muestra por el factor curva).

	ABS A	ABS B	AVERAGE	ABS NET	% LYSINE
BLANCO	0.109	0.111	0.110	0.109	
BLANCO	0.110	0.109	0.109		
NORMAL	0.169	0.175	0.172	0.062	0.283
NORMAL	0.173	0.174	0.173	0.063	0.289
QPM	0.200	0.201	0.200	0.090	0.412
QPM	0.199	0.199	0.199	0.089	0.405
1	0.193	0.187	0.190	0.080	0.364
2	0.188	0.190	0.189	0.079	0.360
3	0.184	0.180	0.182	0.072	0.328
4	0.175	0.175	0.175	0.065	0.296

$$\% \text{ Lys} = 4.5454 \times 0.0623$$

$$\% \text{ Lys} = 0.2830$$



Análisis de micronutrientes y minerales

Alejandra Miranda, Bertha Pérez, Dionicio Zavala, Aldo Rosales, Irving Rosas, Luisa Cabrera

Cuantificación de carotenoides en harina de maíz por UPLC

Justificación

El maíz es un alimento básico de la población mundial¹. Particularmente el maíz amarillo es el único cereal con altas cantidades de carotenoides, importante en las actividades biológicas de animales y en humanos debido a sus propiedades antioxidantes, nutricionales y de pigmentación². Los carotenoides aumentan la respuesta inmune y reducen el riesgo de padecer enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular³.

En la naturaleza existen cerca de 700 carotenoides donde alrededor de 50 son precursores de vitamina A (provA)⁴. En maíz, estos carotenoides incluyen al β -caroteno, β caroteno y β -criptoxantina^{1,3} y han sido el campo de acción de los mejoradores para incrementar su contenido y disponibilidad; de ahí la importancia en la exactitud de los ensayos analíticos para carotenoides, especialmente para el β caroteno¹.

Fundamento

El método de extracción de carotenoides se basa en una separación líquido-líquido, donde en principio, una mezcla de etanol con butil hidroxitolueno (BHT) como antioxidante es adicionada a la muestra para desnaturalizar las proteínas⁵. Así mismo, se lleva a cabo una saponificación con hidróxido de potasio (KOH) para reducir la cantidad de lípidos presentes en

el extracto, los cuales interfieren con la separación cromatográfica de los carotenoides y acortan la vida útil de la columna^{6,3}. La adición de agua posterior a esta etapa, es necesaria para evitar la formación de una emulsión³.

Dentro de los solventes ampliamente utilizados para la extracción o partición, se encuentra el hexano, el cual permite la separación, sin necesidad de agitación, de los carotenoides en la fase orgánica mientras que la fase acuosa es descartada. El bajo punto de ebullición del hexano permite que éste sea removido fácilmente por evaporación para realizar, enseguida, el análisis cromatográfico³. Típicamente, las muestras alimenticias contienen tanto carotenos apolares como xantofilas polares, por lo que el proceso cromatográfico debe ser capaz de hacer frente a este intervalo de polaridades⁷.

Alcance

Aplicable para maíz híbrido y criollo amarillo, tanto en grano completo como en endospermo y productos derivados del procesamiento de este cereal. Es posible analizar 50 muestras en 8 horas.

Condiciones cromatográficas

- Sistema Acquity UPLC con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample manager, Detector de Diodos (PDA).
- Fase Móvil A (A2): Solución acuosa de acetato de amonio 10 mM:2-propanol (90:10, v/v).
- Fase Móvil B (B1): Acetonitrilo:2-Propanol (90:10, v/v).
- Solución de lavado débil: Agua:Metanol (90:10, v/v).

Cuadro 106. Material y equipos utilizados en la cuantificación de carotenoides por UPLC.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Matraces volumétricos	100 y 250 mL	Pyrex o KIMAX
Probetas graduadas de vidrio	100, 500 y 1000 mL	Pyrex o KIMAX
Pipetas Pasteur de vidrio	3 mL	Corning
Bulbos de goma	5 mL	Thomas Scientific
Tubos de plástico de fondo cónico (sin tapa)	15 mL	Corning
Tubos de vidrio con tapón de rosca	15 mL	Pyrex o KIMAX
Celda UV de cuarzo	10 mm de espesor interior 45 mm de altura 12.5 mm de espesor exterior	N/A
Acrodiscos	Material de celulosa regenerada (GHP) o de teflón (PTFE), con diámetro de poro de 0.22 mm	Agilent o PALL
Jeringas de vidrio	5 mL con luer lock central. Fortuna Optima	Sigma-Aldrich. Cat. Z314544-10EA
Viales para HPLC	Vidrio. Dimensiones de 12 x 32 mm. Recobro total	Waters. No. parte 186000384c
Tapones para viales HPLC	Tapón de rosca y septum de silicona PTFE pre-perforado. Dimensiones de 12 x 32 mm	Waters. No. parte 186000305
Dispensador	10 mL	Dispensette, S4600140
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG64
Baño María (digital)	2 L, con intervalo de temperatura de 5 a 100 C. Calentador de 300 W	Polyscience
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Centrífuga	Velocidad de 200 a 3750 rpm. Temperatura de trabajo 20°C. Rotor SX4750 (número de tubos x capacidad nominal de 4 x 750 mL)	Beckman Coulter, Allegra X-12
Evaporador con vacío SpeedVac	Cabezal par 10 tubos de 15 mL	Thermo Scientific Savant, SPD121P
Evaporador con nitrógeno gaseoso	45 agujas de suministro de nitrógeno	Organomation Associates Inc.
Espectrofotómetro	Longitud de onda de 190-1100 nm. Exactitud de longitud de onda ± 1 nm. Lámpara de deuterio (UV) y tungsteno (visible). Intervalo de medición de absorbancia de 0.3-3.0 A. Celda de cuarzo o sílice de 1 cm.	Beckman Coulter, DU 530
Sistema de agua desionizada ultra purificada	Agua ultrapura tipo 1. TOC ≤ 5 ppb	Millipore, Direct-Q3UV
Sistema de filtración con bomba de vacío	N/A	Millipore
Sonicador	Capacidad de 1 L	Branson, 2510
Cromatógrafo	Con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample Manager y Detector de Diodos (PDA) y UV-VIS	Waters, Acquity UPLC

- Solución de lavado fuerte: Metanol:Agua (90:10, v/v).
- Tiempo de corrida = 10 min.
- Flujo= 0.3 mL min⁻¹.
- Temperatura de la columna = 35°C.
- Temperatura del automuestreador: 10°C.
- Volumen de inyección = 2 μ L.
- Volumen de inyección del estándar de recuperación= 0.8 μ L.
- Longitud de onda = 450 nm.
- Precolumna: Acquity UPLC Col. In-Line Filter.
- Columna: Acquity UPLC BEH C8, 1.7 μ m 2.1x100 mm (Colum Part No. 186002878. Waters).

El coeficiente de variación entre las tres inyecciones del apocaroteno debe ser menor al 5 % (CV < 5.0).

Cuadro 108. Sistema gradiente para el análisis de carotenos por UPLC.

Tiempo	% A	% B	Curva
0	30	70	6
2.0	30	70	6
2.5	13	87	6
6.0	13	87	6
6.5	3.5	96.5	6
9.5	3.5	96.5	6
10	30	70	6

Límite de Cuantificación: Lo establece el área obtenida del volumen de inyección de 0.1 μ L de cada carotenoide.

Diagrama de flujo

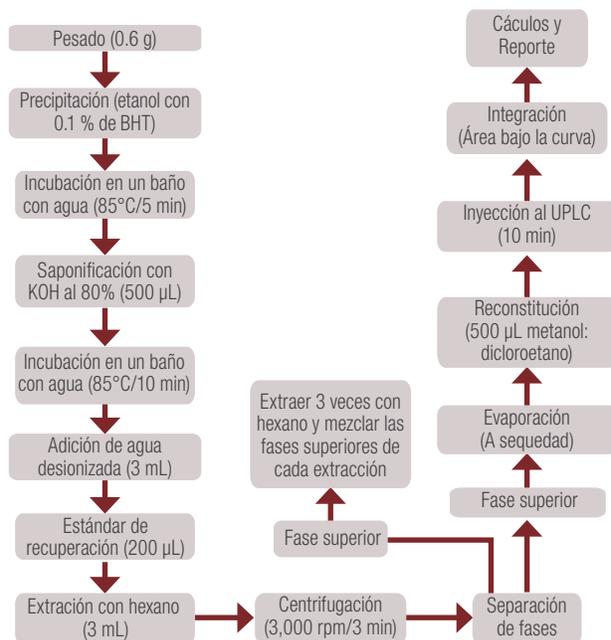


Figura 214. Diagrama de flujo para el análisis de carotenoides por UPLC.

Cuadro 107. Reactivos utilizados en la cuantificación de carotenoides por UPLC.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol con 0.1 % de BHT	Etanol absoluto (Meyer, Cat. 0390, CAS 64-17-5). 2,6 di-terbutil-4-metil fenol, pureza \geq 99 % (Sigma Aldrich, Cat. B1378, CAS 128-37-0).	Disolver 250 mg de BHT en 100 mL de etanol. Aforar a 250 mL.	Estable durante 1 semana a temperatura ambiente.
Metanol con 0.01 % de BHT	Metanol HPLC, pureza $>$ 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). 2,6 di-terbutil-4-metil fenol, pureza \geq 99 % (Sigma Aldrich, Cat. B1378, CAS 128-37-0).	Disolver 25 mg de BHT en 100 mL de metanol. Aforar a 250 mL.	Estable por 1 semana a temperatura ambiente
Hidróxido de potasio al 80%	Hidróxido de potasio (Merck, Cat. 1.05033, CAS 1310-58-3). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Disolver 80 g de hidróxido de potasio en 50 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL.	Preparar la solución en baño de hielo, debido a que al disolverse la sosa se genera calor. (Reacción exotérmica)
Estándar de recuperación (apocaroteno)	β -apo-8'-carotenal (trans) pureza \geq 96% UV (Sigma Aldrich, Cat. 10810, CAS 1107-26-2). Metanol HPLC, pureza $>$ 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1).	Ver Preparación de estándar de recuperación	Estable por 2 semanas a 4°C.
Agua desionizada	Agua obtenida directamente del sistema Direct-Q3UV millipore	La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 μ S/cm a 25°C.	
2-propanol	2-propanol, pureza \geq 99.5 %, (J.T. Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0).		Manipular dentro de una campana de extracción.
Hexano grado HPLC	Hexano, pureza \geq 95 %, CHROMASOLV para HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 270504, CAS 110-54-3).		Manejarlo dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Fase móvil A2: Solución de acetato de amonio 10 mM: 2-propanol (90:10)(v/v)	2-propanol (JT Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0). Acetato de amonio (Merck, Cat. 101116, CAS 631-61-8). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	En un frasco de vidrio de 500 mL disolver 0.3854 g de acetato de amonio en 450 mL de agua. Adicionar 50 mL de 2-propanol. Homogenizar.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 μ m y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 semana a temperatura ambiente.
Fase móvil B1: Acetonitrilo:2-Propanol (90:10)(v/v)	2-propanol (JT Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0). Acetonitrilo, pureza $>$ 99 % (Merck, Cat. 100030, CAS 75-05-8).	Medir 450 mL de acetonitrilo y transferirlos a un frasco de 500 mL. Adicionar 50 mL de 2-propanol. Homogenizar.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 μ m y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 semana a temperatura ambiente.
Metanol: 1,2-dicloroetano (50:50) (v/v) †	Metanol HPLC, pureza $>$ 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). 1,2-dicloroetano, pureza $>$ 99 %, CHROMASOLV HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 34872, CAS 107-06-2).	Mezclar 250 mL de 1,2-dicloroetano con 250 mL de metanol en un frasco de 500 mL y mezclar.	Estable por una semana a temperatura ambiente.
Estándares de carotenoides	β -Carotene (Carotene Nature β , β -Carotene HPLC 96 % , synth., cryst. Cat. 0003). β -Cryptoxanthin (Carotene Nature (3R)- β , β -Caroten-3-ol) HPLC 97 % , synth., cryst. Cat. 0055). Lutein (Carotene Nature, (Xanthophyll, (3R,3'R,6'R)- β , ϵ -Carotene-3,3'-diol) HPLC 94 % , isolated, cryst. Cat. 0133). Zeaxanthin ((3R,3'R)- β , β -Carotene-3,3'-diol HPLC 97% , synth., cryst. Cat. 0119).	Ver preparación de curva de calibración.	Mantenerlos a -80°C hasta su uso, protegidos de la luz.
Solución de lavado débil: Agua: Metanol (90:10) (v/v)	Metanol HPLC, pureza $>$ 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 900 mL de agua con 100 mL de metanol grado HPLC en un frasco de 1L. Homogenizar.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 μ m y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 mes a temperatura ambiente.
Solución de lavado fuerte: Metanol: Agua (90:10) (v/v)	Metanol HPLC, pureza $>$ 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 900 mL de metanol grado HPLC con 100 mL de agua en un frasco de 1L. Homogenizar.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 μ m y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 mes a temperatura ambiente.

Procedimiento

Curva de calibración

Idealmente, la curva de calibración se debe realizar cada vez que se lleva a cabo un análisis cromatográfico, sin embargo, es posible realizar esta actividad al menos cada seis meses.

Preparación de los estándares

1. Retirar del refrigerador o congelador cada uno de los estándares y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
2. Reconstituir cada estándar con 5 mL de 2-propanol de la siguiente manera:
 - a. Adicionar 200 μ L de 2-propanol al vial que contiene el estándar, mezclar y trasvasar a un vial debidamente identificado.
 - b. Repetir el paso anterior hasta que el 2-propanol sea incoloro (aproximadamente 5 veces).

NOTA: Realizar este proceso con extremo cuidado ya que cada estándar contiene únicamente 1 mg de material.

 - c. Adicionar el 2-propanol necesario para obtener los 5 mL, la concentración final del estándar es de 200 mg mL^{-1} .
3. Tomar 500 μ L de cada estándar y transferirlos a un tubo de vidrio de 15 mL. Adicionar 1 mL de agua desionizada, 3 mL de metanol HPLC y 3 mL de hexano.
4. Agitar en vórtex y esperar a que se lleva a cabo la separación de fases.
5. Transferir la fase superior, con una pipeta Pasteur, a un tubo etiquetado y limpio para cada uno de los estándares.
6. Agregar nuevamente 3 mL de hexano a la fase inferior, agitar con ayuda del vórtex y esperar a que se lleve a cabo la separación de las fases.
7. Transferir la fase superior al tubo que contiene la fase previamente separada. Realizar esta extracción 3 veces (volumen final de 9 mL).
8. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm la absorbancia de cada uno de los estándares, para determinar la concentración inicial (stock).
9. Utilizar el hexano como blanco y los siguientes coeficientes de extracción para calcular la concentración.

Coefficiente de Extinción para los carotenoides utilizados (E1 %)

- Luteína E1%= 2550
- Zeaxantina E1%= 2348
- β -criptoxantina E1%= 2550
- β -caroteno E1%=2592

Cuadro 109. Concentraciones y absorbancias de los estándares después de la extracción con hexano (solución stock).

Estándar	Absorbancia aprox. en hexano	Concentración aprox. de la solución stock (ng L^{-1})
Luteína	2.168-2.384	8501960
Zeaxantina	0.748-0.872	3185689
β -criptoxantina	2.505-2.479	10486169
β -caroteno	2.602-2.565	9637037

10. Evaporar cada una de las soluciones hasta sequedad con ayuda del SeepVac o evaporador de nitrógeno por 40-50 min.
11. Reconstituir con 2 mL de metanol: 1,2-dicloroetano (50:50, v/v).
12. Leer la absorbancia y utilizar como blanco la mezcla de metanol:1,2-dicloroetano (50:50, v/v).

El valor aproximado para Luteína, β -criptoxantina y β -caroteno será una absorbancia de 2.0. Para la zeaxantina el valor aproximado será de 1.0 o menor de 1.0.
13. Diluir con metanol:1,2-dicloroetano (50:50, v/v) cada estándar para obtener una absorbancia de 1.0 (Solución 1).
14. Etiquetar un vial y trasvasar la Solución 1 de cada estándar para colocarlo en el automuestreador del UPLC.
15. Diluir con metanol: 1,2-dicloroetano la Solución 1 para obtener una absorbancia de 0.1 (Solución 2).
16. Etiquetar un vial y trasvasar la Solución 2 de cada estándar para colocarlo en el automuestreador del UPLC.

Cuadro 110. Concentraciones y absorbancias de cada uno de los estándares después de la evaporación y reconstitución con metanol:1,2-dicloroetano.

Estándar	Absorbancia de la Solución 1	Concentración aprox. de la Solución 1 (ng L^{-1})	Absorbancia de la Solución 2	Concentración aprox. de la Solución 2 (ng L^{-1})
Luteína	1.182	4650980.39	0.152	596078.431
Zeaxantina	0.748	4582623.51	0.193	797316.865
β -cripoxantina	0.947	3968985.75	0.188	787929.589
β -caroteno	1.040	3851851.85	0.193	744598.765

Ejemplo:

Solución de β -caroteno

- Adicionar 2 mL de metanol:1,2-dicloroetano (50:50, v/v) a la solución stock. Leer la absorbancia. Si la absorbancia es de 2.0, adicionar 3 mL de metanol: 1,2-dicloroetano (50:50, v/v).
 - Leer la absorbancia.
 - Adicionar 2 mL de metanol:1,2 dicloroetano (50:50, v/v) a la *Solución 1*. Leer la absorbancia. Si la absorbancia es mayor de 0.1, adicionar más solvente.
- Inyectar al cromatógrafo la Solución 1 y la Solución 2 de cada uno de los estándares, con los siguientes volúmenes de inyección: 0.1 μ L, 0.5 μ L, 1.0 μ L, 3.0 μ L, 4.0 μ L y 5.0 μ L. *Para luteína y zeaxantina, solo inyectar hasta el volumen de 3.0 μ L.*
 - Graficar, para cada carotenoide, el área bajo la curva obtenida de cada volumen de inyección contra los respectivos nanogramos de carotenoide encontrados en dicho volumen inyectado, tal como se muestra en el Cuadro 110 y la figura 215 para el caso del β -caroteno.

Preparación del estándar de recuperación (apocaroteno)

- Retirar del congelador de -20°C el apocaroteno y permitir que alcance la temperatura ambiente (alrededor de 1 h).
 - Disolver 1 mg de apocaroteno en 10 mL de metanol con 0.01 % de BHT (*Solución 3*) en un tubo de vidrio de 15 mL.
 - Tomar 1 mL de la solución anterior y diluirla con 14 mL de metanol con 0.01 % de BHT, para obtener un volumen final de 15 mL (*Solución 4*).
 - Medir la absorbancia de la *Solución 4* en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 450 nm. La respuesta del apocaroteno diluido (*Solución 4*) se debe encontrar entre 0.8-0.84 de absorbancia. Si la absorbancia es mayor, realizar la dilución correspondiente.
- NOTA: La solución 3 y la solución 4 son estables por 2 semanas si se almacenan a una temperatura entre 2 y 4°C .

Extracción y cuantificación de carotenos⁸

- Pesar 600 mg de harina y depositarla en un tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca.
- Adicionar 6 mL de etanol con 0.1 % de BHT como antioxidante y agitar en vórtex.

Cuadro 111. Datos necesarios para la construcción de la curva de calibración del β -caroteno.

Estándar	Longitud de onda (nm)	E1%	Absorbancia	Concentración (g 100 mL ⁻¹)	Concentración (ng L ⁻¹)
β -caroteno (Solución 1)	445	2592	1.574	0.00060725	6072530.86
β -caroteno (Solución 2)	445	2592	0.189	7.2917E-05	729166.667

Absorbancia	Vol iny (μ L)	Estándar	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva	ng de carotenoide
0.193	0.1	β -caroteno	8.75	687	0.073
0.193	0.1	β -caroteno	8.75	557	0.073
0.193	0.5	β -caroteno	8.75	5267	0.365
0.193	0.5	β -caroteno	8.75	5437	0.365
0.193	1	β -caroteno	8.75	14409	0.729
0.193	1	β -caroteno	8.85	14556	0.729
0.193	3	β -caroteno	8.76	60614	2.188
0.193	3	β -caroteno	8.76	60342	2.188
0.193	4	β -caroteno	8.75	83897	2.917
0.193	4	β -caroteno	8.76	83725	2.917
0.193	5	β -caroteno	8.75	103492	3.646
0.193	5	β -caroteno	8.76	103200	3.646
1.04	0.1	β -caroteno	8.75	21250	0.583
1.04	0.1	β -caroteno	8.75	21751	0.583
1.04	0.5	β -caroteno	8.76	109893	2.915
1.04	0.5	β -caroteno	8.76	108180	2.915
1.04	1	β -caroteno	8.76	227318	5.830
1.04	1	β -caroteno	8.76	224748	5.830
1.04	3	β -caroteno	8.76	679374	17.489
1.04	3	β -caroteno	8.76	682010	17.489
1.04	4	β -caroteno	8.76	903670	23.319
1.04	4	β -caroteno	8.76	917528	23.319
1.04	5	β -caroteno	8.76	1087817	29.148
1.04	5	β -caroteno	8.76	1087032	29.148

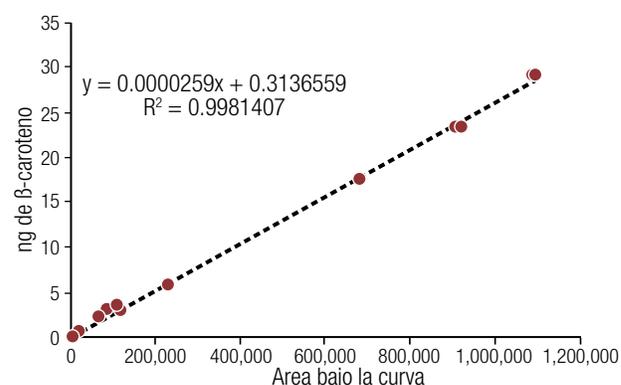


Figura 215. Curva de calibración para el β -caroteno.

3. Incubar las muestras a 85°C durante 5 minutos en baño María.
4. Retirar los tubos de la incubación y adicionar 500 µL de hidróxido de potasio al 80 %. Agitar en vórtex.
5. Incubar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 85°C. Transcurridos los primeros 5 minutos, retirar los tubos del baño, agitarlos en vórtex e introducirlos de nueva cuenta en el baño hasta completar los 10 minutos de incubación. Retirar los tubos y colocarlos en un recipiente con hielo triturado.
6. Adicionar a cada tubo 3 mL de agua desionizada fría y agitar en vórtex.
7. En campana de extracción, agregar 3 mL de hexano a cada tubo y agitar en vórtex hasta diluir completamente el gramo de harina.
8. Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 3 minutos.
9. Con una pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante (fase superior) a un tubo limpio y debidamente etiquetado. Mantener dichos tubos en hielo y bien tapados.
10. Repetir los pasos 7, 8 y 9 dos veces más (se obtiene un volumen aproximado de 9 mL).
11. Evaporar totalmente los sobrenadantes obtenidos en el punto 9 utilizando el Speed Vac (aproximadamente 50 minutos a 35°C y presión de vacío de 2.5 psi). Culminada esta etapa, cubrir inmediatamente los tubos con sus respectivos tapones.

NOTA: Las muestras evaporadas son estables hasta 48 h si se mantienen a -20°C.

1. Reconstituir la muestra evaporada adicionando 500 µL de metanol: 1,2-dicloroetano (50:50).
2. Filtrar las muestras con acrodiscos de 0.22 µm y recibir el filtrado en viales etiquetados para su inyección al UPLC.
3. Al concluir el análisis en el cromatógrafo, integrar cada uno de los picos de interés obtenidos en el cromatograma para determinar el área bajo la curva (Figura 216).
4. Realizar los cálculos con base a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración y reportar la concentración obtenida.

NOTA: Las muestras reconstituidas no son estables después de 24 h.

Eficiencia de extracción

Para determinar la eficiencia de extracción para los carotenoides, a cada muestra se le agregan 200 µL de apocaroteno después de la hidrólisis; se realiza el proceso de extracción y se compara el área obtenida con la encontrada para el apocaroteno puro. Con esto, se obtiene un valor denominado eficiencia de extracción (EE), cuyo intervalo de aceptación es entre 80 y 110 %.

Secuencia de inyección al sistema cromatográfico

1. Blanco (solución de metanol:1,2-dicloroetano, 50:50, v/v): 1 inyección.
2. Estándar de recuperación (apocaroteno): 3 inyecciones.

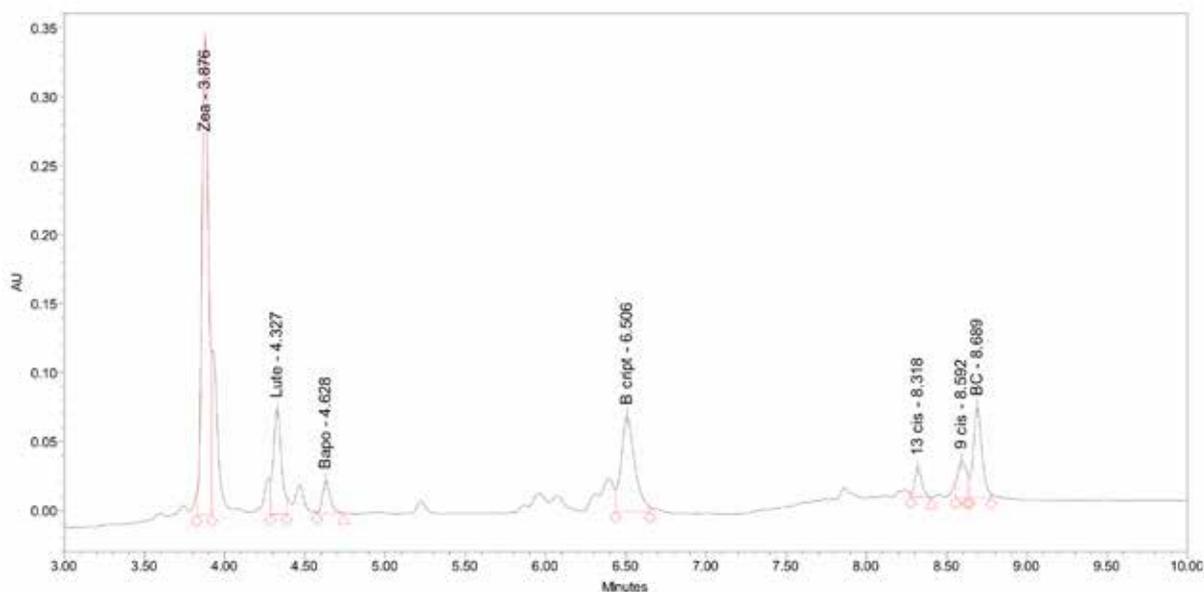


Figura 216. Cromatograma tipo de carotenoides en grano completo

(Zea=Zexantina, Lute=Luteina, Bapo= Apocaroteno, Bcripto= β-criptoxantina, 13cis y 9cis= isómeros de configuración del β-caroteno y BC=β-caroteno).

- Muestras problema: 1 inyección.
- Cada 10 muestras realizar un duplicado.

$$CBH\ inicial = \frac{m \cdot \text{area} \pm b \cdot \left(\frac{V_r}{V_{inyec}}\right)}{M} \cdot \frac{1}{1,000}$$

Cálculos

A través de la curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta característica para cada carotenoide. Por lo tanto, la concentración para cada uno está dada por la siguiente fórmula:

Dónde:

CBH inicial = Concentración de cada carotenoide en base húmeda ($\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra)

M = Pendiente de la recta característica del carotenoide

Área = Área bajo la curva de cada carotenoide presente en la muestra

B = Ordenada al origen de la recta característica

V_r = Volumen de reconstitución (500 μL)

V_{inyec} = Volumen de inyección (2 μL)

M = Peso de la muestra (0.6 g)

1/1000 = Factor para convertir de ng g^{-1} a $\mu\text{g g}^{-1}$.

Posteriormente, se realiza una corrección de la concentración de carotenoides con base a la eficiencia de extracción, para lo cual se divide la concentración del carotenoide en base húmeda (CBH inicial) entre la eficiencia de extracción calculada (EE). A continuación, se realiza la corrección por humedad, misma que se determina por el método de la termobalanza (consultar procedimiento para mayor detalle) y una vez obtenido el dato, se utiliza la siguiente fórmula para finalmente reportar la concentración en base seca:

$$CBS = \frac{CBH \times 100}{100 - \%H}$$

Dónde:

CBS = Concentración de cada carotenoide en base seca ($\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra)

CBH = Concentración de cada carotenoide en base húmeda ($\mu\text{g g}^{-1}$)

H = Contenido de humedad (%)

Para determinar el contenido de carotenoides con actividad Pro-Vitamina A, se realiza el cálculo de la siguiente manera:

$$Pro\ Vitamina\ A\ (\mu\text{g g}^{-1}) = 0.5 \cdot \text{Contenido de } \beta\text{-Criptoxantina} + \text{Contenido de 9-cis} + \text{Contenido de 13-cis} + \text{contenido de } \beta\text{-caroteno.}$$

Cuadro 112. Solución a problemas comunes en la cuantificación de carotenoides por UPLC.

Problema	Solución
El área del estándar de recuperación puro, es menor al área recuperada en la muestra.	Se realiza nuevamente la extracción, con muestra recién molida o en su defecto con la harina.
Variación del volumen de las soluciones durante la incubación en el baño maría.	Agregar etanol con BHT para alcanzar el volumen inicial.
Se observa variación en la coloración después de agregar KOH.	Verificar que se está agregando el volumen correcto. Calibrar la pipeta.
Presencia de película blanca semitransparente.	La película se genera cuando se agrega agua a las fracciones de hexano. Evitar que pase a la solución que se va a evaporar, porque opaca la columna y aumenta la presión del sistema. Asegurarse de que no se haya formado la película cuando termine la centrifugación. Si esto ocurre, centrifugar una vez más.
Los volúmenes de las soluciones varían durante la extracción.	Verificar que los tapones y los empaques de los tubos estén bien colocados para evitar pérdidas por evaporación.
Evaporación incompleta o nula.	Completar el proceso de evaporación, programando sesiones breves (pueden ser de unos cuantos minutos). Utilizar muestras muy frías (recién sacadas del refrigerador) para evitar evaporación. Verificar que el empaque de la tapa de la cámara de evaporación esté bien colocado.
Hay líquido en los tubos después de la evaporación.	Asegurarse de que al transferir el hexano no haya pasado agua. Evitar que pase agua al transferir el hexano. Asegurarse de que no pasen partículas de harina durante la extracción.
Turbidez al reconstituir la solución evaporada.	Asegurarse de que la película blanca que se forma cuando se agrega agua al hexano no pase a la solución.
Polvo amarillo en la tapa y en el empaque de la cámara de evaporación.	Asegurarse de que el empaque esté bien colocado y de que la bomba funcione correctamente.
Presión alta constantemente y aumento gradual de presión de la columna.	Lavar la columna con agua y solvente orgánico sin sales después de cada sesión de inyecciones. Si después de lavar la columna la presión no disminuye, cambiar la pre columna, el filtro de solvente y el filtro en línea. Verificar que los solventes se hayan desgasificado y filtrado correctamente. Purgar las líneas del UPLC.
Burbujas en el cromatógrafo.	Verificar que los filtros de las líneas de solvente estén completamente sumergidos y que no haya burbujas en las líneas. Si esto ocurre, purgar las líneas del UPLC.
Ruido en los cromatogramas.	Verificar que no se haya evaporado la muestra dentro del vial. Verificar que durante las inyecciones no hayan variado las condiciones ambientales del área de trabajo.

Referencias

- [1] Howe, J. A. and Tanumihardjo, S. A. Evaluation of Analytical Methods for Carotenoid Extraction from Biofortified Maize (*Zea mays* sp.). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7992-7997.
- [2] Kijak, K.; Grbesa, D. and Karolyi, D. Reflectance colorimetry as a simple method for estimating carotenoid content in maize grain. *J. Cereal Sci.* **2014**, *59*: 109-111.
- [3] Rodríguez, A. D. B. and Kimura, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Harvest Plus Technical Monograph 2. **2004**, *58* p.
- [4] Heying, E. K.; Tanumihardjo, J. P.; Vasic, V.; Cook, M.; Palacios-Rojas, N. and Tanumihardjo, S. A. Biofortified Orange Maize Enhances β -Cryptoxanthin Concentrations in Egg Yolks of Laying Hens Better than Tangerine Peel Fortificant. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 11892-11900.
- [5] Seo, J. S.; burri, B. J.; Quan, Z. and Neidlinger, T. R. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1073*, 371-375.
- [6] Mugode, L.; Ha, B.; Kaunda, A.; Sikombe, T.; Phiri, S.; Mutale, R.; Davis, C.; Tanumihardjo, S. and De Moura, F. F. Carotenoid Retention of Biofortified Provitamin A Maize (*Zea mays* L.) after Zambian Traditional Methods of Milling, Cooking and Storage. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6317-6325.
- [7] Panfili, G.; Fratianni, A. and Irano, M. Improved Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography Procedure for the Determination of Carotenoids in Cereals. *J. Agric. Food Chem.*
- [8] Kurilich, C. A. and Juvik, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*: 1948-1955.

Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante digestión ácida y su análisis a través de plasma de acoplamiento inductivo con espectrómetro de emisión óptica (ICP-OES)

Justificación

Los seres humanos necesitan el consumo de microelementos como Fe, Zn, Cu, I, Se y vitaminas para una vida saludable. No obstante, reportes de la FAO y ONU indican que más de la mitad de la población mundial padece de desnutrición de micronutrientes, siendo más vulnerables las mujeres y niños de países en desarrollo¹⁻⁴ donde su principal fuente son alimentos de origen vegetal. Es por ello, que diversos programas de mejoramiento han propuesto la biofortificación como estrategia para incrementar el contenido de micronutrientes en los cultivos, principalmente en maíz, arroz, trigo, yuca, camote y frijol. Por lo tanto, es necesario monitorear el contenido de estos microelementos en las distintas etapas del mejoramiento^{1-3,5-7}. Cabe mencionar que algunas de las deficiencias provocadas por la falta de micronutrientes

como zinc y hierro son: retrasos en el crecimiento, madurez ósea, sexual, dermatitis, diarrea, alopecia, fallas en el sistema inmunológico⁸, anemia, deterioro mental, problemas durante el embarazo, disminución de la productividad y baja tasa de conversión de energía a partir de los alimentos^{3, 8-10}.

Fundamento

Dentro del instrumento, se activa una bobina de radiofrecuencia (RF) creando campos eléctricos y magnéticos en la parte superior de la antorcha. Cuando el gas argón pasa a través de la antorcha, se somete a una descarga eléctrica causada por una "chispa", la cual ocasiona que algunos electrones se desprendan de los átomos de argón. Estos electrones son atrapados y acelerados por los campos magnéticos (acoplamiento inductivo). Los electrones de alta energía a su vez chocan con otros electrones de átomos de argón y los convierte en electrones de alta energía. Esta ionización colisional del argón continúa en una reacción en cadena, descomponiendo el gas en una mezcla de átomos de argón, electrones e iones de argón, formando plasma. La muestra líquida se introduce en un nebulizador que la transforma en aerosol conformado por gotas muy pequeñas para ser llevadas al plasma. El plasma desolvata el aerosol para dejar solo partículas microscópicas de sal de las moléculas individuales (vaporización) que son desasociadas en átomos (atomización), los cuales son excitados e ionizados. La luz emitida por los átomos excitados y los iones es medida por el espectrómetro, mayor intensidad de luz corresponde a mayor concentración del elemento¹⁰.

Cuadro 113. Material y equipos utilizados en la determinación de hierro y zinc en ICP-OES.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
ICP-OES	N/A	Perkin Elmer, Optima 8300
Probeta	Plástico	Nalgene
Frascos ámbar	1 L	Pyrex
2 dispensadores para ácidos	Capacidad mínima de 5 mL	Brand
Micropipetas	20-200 μ L, 100-1000 μ L y 0.5-5.0 mL	Eppendorf
Campana de extracción	Mínimo 800 cfm	Labconco
Tubos de digestión	100 mL	A.I. Scientific
Digestores	Es ideal que cuenten con controlador	A.I. Scientific, AIM 600
Película plástica	1 rollo	Kleen Pack
Tubos Falcon	50 mL	Greiner
Desecador	N/A	N/A

Cuadro 114. Reactivos utilizados en la determinación de hierro y zinc en ICP-OES.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Detergente ácido al 2 %	Detergente ácido libre de fosfatos (Citranox, Cat. 1801).	Agregar 20 mL de detergente a 1 L de agua desionizada.	Usar equipo de protección personal (EPP) ya que el detergente es irritante para la piel y los ojos.
Mezcla ácida para digestión (ácido nítrico: perclórico en una proporción 9:1)	Ácido nítrico al 70 % (OmniTrace EMD, Cat. NX0407, CAS 7697-37-2). Ácido perclórico al 70 % (Mallinckott, Cat. 2766, CAS 7601-90-3).	Mezclar 100 mL de ácido perclórico y 900 mL de ácido nítrico.	Usar EPP. Preparar la solución dentro de una campana de extracción. Utilizar recipientes de plástico (preferentemente de propileno). Almacenar a temperatura ambiente por máximo 2 meses.
Solución de ácido nítrico al 1 %	Ácido nítrico al 70 % (OmniTrace EMD, Cat. NX0407, CAS 7697-37-2).	Diluir 1 mL ácido nítrico en 99 mL de agua desionizada.	Usar EPP. Preparar la solución dentro de una campana de extracción. Utilizar recipientes de plástico (preferentemente de propileno). Almacenar a temperatura ambiente por máximo 2 meses.
Estándar intermedio de Fe y Zn con una concentración de 100 mg L ⁻¹	Estándar de Fe (1000 µg mL ⁻¹) (Perkin Elmer, Cat. N9300168). Estándar de Zn (1000 µg mL ⁻¹) (Perkin Elmer, Cat. N9300126).	En un matraz aforado de 50 mL, agregar 5 mL de cada estándar y aforar con NH ₃ al 1 %.	Utilizar recipientes de plástico o de vidrio destinados únicamente para este propósito. Almacenar a 4 °C por 2 meses máximo.
Estándar de maíz	Estándar de maíz (Corn Meal High Purity Standards), Cat. CRM-CM-A).		Almacenar en un desecador.
Gas argón	Argón ultra alta pureza 99.999 % (Infra, Cat. 32040, CAS 7440-37-1).		Se recomienda que los tanques se localicen fuera del área de trabajo para evitar contaminación y accidentes.
Gas nitrógeno	Nitrógeno alta pureza 99.997 % (Infra, Cat. 32125, CAS 7727-37-9).		Se recomienda que los tanques se localicen fuera del área de trabajo para evitar contaminación y accidentes.

Alcance

Este método se aplica todo tipo de maíz y cultivos como trigo, arroz, frijol y mijo. Se procesan hasta 200 muestras por semana.

Diagrama de flujo

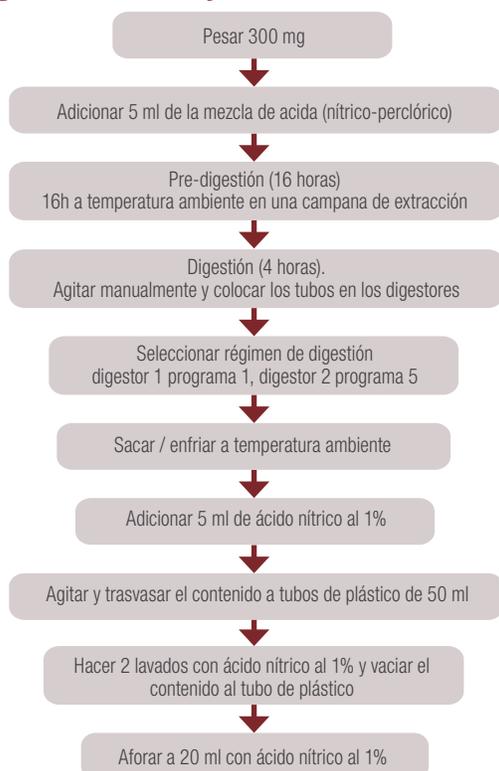


Figura 217. Diagrama de flujo.

Procedimiento

Acondicionamiento del área de trabajo y material utilizado para el análisis

1. Limpiar perfectamente la campana de extracción antes de cada pre-digestión.
2. Verificar que los digestores estén calibrados y limpios.
3. El material a utilizar deberá ser exclusivo para este procedimiento y cuando sea necesario, lavarlo con detergente ácido y enjuagar perfectamente con agua destilada o desionizada para evitar fuentes de contaminación.
4. Se recomienda utilizar guantes de nitrilo libres de látex.

Pesado y digestión

NOTA: Mantener siempre los tubos con película plástica (*kleenpack*) para evitar contaminación.

5. Pesar 300 mg de la muestra a analizar (granos de trigo y arroz pueden utilizarse completos; para maíz es necesario moler el grano [consultar la sección de molienda para mayores detalles]) en tubos de vidrio para digestión previamente etiquetados. incluir dos tubos con el material testigo y dos tubos sin material (blancos).
6. Adicionar con un dispensador para ácidos y dentro de una campana de extracción, 5 mL de la mezcla ácida a cada tubo (descender con el ácido los restos de muestra adheridos a las paredes del tubo).

7. Dejar en reposo los tubos dentro de la campana de extracción de 12 a 14 horas (toda la noche). A esta etapa se le denomina “pre-digestión” y es importante para retirar los remantes de humedad de las muestras; el no hacerlo podría ocasionar la proyección de las muestras fuera de los tubos durante la digestión.
8. Finalizada la pre-digestión, mezclar el contenido de los tubos (manualmente o con el vórtex) para homogenizar las muestras con la mezcla de ácidos.
9. Colocar la gradilla de acero del digestor en su posición y colocar tanto los testigos como los blancos aleatoriamente y las muestras en orden numérico.
10. Activar los digestores con el siguiente régimen de temperatura (aplica para harina de maíz, granos completos de trigo y arroz; Cuadro 115):

Cuadro 115. Secuencia de digestión.

Secuencia	Parámetro
1	Llegar a 80°C
2	Mantener 10 min
3	Llegar a 100°C
4	Mantener 10 min
5	Llegar a 120°C
6	Mantener 60 mi
7	Llegar a 130°C
8	Mantener 30 min
9	Llegar a 140°C
10	Mantener 15 min
11	Llegar a 150°C
12	Mantener 25 min
13	Llegar a 170°C
14	Mantener 20 min
15	Llegar a 180°C
16	Mantener 7 min
17	Llegar a 225°C
18	Mantener 5 min
19	Fin

11. Culminado el ciclo, retirar la gradilla del digestor y dejar a temperatura ambiente dentro de la campana de extracción.
12. Adicionar 5 mL de HNO₃ al 1 % en cada tubo y cubrirlos nuevamente con película plástica (kleenpack). Dejarlos en reposo toda la noche para disolver las sales minerales.
13. Mezclar cada muestra en el vórtex y transferir a un tubo plástico de 50 mL, el cual debe estar identificado con el mismo número de muestra.
14. Posteriormente, adicionar 5 mL más de HNO₃ al 1 % al tubo de vidrio y mezclar nuevamente para hacer un primer lavado. Transferirlo al tubo de plástico.
15. Repetir el paso 14 una vez más, de tal modo que se realicen un total de dos lavados.

16. Con una piseta, aforar las muestras con HNO₃ al 1 % para obtener un volumen final de 20 mL.
17. Cerrar perfectamente los tubos y almacenar a temperatura ambiente hasta su análisis en el ICP-OES.

Curva de calibración

18. Desarrollar una curva de calibración en un intervalo de 0 a 2 mg L⁻¹.
19. Dado que al final de la digestión queda un remanente de ácido perclórico de aproximadamente 0.5 mL, al completar el volumen a 20 mL con HNO₃ al 1 %, cada muestra esta disuelta en una solución de ácido perclórico al 2.5 % y ácido nítrico al 1 %, por lo que la curva estándar debe desarrollarse con la misma matriz que las muestras. Así, para preparar 100 mL de cada punto de la curva, adicionar en un matraz volumétrico los volúmenes indicados en el Cuadro 115.

20. Aforar con ácido nítrico al 1 %.

NOTA: El punto de la curva cuya concentración es de 1 mg L⁻¹ debe prepararse por duplicado, ya que se utiliza como solución de chequeo durante la lectura de las muestras.

Cuadro 116. Preparación de curva estándar.

Concentración de Fe y Zn (mg L ⁻¹)	Volumen de HClO ₄ concentrado (mL)	Volumen del estándar intermedio [100 mg L ⁻¹] (mL)
0	2.5	0.
0.25	2.5	0.25
0.5	2.5	0.5
1.0	2.5	1.0
1.5	2.5	1.5
2.0	2.5	2.0

Lectura de muestras en ICP-OES

21. Verificar la presión del aire comprimido, nitrógeno, argón y agua de enfriamiento (Cuadro 117).

Cuadro 117. Datos de presión de los elementos requeridos.

Elemento	Presión solicitado por el fabricante (PSIG)	Presión recomendada (PSIG) ¹
Aire comprimido ²	80 - 120	90
Nitrógeno	30 - 120	40
Argón	80 - 120	90
Agua	45 - 80	60

¹ Según experiencia del Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz.

² Se recomienda tener un compresor para uso exclusivo del ICP-OES.

22. Encender el equipo (ICP-OES) y abrir el software *Syngistix*.
23. Esperar el tiempo de calentamiento del espectrofotómetro (asignado por el equipo, entre 1 y 3 horas, dependiendo del uso del equipo).
24. Cuando el equipo se encuentre acondicionado, encender el plasma y esperar una hora antes de analizar las muestras.
25. Durante el tiempo de espera, capturar la lista de blancos, testigos y muestras con su respectivo peso y darlas de alta en el *Sample List* del equipo. Enseguida programar el análisis de la solución de chequeo (concentración de 1 mg L^{-1}) después de cada 15 muestras analizadas.
26. Capturar también los datos de la curva de calibración.
27. Verificar la correcta ubicación de las líneas de flujo (Figura 218).

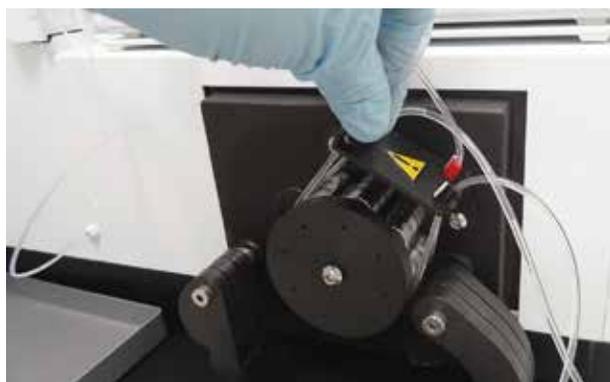


Figura 218. Ubicación de líneas.

28. Transcurrida la hora, analizar la curva de calibración, la cual debe tener una correlación mínima de 0.999 para continuar con los análisis.
29. Verificar que los picos de la curva están centrados (Figura 219).

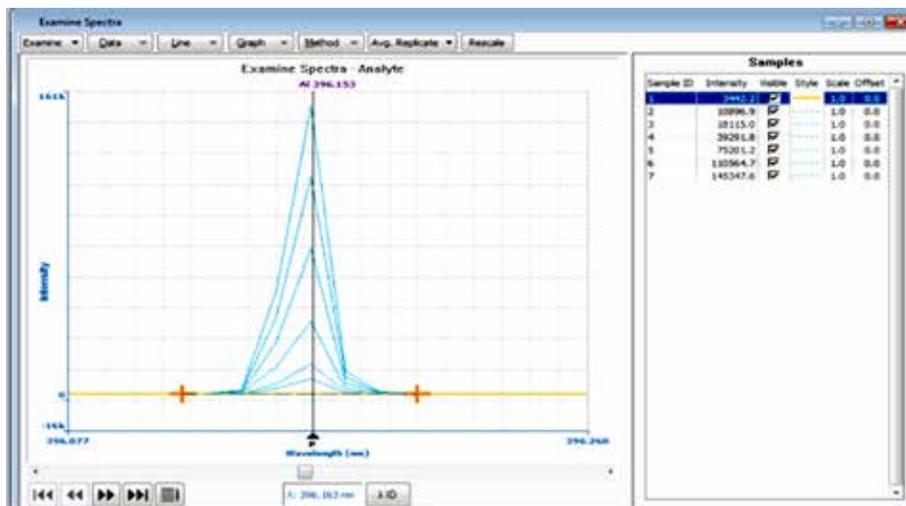


Figura 219. Posición centrada de los picos.

30. Analizar las muestras del *Sample list*. El equipo realiza tres lecturas de cada muestra y promedia los resultados, los cuales son mostrados automáticamente.

NOTA: El RSD (Desviación relativa estándar, por sus siglas en inglés) para cada muestra debe ser menor al 2%, en caso contrario, repetir la lectura.

31. Finalmente, exportar los resultados obtenidos a un archivo Excel.

Referencias

- (1) Bouis, H. E.; Welch, R. M. Biofortification - A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop Sci.* **2010**, *50* (Supplement 1), S – 20 – S – 32.
- (2) Meenakshi, J. V.; Johnson, N. L.; Manyong, V. M.; DeGroot, H.; Javelosa, J.; Yanggen, D. R.; Naher, F.; Gonzalez, C.; Garcia, J.; Meng, E. How Cost-Effective is Biofortification in Combating Micronutrient Malnutrition? An Ex ante Assessment. *World Dev.* **2010**, *38* (1), 64–75.
- (3) Ortiz-Monasterio, J. I.; Palacios-Rojas, N.; Meng, E.; Pixley, K.; Trethowan, R.; Peña, R. J. Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *J. Cereal Sci.* **2007**, *46* (3), 293–307.
- (4) FAO-ONU. Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/publications/sofi/en>.
- (5) Welch, R. M. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant Soil* **2002**, *247*, 83–90.
- (6) Pixley, K.; Palacios-Rojas, N.; Glahn, R. P. The usefulness of iron bioavailability as a target trait for breeding maize (*Zea mays* L.) with enhanced nutritional value. *F. Crop. Res.* **2011**, *123* (2), 153–160.
- (7) Fageria, N. K.; Moraes, M. F.; Ferreira, E. P. B.; Knupp, A. M. Biofortification of Trace Elements in Food Crops for Human Health. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2012**, *43* (3), 556–570.
- (8) Khush, G. S.; Lee, S.; Cho, J.-I.; Jeon, J.-S. Biofortification of crops for reducing malnutrition. *Plant Biotechnol. Rep.* **2012**, *6* (3), 195–202.
- (9) Saltzman, A.; Birol, E.; Bouis, H. E.; Boy, E.; De Moura, F. F.; Islam, Y.; Pfeiffer, W. H. Biofortification: Progress toward a more nourishing future. *Glob. Food Sec.* **2013**, *2* (1), 9–17.
- (10) Boss, C. B.; Fredeen, K. J. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 3rd ed.; Perkin Elmer: USA, 2004.

Determinación de hierro y zinc en harina de maíz mediante fluorescencia de rayos x (XRF) utilizando el equipo Oxford™ X-Supreme 8000

Justificación

Diversos métodos instrumentales han sido utilizados para la determinación de micronutrientes, principalmente el ICP-OES, sin embargo, son métodos costosos y requieren tratamientos agresivos y prolongados. Las principales ventajas de la XRF sobre los métodos de química húmeda radican en que el análisis no es destructivo, no utiliza químicos nocivos y por tanto no produce residuos tóxicos, además puede ser realizado en muestras sólidas¹⁻⁴.

Fundamento

La técnica está basada en el hecho de que todos los elementos producen rayos X “secundarios” cuando son expuestos a rayos X de alta energía específica, la energía e intensidad de los rayos X emitidos es usada para determinar la composición elemental de la muestra analizada. También es posible cuantificar la concentración de elementos con base en la intensidad de los fotones liberados, ya que la intensidad es directamente proporcional a la cantidad del elemento, para ello, es necesario desarrollar una curva de calibración⁵.

La calibración es elaborada relacionando la intensidad de la emisión de rayos X de un elemento en un grupo de muestras cuya concentración ha sido previamente determinada mediante un método de referencia (por ejemplo, ICP-OES). Las calibraciones son validadas comparando el valor dado por el XRF y el dado por el método de referencia, esto se realiza en un grupo de muestras diferente al utilizado en la calibración^{1,5}.

Alcance

Mediante la presente técnica se puede estimar el contenido de hierro y zinc en muestras de harina de maíz y granos de trigo (la correlación existente entre los valores de XRF y valores de referencia en ICP-OES es de aproximadamente 0.9 para ambos elementos en harina de maíz). Un técnico con capacitación media puede procesar hasta 200 muestras diarias.

Cuadro 118. Material y equipos utilizados en la determinación de hierro y zinc mediante XRF.

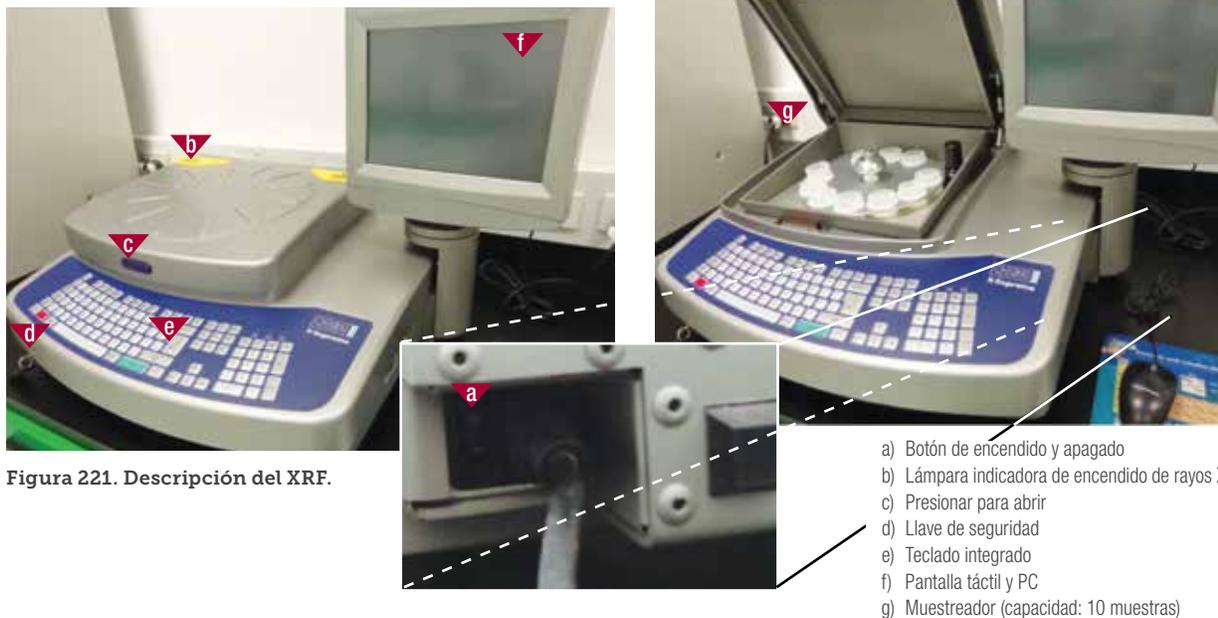
Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Fluorómetro	Carrusel para 10 muestras	Oxford Instruments, X-Supreme 8000
Contenedores de muestra	Específicos para X-Supreme 8000	Oxford Instruments
Película plástica	Polipropileno	Oxford Instruments, Poly 4
Aire comprimido	Seco, presión mínima de 60 PSIG	N/A
Aplanador de muestra	Cualquier objeto de plástico plano, limpio y que entre en los contenedores	N/A

Diagrama de flujo

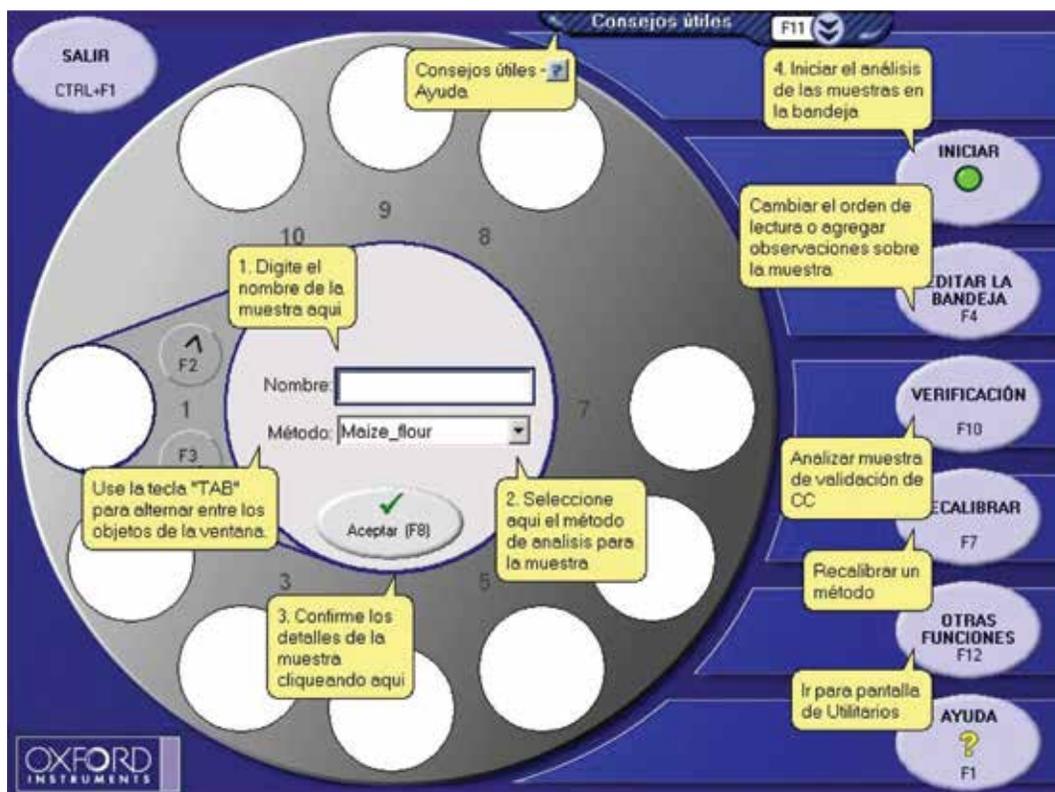


Figura 220. Diagrama de flujo para la determinación de hierro y zinc mediante XRF.

Descripción general del instrumento



Descripción general de la pantalla de inicio



Procedimiento

1. Encender el equipo, el botón de encendido se encuentra en la parte posterior derecha del equipo (Figura 223). Encender el equipo 20 minutos antes de su uso para que el sistema se acondicione. Se pueden analizar hasta 10 muestras por corrida.



Figura 223. XRF Oxford™ X-Supreme 8000. El círculo rojo muestra la ubicación del botón de encendido (en la parte posterior).

2. Automáticamente se inicia el programa que controla el equipo, se debe colocar la contraseña para ingresar (en modo *Manager*) (Figura 224).



Figura 224. Ingreso de contraseña.

3. El equipo cuenta con dos tipos de contenedores para colocar las muestras, el primero va en el muestreador (Figura 225a) y sirve como base al segundo contenedor (Figura 225b), en el cual se coloca directamente la harina que se pretende analizar. Los contenedores se preparan de la siguiente manera:

- a. Cada contenedor consta de dos cilindros separados:

- i. Un cilindro de plástico (con mayor diámetro) en el caso de los contenedores que van directo en el carrusel.
- ii. Uno de metal (cilindro externo) y uno de plástico (cilindro interno) para los contenedores que contendrán la muestra (Figura 225).



Figura 225. Contenedores de muestra.

- b. Se debe colocar una película de polipropileno (Poly 4 Oxford Instruments™) en la base del cilindro interior (Figura 226a y 226b) y con el cilindro exterior deslizar sobre la película de polipropileno hacia abajo (Figura 226c y 226d) para que estire la película y quede la superficie plana y sujeta entre los cilindros (Figura 226e y 226f). En caso de que la superficie no quede lisa, debe repetirse el procedimiento, ya que cualquier borde o protuberancia puede causar interferencia en el análisis.
 - c. Identificar los contenedores mediante un número, evitará confusiones al momento de analizar las muestras.
4. Los contenedores que solo son de plástico (mayor diámetro) deben colocarse en el carrusel del muestreador (Figura 227a) y la muestra de harina debe vaciarse en los contenedores de metal-plástico (Figura 227b) y aplanarse levemente con un objeto plástico plano (Figura 228a) para que quede la superficie empaquetada y lisa (Figura 228b).

NOTA: La cantidad de muestra no ocasiona variaciones considerables en los resultados, sin embargo, se sugiere utilizar una cantidad constante en la calibración y en los análisis. Diversas pruebas han demostrado que cantidades mayores a 3 g de harina no producen efectos en la señal del XRF.



Figura 226. Colocación de la película de polipropileno

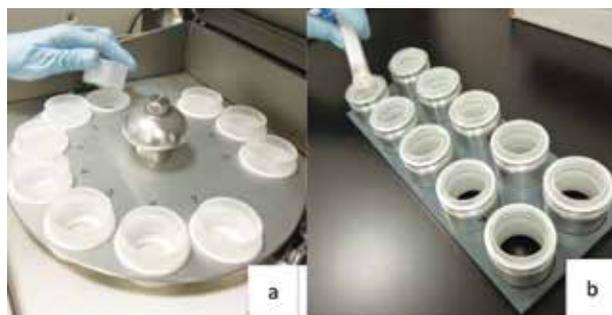


Figura 227. Colocación de contenedores y muestra.

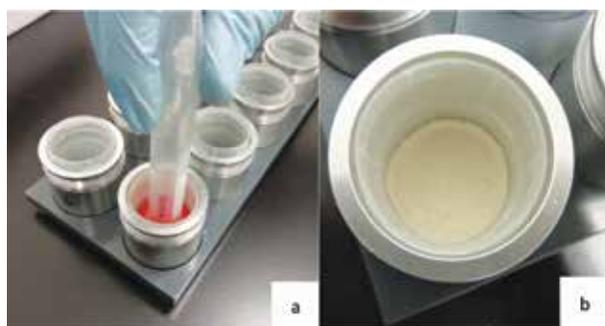


Figura 228. Empaquetamiento de la muestra.

5. Los contenedores con la harina se colocan sobre los contenedores del muestreador (Figura 229).



Figura 229. Colocación de los contenedores en el muestreador.

6. Se cierra la tapa del equipo y se coloca la llave en posición de lectura (*ENABLE*) en la parte inferior izquierda del (Figura 230). Si la llave no se encuentra en la posición correcta, el equipo no analiza las muestras.



Figura 230. Posición de la llave.

7. En el software se debe proporcionar la identificación de las muestras y especificar el método a utilizar (Figura 231). Para harina de maíz, se emplea el método llamado *Maize_flour*. Al nombrar la muestra y el método, los círculos del carrusel cambian de color blanco a rojo. Cada vez que se introducen los datos de cada posición, se debe presionar el botón Enter en el teclado o el botón aceptar de la pantalla (táctil).

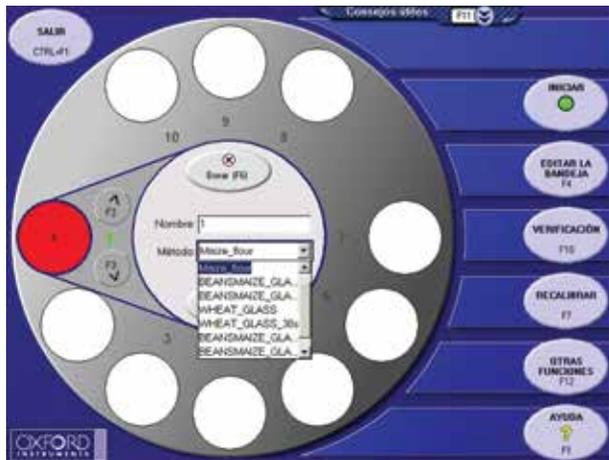


Figura 231. Identificación de la muestra y método.

8. Dada la información, se debe presionar el botón **INICIAR** (Figura 232).

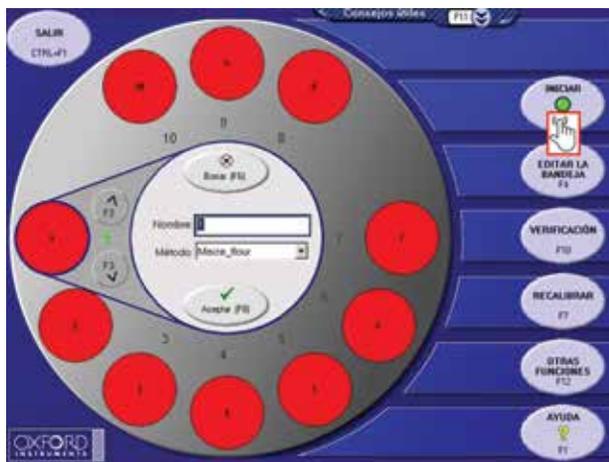


Figura 232. Inicio del análisis.

9. El equipo ajusta las condiciones de análisis (Figura 233a), y comienza la medición de cada muestra (Figura 233b). Cuando el equipo se encuentra analizando, se encienden las luces con el símbolo ☼, lo que indica que se están emitiendo rayos X en las muestras (Figura 233c).
10. Una vez que el equipo concluye el análisis, despliega en pantalla los resultados (Figura 234).
11. Al seleccionar **ACEPTAR TODO**, la pantalla regresa al inicio (Figura 231), para analizar otro grupo de muestras. Se sugiere analizar por duplicado el 10 % de las muestras seleccionadas de manera aleatoria y las muestras con los valores más altos y bajos del grupo.
12. Las muestras deben ser regresadas al tubo contenedor. Se recomienda colocar la muestra en un trozo de papel (en el laboratorio de Calidad de

Maíz se utiliza papel encerado) y colocarla en forma de cono para facilitar el vaciado al tubo (Figura 235).

13. Los contenedores internos se deben desarmar y limpiar con aire comprimido para repetir el análisis utilizando nueva película de polipropileno.

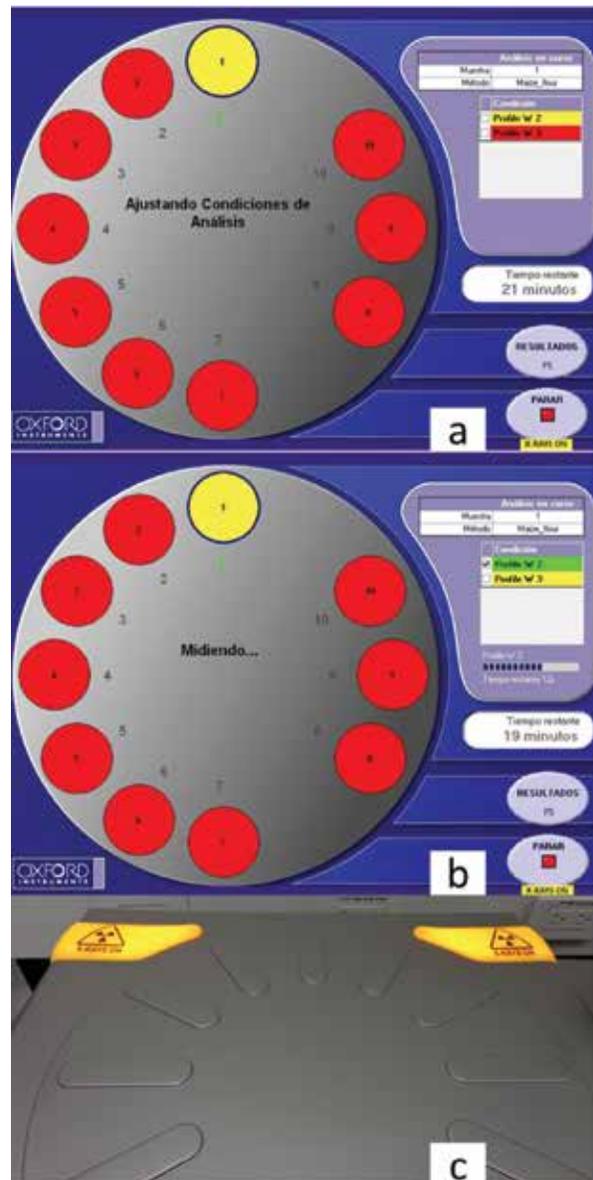


Figura 233. Medición en el XRF.

Resultados (011)			
Muestra 1 (Maiz - Rosas)			
Análisis	Línea	Concentración	Intensidad
Fe	Ka	18.7 mg/kg	188.7 cps
Zn	Ka	25.1 mg/kg	35.4 cps

Figura 234. Resultados obtenidos.

14. La información de cada muestra también se guarda, de manera automática, en el historial que genera el equipo. Para consultar esta información, se debe seleccionar la opción *OTRAS FUNCIONES* en la pantalla de inicio (Figura 231) y se desplegará el menú que se muestra en la figura 235a. En el nuevo menú se selecciona *RESULTADOS GRABADOS* y aparecerá la identificación de todas las muestras que el equipo ha analizado, basta con seleccionar la muestra de interés para obtener la información de la misma (Figura 235b).

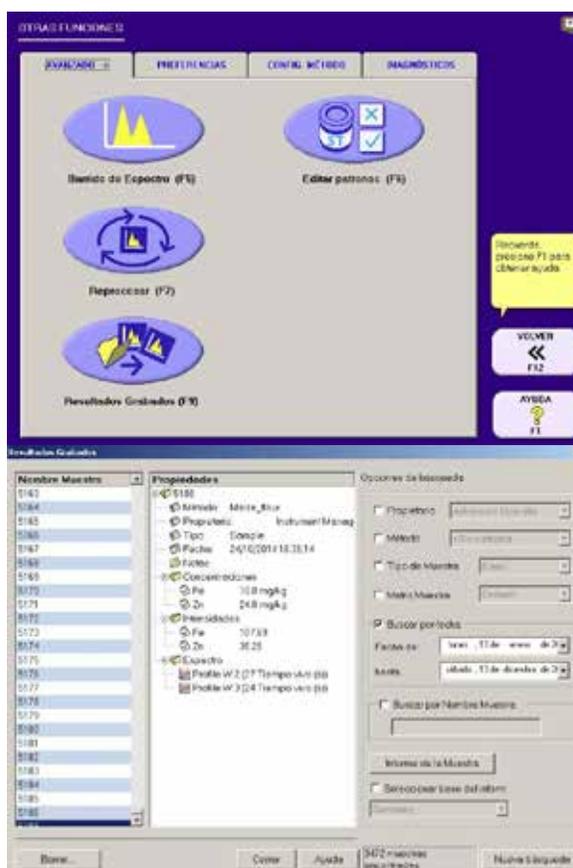


Figura 235. Revisión de los resultados generados.

Cuadro 119. Comparativo en la determinación de Fe y Zn para 40 muestras*.

Proceso	Costo (\$ USD)		Tiempo	
	ICP-OES	XRF	ICP-OES	XRF
Lavado de material	0	0	30 min	0 min
Molienda	128	128	40 min	40 min
Pesado	0	0	40 min	0 min
Pre-digestión	0	0	16 h	0 min
Digestión (incluyendo enfriamiento de las muestras)	120	0	5 h	0 min
Preparación de curva estándar	60	0	20 min	0 min
Lectura en el equipo	280	104	3 h	80 min
Total	588	232	26 h 10 min	120 min

*Precios del 2017 en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz, CIMMYT. Se estimó el precio para 40 muestras dado que son las que pueden someterse a digestión ácida en un mismo ciclo.

Cuadro 120. Solución a problemas comunes en la determinación de hierro y zinc mediante XRF.

Problema	Solución
El equipo no analiza las muestras.	Asegurar que la llave se encuentre en la posición ENABLE.
Los resultados de las repeticiones varían demasiado (coeficiente de variación > 10).	Realizar otra lectura asegurando que la superficie de polipropileno quede lisa.
Al encender el equipo no abre automáticamente el programa.	Localizar el icono del programa X-Supreme y dar doble click



Referencias

- Paltridge, N. G.; Milham, P. J.; Ortiz-Monasterio, J. I.; Velu, G.; Yasmin, Z.; Palmer, L. J.; Guild, G. E.; Stangoulis, J. C. R. Energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry as a tool for zinc, iron and selenium analysis in whole grain wheat. *Plant Soil* **2012**, *361* (1-2), 261–269.
- Paltridge, N. G.; Palmer, L. J.; Milham, P. J.; Guild, G. E.; Stangoulis, J. C. R. Energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of zinc and iron concentration in rice and pearl millet grain. *Plant Soil* **2012**.
- Sitko, R.; Zawisza, B.; Jurczyk, J.; Buhl, F.; Zielonka, U. Determination of High Zn and Pb Concentrations in Polluted Soils Using Energy-Dispersive X-ray Fluorescence Spectrometry. *Polish J. Environ. Stud.* **2004**, *13* (1), 91–96.
- Stangoulis, J. C. R. Technical aspects of zinc and iron analysis in biofortification of the staple food crop, wheat and rice. In *19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*; Brisbane, Australia, 2010; pp 42–44.
- Beckhoff, B.; Kanngießer, B.; Langhoff, N.; Wedell, R.; Wolff, H. *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis.*; Springer: Berlin, 2006.

Determinación de cenizas en seco

Justificación

Las cenizas se pueden definir como los residuos inorgánicos remanentes, después del proceso de ignición u oxidación completa de materia orgánica, en un producto alimenticio¹. El contenido de cenizas es una medida del contenido de minerales y otra materia inorgánica en la biomasa y es utilizada junto con otros procedimientos para determinar la composición total de una muestra biológica (análisis proximales)²; también se ha propuesto como una medida indirecta para evaluar el rendimiento de la fotosíntesis y la transpiración de los cultivos³; y, en algunos casos forma parte de la preparación de las muestras en análisis específicos de minerales¹.

Fundamento

Al someter la muestra biológica a temperaturas de entre 500-600°C, el agua y compuestos volátiles son vaporizados, y las sustancias orgánicas son transformadas a CO₂ y óxidos de nitrógeno debido a la presencia de oxígeno en el aire. La mayoría de los minerales son convertidos a óxidos, sulfatos, fosfatos, cloruros y silicatos. Elementos como el hierro, selenio, plomo y mercurio son parcialmente volatilizados con este procedimiento³.

Alcance

El presente protocolo se basa en el método de la AACC 08-034, es aplicable a harinas de todo tipo de maíz y diferentes cereales. Un técnico calificado puede procesar hasta 50 muestras por día.

Cuadro 121. Material y equipos utilizados en la determinación de cenizas.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG135
Estufa de secado	105°C.	Barnstead Thermolyne, OV47525
Crisoles	De porcelana o platino	N/A
Desecador	N/A	N/A
Sílice para sellar desecador	N/A	N/A
Mufla	N/A	ThermoFisher, Lindberg/Blue
Pinzas de sujeción	Para crisoles	N/A
Guantes aislantes de calor	N/A	N/A
Pinzas para mufla	N/A	N/A
Marcadores	Lápiz de grafito o especiales para porcelana	N/A

Diagrama de flujo

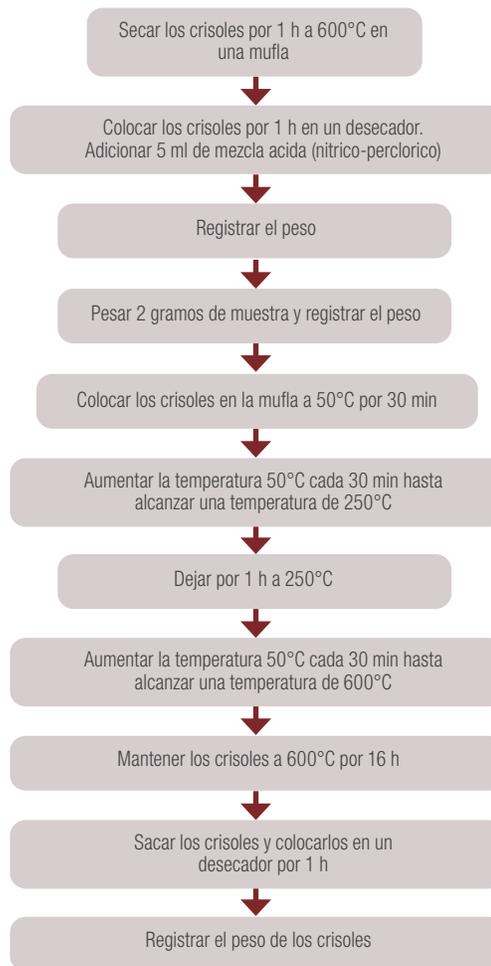


Figura 236. Diagrama de flujo para la determinación de cenizas.

Procedimiento

1. Marcar los crisoles de porcelana utilizando un marcador para porcelana o lápiz de grafito (con grafito se tiene que remarcar en cada uso y con el marcador de porcelana se garantiza mayor durabilidad).
2. Colocar los crisoles en el horno de mufla durante 1 hora a 600°C. Posteriormente, enfriar los crisoles en un desecador por una hora. Durante la manipulación de los crisoles se deben utilizar pinzas para mufla y guantes aislantes (abrir el horno lentamente para evitar golpes de calor).
3. Pesar los crisoles, sujetarlos con ayuda de pinzas o guantes y registrar el peso exacto.

- Pesar 2 gramos de muestra en cada crisol y registrar el peso. Incluir muestra testigo (valor conocido) para garantizar los resultados obtenidos. Se recomienda que las muestras analizadas tengan un contenido de humedad inferior al 15%, en caso contrario, someterlas a proceso de secado para evitar que la muestra sea proyectada cuando se calienta en el horno.
- Colocar los crisoles dentro del horno de mufla a 50°C durante 30 minutos. La temperatura se debe aumentar 50°C gradualmente cada media hora hasta alcanzar los 600°C. Se hace una excepción a los 250°C, temperatura que se debe mantener durante una hora dado que es cuando el proceso de combustión es más intenso.
- Mantener los crisoles a 600°C durante 16 horas. Posteriormente, retirarlos del horno de mufla y dejar que se enfríen en un desecador durante una hora.
- Registrar el peso exacto de los crisoles que contienen la muestra en forma de cenizas.
- Calcular el porcentaje de ceniza de la siguiente manera:

Registrar los pesos en un cuadro:

Lab.	No	Crisol	P. M.	C.+M.	C.+R.	%
No.	Crisol	g	g	g	g	Cenizas
Testigo	0	29.3249	2.0015	31.3264	29.3489	1.1991
5344	1	27.2423	2.0005	29.2428	27.2716	1.4646
5345	2	30.5319	2.0010	32.5329	30.5623	1.5192
5346	3	30.7852	2.0004	32.7856	30.8133	1.4047

Dónde:

P.M. = peso de la muestra.

C + M = peso del crisol más peso de la muestra.

C + R = peso del crisol más peso de las cenizas.

Calcular el porcentaje de cenizas:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{Peso de cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Se sugiere analizar por duplicado el 10 % de las muestras e incluir una muestra con valor conocido para garantizar los resultados obtenidos.

Se recomienda que las muestras analizadas tengan un contenido de humedad inferior al 15%, en caso contrario, someterlas a proceso de secado (durante 24 h a 80°C o durante 3 horas a 105°C) para evitar que la muestra sea proyectada cuando se calienta en el horno.

Cuadro 122. Solución a problemas comunes en la determinación de cenizas.

Problema	Solución
Cenizas color oscuro o pardo.	Asegurar que el incremento de temperatura haya sido gradual. Verificar la temperatura del horno con un pirómetro.
Los resultados de las repeticiones varían demasiado (coeficiente de variación > 10).	Realizar otra lectura verificando el correcto pesado de las muestras. Verificar el funcionamiento correcto de la balanza utilizada.
Las muestras se proyectan fuera de los crisoles.	Secar las muestras a 105°C durante 3 horas y repetir el análisis.
El valor del testigo es diferente a lo esperado.	Verificar que el tiempo de enfriamiento sea el correcto (una hora). Verificar que los desecadores estén funcionando correctamente. Verificar el funcionamiento correcto de la balanza utilizada.

Referencias

- Marshall, M. R. Ash Analysis. In *Food Analysis*; Nielsen, S. S., Ed.; Springer Science, 2010; pp 105–115.
- Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R. O.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. *Determination of Ash in Biomass*; Technical Report; NREL/TP-510-42622; Colorado, USA, 2008.
- Cabrera-Bosquet, L.; Sánchez, C.; Rosales, A.; Palacios-Rojas, N.; Araus, J. L. Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) assessment of δ(18)O and nitrogen and ash contents for improved yield potential and drought adaptation in maize. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59 (2), 467–474.
- American Association of Cereals Chemists (AACC). *AACC Method 08-03. Ash Rapid Method.*, 7th ed.; St. Paul, Minn., USA, 2003.



Determinación de compuestos antioxidantes

Daniel Díaz, Alejandra Miranda, Luisa Cabrera, Miguel Bojorges, Aide Molina

Cuantificación de carotenoides totales por espectrofotometría

Justificación

El maíz amarillo es el único cereal con cantidades apreciables de carotenoides (0.45 - 41.5 mg kg⁻¹ de muestra seca)¹ y debido a sus propiedades nutricionales (precursor de vitamina A), amplia distribución, propiedades antioxidantes y de pigmentación¹ son de interés para su investigación, utilizando diversas técnicas de extracción, identificación o cuantificación^{2,3}.

Fundamento

Según Kurilich y Juvik (1999), la extracción de carotenoides en harina de maíz se realiza mediante una mezcla de etanol con butil hidroxitolueno (BHT) como agente antioxidante, hidróxido de potasio (KOH) para la remoción de lípidos y hexano como solvente de extracción, el cual permite la fácil y rápida separación de carotenoides en una fase orgánica (fase superior) para su posterior cuantificación por espectrofotometría. Este método se basa en la facultad que tienen las sustancias para absorber ciertas longitudes de onda; particularmente los carotenoides presentan espectros de absorción entre 400 y 500 nm (Figura 237), los cuales corresponden a los colores azul y verde del espectro visible y la luz roja-anaranjada-amarilla que reflejan proporcionan a los compuestos su color característico³.

Cabe señalar que el contenido de carotenoides totales por espectrofotometría se expresa en función del β-caroteno por ser el principal precursor de vitamina A⁴.

Alcance

La técnica aplica para todo tipo de maíz y alimentos derivados. Es posible analizar entre 45 y 50 muestras en 8 horas.

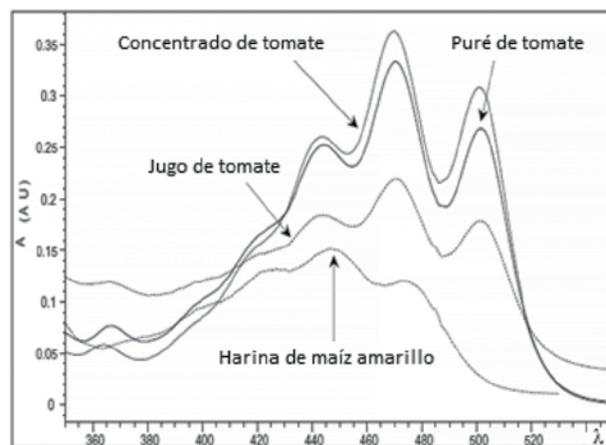


Figura 237. Espectro visible de los extractos en hexano de: puré de tomate, jugo de tomate, concentrado de tomate y harina de maíz amarillo³.

Cuadro 123. Material y equipo utilizados en la cuantificación de carotenoides totales.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Matraces volumétricos	100 y 250 mL	Pyrex, KIMAX
Probetas graduadas de vidrio	10 y 50 mL	Pyrex, KIMAX
Pipetas Pasteur de vidrio	3 mL	Corning
Bulbos de goma	5 mL	Thomas Scientific
Tubos de plástico de fondo cónico (sin tapa)	15 mL	Corning
Tubos de vidrio con tapón de rosca	15 mL	Pyrex, KIMAX
Charola de plástico o unisel	N/A	N/A
Celda UV de cuarzo	10 mm de espesor interior 45 mm de altura 12.5 mm de espesor exterior	N/A
Fascos para solventes con tapa (Schott)	500 y 1,000 mL	Pyrex
Dispensador	10 mL	Dispensette, S4600140
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG64
Baño María (digital)	2 L, con intervalo de temperatura de 5 a 100°C.	Polyscience
Agitador	Tipo vórtex	Genie 2
Máquina de hielo frappé	N/A	Cornelius, B430AP
Centrífuga	Velocidad de 200 a 3750 rpm. Temperatura de trabajo 20°C. Rotor SX4750 (número de tubos x capacidad nominal de 4 x 750 mL)	Beckman Coulter, Allegra X-12
Espectrofotómetro	Longitud de onda de 190-1,100 nm. Exactitud de longitud de onda ± 1 nm. Lámpara de deuterio (UV) y tungsteno (visible). Intervalo de medición de absorbancia de 0.3-3.0 A. Celda de cuarzo o sílice de 1 cm.	Beckman Coulter, DU 530
Campana de extracción	Mínimo 500 CFM	Lanconco
Sistema de agua desionizada ultra purificada	Agua ultrapura tipo I. TOC ≤ 5 ppb	Millipore, Direct-Q3UV

Cuadro 124. Reactivos utilizados en la cuantificación de carotenoides totales.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Estándar de β-caroteno	β-Carotene (Carotene Nature, β,β-Carotene grado HPLC ≥ 96 % Synth., Cryst., Cat. 0003).	Ver preparación de curva de calibración.	Mantener a -80 °C y protegidos de la luz hasta su uso.
2-propanol	2-propanol, pureza ≥ 99.5 %, (J.T. Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0).	N/A	Manipular dentro de una campana de extracción.
Agua desionizada	Agua obtenida directamente del Direct-Q3UV millipore.	La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 µS/cm a 25°C.	N/A
Metanol grado HPLC	Metanol grado HPLC, pureza ≥ 99.9 % (JT Baker, Cat. 9093, CAS 67-56-1).	N/A	Manipular dentro de una campana de extracción.
Hexano grado HPLC	Hexano Pureza ≥ 95 %, CHROMASOLV para HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 270504, CAS 110-54-3).	N/A	Manipular dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Etanol con 0.1% de BHT	Etanol absoluto (Meyer, Cat. 0390, CAS 64-17-5). 2,6 di-terbutil-4-metil fenol, pureza ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Cat. B1378, CAS 128-37-0).	Disolver 250 mg de BHT en 100 mL de etanol. Aforar a 250 mL.	Estable durante 1 semana a temperatura ambiente.
Hidróxido de potasio al 80 %	Hidróxido de potasio (Merck, Cat. 1.05033, CAS 1310-58-3). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Disolver 80 g de hidróxido de potasio en 50 mL de agua destilada. Aforar a 100 mL.	Preparar la solución en baño de hielo, debido a que al disolverse la sosa se genera calor. (Reacción exotérmica)
Agua desionizada fría	Agua obtenida directamente del Direct-Q y mantenida en refrigeración (4°C).	La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 µS cm ⁻¹ a 25°C.	Mantener en refrigeración (4°C)

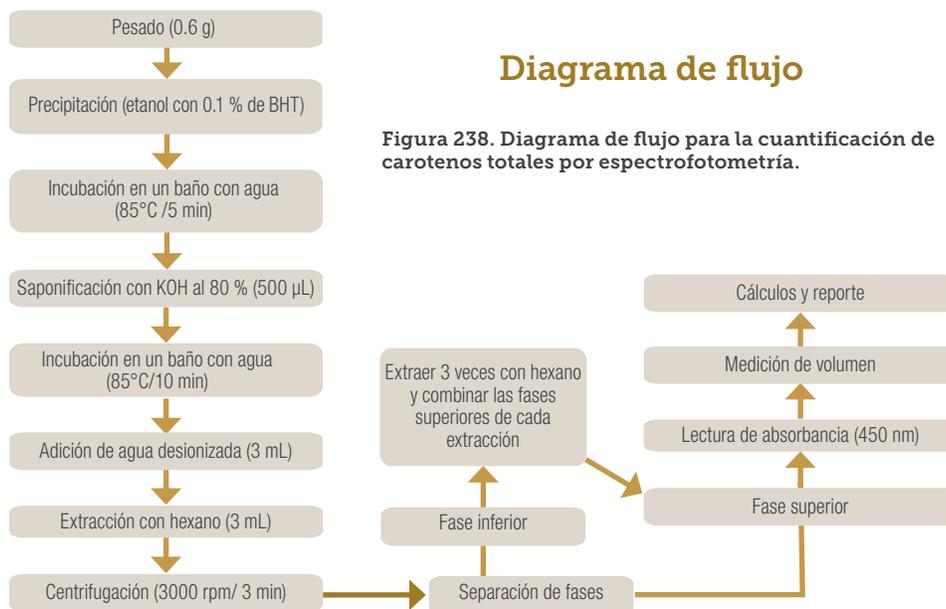


Figura 238. Diagrama de flujo para la cuantificación de carotenos totales por espectrofotometría.

Procedimiento

Curva de calibración de β -caroteno

Idealmente, la curva de calibración se debe realizar cada vez que se lleva a cabo un análisis, sin embargo, es posible realizar esta actividad al menos cada seis meses.

Preparación del estándar de β -caroteno.

1. Retirar del refrigerador o congelador el estándar y dejar que alcance la temperatura ambiente.
2. Reconstituir el estándar con 5 mL de 2-propanol de la siguiente manera:
 - a. Adicionar 200 μ L de 2-propanol al vial que contiene el estándar, mezclar y trasvasar a un vial debidamente identificado.
 - b. Repetir el paso anterior hasta que el 2-propanol sea incoloro (aproximadamente 5 veces).

NOTA: Realizar este proceso con extremo cuidado ya que el estándar contiene únicamente 1 mg de material.

- c. Adicionar el 2-propanol necesario para obtener los 5 mL, la concentración final del estándar es de 200 μ g mL⁻¹.
3. Tomar 500 μ L del estándar y transferirlos a un tubo de vidrio de 15 mL. Adicionar 1 mL de agua desionizada, 3 mL de metanol HPLC y 3 mL de hexano.
 4. Agitar en vórtex y esperar a que se lleva a cabo la separación de fases.
 5. Transferir la fase superior, con una pipeta Pasteur, a un tubo etiquetado y limpio.
 6. Agregar nuevamente 3 mL de hexano a la fase inferior, agitar con ayuda del vórtex y esperar a que se lleve a cabo la separación de las fases.
 7. Transferir la fase superior al tubo que contiene la fase previamente separada. Realizar esta extracción 3 veces (volumen final de 9 mL).
 8. Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm la absorbancia del estándar para determinar la concentración inicial (stock).
 9. Utilizar el hexano como blanco y el coeficiente de extracción de $E_{1\%,1\text{cm}} = 2592$ para calcular la concentración.

Construcción de la curva de calibración

A partir de la concentración calculada de la solución inicial, realizar una serie de diluciones con hexano, teniendo como límite máximo una absorbancia de 1.5.

Con las concentraciones y absorbancias respectivas de cada dilución, construir una gráfica como la que se muestra en la figura 239 para obtener la ecuación característica de la recta y el coeficiente de determinación (R^2).

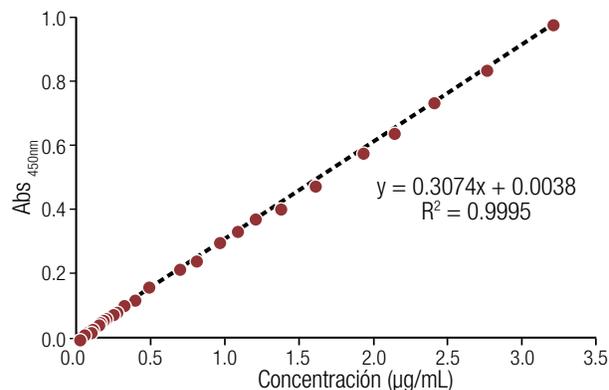


Figura 239. Curva de calibración para β -caroteno a 450 nm

Extracción y cuantificación de carotenos²

10. Pesar 0.6 g de harina en la balanza analítica y depositarla en un tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca.
11. Adicionar 6 mL de etanol con 0.1 % de BHT como antioxidante y agitar en vórtex.
12. Incubar las muestras a 85°C durante 5 minutos en baño María.
13. Retirar los tubos de la incubación y adicionar 500 μ L de hidróxido de potasio al 80 %. Agitar en vórtex.
14. Incubar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 85°C. Transcurridos los primeros 5 minutos, retirar los tubos del baño, agitarlos en vórtex e introducirlos de nueva cuenta en el baño hasta completar los 10 minutos de incubación. Retirar los tubos y colocarlos en un recipiente con hielo triturado.
15. Adicionar a cada tubo 3 mL de agua desionizada fría y agitar en vórtex.
16. En campana de extracción, agregar 3 mL de hexano a cada tubo y agitar en vórtex hasta diluir completamente el grumo de harina.
17. Centrifugar las muestras a 3,000 rpm durante 3 minutos.
18. Con una pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante (fase superior) a un tubo limpio y debidamente etiquetado. Mantener dichos tubos en hielo y bien tapados.
19. Repetir los pasos 7, 8 y 9 dos veces más (se obtiene un volumen aproximado de 9 mL).

20. Leer la absorbancia de los extractos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm, utilizando como blanco de ajuste hexano.
21. Medir el volumen total del extracto de carotenoides obtenido en una probeta de vidrio de 10 mL y registrar el valor.
22. Calcular la concentración de carotenoides totales de la muestra.

Cálculos

Concentración inicial del estándar (stock):

Partiendo de la Ley de Lambert-Beer, se tiene que:

$$A = (E\%) (L) (C)$$

Donde:

A = Absorbancia del estándar

E % = Coeficiente de Extinción $[(\%)^{-1} (\text{cm})^{-1}]$

L = distancia que la luz debe atravesar a través de la muestra (cm)

C = concentración del analito (% p/v)

Despejando la variable "C" de la tal fórmula, se tiene:

$$C = \frac{A}{(E\%)(L)} \times 10,000$$

Dónde: 10,000 = Factor para convertir de g 100 mL⁻¹ a µg mL⁻¹

Así, la concentración de carotenoides totales queda referida en µg mL⁻¹.

Ejemplo:

Absorbancia del estándar de β-caroteno (dada por el espectrofotómetro): 2.476

Coeficiente de extinción (E_{1%,1cm}) del β-caroteno en hexano a 450 nm: 2,592

Distancia de la trayectoria óptica (tamaño de la celda de cuarzo): 1 cm

Sustituyendo los valores en la fórmula anterior se tiene que:

$$C = \frac{2.476}{\left(\frac{2592}{\% \cdot \text{cm}}\right) * 1 \text{cm}} \times 10000 = \frac{2.476}{\left(\frac{2592}{\frac{\text{g}}{100 \text{mL}} * \text{cm}}\right) * 1 \text{cm}} \times 10000 = 9.552 \text{ µg/mL}$$

Concentración de carotenoides totales en la muestra húmeda:

Considerando la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración, el volumen de extracto obtenido y el peso de la muestra, se tiene que:

$$\text{CBH inicial} = \frac{Y-0.0038}{0.3074 \times M} \times V$$

Dónde:

CBH inicial = Concentración de carotenoides totales en base húmeda (µg g⁻¹)

Y = Absorbancia a 450 nm

M = Peso de la muestra (0.6 g)

V = Volumen de extracto obtenido (mL)

Ejemplo:

La absorbancia para una muestra "X" fue 0.1235, el volumen de extracto recuperado fue de 8.5 mL y el peso de la muestra 0.6019 g. Por lo tanto, sustituyendo los valores en la fórmula previa se tiene que:

$$\text{CBH inicial} = \frac{0.1235-0.0038}{0.3074 \times 0.6019} \times 8.5 = 5.499 \text{ µg/g}$$

Eficiencia de extracción:

La eficiencia de extracción (EE) para asegurar la confiabilidad de los resultados debe ser ≥ 90 %, de modo que este parámetro se calcula:

$$EE = \frac{(V \times 100)}{g}$$

Dónde:

EE = eficiencia de extracción (%)

V = Volumen de extracto en hexano obtenido (mL)

Finalmente, para expresar el resultado en base seca, se considera el porcentaje de humedad obtenido de la termobalanza y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{CBS} = \frac{\text{CBHreal} \times 100}{100 - \% H}$$

Dónde:

CBS = Concentración de carotenos totales en base seca (µg g⁻¹ de muestra)

CBH real = Concentración de carotenos totales en base húmeda (µg g⁻¹)

H = Contenido de humedad (%)

Cuadro 125. Solución a problemas comunes en la cuantificación de carotenos totales.

Problema	Solución
Variación en la coloración después de agregar el KOH.	Verificar que se está agregando el volumen correcto. Calibrar la micro pipeta utilizada.
Cambios en los volúmenes de la solución durante la incubación en el baño de agua.	Completar el volumen inicial (6 mL) con etanol conteniendo 0.1 % de BHT. Cambiar las tapas de los tubos por otra cuyo empaque o sello se encuentre en buenas condiciones.
La harina precipitada después de la centrifugación no se disuelve durante el mezclado en el vórtex.	Inclinarse ligeramente el tubo y mezclar en el vórtex, haciendo énfasis en el fondo del tubo, ya que si el grumo de harina no se disuelve, la extracción de los carotenoides no es eficiente.
Presencia de una película blanca semitransparente	La película se genera cuando se agrega agua a las fracciones de hexano. Por lo tanto, evitar que la película pase a la solución. Asegurarse que, concluida la centrifugación, no se haya formado película. Si esto ocurre, centrifugar una vez más.
Valores bajos para las muestras usadas como testigo (valores de referencia)	Verificar que el proceso de extracción se haya seguido correctamente. Verificar la preparación y caducidad de los reactivos utilizados. Verificar la curva de calibración. Asegurarse de que el grumo de harina fue desintegrado completamente.
Las mediciones de la absorbancia entre repeticiones varía significativamente	Verificar que el pipeteo se hace correctamente.

Referencias

- (1) Kljak, K.; Grbesa, D. and Karolyi, D. Reflectance colorimetry as a simple method for estimating carotenoid content in maize grain. *J. Cereal Sci.* 2014, 59: 109-111.
- (2) Kurilich, C. A. and Juvik, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in Zea mays. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47: 1948-1955.
- (3) Rodriguez, A. D. B. and Kimura, M. HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. Harvest Plus Technical Monograph 2. 2004, 58 p.
- (4) Salinas, M. Y.; Arellano S. S.; Ruiz, S. J. y Espinosa, T. E. Physicochemical characteristics and carotenoid content in yellow corn (*Zea mays* L.) grown in the state of Mexico. *Agricultura Técnica en México.* 2008, 34:357-364.
- (5) Luterotti, S.; Markovic, K.; Franko, M.; Bicanic, D.; Madzgalj, A. and Kljak, K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chem.* 2013, 140: 390-397.

Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por capacidad de absorción de radicales libres (ORAC)

Justificación

De los alimentos de origen vegetal no solo se obtienen los antioxidantes más conocidos como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol) y la provitamina A (β -caroteno), también se puede encontrar una mezcla de otras sustancias naturales con capacidad antioxidante como flavonoides, compuestos fenólicos, entre otros.

Los antioxidantes son compuestos que protegen el sistema biológico contra los daños que puedan causar una oxidación excesiva. De acuerdo a numerosos estudios la capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con la prevención de enfermedades degenerativas, como diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, cataratas y disfunciones de estrés oxidativa, por lo que llevando una dieta balanceada y rica en productos naturales con pigmentación rojo, morado, azul y amarillo (son indicativos de una alta capacidad antioxidante) es posible prevenir diferentes enfermedades^{1,2}

Fundamento

El ensayo para la determinación de la capacidad antioxidante (ORAC por sus siglas en inglés) originalmente fue desarrollado por Cao y colaboradores³ y consiste en la medición de fluorescencia de una molécula a la que se somete a la acción de un generador de radicales libres. A medida que la molécula fluorescente es atacada y dañada por los radicales va perdiendo su fluorescencia, evaluando así el área bajo la curva (AUC) de la muestra, comparada con el blanco que no tiene ningún compuesto antioxidante. Los resultados se expresan como equivalentes de Trolox. ORAC es de los pocos métodos para determinación de capacidad antioxidante que en su resultado incluye el porcentaje y tiempo de inhibición en que actúan las especies reactivas por antioxidantes⁴.

Cuadro 126. Material y equipo utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Baño María	85°C	Polyscience.
Centrífuga	Para tubos cónicos de 50 mL	Beckman Coulter, Allegra X-12
Centrífuga	Para tubos Eppendorf	Eppendorf 5417R
Termomixer	N/A	Eppendorf, Thermomixer comfort
Incubadora de microplacas	N/A	ThermoStat Plus
Micropipetas	20 – 200 μ L, 100 – 1000 μ L y 0.5 – 5 mL	Eppendorf
Pipeta multicanal	20 – 300 μ L	Eppendorf Research Pro
Lector de microplacas	N/A	PheraStar
Microplacas	96 pozos para fluorescencia (negras)	NUNC
Tubos de vidrio	10 mL	Pyrex
Campana de extracción	Mínimo 500 CFM	Labconco
Pipetas Pasteur	3 mL	Corning
Bulbos de goma	5 mL	Thomas Scientific
Evaporador SpeedVac	Cabezal para 60 microtubos	Thermo Scientific
Sonicador	1 L	Branson 2510
Microtubos	1.5 y 2 mL	Eppendorf
Tubos de vidrio con tapa de rosca	15 mL	Pyrex

Cuadro 127. Reactivos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol 80%	Etanol absoluto (EMSURE, Cat. 1009835000, CAS 64-17-5).	Mezclar 80 mL de etanol con 20 mL de agua destilada. Homogenizar.	Preparar diariamente.
Hidróxido de Sodio 2N.	Hidróxido de sodio grado reactivo (JT Baker, Cat. 3722-05, CAS 1310-73-2).	Adicionar poco a poco 80 g de NaOH a 900 mL de agua destilada, disolverlo en agitación y en baño de hielo. Cuando la solución esté a temperatura ambiente aforar a 1L.	Preparar en campana de extracción. Almacenar a temperatura ambiente.
Ácido Clorhídrico 2N	Ácido clorhídrico al 37% grado reactivo (JT Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0).	En un matraz agregar 600 mL de agua Millipore y adicionar poco a poco 172 mL de HCl 37%. Una vez que está a temperatura ambiente, aforar a 1 L.	Preparar en campana de extracción.
Hexano	Hexano HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 27054, CAS 110-54-3).	Usar directamente.	
Acetato de Etilo	Acetato de etilo 99.9% (JT Baker, Cat. 9280, CAS 141-78-6).	Usar directamente.	
Metanol 50%	Metanol (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1).	Mezclar 50 mL de metanol con 50 mL de agua Millipore. Homogenizar.	Preparar diariamente.
BHT 0.1%	Etanol absoluto (EMSURE, Cat. 1009835000, CAS 64-17-5). 2, 6 di-terbutil-4-metilfenol (Sigma Aldrich, Cat. B1378, CAS 128-37-0).	Disolver 250 mg de BHT en 100 mL de etanol. Aforar a 250 mL.	Estable por una semana a temperatura ambiente.
Hidróxido de potasio 80%.	Hidróxido de potasio (EMSURE, Cat. 1.05033.1000, CAS 1310-58-3).	Transferir 80 g de hidróxido de potasio a un matraz aforado de 100 mL. Adicionar agua hasta disolver. Aforar.	Para la preparación colocar el matraz en baño de hielo y colocar en una parrilla de agitación.
Agua grado HPLC	Agua directa del Milli-Q.	Usar directamente.	La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C.
Hexano HPLC	Hexano grado HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 27054, CAS 110-54-3).	Usar directamente.	Utilizar el solvente en la campana de extracción
Metanol: Isopropanol (50:50)	Metanol (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS. 67-56-1). Isopropanol (JT Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0).	Preparar una solución de 10 mL de metanol concentrado y agregarle 10 mL de isopropanol concentrado. Homogenizar.	Preparar diariamente. Ajustar el volumen de acuerdo a la cantidad de muestras a analizar en un día.
Buffer de fosfatos (75 mM, pH 7.4)	Solución buffer de fosfatos 1.0 M pH 7.4 (Sigma Aldrich, Cat. P3619).	A 75 mL de la solución de buffer de fosfato, adicionar 500 mL de agua destilada, homogenizar y aforar a un litro. Ajustar pH con ácido clorhídrico.	La solución buffer de fosfatos 1.0 M se precipita, se recomienda temperar un día antes de preparar la solución para que las sales precipitadas se disuelvan. Estable por un mes a 4°C.
Trolox 20 mM	Trolox [(±)6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2- acidocarboxílico] (Sigma Aldrich, Cat. 238813-5G, CAS 53188-07-1).	En un tubo de vidrio de 10 mL, pesar 25 mg de Trolox. Adicionar 2.5 mL de buffer de fosfatos 75 mM. Sonicar por 10 min.	Preparar un día antes de hacer el proceso. Almacenar máximo 30 días a -20°C, protegido de la luz.
Trolox 100 μM	Trolox 20 mM.	De la solución de trolox 20 μM , tomar una alícuota de 0.250 mL y aforar a 50 mL con buffer de fosfatos 75 mM, pH 7.4.	Almacenar en frasco ámbar o cubrir con papel aluminio el recipiente contenedor. Almacenar a 4°C máximo 1 semana.
Fluoresceína 400 μM	Sal sódica de fluoresceína (Sigma Aldrich, Cat. F6377, CAS 518-47-8).	Disolver 15.05 mg de fluoresceína en buffer de fosfatos 75 mM, pH 7.4. Aforar a 100 mL.	Almacenar en frasco ámbar o cubrir con papel aluminio. Almacenar a 4°C. Estable por 3 meses.
Fluoresceína 0.1 μM	Sal sódica de fluoresceína (Sigma Aldrich, Cat. F6377, CAS 518-47-8).	De la solución de fluoresceína 400 μM , agregar 0.1 mL y aforar a 10 mL con buffer de fosfatos 75 mM, pH 7.4. De ésta solución tomar 0.325 mL y aforar a 13 mL.	Cubrir los tubos con papel aluminio. Preparar diariamente.
AAPH	AAPH (2,2'-azobis-2-metilpropanimidamida, diclorhidrato) (Sigma Aldrich, Cat. 440914, CAS 2997-92-4).	Disolver 103.5 mg de AAPH en 2.5 mL de buffer de fosfatos 75 mM, pH 7.4. Mantener en baño de hielo.	Preparar diariamente. No reutilizar la solución. Cantidad requerida para una placa.

Alcance

Éste método permite analizar de 12 a 24 muestras por día con la colaboración de 2 personas capacitadas y es compatible con cualquier variedad de maíz y sus

derivados, que dependiendo su concentración de compuestos antioxidantes puede modificarse la dilución de la muestra para su transferencia a microplaca.

Diagrama de flujo

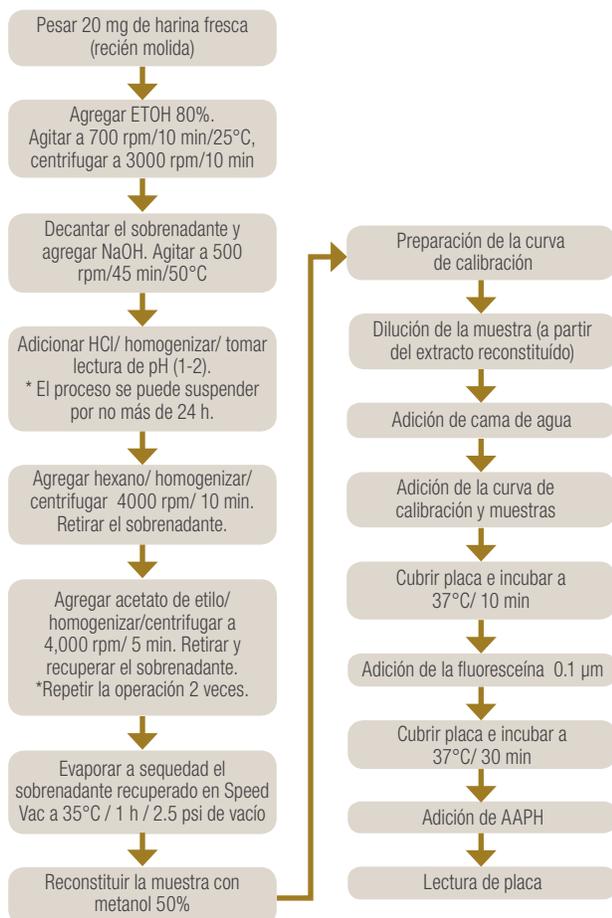


Figura 240. Diagrama de flujo para determinación de fracción hidrofílica.

Procedimiento

Fracción Hidrofílica

1. Pesarse 20 mg (\pm 1 mg) de harina recién molida en un tubo cónico de 2 mL.
2. Adicionar 500 μ L de etanol 80% y agitar en vórtex.
3. Colocar los tubos en el termomixer y agitar a 700 rpm durante 10 minutos a 25°C.
4. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min.
5. Decantar el sobrenadante y continuar trabajando con el precipitado (pellet de harina).
6. Agregar 500 μ L de hidróxido de sodio 2M y agitar en vórtex.
7. Colocar los tubos en el termomixer y agitar a 500 rpm durante 45 minutos a 50°C.
8. Adicionar 500 μ L de ácido clorhídrico 2 M y agitar en vórtex. En este paso se puede detener el proceso por no más de 24 h, tapando los tubos y dejándolos en un lugar fresco y seco.

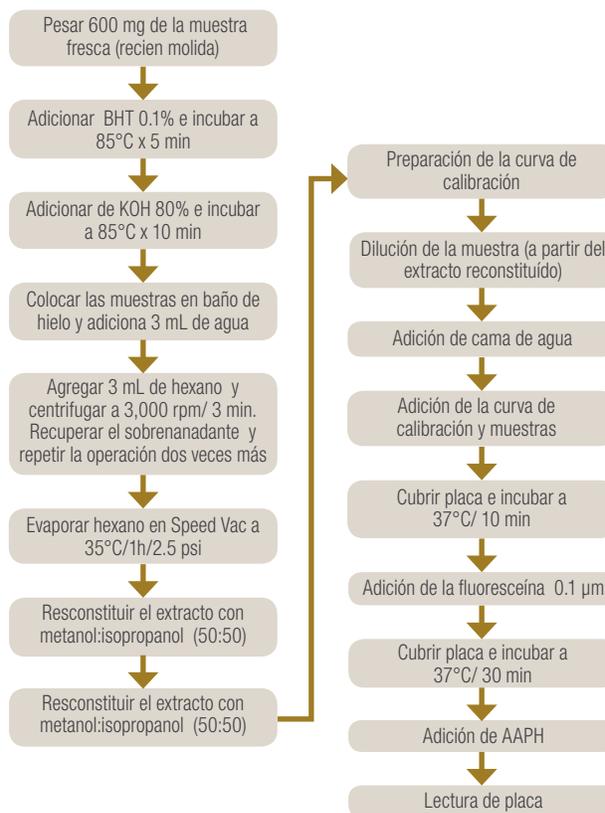


Figura 241. Diagrama de flujo para determinación de fracción lipofílica.

NOTA: Se sugiere tomar al azar algunas muestras para verificar el pH (con tiras reactivas), mismo que deberá encontrarse entre 2 y 2.5.

9. Adicionar 500 μ L de hexano, agitar en vórtex y centrifugar a 4000 rpm durante 5 min. Con una pipeta Pasteur, descartar cuidadosamente el sobrenadante para no tomar el precipitado.
10. Adicionar 500 μ L de acetato de etilo a cada tubo y mezclar en vórtex.
11. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos.
12. Retirar el sobrenadante y coleccionar en un microtubo de 1.5 mL.
13. Repetir los pasos 10 a 12 hasta completar 3 lavados.
14. Evaporar a sequedad el extracto obtenido en Speed Vac a 35°C por 1 hora a 2.5 psi de vacío durante 50 minutos.
15. Resconstituir la muestra adicionando 0.5 mL de metanol 50%.

Fracción Lipofílica

16. Pesar 600 mg de harina y depositarla en un tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca.
 17. Agregar 6 mL de etanol con 0.1 % de BHT como antioxidante y agitar en vórtex.
 18. Incubar las muestras a 85°C durante 5 minutos en baño María.
 19. Retirar los tubos de la incubación y adicionar 500 μ L de hidróxido de potasio al 80 %. Agitar en vórtex.
 20. Incubar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 85°C. Transcurridos los primeros 5 minutos, retirar los tubos del baño, agitarlos en vórtex e introducirlos de nueva cuenta en el baño hasta completar los 10 minutos de incubación. Retirar los tubos y colocarlos en un recipiente con hielo triturado.
 21. Adicionar a cada tubo 3 mL de agua desionizada fría y agitar en vórtex.
 22. En campana de extracción, agregar 3 mL de hexano a cada tubo y agitar en vórtex hasta diluir completamente el grumo de harina.
 23. Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 3 minutos.
 24. Con una pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante (fase superior) a un tubo limpio y debidamente etiquetado. Mantener dichos tubos en hielo y bien tapados.
 25. Repetir los pasos 22, 23 y 24 dos veces más (se obtiene un volumen aproximado de 9 mL).
 26. Evaporar totalmente los sobrenadantes obtenidos en el punto 9 utilizando el Speed Vac (aproximadamente 50 minutos). Culminada esta etapa, cubrir inmediatamente los tubos con sus respectivos tapones.
- NOTA: Las muestras evaporadas son estables hasta 24 h si se mantienen a -20°C.
27. Reconstituir la muestra evaporada adicionando 500 μ L de una solución de metanol:isopropanol (50:50).

Preparación de la placa

28. Homogenizar en vórtex, verificar que toda la muestra haya sido solubilizada.
29. Dilución de la muestra:
Para dilución 1:75.
En tubos de 10 mL agregar 0.12 mL de la muestra reconstituida más 9.88 mL de buffer de fosfatos pH 7.4, para obtener un volumen de 10 mL. En caso de que la muestra esté muy concentrada, aumentar la dilución. Se recomienda para granos amarillos.

Para dilución 1:100.

En tubos de 10 mL agregar 0.1 mL de la muestra reconstituida más 9.90 mL de buffer de fosfatos pH 7.4, para obtener un volumen de 10 mL. En caso de que la muestra esté muy concentrada, aumentar la dilución. Se recomienda para granos morados o azules.

Llenado de la placa:

El llenado de la placa se hace de forma vertical (de arriba hacia abajo y la segunda mitad de abajo hacia arriba).

30. Adicionar 200 μ L de agua desionizada, la cual funciona como cámara de protección para las muestras (Figura 242).



Figura 242. Adición de cámara de agua.

31. Adicionar 25 μ L de cada tubo de la curva de calibración (Figura 243) en la primera fila de arriba hacia abajo y en la última fila de abajo hacia arriba (el propósito de hacer el sentido inverso es para compensar la reacción que ya se inició en las primeras muestras).



Figura 243. Adición de curva de calibración.

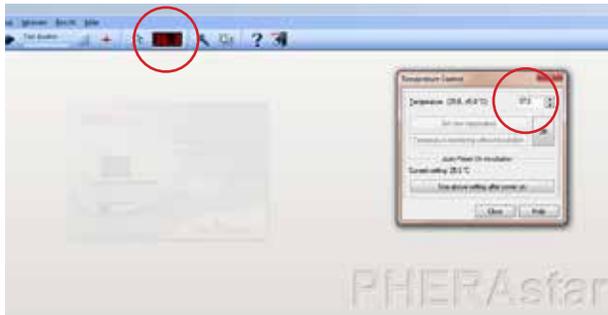


Figura 247. Programación de la temperatura.

39. Seleccionar el icono de menú (que estará activado). En la ventana aparecen las plantillas que se utilizaron por última vez, entre ellas la plantilla de ORAC. Seleccionar la plantilla dando clic sobre el nombre de la última corrida (Figura 248).

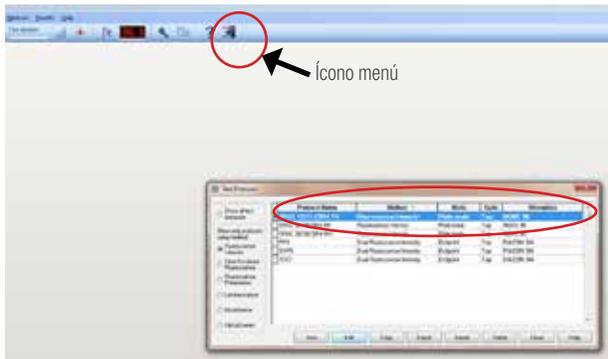


Figura 248. Selección de plantilla.

40. Aparece una ventana en donde están los parámetros que se tienen que utilizar para la lectura de la placa, se debe verificar que estén correctos en las pestañas de *basic parameters* (Figura 249) y *layout* (Figura 250).

Basic parameters:

- Nombre del experimento
- Microplate: NUNC 96
- Focal height: 7.6
- Positioning delay: 0.3
- No. of cycles: 65
- No. of flashes per well and cycle: 10
- Cycle time: 90.
- No. of multichromatics: 1
- Optic module: FI 485 520

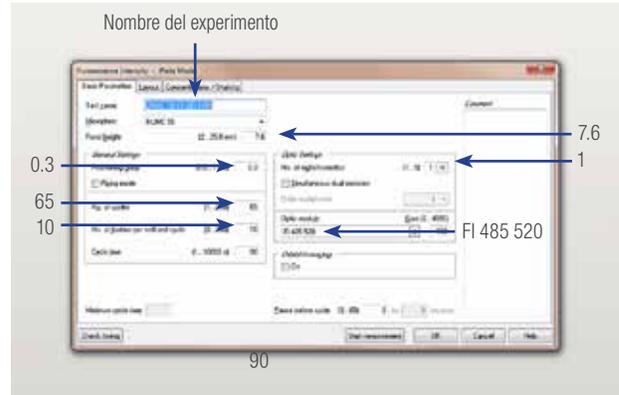


Figura 249. Programación de variables en basic parameters.

Layout:

- Index: Start value: 1, increase.
- Replicates: 1, horizontal.
- Reading direction: Arriba-abajo.

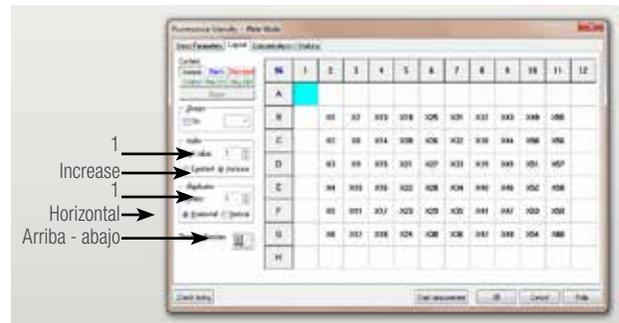


Figura 250. Programación de variables en layout.

41. Verificar que en la pestaña de *concentration/shaking* los parámetros sean correctos de acuerdo a la figura 251. Una vez que los parámetros para lectura estén correctos, dar clic en el botón *start measurement*.

- Mode: Orbital.
- Shaking width: 4 > 175 rpm.
- Shaking: Before each cycle.
- Shaking time: 8.
- Start measure.

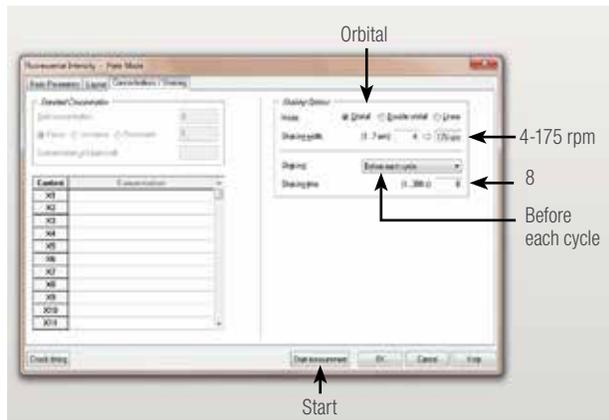


Figura 251. Programación de variables en concentration/shaking.

42. Posteriormente aparece otra ventana, en donde se verifican los parámetros *focus and gain adjustment* de la figura 252.

- Optic module: FI 845 520.
- Focal height: 7.6.
- Gain adjustment.
- Selected well.
- Required value: 21%.

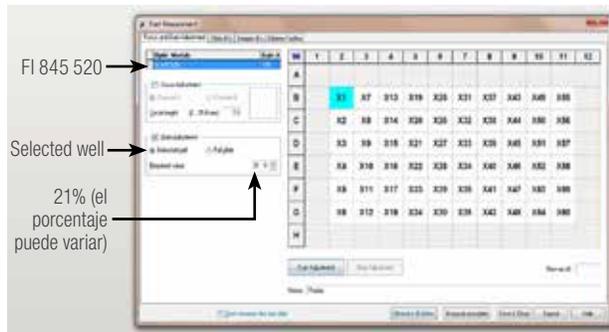


Figura 252. Programación de variables en focus and gain adjustment.

43. Una vez que se han verificado los parámetros y éstos son correctos, colocar la placa en el equipo y dar clic en el botón *gain adjustment* para ajustar con el blanco de la curva, que debe estar entre 50000-55000 de ganancia. Ya que la placa está ajustada, presionar el botón *measure one plate* (Figura 253), el equipo comenzará con el ciclo de lectura que dura 96 min.

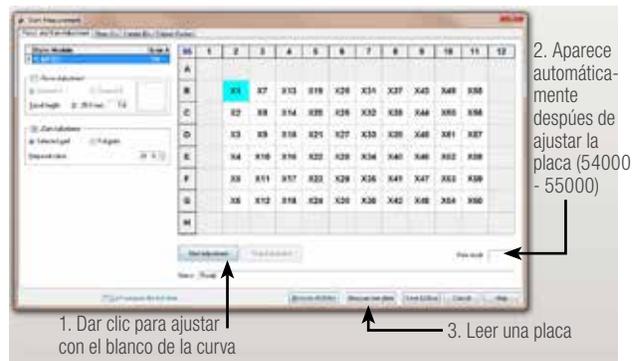


Figura 253. Ajuste y lectura de la placa.

44. Para visualizar los datos obtenidos, desplegar la opción *results* y seleccionar la opción *open de last test run*, que muestra la lectura de la última corrida o análisis realizado (Figura 254).

- *Results > open the last test run.*



Figura 254. Visualización de datos.

45. En la pantalla aparecen las gráficas de la pérdida de fluorescencia de las muestras analizadas y en la misma la opción *table view*, que se debe seleccionar para la obtención de los datos numéricos (Figura 255).



Figura 255. Visualización de los ciclos en gráficas.

46. Desplegar la opción *All* y seleccionar *All cycles* y en la tabla aparecen todos los ciclos de la pérdida de fluorescencia de cada muestra (Figura 256).

Figura 256. Visualización de los datos de todos los ciclos.

47. Los datos deben exportarse a Excel para su procesamiento, dando clic en el ícono de excel (*export displays table to excel*) los envía a un archivo para la aplicación de la fórmula (Figura 257).

Figura 257. Exportar datos a Excel.

Cálculo de la capacidad antioxidante

48. Determinar el área bajo la curva (AUC) de cada muestra con la siguiente fórmula (seguir el mismo método para la curva de calibración):

$$AUC = 0.5 + (R_1/R_1) + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1) + 0.5 * (R_n/R_1)$$

49. Determinar el AUC Neta, restando el blanco de la curva a la AUC de la muestra (se sigue el mismo método para la curva de calibración):

$$AUC \text{ Net} = AUC_{\text{muestra}} - AUC_{\text{Blanco}}$$

50. Determinar la concentración de μMol de Trolox por litro de muestra ($\mu\text{Mol TE L}^{-1}$) aplicando la fórmula de regresión lineal:

$$x = \frac{Y - b}{m}$$

Dónde:

$x = \mu\text{MTE L}^{-1}$.

$Y = \text{AUC Net}$.

$b = \text{intersección}$.

$m = \text{pendiente}$.

51. Posteriormente aplicar la siguiente fórmula, de acuerdo al volumen y peso utilizado para el análisis:

$$\frac{\mu\text{MTE}}{100\text{g}} = \frac{\frac{(x \times \text{dil}) \text{ Vf}}{1000}}{W} \times 100$$

Dónde:

$x = \mu\text{M TE/L}$

dil = Dilución

Vf = Volumen final

W = peso

52. Para el cálculo en base seca:

$$\frac{\mu\text{MTE}}{100\text{g}} = \frac{\frac{(x \times \text{dil}) \text{ Vf}}{1000}}{W} \times 100$$

Dónde:

H = Humedad de la muestra.

Cuadro 129. Solución a problemas comunes en la determinación de la capacidad antioxidante por ORAC.

Problema	Solución
El pH de la muestra no disminuyó al agregarle el HCl.	Agregar HCl poco a poco e ir tomando lectura de pH hasta que esté en 1.
Al centrifugar, la muestra no se separó.	Dar ligeros golpeteos del tubo en forma vertical contra una base sólida. Centrifugar nuevamente.
La muestra no se evaporó correctamente en el Speed Vac.	Verificar que la bomba de vacío esté encendida. Agregar 10 min o más hasta evaporar completamente el extracto.
Hay una capa gelatinosa en el fondo de los tubos de las muestras que ya fueron evaporadas.	Al momento de hacer los lavados con acetato de etilo o hexano, verificar extraer solo el sobrenadante.
No hay repetibilidad en las muestras.	Verificar que la muestra sea fresca. Verificar la calibración de balanzas y pipetas. Verificar el pipeteo correcto. El proceso se debe realizar en ausencia de luz blanca. Por el tipo de análisis los resultados en las muestras no serán iguales, por eso es necesario analizar la muestra por triplicado y en los cálculos promediar los tres datos.
La curva de calibración no termina su ciclo.	Verificar el pipeteo. Verificar la caducidad de los reactivos. El Trolox está muy concentrado, por lo que no terminará su ciclo.

Referencias

- Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 2001, 73 (2), 239–244.
- Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (12), 4026–4037.
- Cao G.; Prior R. L. Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. *Methods* 1999, 299 (1995), 50–62.
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (1), 48–54.

Determinación de la capacidad antioxidante de harina de maíz por el método de DPPH

Justificación

De los alimentos de origen vegetal no solo se obtienen los antioxidantes más conocidos como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α-tocoferol) y la provitamina A (β-caroteno), también se puede encontrar una mezcla de otras sustancias naturales con capacidad antioxidante como flavonoides, compuestos fenólicos, entre otros.

Los antioxidantes son compuestos que protegen el sistema biológico contra los daños que puedan causar una oxidación excesiva. De acuerdo a numerosos estudios la capacidad antioxidante está estrechamente relacionada con la prevención de enfermedades degenerativas, como diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurológicas, cataratas y disfunciones de estrés oxidativa, por lo que llevando una dieta balanceada y rica en productos naturales con colores con pigmentación rojo, morado, azul y amarillo (son indicativos de una alta capacidad antioxidante) es posible prevenir diferentes enfermedades^{1,2}

Fundamento

La metodología consiste en una extracción del pigmento del maíz con etanol (análisis utilizado para extracción de antocianinas por HPLC en el laboratorio de calidad nutricional de maíz del CIMMYT⁵) y posteriormente reacción antioxidante con el radical DPPH. El análisis por radical DPPH se basa en transferir electrones a una solución de etanol (color violeta), una vez los radicales libres de DPPH entran en contacto con la solución, provoca pérdida de color (de violeta a amarillo) y por ende, la pérdida de absorbancia^{3,4}.

Alcance

Con esta metodología se pueden analizar 17 muestras por día con la colaboración de un técnico capacitado. Está diseñado específicamente para maíces pigmentados.

Cuadro 130. Material y equipos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo AE160
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Matraces volumétricos	25, 50 y 100 mL	Pyrex
Sonicador	Capacidad de 1 L	Branson, 2510
Centrífuga	Para tubos Eppendorf	Eppendorf 5417R
Termomixer	Para microtubos de 2 mL	Eppendorf, Thermomixer comfort
Potenciómetro	N/A	OAKTON pH 510 Series
Micropipetas	0.1 – 10, 20 – 200 μ L, 100 – 1000 μ L y 0.5 – 5 mL	Eppendorf
Pipeta multicanal	20 – 300 μ L	Eppendorf Research Pro
Lector de microplacas	N/A	Biotek
Microplacas	96 pozos	NUNC
Campana de extracción	Mínimo 500 CFM	Labconco
Evaporador SpeedVac	Cabezal para 60 microtubos	Thermo Scientific UVS400
Microtubos	2 mL.	Eppendorf
Temporizador digital	N/A	Sper Scientific 810015

Cuadro 131. Reactivos utilizados en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.

Reactivo / mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
DPPH 1 mM	DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) (Sigma Aldrich, Cat. D9132-5G, CAS 1898-66-4).	En un tubo cónico de 50 mL. Disolver 9.9 mg de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) en 25 mL de Metanol (por ser una solución oscura, aforar abajo del menisco). Sonicar la solución por 3 min.	Estable por 1 mes a -20 °C. Para su preparación utilizar respirador de polvos. Cubrir el tubo con papel aluminio para proteger del contacto con la luz.
Dilución de DPPH 200 μ M.	DPPH (1 mM).	En un tubo cónico de 50 mL. Tomar una alícuota de 10 mL de la solución 1 mM y aforar a 50 mL con Metanol.	Se prepara diariamente y se desecha al haber concluido el análisis.
Ácido Ascórbico 1 mM.	Ácido Ascórbico (Sigma Aldrich, Cat. A92902-25G, CAS 50-81-7).	En un matraz volumétrico de 100 mL. Disolver 17.6 mg de ácido ascórbico y aforar a 100 mL con metanol. Almacenar en un frasco bien cerrado. Para disolver la solución sonicar durante 3 min.	Estable por 1 mes a -20 °C. Cubrir el matraz con papel aluminio para proteger del contacto con la luz.
Mezcla metanol-HCL 1%.	Metanol grado HPLC (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Ácido clorhídrico (JT Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0).	Utilizar directamente.	Estable por 1 mes a temperatura ambiente.

Diagrama de flujo

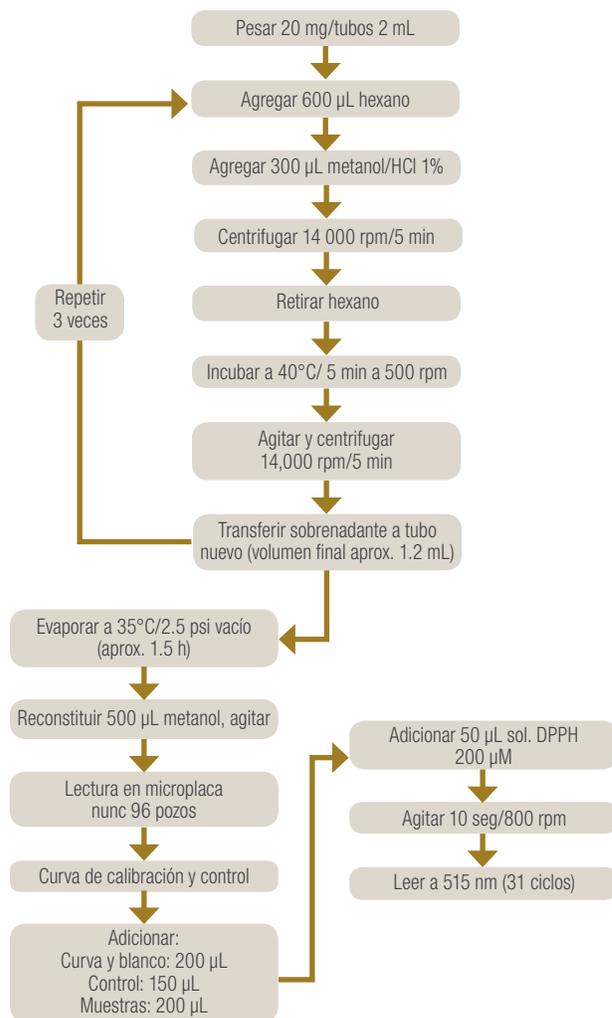


Figura 258. Diagrama de flujo.

Procedimiento

1. En microtubos de 2 mL, pesar 20 mg (\pm 0.1) de la muestra.
2. Adicionar 600 μ L de hexano y agitar en vórtex.
3. Adicionar 300 μ L de la solución de metanol con ácido clorhídrico al 1% y agitar en vórtex.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
5. Retirar el sobrenadante con ayuda de una pipeta y descartar.
6. Incubar los microtubos en termomixer a 40°C por 5 minutos a 500 rpm.
7. Agitar en vórtex.
8. Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos.
9. Transferir (decantando) el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL debidamente identificado.

- Con el precipitado (pellet), repetir los pasos 2 a 4 (tres veces).
- Evaporar los sobrenadantes utilizando el Speed Vac (aproximadamente 90 minutos a 35 °C y presión de vacío de 2.5 psi).

Para grano completo

- Reconstituir la muestra con 160 µL de metanol y agitar en vortex hasta que la muestra se incorpore a la solución.
- Si la solución reconstituida presenta sedimentos, centrifugar a 14 000 rpm durante 3 minutos.
- Posteriormente ajustar la concentración de las muestras, ésta tiene que ser la misma para todas sin importar el volumen, por ejemplo, para una muestra con una concentración de antocianinas por cromatografía de 658.35 µg g⁻¹, tomar una alícuota de 17 µL de la solución reconstituida y llevarla a 350 µL con metanol.

Para olate

- Reconstituir la muestra con 1.5 mL de metanol y agitar en vortex hasta que la muestra se incorpore a la solución.
- Si la solución reconstituida presenta sedimentos, centrifugar a 14,000 rpm durante 3 minutos.
- Posteriormente ajustar la concentración de las muestras, ésta tiene que ser la misma para todas sin importar el volumen, *por ejemplo, para una muestra con una concentración de antocianinas por cromatografía de 5618.54 µg g⁻¹, tomar una alícuota de 11 µL de la solución reconstituida y llevarla a 1.5 mL con metanol.*

NOTAS:

- No reconstituir las muestras si no pueden ser leídas inmediatamente, conservarlas a -20°C por no más de 24 horas.
- El límite de cuantificación de Capacidad Antioxidante de este ensayo está dado por el conocimiento previo de la concentración de antocianinas para cada muestra.

Preparación de la curva estándar de DPPH

- En un tubo cónico de 50 mL preparar una solución concentrada de DPPH 0.1 mM: Tomar una alícuota de 10 mL de DPPH 200 µM y agregar 10 mL de metanol para un volumen final de 20 mL. Esta solución se debe preparar diariamente.

- En tubos de vidrio de 5 mL, preparar diariamente diluciones de 0.010, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080, y 0.100 mM de DPPH y aforar a 2 mL con metanol. Agitar en el vortex antes de usar y cubrir con papel aluminio para proteger del contacto con la luz.

Cuadro 132. Preparación de la curva de DPPH y concentraciones.

No. Tubo	DPPH 0.1 mM (mL)	Metanol (mL)	Concentración de DPPH (mM)	Volumen Final (mL)
1	0.200	1.800	0.010	2.000
2	0.400	1.600	0.020	2.000
3	0.800	1.200	0.040	2.000
4	1.200	0.800	0.060	2.000
5	1.600	0.400	0.080	2.000
6	2.000	0.000	0.100	2.000

Curva control de ácido ascórbico

- En un tubo cónico de 50 mL preparar una solución concentrada de 0.1 mM de ácido ascórbico: Tomar una alícuota de 2.5 mL de Ácido Ascórbico 1 mM y aforar a 25 mL con metanol. Esta solución se debe preparar diariamente.
- En tubos de vidrio de 5 mL, preparar diariamente diluciones de 0.010, 0.020, 0.040, 0.060, 0.080, y 0.100 mM de DPPH y aforar a 2 mL con metanol. Agitar en el vortex antes de su uso y cubrir con papel aluminio para proteger del contacto con la luz.

Cuadro 133. Preparación de las concentraciones de ácido ascórbico.

No. Tubo	Ácido Ascórbico 0.1 mM (mL)	Metanol (mL)	Concentración de Ácido Ascórbico (mM)	Volumen Final (mL)
1	0.200	1.800	0.010	2.000
2	0.400	1.600	0.020	2.000
3	0.800	1.200	0.040	2.000
4	1.200	0.800	0.060	2.000
5	1.600	0.400	0.080	2.000
6	2.000	0.000	0.100	2.000

Reacción Colorimétrica

Las siguientes actividades deben realizarse en un medio con temperatura controlada y luz amarilla, nunca con luz directa. En una microplaca NUNC de 96 pozos (Figura 259):

- De la curva de calibración, agregar 200 µL de cada dilución (por duplicado).

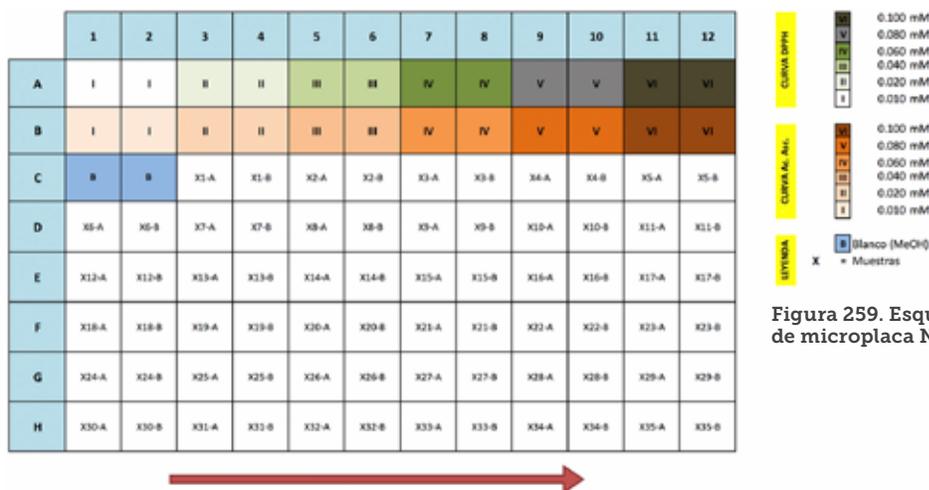


Figura 259. Esquema del llenado de microplaca NUNC 96.

Para el control, agregar 150 μ L de ácido ascórbico de las diferentes concentraciones de la curva del control (por duplicado).

- Para el blanco, se agregan 200 μ L de metanol (por duplicado). Y finalmente se agregan 150 μ L de cada muestra (por duplicado).
- Para iniciar la reacción, a cada pozo adicionar 50 μ L de la solución DPPH 200 μ M, el volumen final deberá ser de 200 μ L. Homogenizar la solución de la microplaca, por medio de agitación orbital a 800 rpm durante 10 segundos.
- Medir la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm en un espectrómetro de placa utilizando una cinética de 31 ciclos, es decir, para grano lecturas cada minuto durante 30 minutos y para olote lecturas cada minuto durante 60 minutos.

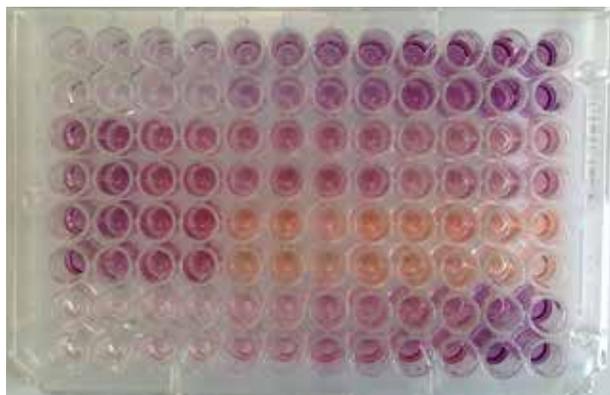


Figura 260. Placa después de reacción colorimétrica.

NOTA: Al final del proceso, las muestras con mayor actividad antioxidante cambian de color morado a amarillo en menor tiempo.

Cálculos

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DPPH} = (A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) * 100 / A_{\text{control}}$$

A_{control} = Absorbancia del DPPH 0.1 mM (tiempo cero)

A_{muestra} = Absorbancia de cada muestra obtenida después de 30 minutos (para grano) o 60 minutos (para olote) con DPPH 0.2 Mm.

Cuadro 134. Solución a problemas comunes en la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH.

Problema	Solución
Evaporación incompleta o nula	Completar el proceso de evaporación, programando sesiones breves (pueden ser de unos cuantos minutos). Utilizar muestras muy frías (recién sacadas del refrigerador) para evitar evaporación. Verificar que el empaque de la tapa de la cámara de evaporación esté bien colocado.

Referencias

- Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 2001, 73 (2), 239–244.
- Wu, X.; Beecher, G. R.; Holden, J. M.; Haytowitz, D. B.; Gebhardt, S. E.; Prior, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52 (12), 4026–4037.
- Muñoz Juárez, M. A.; Gutiérrez, D. M. Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol *Nicotiana Glauca*. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* 2004, 26 (2), 1–4.
- Molyneux, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* 2004, 26 (December 2003), 211–219.
- Galicia, L.; Miranda, A.; Gutiérrez, M. G.; Custodio, O.; Rosales, A.; Ruiz, N.; Surles, R. *Protocolos del laboratorio. Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal*; 2012.

Determinación de antocianinas totales en granos de maíz pigmentados

Justificación

En diversas razas de maíz se presentan variantes de grano pigmentado con coloraciones que van desde el negro hasta el rosa pálido, siendo los rojos y azul/morados los más comunes¹. El color se determina por el contenido de pigmentos encontrados, destacando las antocianinas y flobafenos en maíces azules y rojos². En general, los maíces pigmentados son producidos por agricultores de subsistencia, en suelos marginales y en pequeñas superficies, y la mayor parte de su producción es para autoconsumo, destinada principalmente a propósitos ornamentales y alimentos “especiales”^{1,3}. Debido a la cantidad significativa de antocianinas, se ha determinado que este tipo de maíz presenta una alta actividad antioxidante, antimutagénica y quimiopreventiva, lo que podría contribuir en la prevención del estrés oxidativo, cáncer, alto colesterol, arterioesclerosis y envejecimiento⁴⁻⁷

Fundamento

El carácter polar de las antocianinas permite su extracción utilizando metanol, haciendo de este un proceso sencillo, rápido y eficiente. El metanol debe ser acidificado (usualmente con HCl) para obtener la forma del catión flavilio, el cual presenta una tonalidad roja y es estable en medios altamente ácidos⁸. Para prevenir la evaporación del solvente, lo cual puede ocasionar hidrólisis en los enlaces lábiles acilo, situación que se agrava por la presencia del HCl⁹, se debe utilizar el metanol a baja temperatura (4°C) y utilizar el HCl en mínimas cantidades, por lo que se emplea el ácido trifluoroacético (TFA) para obtener el bajo pH, el cual es más volátil que el HCl y permite extraer también antocianinas poliacetiladas más complejas¹⁰. A mayor intensidad en la coloración roja, corresponde una mayor concentración de antocianinas.

Alcance

La presente metodología aplica para todo tipo de maíz pigmentado (excepto amarillos). Una persona calificada puede procesar hasta 72 muestras por día.

Cuadro 135. Material y equipos utilizados en la determinación de antocianinas totales.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG135
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Microtubos	1.5 mL	Eppendorf
Centrífuga	Para microtubos	Eppendorf, 5417R
Microplacas	96 pozos	NUNC
Agitador	Horizontal	Eberbach
Vaso de precipitados	250 mL	Pyrex
Frasco de vidrio	Tapa de rosca, 50 mL	Pyrex
Frasco de vidrio ámbar	Tapa de rosca, 100 mL	Pyrex
Micropipetas	20 – 200 µL y 100 – 1000 µL	Eppendorf
Matraz aforado	100 mL	Pyrex
Lector de microplacas	N/A	Quant BioTek

Cuadro 136. Reactivos utilizados en la determinación de antocianinas totales.

Reactivo/ Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Ácido clorhídrico (HCl) concentrado (36.5 - 38 %).	HCl (JT Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0).	Utilizar el ácido concentrado.	Vaciar una cantidad de aproximadamente 50 mL en un frasco de vidrio para manipularlo fácilmente.
Metanol al 80%	Metanol absoluto (Sigma Aldrich Cat. M1775-1GA, CAS 67-56-1).	Mezclar 80 mL de metanol y 20 mL de agua desionizada.	Almacenar a 4°C en una botella cerrada. Con sellado hermético y a 4°C se conserva hasta un mes.
Ácido Trifluoroacético (TFA) al 1% en metanol al 80%, pH 1.4	TFA (Pierce, Cat. 28901, CAS 76-05-1).	En un matraz aforado de 100 mL, mezclar 1 mL de TFA con 90 mL de metanol al 80% y aforar. Vaciar la solución en un vaso de precipitados de 250 mL y ajustar el pH a 1.4 con HCl.	Preparar semanalmente y almacenar a 4°C en una botella cerrada. Preparar en campana de extracción.
Solución concentrada de cloruro de pelargonidina (100 µg mL ⁻¹).	Cloruro de pelargonidina (Sigma Aldrich, Cat. P-1659-10MG, CAS 134-04-3).	Disolver 2.5 mg de cloruro de pelargonidina en 25 mL de TFA al 1% en metanol al 80% y pH 1.4.	Proteger de la luz colocando la solución en frasco ámbar o cubriendo el recipiente con papel aluminio y almacenar en una botella cerrada. Almacenar a 4°C en una botella cerrada. Con sellado hermético y a 4°C se conserva hasta un mes.

Diagrama de flujo

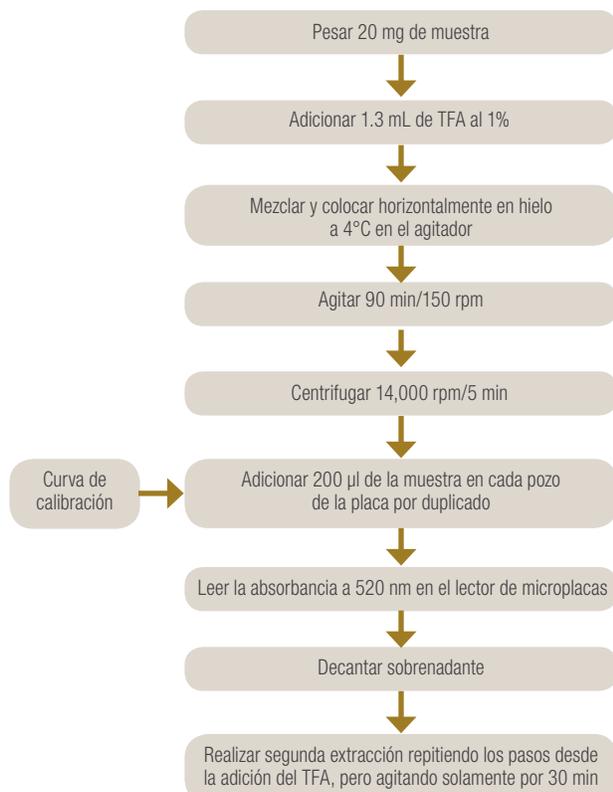


Figura 261. Diagrama de flujo para determinar antocianinas totales.

Procedimiento

Extracción

1. Pesarse 20 mg de muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
2. Adicionar 1.3 mL de TFA al 1%.
3. Tapar los tubos adecuadamente.
4. Mezclar las muestras utilizando vórtex y colocarlas horizontalmente sobre hielo (4°C) en el agitador (Figura 262).



Figura 262. Colocación de muestras en hielo y agitación.

5. Agitar las muestras durante 90 minutos a 150 rpm.
6. Después de la incubación en hielo, centrifugar los tubos a 14000 rpm durante 5 minutos. Asegurar que no haya partículas flotando en el sobrenadante, si esto ocurre, centrifugar nuevamente.
7. Transferir 200 µL del sobrenadante de cada muestra en los pozos de la microplaca y posteriormente, leer la absorbancia en el espectrofotómetro de microplacas (ver paso 10).
8. Decantar el sobrenadante restante en un recipiente para desechos.
9. Repetir los pasos 2 a 7, pero agitar solo 30 minutos en el paso 5.

Lectura de muestras en el espectrofotómetro

10. Por cada extracción, tomar 200 µL del sobrenadante y transferirlo a la microplaca (por duplicado).
11. Siempre incluir, por duplicado, una curva estándar, muestras blanco (que corresponden al TFA al 1%) y muestras control (testigos) con valores conocidos (Figura 263).

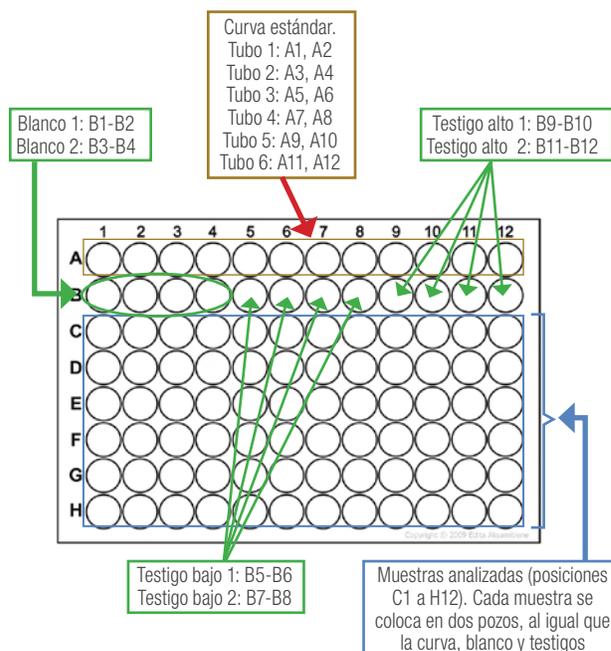


Figura 263. Ubicación de las muestras en la microplaca.

12. Leer la absorbancia a 520 nm en el lector de microplacas.
13. Para calcular el contenido total de antocianinas es necesario sumar la cantidad de ambas extracciones.

Curva estándar

14. Preparar una solución concentrada de 100 µg mL⁻¹ de cloruro de pelargonidina en TFA al 1%.
15. Preparar diariamente diluciones de 0, 1, 3, 5, 10 y 15 µg mL⁻¹ (en TFA al 1%) en tubos de vidrio de 5 mL (Cuadro 137).
16. Agitarlas adecuadamente en vórtex antes de utilizarlas.

Cuadro 137. Curva estándar para antocianinas totales.

Tubo	Volumen de cloruro de pelargonidina a 100 µg mL ⁻¹ (µL)	TFA al 1% (mL)	Volumen total (mL)	Concentración final de cloruro de pelargonidina (µg mL ⁻¹)
1	0	5	5	0
2	50	4.95	5	1
3	150	4.85	5	3
4	250	4.75	5	5
5	500	4.5	5	10
6	750	4.25	5	15

Cálculos

17. Para cada extracción, determinar el coeficiente de correlación y la pendiente de la curva estándar (El RSQ mínimo debe ser de 0.999).
18. Calcular la absorbancia promedio de los blancos (Abs blanco).
19. Calcular la absorbancia promedio de los testigos y de cada muestra (Abs muestra).
20. Restar la absorbancia promedio de los blancos a la absorbancia promedio de los testigos y muestras (Abs corregida).
21. Calcular la cantidad equivalente de pelargonidina en la muestras y testigos con la siguiente fórmula:

$$Pel (mg kg^{-1}) = \frac{Abs \text{ corregida}}{pendiente} \times \frac{volumen \text{ de hidrólisis (mL)}}{Cantidad \text{ de muestra (mg)}} \times 1,000$$

Para el presente protocolo, el volumen de la hidrólisis es 1.3 mL y la cantidad de muestra es 20 mg.

22. Para cada testigo y muestra, sumar la cantidad de pelargonidina de la extracción 1 y de la extracción 2.

Cuadro 138. Solución a problemas comunes en la determinación de antocianinas totales.

Problema	Solución
Las absorbancias de las muestras son mayores que el punto más alto de la curva de calibración.	Opción 1: Diluir el extracto con TFA al 1%. Opción 2: Pesar 10 mg de la muestra en lugar de 20 mg.
Las lecturas de las repeticiones son diferentes.	Usualmente esto sucede debido a que al adicionar el sobrenadante a la microplaca, parte de la muestra queda en la punta de la pipeta, por lo que se recomienda "lavar" la punta con la misma muestra.
Los resultados de las repeticiones varían demasiado (coeficiente de variación > 10).	Realizar otra lectura verificando el correcto pesado de las muestras. Verificar el funcionamiento correcto de la balanza utilizada.

Referencias

- (1) Salinas-Moreno, Y.; García-Salinas, C.; Coutiño-Estrada, B.; Vidal-Martínez, V. A. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, 36 (3-A), 285–294.
- (2) Egesel, C. O.; Wong, J. C.; Lambert, R. J.; Rocheford, T. R. Combining Ability of Maize Inbreds for Carotenoids and Tocopherols. *Crop Sci.* 2003, 43 (3), 818–823.
- (3) Abdel-Aal, E.-S. M.; Young, J. C.; Rabalski, I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (13), 1224–1231.
- (4) Serna-Saldivar, S. O.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Mora-Rochin, S.; García-Lara, S. Potencial nutracéutico de los maíces criollos y cambios durante el procesamiento tradicional y con extrusión. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, 36 (3-A), 295–304.
- (5) Escalante-Aburto, A.; Ramírez-Wong, B.; Torres-Chávez, P. I.; Barrón-Hoyos, J. M.; Figueroa-Cárdenas, J. D. D.; López-Cervantes, J. La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013, 36 (4), 429–437.
- (6) Zilić, S.; Serpen, A.; Akilloğlu, G.; Gökmen, V.; Vančetović, J. Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60 (5), 1224–1231.
- (7) Mora-Rochin, S.; Gutiérrez-Urbe, J. A.; Serna-Saldivar, S. O.; Sánchez-Peña, P.; Reyes-Moreno, C.; Milán-Carrillo, J. Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *J. Cereal Sci.* 2010, 52 (3), 502–508.
- (8) Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr. A* 2004, 1054 (1-2), 129–141.
- (9) Rodríguez-Saona, L. E.; Wrolstad, R. E. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc., 2001; pp 1–11.
- (10) Harborne, J. B. *The flavonoids. Advances in research since 1986*; Harborne, J. B., Ed.; CRC Press, 1993.

Cuantificación de antocianinas glicosiladas en maíz pigmentado por HPLC

Justificación

El grano de maíz tipo antociano (rosa, rojo, azul, morado y negro) debe su coloración a las antocianinas, que representan uno de los principales grupos de pigmentos vegetales solubles en agua visibles al ojo humano. Las antocianinas, además de ser colorantes inocuos para el consumo humano, poseen importantes actividades biológicas como antioxidantes, antimutagénicas y anticancerígenas, por lo que son de interés para la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética¹.

En maíz, estos pigmentos se acumulan predominantemente en pericarpio, en capa de aleurona o en ambas estructuras², aunque en 2012 Cui y colaboradores³ reportaron la presencia marginal de estos fenoles en el endospermo harinoso y en el embrión. La acumulación del pigmento en las estructuras del grano determina el posible uso de este tipo de maíces. Si el pigmento se concentra en la aleurona, el grano puede destinarse al proceso de nixtamalización, mientras que, si se acumula en el pericarpio en cantidad suficiente, el grano puede considerarse para la extracción de pigmentos⁴.

Fundamento

Las antocianinas son compuestos orgánicos solubles en agua y pueden ser extraídas fácilmente utilizando solventes polares⁵; el solvente más usado por su eficiencia extractiva es el metanol con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (HCl)^{5,6}, con el propósito de obtener el catión flavilio, mismo que es de color rojo y estable en un medio altamente ácido⁶, lo que proporciona resultados más confiables respecto a la caracterización y cuantificación de las antocianinas⁷. Sin embargo, cuando la muestra a analizar contiene material lipídico o sustancias liposolubles como ceras o clorofilas, es conveniente realizar una serie de lavados del extracto con un solvente orgánico como el hexano, para así eliminarlas y evitar interferencias durante su detección⁶.

Actualmente, la técnica utilizada para la identificación y cuantificación de dichos metabolitos secundarios es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), dado que permite la separación simultánea, identificación y cuantificación de compuestos antocianos sin requerir una pureza excesiva de los extractos⁶.

Alcance

Se pueden identificar y cuantificar antocianinas en harina de grano completo, pericarpio y capa de aleurona de maíces pigmentados, así como productos derivados del procesamiento del maíz (atoles, tortillas, botanas). Dos técnicos capacitados pueden analizar 40 muestras por día.

Cuadro 139. Material y equipos utilizados en la cuantificación de antocianinas por UPLC.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Matraces volumétricos	100 mL	Pyrex, KIMAX
Probetas graduadas de vidrio	500 y 1000 mL	Pyrex, KIMAX
Micropipeta	0.1-1.0 mL	RAININ, Classic
Micropipeta	0.5-5.0 mL	Eppendorf Research
Dispensador	0.05-0.5 mL	Dispensette III
Pipetas Pasteur de plástico	3 mL	
Microtubos de plástico con tapa	2 mL	Eppendorf
Frascos para solventes con tapa	500 y 1000 mL	Pyrex o Schott
Viales para HPLC	Vidrio. Dimensiones de 12 x 32 mm. Máximo recobro.	Waters. No. parte 186000327c
Viales para HPLC	Vidrio. Dimensiones de 12 x 32 mm. Con inserto para volumen de 0-300 µL	Waters. No. parte 186001126c
Tapones para viales HPLC	Tapón de rosca y septum de silicona PTFE pre-perforado. Dimensiones de 12 x 32 mm	Waters. No. parte 186000305
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG64
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Centrífuga	Fuerza centrífuga relativa de 25000 g, capacidad para 6 x 5 u 8 tiras y hasta 30 tubos de 1.5-2.0 mL, intervalo de temperatura de -9 a 40°C.	Eppendorf, 1517R
Campana de extracción		Lanconco
Evaporador con vacío SpeedVac	Cabezal par 60 microtubos de 2.0 mL	Thermo Scientific Savant, SPD121P
Termomixer confort	Con control de temperatura, agitación y tiempo.	Eppendorf
Sistema de agua desionizada ultra purificada	Agua ultrapura tipo 1. TOC ≤5 ppb	Millipore, Direct-Q3UV
Sistema de filtración con bomba de vacío		Millipore
Membranas para filtración	47 mm, 0.47 mm, GHP	Waters. No. parte WAT200537
Sonicador	Capacidad de 1 L	Branson, 2510
Cromatógrafo	Con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample Manager y Detector de Diodos (PDA)	Waters, Alliance 2996
Tiras para medir pH	Intervalo 0-6	Sigma-Aldrich. No. cat. P4786

Cuadro 140. Reactivos utilizados en la cuantificación de antocianinas por UPLC.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Agua desionizada	Agua obtenida directamente del sistema Direct-Q3UV millipore		La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 $\mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C.
Solución de lavado del inyector (metanol:agua, 50:50, v/v)	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 500 mL de metanol grado HPLC con 500 mL de agua desionizada.	Al preparar esta solución, medir por separado cada uno de los volúmenes indicados, ya que en la mezcla los volúmenes no son aditivos. Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de utilizar la solución, ya que la mezcla es exotérmica. Estable por 3 meses a temperatura ambiente.
Fase Móvil A: Solución de ácido trifluoroacético al 0.09 %, pH 2.0 \pm 0.05	Ácido trifluoroacético grado HPLC (Pierce, Cat. 28901, CAS 76-05-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	En un litro de agua desionizada, previamente filtrada a través de una membrana de 0.45 μm , adicionar 900 μL de ácido trifluoroacético Agitar y medir el pH, el cual debe ser 2.0 \pm 0.5. Posteriormente sonicar por 5 min.	Realizar la solución en la campana de extracción. El ácido trifluoroacético es corrosivo, tener precaución en su manipulación. La solución de TFA es estable a temperatura ambiente durante una semana.
Fase Móvil B: Metanol: Acetonitrilo (50:50,v/v) con 0.09 % de TFA	Acetonitrilo, pureza > 99% (Merck, Cat. 100030, CAS 75-05-8). Metanol HPLC, pureza > 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Ácido trifluoroacético grado HPLC (Pierce, Cat. 28901, CAS 76-05-1).	Mezclar 500 mL de acetonitrilo con 500 mL de metanol. Dejar que la mezcla alcance la temperatura ambiente y filtrar la solución con una membrana de 0.47 μm . Adicionar a la mezcla 900 μL de ácido trifluoroacético.	El acetonitrilo es carcinógeno y flamable. Estable por 3 meses a temperatura ambiente.
Metanol con ácido clorhídrico al 1 %	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Ácido clorhídrico al 37%, grado reactivo (JT Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0).	Transferir 500 mL de metanol a un frasco debidamente identificado y agregar 5 mL de ácido clorhídrico al 37 %.	Estable por 3 meses a temperatura ambiente. Preparar la solución en una campana de extracción.
Hexano HPLC	Hexano, pureza \geq 95 %, CHROMASOLV para HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 270504, CAS 110-54-3).		Manejarlo dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Estándar de recuperación (ácido gálico a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido gálico, pureza 100 %, grado reactivo (Sigma Aldrich, Cat. G7384, CAS 149-91-7).	Disolver 10 mg (\pm 0.5) de ácido gálico en 100 mL de metanol grado HPLC.	Preparar la solución cada vez que se vaya a realizar el análisis de una muestra o grupo de muestras. Almacenar en refrigeración.
Estándares de antocianinas	Cianidina 3-glicósido clorada, pureza \geq 95 % (Sigma-Aldrich, Cat. 52976, CAS 7084-24-4). Pelargonidina 3-glicósido, pureza \geq 97 % (Sigma Aldrich, Cat. 79576, CAS 18466-51-8). Peonidina 3-glicósido, pureza \geq 95 % (Sigma Aldrich, Cat. 40796, CAS 6906-39-4).	Ver preparación de la curva de calibración.	Mantener los estándares en las condiciones que indique el certificado.

Condiciones Cromatográficas:

- Fase Móvil A: Agua con 0.09 % de TFA, pH 2.0 \pm 0.5.
- Fase Móvil B: Acetonitrilo: Metanol (50:50, v/v) con 0.09 % de TFA.
- Tiempo de corrida: 35 min.
- Flujo de trabajo: 0.4 mL min⁻¹.
- Solución de lavado: Agua: Metanol (50:50, v/v).
- Temperatura de la columna: 35°C.
- Temperatura del automuestreador: 10°C.
- Volumen de inyección: 20 μL .
- Longitud de onda: 525 (210 – 580) nm.
- Longitud de onda para ácido gálico: 280 nm.
- Volumen de inyección de ácido gálico: 20 μL .

- Columna: Zorbax-SB-Aq, 4.6 mm x 150mm, 3.5 μm (No. parte 863953.914. Agilent).
- Pre-columna: Securityguard cartridge kit Phenomenex (No. Parte: KJ0-4282).
- Límite de Detección: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.020 $\mu\text{g g}^{-1}$).
- Límite de Cuantificación: 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.099 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Cuadro 141. Sistema gradiente para el análisis de antocianinas glicosiladas por HPLC.

Tiempo	% A	% B	Curva
0	90	10	6
6	83	17	6
25	63	37	6
25.1	50	50	6
30	50	50	6
30.1	90	10	6
35	90	10	6

Diagrama de flujo

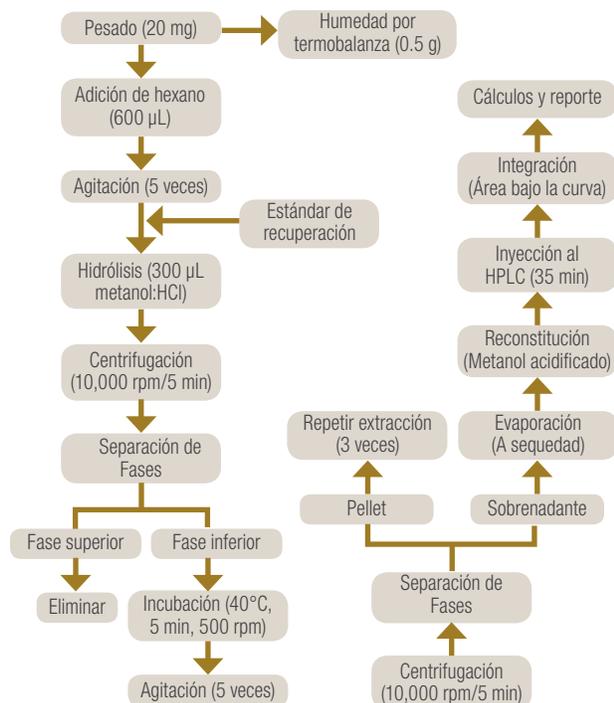


Figura 264. Diagrama de flujo para la cuantificación de antocianinas glicosiladas por HPLC.

Procedimiento

Curva de calibración

Idealmente, la curva de calibración se debe realizar cada vez que se lleva a cabo un análisis cromatográfico, sin embargo, es posible realizar esta actividad al menos cada seis meses.

a) Preparación de los estándares

- Retirar del refrigerador o congelador cada uno de los estándares y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
- Reconstituir cada estándar con 5 mL de metanol con ácido clorhídrico al 1 % de la siguiente manera:
 - Adicionar 200 µL de metanol acidificado al vial que contiene el estándar, mezclar y trasvasar a un vial debidamente identificado.
 - Repetir el paso anterior hasta que el metanol acidificado sea incoloro (aproximadamente 5 veces). Realizar este proceso con extremo cuidado ya que cada estándar contiene únicamente 1 mg de material.
 - Adicionar el metanol acidificado necesario para obtener los 5 mL, la concentración final del estándar es de 200 µg mL⁻¹.

- Preparar una solución de cada estándar a una concentración de 100 µg mL⁻¹ mezclando 1 mL del estándar reconstituido con 1 mL de metanol acidificado.
- Realizar las diluciones de la solución de cada estándar que se muestran en el Cuadro 142. El volumen final de cada punto es de 1000 µL.

Cuadro 142. Preparación de la curva de calibración y concentración obtenida

Solución de estándar [100 µg mL ⁻¹] (µL)	Metanol con HCl al 1 % (µL)	Concentración final del estándar (µg mL ⁻¹)
10	990	1
50	950	5
200	800	20
400	600	40
800	200	80
0	0	100

- Colocarlas en viales e inyectar al cromatógrafo para generar una curva como la que se presente a continuación:

Curva de calibración para cianidina 3-glicosido.

Cuadro 143. Área bajo la curva de cianidina 3-glicosido.

Concentración [µg mL ⁻¹]	Área 1	Área 2	Promedio	C (µg)
1	0	0	0	0.020
5	490260	497037	493649	0.099
20	2565434	2539222	2552328	0.397
40	6432352	6479025	6455689	0.794
80	12617971	12614497	12616234	1.589
100	16183528	16420106	16301817	1.986

Cuadro 144. Tiempo de retención para cianidina 3-glicosido.

C [µg mL ⁻¹]	Tiempo de retención 1 (min)	Tiempo de retención 2 (min)	Promedio	CV
1	0	0	0	0
5	21.745	21.715	21.730	0.097
20	21.665	21.666	21.666	0.003
40	21.628	21.608	21.618	0.065
80	21.579	21.57	21.575	0.029
100	21.562	21.573	21.568	0.036
Promedio			21.631	
SD				0.067

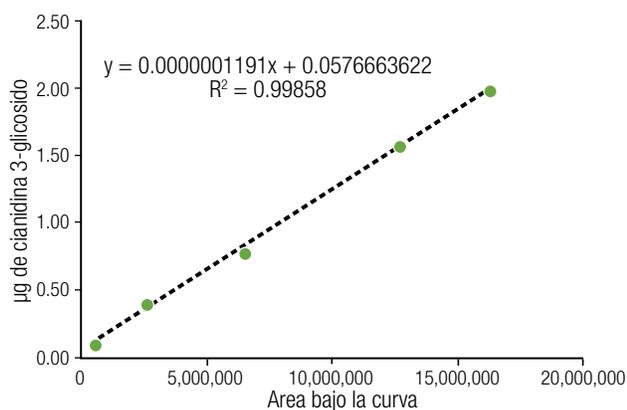


Figura 265. Curva de calibración para la cianidina 3-glicosido

Extracción y cuantificación de antocianinas glicosiladas

1. Pesar 20 mg (± 0.1) de la muestra en un tubo cónico de 2 mL.
2. Agregar 600 μL de hexano y agitar en vórtex 5 veces.
3. Agregar 100 μL de ácido gálico (estándar de recuperación) a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y agitar en vórtex 5 veces.
4. Adicionar 300 μL de la solución de metanol con ácido clorhídrico al 1 % y agitar en vórtex.
5. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
6. Con la pipeta de plástico, retirar cuidadosamente el sobrenadante (fase superior) y descartarlo.
7. Colocar los tubos con el resto de la solución en el *termomixer* y agitar a 500 rpm durante 5 minutos a 40°C.

8. Agitar en vórtex.
9. Centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
10. Con una pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante (fase superior) a un tubo limpio y debidamente etiquetado.
11. Repetir los pasos 2 a 10 (excepto el paso 3) dos veces más colectando los sobrenadantes del paso 10 en un mismo tubo para cada muestra.
12. Evaporar totalmente los sobrenadantes colectados en el paso 10 (aproximadamente 1.8 mL) utilizando el Speed Vac a 35°C y una presión de vacío de 2.5 torr (aproximadamente 120 minutos).
13. Reconstituir la muestra evaporada adicionando 100 μL de metanol acidificado con HCl al 1 % si es grano completo o, 3 mL de metanol acidificado si la muestra que se está analizando es pericarpio o capa de aleurona. Mezclar en vórtex.

NOTA: El volumen de reconstitución tiene que ser considerado en los cálculos. Las muestras reconstituidas son estables por 24 horas si se mantienen a -20°C.

14. Transferir la muestra reconstituida en un vial previamente etiquetado y con inserto si la muestra analizada fue grano completo, o en un vial de 1.5 mL para pericarpio o capa de aleurona.
15. Inyectar las muestras en el sistema cromatográfico (HPLC).
16. Al concluir el análisis en el cromatógrafo, integrar cada uno de los picos de interés obtenidos en el cromatograma para determinar el área bajo la curva (Figura 266).
17. Realizar los cálculos con base a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración de cada estándar y reportar la concentración obtenida.

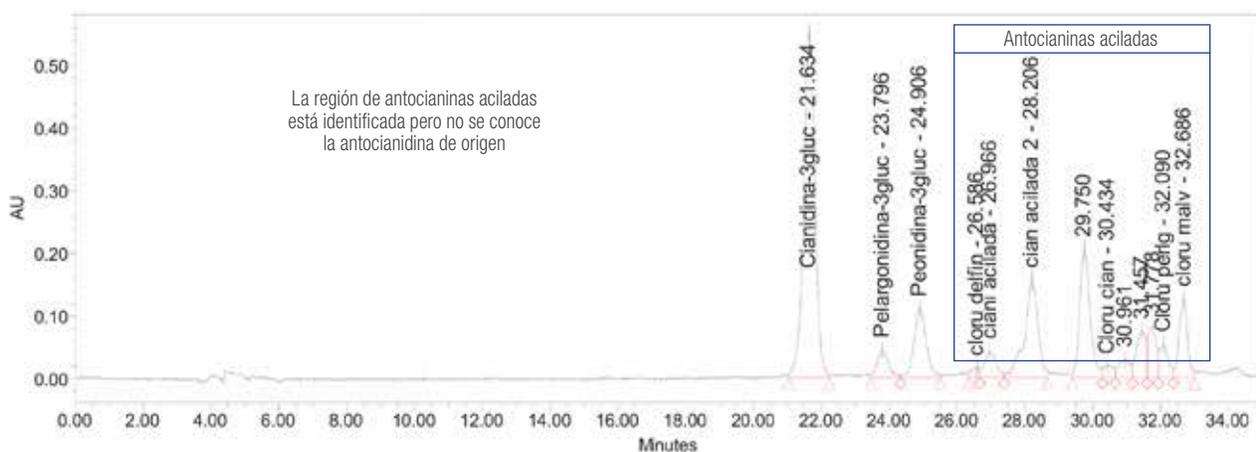


Figura 266. Cromatograma tipo de antocianinas glicosiladas en maíz morado, a una longitud de onda de 520 nm.

Eficiencia de extracción

Para determinar la eficiencia de extracción de antocianinas glicosiladas, en cada muestra se agregan 100 µL de una solución de ácido gálico a una concentración de 100 µg mL⁻¹ (paso 4) antes de adicionar los 300 µL de metanol acidificado. Se realiza el proceso de extracción y se compara su área con el estándar de ácido gálico puro inyectando 20 µL de éste. Se realiza el cociente entre las áreas y se obtiene un valor denominado eficiencia de extracción *EE*. El intervalo de aceptabilidad de la eficiencia de extracción es de 80-110 %.

Secuencia de inyección al sistema cromatográfico

- Blanco (solución de metanol acidificado al 1 % con HCl): 1 inyección.
- Curva de calibración: 2 inyecciones por cada punto.
- Estándar de recuperación (ácido gálico): 4 inyecciones.
- Muestra: 1 inyección.
- Cada 10 muestras realizar un duplicado.

Cálculos

A partir de la curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta característica para los estándares de antocianinas. Por tanto, la concentración base húmeda para cada antocianina glicosilada está dada por la expresión:

$$CBH\ inicial = \frac{m * area \pm b * (V_r / V_{inyec})}{M}$$

Dónde:

CBH inicial = Concentración de la antocianina correspondiente en base húmeda (µg g⁻¹ de muestra).

M = Pendiente de la recta característica de la antocianina.

Área = Área bajo la curva de cada antocianina presente en la muestra.

B = Ordenada al origen de la recta característica del ácido.

V_r = Volumen de reconstitución (1000 o 3000 µL, para grano entero y pericarpio, respectivamente).

V_{inyec} = Volumen de inyección (20 µL).

Posteriormente se realiza la corrección de la concentración con base a la eficiencia de extracción, dividiendo la concentración obtenida (CBH inicial) entre la eficiencia de extracción (EE). A continuación, se

realiza la corrección por humedad, misma que se determina por el método de la termobalanza (consultar procedimiento para mayor detalle) y una vez obtenido el dato, se utiliza la siguiente fórmula para finalmente reportar la concentración en base seca:

$$CBS = \frac{CBH \times 100}{100 - \% H}$$

Dónde:

CBS= Concentración de cada antocianina en base seca (µg g⁻¹ de muestra)

CBH = Concentración de cada antocianina en base húmeda (mg g⁻¹)

H = Contenido de humedad (%)

Cuadro 145. Solución a problemas comunes en la cuantificación de antocianinas por UPLC.

Problema	Solución
El área del estándar de extracción es menor al área recuperada en la muestra.	Se realiza nuevamente la extracción con ácido gálico recién preparado. Se revisa la integración de ácido gálico a 280 nm.
No se re suspende la muestra rápidamente.	Agitar en vortex aproximadamente 5 veces o esperar un tiempo de 30 min. Este efecto se debe a que en la extracción también se desprende un poco de almidón.
El área de la antocianina sobrepasa el límite máximo de la curva de calibración.	Re-suspender en un volumen mayor a 3 mL o en 1 mL y posteriormente realizar una dilución de 1:100, esto sucede especialmente en olotos y pericarpios.
Presión alta constantemente y aumento gradual de presión de la columna.	Lavar la columna con agua y solvente orgánico sin sales después cada sesión de inyecciones. Si aún después de lavar la columna la presión no disminuye, cambiar el filtro de la pre columna.
Burbujas en el cromatógrafo	Verificar que los solventes se hayan desgasificado y filtrado correctamente. Verificar que los filtros de las líneas de solvente estén completamente sumergidos y que no haya burbujas en las líneas. Si esto ocurre, purgar las líneas del HPLC.
Ruido en los cromatogramas.	Esto es normal en muestras con contenido bajo de antocianinas, ejemplo: Cianidina 3-gluc 40 µg g ⁻¹ .

Referencias

- [1] Salinas, M. Y.; Cruz, C. F. J.; Díaz, O. S. y Castillo, G. F. Granos de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutraceútico. *Rev. Fitotec. Mex.* **2012**, *35* (1), 33-41.
- [2] Salinas, M. Y.; Soto, H. M.; Martínez, B. F.; González, H. B. y Ortega, P. R. Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Rev. Fitotec. Mex.* **1999**, *22*, 161-174.
- [3] Cui, L.; Rongqi, G.; Shuting, D.; Zhang, J.; Peng, L.; Zhang, H.; Meng, J. and Shi, D. Effects of ear shading on the anthocyanin contents and quality of kernels in various genotypes of maize. *Aust. J. Crop. Sci.* **2012**, *4*, 704-710.
- [4] Salinas, M. Y.; García, S. C.; Cotino, E. B. y Vidal, M. V. A. Variabilidad en contenido y tipo de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* **2013**, *36* (3-A), 285-294.
- [5] Awika, J. M.; Rooney, L. W.; Waniska, R. D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem.* **2004**, *90* (293-301).
- [6] Escribano, B. M. T.; Santos, B. C. and Rivas, G. J. C. Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr A.* **2004**, *1054* (129-141).
- [7] Kong, J.; Chia, L.; Goh, N.; Chia, T. and Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* **2003**, *64*, 923-933.

Cuantificación de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico en maíz por HPLC

Justificación

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios vegetales, de los que se han identificado más de 8000 que difieren en estructuras químicas y en actividad¹. Algunos son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de tensión y contra el ataque de organismos patógenos². También se vincula el consumo de estos fitoquímicos con beneficios a la salud, debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas³. El maíz contiene más fenoles totales y mayor poder antioxidante que cereales como trigo, arroz o avena y su contenido en el germen está asociado con la tolerancia a *Fusarium* spp; los fenoles del endospermo participan en el desarrollo de colores pardos en masa y tortilla y los del pericarpio se relacionan con la tolerancia a plagas de almacén². Así mismo, investigadores relacionan la dureza del grano de maíz con el contenido de fenoles⁴. En cereales, los compuestos fenólicos más abundantes son el ácido ferúlico, seguido por los ácidos diferúlicos y coumárico⁵. Un análisis de los compuestos fenólicos del maíz puede ayudar a determinar la actividad antioxidante del grano y su potencial uso en la industria como alimento funcional¹.

Fundamento

Los ácidos fenólicos se encuentran en forma libre y ligada. Los ácidos libres son extraídos usando la mezcla de solventes alcohol/agua, en tanto que los ácidos fenólicos ligados son liberados del residuo de la extracción inicial mediante hidrólisis alcalina con hidróxido de sodio (NaOH), seguida por una hidrólisis con ácido inorgánico (HCl) y finalmente, ambas fracciones de ácidos fenólicos son recuperadas con acetato de etilo^{8,9} para su posterior evaporación a sequedad y cuantificación⁷. Cabe mencionar que los solventes utilizados para la extracción en su mayoría son alcoholes, pero los ácidos fenólicos muy polares como el ferúlico o coumárico, no pueden ser extraídos completamente con solventes orgánicos puros, por lo que se utiliza una mezcla de alcohol: agua. Así mismo, solventes menos polares como el hexano, son adecuados y utilizados para la extracción de compuestos no polares extraños e indeseables como las ceras, aceites, esteroides y clorofilas⁶. Actualmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa representa la técnica más confiable para la identificación y cuantificación en el análisis de fenoles⁸.

Alcance

La presente metodología permite identificar y cuantificar los ácidos *p*-coumárico y ferúlico en su forma ligada, presentes en grano completo o pericarpio de maíces blancos y pigmentados (amarillos, azules y rojos). Se pueden analizar 50 muestras por día con la colaboración de 2 analistas.

Cuadro 146. Material y equipos utilizados en la cuantificación de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Matraces volumétricos	100 y 1000 mL	Pyrex, KIMAX
Probetas graduadas de vidrio	500 y 1000 mL	Pyrex, KIMAX
Pipetas Pasteur de plástico	3 mL	
Microtubos de plástico con tapa	1.5 y 2 mL	Eppendorf
Multipipeta	0.001-50 mL	Eppendorf, Xstream
Puntas Combitips plus	5 y 10 mL	Eppendorf. Cat. 022266501
Tiras para medir pH	Intervalo 0-6	Sigma-Aldrich. Cat. P4786
Gradillas de microtubos		
Frascos para solventes con tapa	500 y 1000 mL	Pyrex o Schott
Viales para HPLC	Vidrio. Dimensiones de 12 x 32 mm. Máximo recobro.	Waters. No. parte 186000327c
Tapones para viales HPLC	Tapón de rosca y septum de silicona PTFE pre-perforado. Dimensiones de 12 x 32 mm	Waters. No. parte 186000305
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG64
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Centrífuga	Fuerza centrífuga relativa de 25000 g, capacidad para 6 x 5 u 8 tiras y hasta 30 tubos de 1.5-2.0 mL, intervalo de temperatura de -9 a 40 C.	Eppendorf, 1517R
Campana de extracción		Lanconco
Evaporador con vacío SpeedVac	Cabezal par 60 microtubos de 1.5-2.0 mL	Thermo Scientific Savant, SPD121P
Termomixer confort	Con control de temperatura, agitación y tiempo.	Eppendorf
Sistema de agua desionizada ultra purificada	Agua ultrapura tipo 1. TOC ≤5 ppb	Millipore, Direct-Q3UV
Sistema de filtración con bomba de vacío		Millipore
Membranas para filtración	47 mm, 0.47 mm, GHP	Waters. No. parte WAT200537
Sonicador	Capacidad de 1 L	Branson, modelo 2510
Cromatógrafo	Con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample Manager y Detector de Diodos (PDA)	Waters, Alliance 2996

Cuadro 147. Reactivos utilizados en la cuantificación de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Agua desionizada	Agua obtenida directamente del sistema Direct-Q3UV millipore.	La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 $\mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C.	
Fase Móvil A: Solución de ácido trifluoroacético al 0.09 %, pH 2.0 \pm 0.05	Ácido trifluoroacético grado HPLC (Pierce, Cat. 28901, CAS 76-05-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	En un litro de agua desionizada, previamente filtrada a través de una membrana de 0.45 μm , adicionar 900 μL de ácido trifluoroacético. Agitar y medir el pH, el cual debe ser 2.0 \pm 0.5. Posteriormente sonicar por 5 min.	Realizar la solución en la campana de extracción. El ácido trifluoroacético es corrosivo, por lo que se debe tener cuidado en la manipulación. La solución de TFA es estable a temperatura ambiente durante una semana.
Fase Móvil B: Acetonitrilo 100 %	Acetonitrilo, pureza > 99 % (Merck, Cat. 100030, CAS 75-05-8).	Filtrar un 1 L de acetonitrilo a través de una membrana de 0.45 μm y sonicar por 5 min.	El acetonitrilo es carcinógeno y flamable. Estable por 3 meses.
Hexano HPLC	Hexano, pureza \geq 95 %, CHROMASOLV para HPLC (Sigma-Aldrich, Cat. 270504, CAS 110-54-3).		Manejarlo dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Etanol al 80 %	Etanol absoluto (Meyer, Cat. 0390, CAS 64-17-5). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 800 mL de etanol con 200 mL de agua desionizada.	Al preparar esta solución, medir por separado cada uno de los volúmenes indicados, ya que en la mezcla los volúmenes no son aditivos. Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de utilizarla, ya que se genera una reacción exotérmica. Estable por 3 meses a temperatura ambiente.
Metanol 50%	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (J. T. Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 500 mL de metanol grado HPLC y adicionar 500 mL de agua desionizada.	Al preparar esta solución, medir por separado cada uno de los volúmenes indicados, ya que en la mezcla los volúmenes no son aditivos. Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de utilizar la solución, ya que la mezcla es exotérmica. Estable por 3 meses a temperatura ambiente.
Hidróxido de sodio 2 M	Hidróxido de sodio, grado reactivo (J.T.Baker, Cat. 3722-05, CAS 1310-73-2). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Pesar 80 g de hidróxido de sodio y trasvasarlos a un matraz volumétrico de 1L, previamente colocado en un baño de hielo. Adicionar agua desionizada, poco a poco, hasta disolución completa del hidróxido. Esperar a que la solución esté a temperatura ambiente para aforar.	Estable por 3 meses a temperatura ambiente
Ácido clorhídrico 2 M	Ácido clorhídrico al 37 %, grado reactivo (J.T.Baker, Cat. 9535-05, CAS 7647-01-0). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	En un matraz volumétrico de 1L, agregar 600 mL de agua desionizada. Medir 172 mL de ácido clorhídrico al 37% y agregarlo al matraz. Dejar que llegue a temperatura ambiente para aforar.	Estable por 3 meses a temperatura ambiente.
Solución stock de ácidos fenólicos a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Ácido <i>p</i> -coumárico, pureza 99.6 %, grado reactivo (Sigma-Aldrich, Cat. C9008, CAS 501-98-4). Ácido <i>trans</i> -ferúlico, pureza 99.8 %, grado reactivo (Sigma-Aldrich, Cat. 128708, CAS 537-98-4). Metanol HPLC, pureza > 99.9% (J. T. Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1).	Disolver 10 mg (\pm 0.50) de ácido <i>p</i> -coumárico y 10 mg \pm 0.5 mg ácido <i>trans</i> -ferúlico en 100 mL metanol HPLC.	Estable por 1 semana. Mantener en refrigeración, en un frasco ámbar o protegido de la luz.
Estándar de recuperación (ácido gálico a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido gálico, pureza 100 %, grado reactivo (Sigma-Aldrich, Cat. G7384, CAS 149-91-7).	Disolver 10 mg \pm (0.5) de ácido gálico en 100 mL de metanol grado HPLC.	Preparar la solución cada vez que se vaya a realizar el análisis de una muestra o grupo de muestras. Almacenar en refrigeración.
Solución de lavado del inyector (metanol:agua, 50:50, v/v)	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (J. T. Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 500 mL de metanol grado HPLC con 500 mL de agua desionizada.	Al preparar esta solución, medir por separado cada uno de los volúmenes indicados, ya que en la mezcla los volúmenes no son aditivos. Dejar que alcance la temperatura ambiente antes de utilizar la solución, ya que la mezcla es exotérmica. Estable por 3 meses a temperatura ambiente.

Condiciones cromatográficas

- Fase Móvil A: Solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0.09 %, pH 2.00 \pm 0.5
- Fase Móvil B: Acetonitrilo
- Tiempo de corrida=20 min
- Flujo= 0.5 mL min⁻¹

- Temperatura de la columna= 35°C
- Temperatura de automuestreador: 10°C
- Volumen de inyección= 10 μL
- Volumen de inyección de estándar de recuperación= 1.2 a 1.5 μL

- Longitud de onda= 280 nm
- Columna: Zorbax-SB-Aq, 4.6 mm x 150 mm, 3.5 μm (No. parte 863953.914. Agilent).

La resolución entre el pico de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico debe ser mayor de 1.5 ($R \geq 1.5$).

El factor de asimetría de los picos debe ser menor de 1.5.

El coeficiente de variación entre las inyecciones del ácido gálico debe ser menor de 5.0 % ($CV < 5.0$).

Cuadro 148. Sistema gradiente para el análisis de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico por HPLC.

Tiempo	% A	% B	Curva
0	85	15	6
10	42	58	6
14	20	80	6
16	85	15	6
20	85	15	6

- Límite de detección: 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOD)
- Límite de cuantificación: 0.02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (LOQ)

Diagrama de flujo

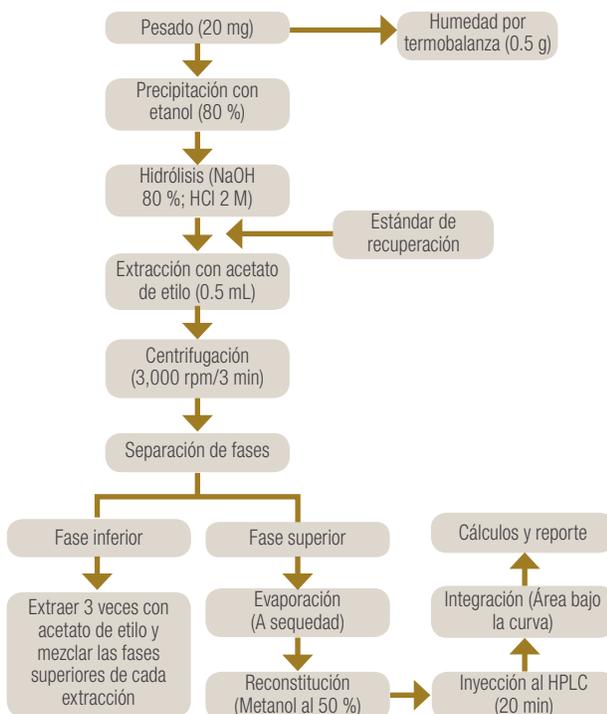


Figura 267. Diagrama de flujo para la cuantificación de ácido *p*-cumárico y ácido ferúlico por HPLC.

Procedimiento

Curva de calibración

La curva de calibración se debe realizar cada que se lleva a cabo la corrida cromatográfica. Sin embargo, por el número de muestras que se analizan en el laboratorio, esta actividad se realiza por lo menos cada seis meses.

Preparar cada punto de la curva por duplicado; el volumen final es de 10 mL para cada concentración, pero considerando el volumen de inyección (10 μL), se tienen las concentraciones del Cuadro 148, mismas que pueden generar una curva como la mostrada en la Figura 268.

Cuadro 149. Preparación de la curva de calibración y concentración obtenida.

Solución stock a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (mL)	Metanol al 50 % (mL)	Concentración de ácidos fenólicos (mg)
1	9	0.1
2	8	0.2
3	7	0.3
4	6	0.4
5	5	0.5
6	4	0.6
7	3	0.7
8	2	0.8
10	0	1.0

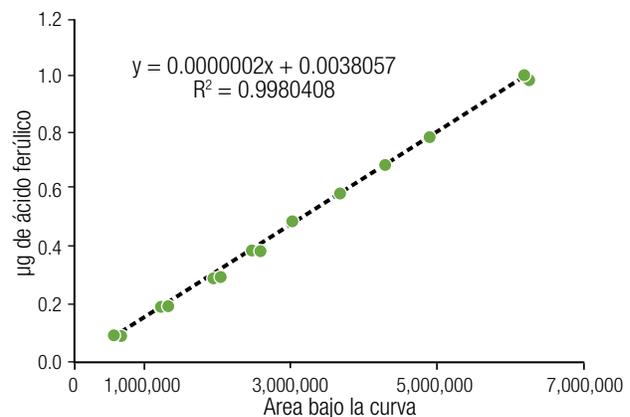


Figura 268. Curva de calibración para el ácido ferúlico.

Extracción y cuantificación de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico

1. Pesar 20 mg (\pm 1 mg) de harina seca o húmeda en un tubo cónico de 2 mL.
2. Adicionar 500 μ L de etanol al 80 % y agitar en vórtex.
3. Colocar los tubos en el termomixer y agitar a 700 rpm durante 10 minutos a 25°C.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y continuar trabajando con el precipitado (pellet de harina).
6. Agregar 500 μ L de hidróxido de sodio 2 M y agitar en vórtex.
7. Colocar los tubos en el termomixer y agitar a 500 rpm durante 45 minutos a 50°C.
8. Adicionar 500 μ L de ácido clorhídrico 2 M y agitar en vórtex.
9. Agregar 200 μ L de ácido gálico (estándar de recuperación), a una concentración de 100 mg mL⁻¹, agitar en vórtex y seguir con el proceso de extracción.
NOTA: Se sugiere que antes de agregar el estándar de recuperación, se tomen al azar algunas muestras para verificar el pH (con tiras reactivas), mismo que deberá encontrarse entre 2 y 2.5.
10. Adicionar 500 μ L de hexano, agitar en vórtex y centrifugar a 3000 rpm durante 3 min. Con una pipeta Pasteur, descartar cuidadosamente el sobrenadante para no tomar el precipitado.

11. Adicionar 500 μ L de acetato de etilo y agitar en vórtex.
12. Centrifugar a 3000 rpm durante 6 minutos.
13. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un microtubo de 1.5 mL (para grano completo) o tubo de 10 mL para pericarpio o aleureona.
14. Repetir los pasos 11 a 13 hasta completar 3 lavados.
15. Evaporar a sequedad el extracto obtenido en Speed Vac a 35°C por 1 hora a 2.5 psi de vacío durante 50 minutos.
16. Reconstituir la muestra adicionando 1 mL de metanol al 50 % para grano completo o bien, 3 mL de metanol al 50 % para pericarpio y capa de aleurona. Mezclar en vórtex.
NOTA: El volumen de reconstitución tiene que ser considerado en los cálculos. Las muestras reconstituidas son estables por 24 horas; si no son resuspendidas, son estables hasta 48 h a -20°C.
17. Transferir la muestra reconstituida en un vial debidamente etiquetado para su inyección al HPLC.
18. Después del tiempo de corrida, integrar cada uno de los picos de interés obtenidos en el cromatograma para determinar el área bajo la curva (Figura 269).
19. Realizar los cálculos con base a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración de cada estándar y reportar la concentración obtenida.

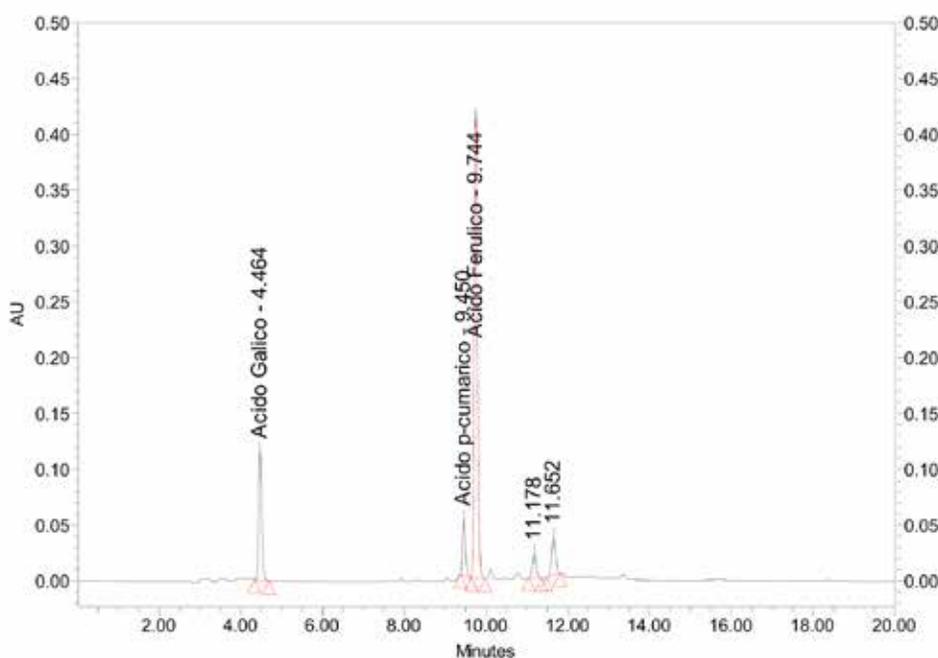


Figura 269. Cromatograma tipo de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico en grano completo.

Eficiencia de extracción

Para determinar la eficiencia de extracción para ambos fenoles, se agregan a cada muestra 200 μL de una solución de ácido gálico a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ después de la neutralización. Se realiza el proceso de extracción y se compara su área con el estándar de ácido gálico puro, inyectando de 1.2-1.5 μL de éste. Así, se obtiene un valor denominado eficiencia de extracción (*EE*). El intervalo de aceptación para la eficiencia de extracción es de 80-110 %.

Secuencia de inyección al sistema cromatográfico

1. Blanco (solución de metanol al 50%): 1 inyección.
2. Curva de calibración: 2 inyecciones por cada punto
3. Estándar de recuperación (ácido gálico): 6 inyecciones
4. Muestras: 1 inyección
5. Cada 10 muestras realizar un duplicado.

Cálculos

A partir de la curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta característica para el ácido *p*-coumárico y para el ácido ferúlico. Por lo tanto, la concentración en base húmeda para cada ácido está dada por la ecuación:

$$CBH_{inicial} = \frac{m * area \pm b * (V_r / V_{inyec})}{M} \times \frac{1}{1,000}$$

Dónde:

CBH = Concentración del ácido correspondiente en base húmeda (mg g^{-1} de muestra).

m = Pendiente de la recta característica del ácido.

Área = Área bajo la curva de cada ácido presente en la muestra.

B = Ordenada al origen de la recta característica del ácido.

V_r = Volumen de reconstitución (1000 o 3000 μL , para grano entero y pericarpio, respectivamente).

V_{inyec} = Volumen de inyección (10 μL).

1/1000 = Factor para convertir de μg a mg .

Posteriormente, se realiza una corrección de la concentración de ácidos fenólicos con base a la eficiencia de extracción, para lo cual se divide la concentración de cada ácido en base húmeda (CBH inicial) entre la eficiencia de extracción calculada (*EE*). A continuación, se realiza la corrección por humedad, misma que se determina por el método de la termobalanza (consultar procedimiento para mayor

detalle) y una vez obtenido el dato, se utiliza la siguiente fórmula para finalmente reportar la concentración en base seca:

$$CBS = \frac{CBH \times 100}{100 - \% H}$$

Dónde:

CBS = Concentración de cada ácido fenólico en base seca (mg g^{-1} de muestra).

CBH = Concentración de cada ácido fenólico en base húmeda (mg g^{-1}).

H = Contenido de humedad (%).

Cuadro 150. Solución a problemas comunes en la cuantificación de ácido *p*-coumárico y ácido ferúlico.

Problema	Solución
El área del estándar de recuperación puro, es menor al área obtenida en la muestra.	Realizar nuevamente la extracción, utilizando ácido gálico fresco.
La resolución entre los picos de ácido <i>p</i> -coumárico y ácido ferúlico, es menor de 1.5	Preparar nuevamente la fase móvil A. Realizar un lavado de columna.
El pH inicial no es de 2.00 ± 0.5	Al adicionar el HCl 2 M no se debe apreciar una solución lechosa, ni percibirse un olor dulce. Adicionar aproximadamente 50 μL de HCl 2 M.

Referencias

- [1] Ruiz, T. N. A.; Rincón, S. F.; Hernández, L. V. M.; Figueroa, C. J. de D. y Loarca, P. M. G. F. Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* **2008**, *31* (3) 29-34.
- [2] Cabrera, S. M. L.; Salina, M. Y.; Velázquez, C. G. A. y Espinosa, T. E. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. *Agrociencia.* **2009**, *43*, 827-839.
- [3] Zhaohui, Z. and Moghadasian, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem.* **2008**, *109* (4): 691-702.
- [4] Del Pozo, I. D.; Brenes, C. H.; Serna, S. S. O. and Talcott, T. S. Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) products. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 696-703.
- [5] Urías, O. V.; Basilio, H. J.; Muy, R. D. y Nino, M. G. Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y salvado de trigo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* **2016**, *3*(7), 43-50.
- [6] Dykes, L. and Rooney, L. W. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *AACC International-Cereal Food World.* **2007**, 105-111 p.
- [7] Stalikas, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*: 3268-3295.
- [8] Tasioulas, M. M. and Tsabolatidou, E. Extraction, separation, and identification of phenolic compounds in virgin olive oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Antioxidants.* **2015**, *4*: 548-562.
- [9] Wang, L.; Yao, Y.; He, Z.; Wang, D.; Liu, A. and Zhang, Y. Determination of phenolic acid concentrations in wheat flours produced at different extraction rates. *J. Cereal Sci.* **2013**, *57*: 67-72.
- [10] Boz, H. Ferulic Acid in Cereals – A Review. *Czech J. Food Sci.* **2015**, *33*(1): 1-7.

Cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles en maíz por UPLC

Justificación

La importancia de la vitamina E se debe a su actividad antioxidante y capacidad para proteger a los ácidos grasos poli insaturados de la oxidación, tanto en plantas como en animales ¹. Está constituida por 2 clases de compuestos: los tocoferoles y los tocotrienoles. Los tocoferoles se encuentran en el embrión de semillas de cultivos oleaginosos³ y son reconocidos como antioxidantes en aceites vegetales, su presencia aumenta la estabilidad de los lípidos contra la auto-oxidación, además proporcionan efectos antiproliferativos e inmunoprotección, mantienen estables las membranas celulares y previenen daños a los tejidos³. En tanto, los tocotrienoles se encuentran principalmente en cereales (como el maíz) y en algunos frutos tropicales (como el coco), mostrando propiedades biológicas, antioxidantes y funcionales, también están relacionados con la disminución de riesgos de enfermedades cardiovasculares a causa del colesterol, colesterol LDL (colesterol malo) y lipoproteínas ².

Dado que el maíz es una fuente importante de aceite vegetal, los programas de mejoramiento e investigación prefieren el aumento de la calidad del aceite mediante el incremento del contenido de vitamina E a la modificación del perfil de ácidos grasos ².

Fundamento

Debido al carácter antioxidante, inestabilidad térmica y fotosensibilidad de los tocoferoles, su cuantificación es susceptible a errores analíticos³, por tanto, la cromatografía líquida (tanto en fase normal como en fase reversa) es la técnica mayormente utilizada para analizar los tocoferoles y tocotrienoles, ya que son estables bajo las condiciones cromatográficas, fáciles de disolver en solventes adecuados y pueden combinarse diversos detectores para facilitar su cuantificación⁴. La técnica se basa en la extracción de los tocoferoles con hexano; así mismo se requiere la saponificación del material para remover lípidos y clorofilas, sobre todo en muestras con alto contenido de aceite y el uso de butil hidroxitolueno (BHT) como antioxidante para protegerlos de la degradación durante el análisis³.

Alcance

Aplica para todo tipo de maíz, tanto en grano completo como en endospermo. Se pueden procesar 50 muestras en 8 horas.

Cuadro 151. Material y equipos utilizados en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.

Material o equipo	Capacidad o especificación	Marca y modelo
Matraces volumétricos	100 y 250 mL	Pyrex o KIMAX
Probetas graduadas de vidrio	100, 500 y 1000 mL	Pyrex o KIMAX
Pipetas Pasteur de vidrio	3 mL	Corning
Bulbos de goma	5 mL	Thomas Scientific
Tubos de plástico de fondo cónico (sin tapa)	15 mL	Corning
Tubos de vidrio con tapón de rosca	15 mL	Pyrex o KIMAX
Charola de plástico o unicel		
Celda UV de cuarzo	10 mm de espesor interior 45 mm de altura 12.5 mm de espesor exterior	
Acrodiscos	Material de celulosa regenerada (GHP) o de teflón (PTFE), con diámetro de poro de 0.22 mm	Agilent o PALL
Frascos para solventes con tapa (Schott)	500 y 1000 mL	Pyrex
Jeringas de vidrio	5 mL con luer lock central. Fortuna Optima	Sigma-Aldrich. Cat. Z314544-10EA
Viales para HPLC	Vidrio. Dimensiones de 12 x 32 mm. Recobro total	Waters. No. parte 186000384c
Tapones para viales HPLC	Tapón de rosca y septum de silicona PTFE pre-perforado. Dimensiones de 12 x 32 mm	Waters. No. parte 186000305
Dispensador	10 mL	Dispensette, S4600140
Balanza analítica	Capacidad máxima 220 g, resolución 0.1 mg	Mettler Toledo, AG64
Baño María (digital)	2 L, con intervalo de temperatura de 5 a 100°C	Polyscience
Agitador	Tipo vórtex	Genie-2
Centrífuga	Velocidad de 200 a 3750 rpm. Temperatura de trabajo 20°C. Rotor SX4750 (numero de tubos x capacidad nominal de 4 x 750 mL)	Beckman Coulter Allegra X-12
Campana de extracción		Lanconco
Máquina de hielo trappé		Cornelius, B430AP
Evaporador con vacío SpeedVac	Cabezal par 10 tubos de 15 mL	Thermo Scientific Savant, SPD121P
Evaporador con nitrógeno gaseoso	45 agujas de suministro de nitrógeno	Organomation Associates Inc.
Espectrofotómetro	Longitud de onda de 190-1100 nm. Exactitud de longitud de onda ± 1 nm. Lámpara de deuterio (UV) y tungsteno (visible). Intervalo de medición de absorbancia de 0.3-3.0 A. Celda de cuarzo o sílice de 1 cm.	Beckman Coulter, DU 530
Sistema de agua desionizada ultra purificada	Agua ultrapura tipo 1. TOC ≤5 ppb	Millipore, Direct-Q3UV
Sistema de filtración con bomba de vacío		Millipore
Sonicador	Capacidad de 1 L	Branson, 2510
Cromatógrafo	Con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample Manager y Detector de Diodos (PDA) y UV-VIS	Waters, Acquity UPLC

Cuadro 152. Reactivos utilizados en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.

Reactivo / Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol absoluto	Etanol absoluto (Meyer, Cat. 0390, CAS 64-17-5).		Manejar dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Etanol con 0.1 % de BHT	Etanol absoluto (Meyer, No. cat. 0390, CAS 64-17-5). 2,6 di-terbutil-4-metil fenol (BHT), pureza ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Cat. B1378, CAS 128-37-0).	Disolver 250 mg de BHT con 250 mL de etanol en un matraz volumétrico.	Estable por 1 semana a temperatura ambiente.
Hidróxido de potasio al 80 %	Hidróxido de potasio, (Merck, Cat. 1.05033, CAS 1310-58-3). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Disolver 80 g de hidróxido de potasio con 50 mL de agua desionizada en matraz volumétrico de 100 mL. Aforar.	Colocar el matraz en un baño de hielo, debido a que al disolverse la sosa el matraz, comienza a generar calor. (Reacción exotérmica)
Agua desionizada	Agua obtenida directamente del sistema Direct-Q3UV millipore		La conductividad debe ser igual o menor de 0.05 µS/cm a 25°C.
Hexano grado HPLC	Hexano, pureza ≥ 95 %, CHROMASOLV para HPLC (Sigma-Aldrich, Cat. 270504, CAS 110-54-3).		Manejar dentro de una campana de extracción. Alejar de toda fuente de ignición.
Fase móvil A2:	2-propanol (JT Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0).		
Solución de acetato de amonio 10 mM: 2-propanol (90:10)(v/v)	Acetato de amonio (Merck, Cat. 101116, CAS 631-61-8). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	En un frasco de vidrio de 500 mL disolver 0.3854 g de acetato de amonio con 450 mL de agua desionizada. Adicionar 50 mL de 2-propanol, agitar y mezclar.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 µm y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 semana a temperatura ambiente.
Fase móvil B1:	2-propanol (JT Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0).		
Acetonitrilo:2-Propanol (90:10)(v/v)	Acetonitrilo, pureza > 99 % (Merck, Cat. 100030, CAS 75-05-8).	Mezclar 450 mL de acetonitrilo y 50 mL de 2-propanol en un frasco de 500 mL.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 µm y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por una semana a temperatura ambiente.
Metanol: 1,2-dicloroetano (50:50) (v/v)	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (J. T. Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). 1,2-dicloroetano, pureza > 99 %, CHROMASOLV HPLC (Sigma Aldrich, Cat. 34872, CAS 107-06-2).	Mezclar 250 mL de 1,2-dicloroetano y con 250 mL en un frasco de 500 mL.	Estable por una semana a temperatura ambiente.
Estándares de tocoferoles y tocotrienoles	D-α-tocotrienol, pureza ≥ 75 % (Sigma-Aldrich, Cat. T0452, CAS 1721-51-3). (+)-γ-tocoferol, pureza ≥ 96 % (Sigma Aldrich, Cat. T1782, CAS 54-28-4). (+)-α-tocoferol (Sigma-Aldrich, Cat. T3634, CAS 59-02-9).	Ver preparación de curva de calibración.	Mantenerlos a -20°C y protegidos de la luz hasta su uso.
Solución de lavado débil: Agua: Metanol (90:10) (v/v)	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 900 mL de agua con 100 mL de metanol grado HPLC en un frasco de 1 L.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 µm y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 mes a temperatura ambiente.
Solución de lavado fuerte: Metanol: Agua (90:10) (v/v)	Metanol HPLC, pureza > 99.9% (JT Baker, Cat. 9093-03, CAS 67-56-1). Agua desionizada (obtenida del Direct-Q3UV).	Mezclar 900 mL de metanol grado HPLC con 100 mL de agua desionizada en un frasco de 1 L.	Filtrar la solución por membrana de 0.22 µm y desgasificar en el ultrasonificador de 5 a 10 min. Estable por 1 mes a temperatura ambiente.

Condiciones cromatográficas

- Sistema Acquity UPLC con los siguientes módulos: Binary Solvent Manager, Sample manager, Detector de Diodos (PDA).
- Fase Móvil A (A2): Solución acuosa de acetato de amonio 10 mM:2-propanol (90:10, v/v)
- Fase Móvil B (B1): Acetonitrilo:2-Propanol (90:10, v/v)
- Solución de lavado débil: Agua: Metanol (90:10, v/v)
- Solución de lavado fuerte: Metanol: Agua (90:10, v/v)

- Tiempo de corrida=11 min
- Flujo= 0.3 mL min⁻¹
- Temperatura de la columna= 35°C
- Temperatura de automuestreador: 10°C
- Volumen de inyección= 2 µL
- Longitud de onda: 290 nm
- Precolumna: Acquity UPLC Col. In-Line Filter
- Columna: Acquity UPLC® BEH C18, 1.7 µm 2.1x100 mm (Colum Part No. 186002352, Waters).

Cuadro 153. Sistema gradiente para el análisis de tocoferoles y tocotrienoles por UPLC.

Tiempo	% A	% B	Curva
0	37	63	6
1.0	4.8	95.2	6
7.0	4.8	95.2	6
9.5	37	63	6

Límite de Cuantificación: Lo establece el área obtenida del volumen de inyección de 0.5 µL de cada tocoferol y cada tocotrienol.

Diagrama de flujo

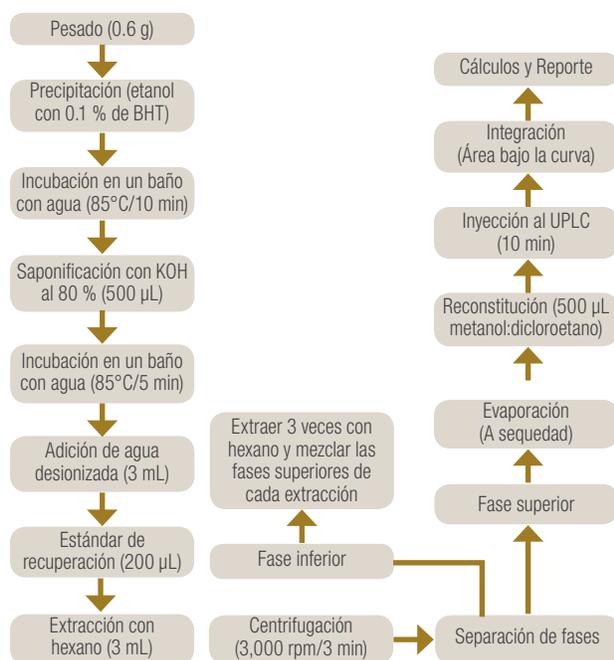


Figura 270. Diagrama de flujo para la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles por UPLC.

Procedimiento

Curva de calibración

Idealmente, la curva de calibración se debe realizar cada vez que se lleva a cabo un análisis cromatográfico, sin embargo, es posible realizar esta actividad al menos cada seis meses.

Preparación de los estándares

Tocoferoles

- Retirar del refrigerador o congelador cada uno de los estándares y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
- Para el alfa tocoferol [(+)- α -tocoferol] y gamma tocoferol [(+)- γ -tocoferol]:
 - Pesar 20 mg de estándar y colocarlo en un matraz volumétrico de 100 mL.
 - Adicionar 30 mL de etanol y disolver.
 - Aforar.
- Leer la absorbancia a una longitud de onda de 292 nm para el alfa tocoferol y 298 nm para el gamma tocoferol. Utilizar etanol como blanco.
- Realizar diluciones de cada estándar hasta obtener una absorbancia de 0.3 (aproximadamente 3 mL del estándar en 10 mL de etanol) (**Solución 1**).

Tocotrienoles

- Reconstituir el estándar de alfa tocotrienol (D- α -Tocotrienol) de la siguiente manera:
 - Adicionar 500 µL de etanol al vial que contiene el estándar, mezclar y trasvasar a un tubo de 15 mL.
 - Completar con etanol hasta un volumen de 10 mL.
- Leer la absorbancia del alfa tocotrienol a una longitud de onda de 292 nm. Utilizar etanol como blanco.
- Realizar diluciones del estándar hasta obtener una absorbancia de 0.3 (**Solución 1**).

Coefficiente de extinción para los estándares utilizados (E1%)

- Alfa tocoferol [(+)- α -Tocoferol] E1%= 75.8
- Gamma tocoferol [(+)- γ -tocopherol] E1%= 91.4
- Alfa tocotrienol [D- α -Tocotrienol] E1%= 91

Cuadro 154. Concentración y absorbancia de los estándares después de su preparación (stock).

Estándar	Absorbancia aprox. en etanol	Concentración aprox. de la solución stock (ng mL ⁻¹)
Alfa tocoferol	1.088	143.53
Gamma tocoferol	1.934	211.59
Alfa tocotrienol	2.155	236.81

Cuadro 155. Concentración y absorbancia de los estándares después de la dilución (Solución 1).

Estándar	Absorbancia de la Solución 1	Concentración aprox. de la solución (ng mL ⁻¹)
Alfa tocoferol	0.330	43.535
Gamma tocoferol	0.328	35.88
Alfa tocotrienol	0.363	39.89

- Etiquetar 3 viales y trasvasar el contenido de cada estándar.
- Programar en el UPLC los siguientes volúmenes de inyección: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 µL por duplicado para construir una curva de calibración con la que se presenta a continuación (Figura 271).

Ejemplo:

Curva de calibración para el alfa tocoferol

Estándar	E1%	λ=nm	Abs	Concentración (ng mL ⁻¹)
α tocoferol (stock)	75.8	292	1.088	143.53
α tocoferol (dilución 1)	75.8	292	0.33	43.53

Absorbancia	Vol. iny. (µL)	Nombre	Tiempo de retención (min)	Area	ng
0.33	0.5	α tocoferol	7.055	23250	21.76
0.33	0.5	α tocoferol	7.06	23461	21.76
0.33	1	α tocoferol	7.055	48942	43.54
0.33	1	α tocoferol	7.063	49776	43.54
0.33	2	α tocoferol	7.062	101825	87.07
0.33	2	α tocoferol	7.064	101520	87.07
0.33	3	α tocoferol	7.063	156583	130.61
0.33	3	α tocoferol	7.062	156729	130.61
0.33	4	α tocoferol	7.063	212226	174.14
0.33	4	α tocoferol	7.057	210799	174.14
0.33	5	α tocoferol	7.055	265333	217.68
0.33	5	α tocoferol	7.057	266948	217.68
0.33	6	α tocoferol	7.057	320154	261.21
0.33	6	α tocoferol	7.079	325077	261.21
0.33	7	α tocoferol	7.084	381497	304.75
0.33	7	α tocoferol	7.085	383157	304.75

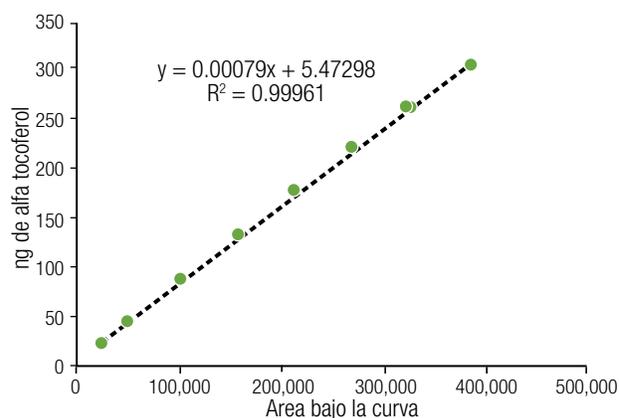


Figura 271. Curva de calibración para el α-tocoferol.

Extracción y cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.

- Pesar 600 mg de harina y depositarla en un tubo de vidrio de 15 mL con tapón de rosca.
- Adicionar 6 mL de etanol con 0.1 % de BHT como antioxidante y agitar en vórtex.
- Incubar las muestras a 85°C durante 5 minutos en baño María.
- Retirar los tubos de la incubación y adicionar 500 µL de hidróxido de potasio al 80 %. Agitar en vórtex.
- Incubar nuevamente los tubos durante 10 minutos a 85°C. Transcurridos los primeros 5 minutos, retirar los tubos del baño, agitarlos en vórtex e introducirlos de nueva cuenta en el baño hasta completar los 10 minutos de incubación. Retirar los tubos y colocarlos en un recipiente con hielo triturado.
- Adicionar a cada tubo 3 mL de agua desionizada fría y agitar en vórtex.
- En campana de extracción, agregar 3 mL de hexano a cada tubo y agitar en vórtex hasta diluir completamente el grumo de harina.
- Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 3 minutos.
- Con una pipeta Pasteur, transferir el sobrenadante (fase superior) a un tubo limpio y debidamente etiquetado. Mantener dichos tubos en hielo y bien tapados.
- Repetir los pasos 20, 21 y 22 dos veces más (se obtiene un volumen aproximado de 9 µL).

20. Evaporar totalmente los sobrenadantes en el punto 9 utilizando el Speed Vac o un sistema de evaporación con nitrógeno (aproximadamente 50 minutos). Culminada esta etapa, cubrir inmediatamente los tubos con sus respectivos tapones.

NOTA: Las muestras evaporadas son estables hasta 48 h si se mantienen a -20°C.

21. Reconstituir la muestra evaporada adicionando 500 µL de metanol: 1,2-dicloroetano (50:50).
22. Filtrar las muestras con acrodiscos de 0.22 µm y recibir el filtrado en viales etiquetados para su inyección al UPLC.
23. Al concluir el análisis en el cromatógrafo, integrar cada uno de los picos de interés obtenidos en el cromatograma para determinar el área bajo la curva (Figura 272).
24. Realizar los cálculos con base a la ecuación obtenida a partir de la curva de calibración y reportar la concentración obtenida.

NOTA: Las muestras reconstituidas no son estables después de 24 h.

Secuencia de inyección al sistema cromatográfico

- Blanco (solución de metanol: 1,2-dicloroetano, 50:50, v/v): 1 inyección.
- Muestra problema: 1 inyección
- Cada 10 muestras realizar un duplicado.

Cálculos

A través de la curva de calibración se obtiene la ecuación de la recta característica para cada tocoferol y para cada tocotrienol. Por lo tanto, la concentración para cada uno está dada por la fórmula siguiente:

$$CBH\ inicial = \frac{m * area \pm b * (V_r / V_{inyec})}{M}$$

Dónde:

CBH inicial= Concentración de cada tocoferol o tocotrienol en base húmeda (µg g⁻¹ de muestra)

m= Pendiente de la recta característica del tocoferol o tocotrienol

Área= Área bajo la curva de

b= Ordenada al origen de la recta característica

V_r = Volumen de reconstitución (500 µL)

V_{inyec} = Volumen de inyección (2 µL)

M= Peso de la muestra (0.6 g)

Posteriormente se realiza la corrección por humedad, misma que se determina por el método de la termobalanza (consultar procedimiento para mayor detalle) y una vez obtenido el dato, se utiliza la siguiente fórmula para finalmente reportar la concentración en base seca:

$$CBS = \frac{CBH \times 100}{100 - \% H}$$

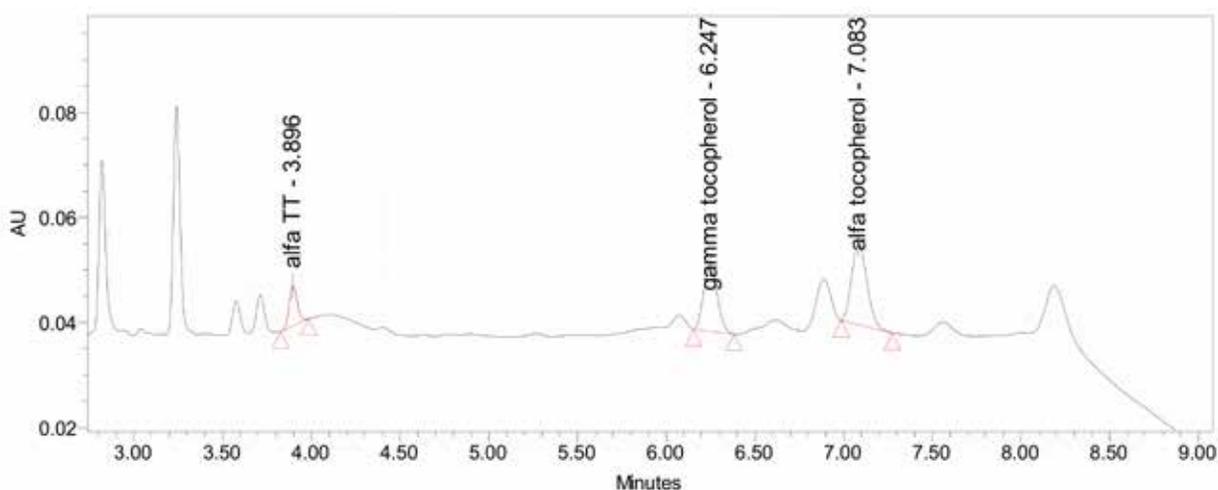


Figura 272. Cromatograma de tocoferoles y tocotrienoles en grano completo (Alfa TT= Alfa tocotrienol, Gamma tocoferol y Alfa tocoferol).

Dónde:

CBS= Concentración de cada tocoferol o tocotrienol en base seca ($\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra).

CBH = Concentración de cada tocoferol o tocotrienol en base húmeda (mg g^{-1}).

H = Contenido de humedad (%).

Referencias

- [1] Traber, M. G. and Atkinson, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Rad. Bio. Med.* **2007**, *43*, 4-15.
- [2] Goffman, F. D. and Bohme, T. Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4990-4994.
- [3] Kurilich, A. C. and Juvik, J. A. Quantification of Carotenoid and Tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1948-1995.
- [4] Luterotti, S.; Markovic, K.; Franko, M.; Bicanic, D.; Madzgalj, A. and Kljak, K. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food Chem.* **2013**, *140*: 390-397.

Cuadro 156. Solución a problemas comunes en la cuantificación de tocoferoles y tocotrienoles.

Problema	Solución
Variación de los volúmenes de las soluciones durante la incubación en el baño María.	Agregar etanol con BHT para alcanzar el volumen inicial.
Se observa variación en la coloración después de agregar KOH	Verificar que se está agregando el volumen correcto. Calibrar la pipeta.
Presencia de película blanca semitransparente	La película se genera cuando se agrega agua a las fracciones de hexano. Evitar que pase a la solución que se va a evaporar porque opaca la columna y aumenta la presión del sistema. Asegurar que no se haya formado la película cuando termine la centrifugación, si esto ocurre, centrifugar una vez más.
Los volúmenes de las soluciones varían durante la extracción	Verificar que los tapones y los empaques de los tubos estén bien colocados para evitar pérdidas por evaporación.
Evaporación incompleta o nula	Completar el proceso de evaporación, programando sesiones breves (pueden ser de unos cuantos minutos). Utilizar muestras muy frías (recién sacadas del refrigerador) para evitar evaporación. Verificar que el empaque de la tapa de la cámara de evaporación esté bien colocado.
Presencia de líquido en los tubos después de la evaporación	Asegurar que no haya pasado agua al transferir el hexano.
Turbidez al re suspender la solución evaporada	Evitar que pase agua al transferir el hexano. Asegurar que no pasen partículas de harina durante la extracción. Asegurar que la película blanca que se forma cuando se agrega agua al hexano no pase a la solución.
Polvo amarillo en la tapa y en el empaque de la cámara de evaporación	Asegurar que el empaque esté bien colocado y que la bomba funcione correctamente.
Presión alta constantemente y aumento gradual de presión de la columna.	Lavar la columna con agua y solvente orgánico sin sales después cada sesión de inyecciones. Si aun después de lavar la columna la presión no disminuye, cambiar la pre columna, el filtro de solvente y el filtro en línea.
Burbujas en el cromatógrafo	Verificar que los solventes se hayan des gasificado y filtrado correctamente. Purgar las líneas del UPLC. Verificar que los filtros de las líneas de solvente estén completamente sumergidos y que no haya burbujas en las líneas. Si esto ocurre, purgar las líneas del HPLC.
Ruido en los cromatogramas	Verificar que no se haya evaporado la muestra dentro del vial. Verificar que durante las inyecciones no hayan variado las condiciones ambientales del área de trabajo.



Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

Carretera México-Veracruz Km 45, El Batán, Texcoco,
México, C.P. 56237, Sede del CIMMYT

Apdo. Postal 6-641
CDMX, Mexico 06600
Tel: +52 (55) 58042004
www.cimmyt.org