



DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES
EN JUGOS DE NARANJA POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

TESIS

QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA

PRESENTA

Q.C.B. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

MONTERREY, NUEVO LEON.

SEPTIEMBRE DE 1994.

TM
Z6658
FM
1994
C3



1020091227



**DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES
EN JUGOS DE NARANJA POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

TESIS

**PRESENTADA A LA FACULTAD DE MEDICINA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

por

QCB NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

MONTERREY, NUEVO LEON.

SEPTIEMBRE DE 1994.

TR
Z



FONDO TESIS


62811

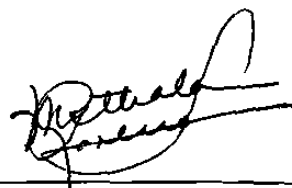
**DETERMINACION DE AMINOACIDOS LIBRES
EN JUGOS DE NARANJA POR
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION**

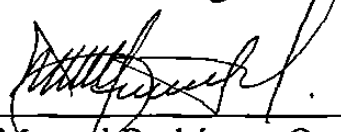
por

Norma Cecilia Cavazos Rocha


El comité de Tesis:


Dra. Nohemí Waskman de J.

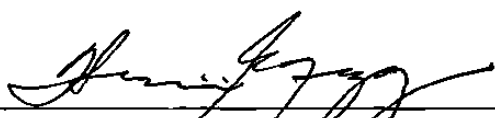

Dra. Mirthala Moreno S.


Dr. Manuel Rodríguez Q.


M.C. Ma. de la Luz Salazar C.


M.C. Laura E. Martínez

Aprobó:


Dra. Herminia G. Martínez Rdz.
Secretario de Ciencias Básicas
Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado
Facultad de Medicina, U.A.N.L.

Asesor de Tesis:

M.C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

Este trabajo se realizó en el

Departamento de Química Analítica de la
Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por estar a mi lado en todo momento.

A mis padres y hermanos

Por su paciencia y apoyo.

A mis amigos

Porque siempre estuvieron a mi lado y me dieron las palabras necesarias para seguir adelante.

A mis compañeros de trabajo

Por su colaboración y estímulo.

A la MC. Ma. de la Luz Salazar

Por su asesoría, por su tiempo, su paciencia, y por sus palabras de estímulo para terminar este trabajo.

Al comité evaluador de tesis

Por sus consejos.

A la Dra. Nohemí Waskman y a la MC. Lidia N. Torres

Por sus valiosos consejos y su colaboración.

A la Maestra Esperanza Torres de Navarro

Por las facilidades que me brindó durante el desarrollo de esta tesis.

Al Ing. Enrique Alcorta

Por su ayuda en la parte estadística y de impresión de este trabajo.

Al MC. Karim Acuña Askar

Por su ayuda en la recuperación de artículos.

A mi esposo Héctor
Con profundo cariño y amor.

A mis padres
Con amor y admiración.

INDICE

	Página
Introducción	
- Elaboración de jugos cítricos	3
- Aminoácidos en jugos de frutas	7
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	19
Material	
- Equipo	20
- Reactivos	20
Método	
- Estandarización	23
• Derivación	23
• Separación de los derivados	23
• Detección	23
• Análisis de los resultados	25
- Análisis de los perfiles de aminoácidos libres en jugos de naranja	26
• Obtención de muestras	26
• Extracción de aminoácidos libres	27
• Derivación	27
• Cálculo de las concentraciones	27
• Comparación de los datos obtenidos	27
Resultados	30
Discusión	47
Conclusiones	54
Bibliografía	55

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA	1	5
FIGURA	2	13
FIGURA	3	13
FIGURA	4	15
FIGURA	5	28
FIGURA	6	29
FIGURA	7	31
FIGURA	8	32
FIGURA	9	40
FIGURA	10	41
FIGURA	11	46
FIGURA	12	49

INDICE DE TABLAS

		Página
TABLA	I	6
TABLA	II	7
TABLA	III	24
TABLA	IV	33
TABLA	V	34
TABLA	VI	35
TABLA	VII	36
TABLA	VIII	38
TABLA	IX	39
TABLA	X	42
TABLA	XI	43
TABLA	XII	45

ABREVIATURAS

°Brix	grados Brix
°C	grados centígrados
CG	Cromatografía de Gases
CII	Cromatografía de Intercambio Iónico
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DABS	Cloruro de Dabsilo
DANS	Cloruro de Dansilo
FI	Fase inversa
g	gramo
hr	hora
λ_{ex}	longitud de onda de excitación
λ_{em}	longitud de onda de emisión
M	Molar
2 ME	2 Mercaptoetanol
μm	micrómetro
μmol	micromoles
μL	microlitros
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimoles
mm	milímetro
N	Normal
nm	nanómetro
nmol	nanomoles
pH	potencial Hidrógeno
OPA	Ortoftaldehído
PITC	Fenilisotiocianato
pmol	picomoles
PQM	Productos Químicos Monterrey
PTC-aa	Feniltiohidantín-aminoácidos
seg	segundo
tp	tamaño de partícula
THF	Tetrahidrofurano
UV	Ultravioleta

INTRODUCCION

En las últimas tres décadas el consumo de jugos de fruta ha aumentado considerablemente. La parte de la cosecha que se consume en forma procesada es mayor que el consumo de fruta fresca. La mayor conveniencia de las formas procesadas, su disponibilidad durante todo el tiempo y su calidad, mejor y más uniforme, han sido los principales factores que han influido en este cambio¹.

Los principales productos derivados de la extracción de la fruta son jugos, bebidas y néctares. De acuerdo con la Federal Standards of Identity de los E.U.A. las características de los productos anteriores son²:

JUGO DE FRUTA: Es el fluido no diluido y no fermentado resultado de la extracción de la fruta.

BEBIDA DE FRUTA: Es el jugo de fruta diluido que puede contener en forma adicionada agua, azúcar, ácido cítrico, goma arábiga, colores y sabores artificiales.

NECTAR DE FRUTA: Es un jugo de fruta con pulpa al cual se le pueden añadir jarabe de azúcar, ácidos, vitaminas, pectina, esencias y agua.

Una bebida de fruta contiene no menos del 25% de jugo natural y un néctar de fruta contiene no menos de un 50% de jugo natural.

Frutas Cítricas

Los cítricos son las bebidas de fruta natural más comunes y muchos opinan que el desayuno sin ellos es incompleto, y con mucha razón, porque el sabor de los cítricos se encuentra entre los más populares y su jugo llena un importante lugar en la dieta. El sabor ácido natural del ácido cítrico, con una cantidad razonable de azúcares para equilibrarlo y sazonado en forma natural con una combinación de aceites esenciales (ésteres, aldehídos y cetonas), constituye una bebida tan refrescante que es difícil de igualar. Inclusive, la mayoría de los refrescos se basa en sabores de cítricos¹.

ELABORACION DE JUGOS DE CITRICOS

El procesamiento de la fruta es continuo desde que el producto sale de la planta agrícola hasta que se asegura su protección contra los microorganismos. La cosecha, clasificación, manejo, almacenamiento, lavado, pelado, calentamiento, etc., son todas etapas que forman parte de la cadena de eventos.

Materias primas

La calidad de un jugo depende totalmente de la calidad de las frutas, pero ésta, a su vez, depende de numerosos factores entre los que se pueden mencionar los siguientes:

- a) La variedad. Esta juega un papel fundamental para las cualidades gustativas. En naranjas se utilizan diversas variedades, por ejemplo, la variedad "Navel" (temprana) y "Valencia" (tardía) son empleadas en Estados Unidos y Francia.
- b) Las condiciones de cultivo tales como el clima, suelo, irrigación, tratamientos, etc., también tienen un papel importante ya que influyen en la concentración de los diferentes compuestos químicos que imparten el sabor y olor a la fruta.
- c) El estado de maduración en el momento de la cosecha también es factor fundamental. Debido a que la concentración de los componentes varía a lo largo del tiempo de maduración, es esencial encontrar la relación óptima de ácidos y azúcares para la elaboración del jugo.
- d) Los métodos de recogida y transporte pueden ser decisivos. Manipulaciones bruscas originan pardeamientos enzimáticos o la activación de enzimas pectolíticas.

Cosecha

La fruta se muestrea periódicamente para ver si ha alcanzado el grado apropiado de madurez. Cuando se juzga conveniente, se realiza la cosecha por el método manual tradicional o en forma mecánica; también pueden utilizarse productos químicos que profundicen la capa de abscisión como la cicloheximida o el etileno. La fruta cae directamente a la tierra y se recoge a mano o mediante barredoras mecánicas.

Procesamiento de frutas cítricas

La fruta cítrica se recibe en la planta enlatadora en donde se muestrea para que el inspector oficial la utilice en la determinación del rendimiento del jugo, de sólidos solubles (°Brix*) y contenido de ácido, lo cual determina si la fruta llena los requisitos de madurez. De esta manera se decide si la fruta se empleará para jugo enlatado, jugo congelado o concentrado congelado.

La fruta de varios tambores se mezcla para lograr la producción de un artículo uniforme. El jugo se extrae de la fruta en máquinas automáticas que manejan aproximadamente de 300 a 700 frutas por minuto. En la figura 1 se describe el funcionamiento de un extractor en línea marca FMC.

Para elaborar un jugo enlatado, una vez verificada la relación azúcar/acidez, el jugo pasa a través de una pasteurizadora para inactivar a las enzimas pectinesterasas y destruir a los microorganismos. Esto se lleva al cabo a una temperatura de 54°C. El jugo caliente se bombea a las llenadoras automáticas de latas. Las tapas se sellan y se esterilizan.

Los jugos fríos se envasan de manera semejante a los enlatados, excepto que se utilizan recipientes de vidrio en lugar de latas, y el producto se mantiene bajo refrigeración a 10°C o menos. El jugo es esterilizado por calentamiento rápido a 115°C durante unos cuantos segundos y se enfría rápidamente hasta 4°C para su envase. El almacenamiento a baja temperatura proporciona un sabor que se asemeja al del jugo fresco ya que el sabor bajo estas condiciones cambia poco, aún durante varios meses.

Para la elaboración de un jugo concentrado congelado las naranjas se manejan de manera similar a aquellas destinadas a producir jugo enlatado en lo que se refiere a extracción y terminado del jugo. El jugo se calienta brevemente antes de concentrarlo para inactivar a las enzimas, que de otra manera causarían la formación de geles sólidos en el recipiente, lo que produciría la clarificación del jugo después de ser reconstituído. Antiguamente se utilizaban evaporadores de baja temperatura (26°C o menos) pero este proceso requería tiempos muy prolongados de concentración, por lo cual han sido sustituidos por evaporadores

* El grado Brix, determinado con un hidrómetro o con un refractómetro, corresponde aproximadamente al contenido porcentual en peso en azúcares.

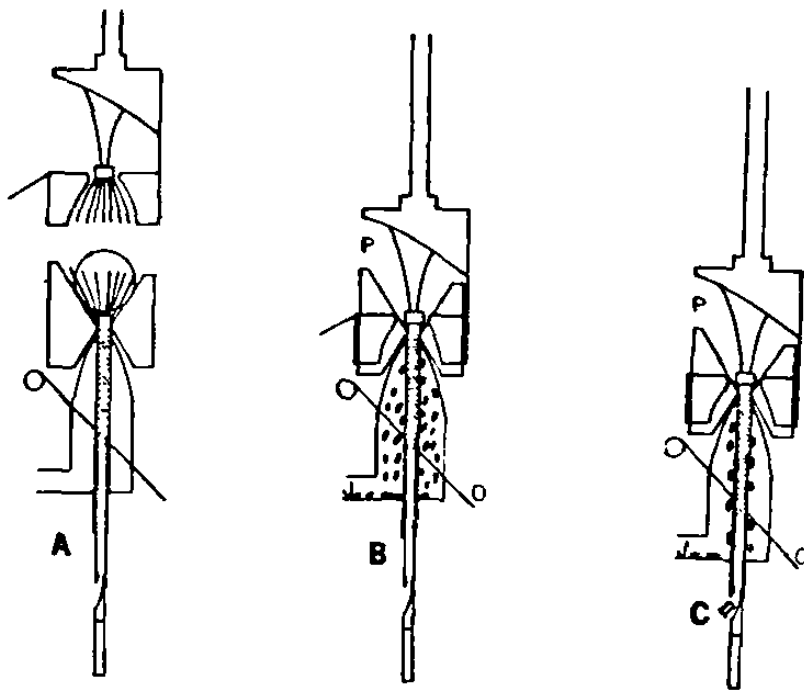


Figura 1. Extractor en serie marca FMC.

A) La fruta se recibe en una fila de tazas estriadas. B) Se exprime por otra taza similar que desciende y embona en la taza estacionaria. C) El jugo, las semillas y las membranas interiores de la fruta pasan a través de un orificio de una pulgada que se corta en la parte inferior de la fruta por medio del extremo afilado de un tubo. Una extensión del tubo afilado sirve como un tamiz perforado para separar el jugo de la pulpa gruesa.

de etapas múltiples con gradientes de temperatura. El jugo pasa una vez a través de cada etapa, durando el proceso de concentración solo unos minutos. En la segunda etapa el calentamiento del jugo alcanza los 96°C, con lo cual se logra la inactivación de las enzimas. En las siguientes etapas la temperatura de evaporación va disminuyendo. Los vapores de cada etapa proporcionan energía para las etapas a menor temperatura. En la tabla I se muestran las temperaturas y las concentraciones logradas en cada una de las etapas³. El concentrado se extrae hasta alcanzar 50-65 grados Brix. La esencia acuosa se recupera de los vapores de las primeras etapas del evaporador y se concentra en una columna de fraccionamiento para adicionarla al concentrado final y mejorar el sabor fresco. También se agrega el aceite extraído en frío de la cáscara para equilibrar el sabor.

TABLA I

Funcionamiento de un concentrador de etapas múltiples.

ETAPA	TEMPERATURA °C	CONCENTRACION DEL PRODUCTO °Brix
Jugo natural	21	12
1	40	13
2	96	16
3	86	33
4	76	40
5	63	48
6	46	56
7	40	63
Enfriador "relámpago"	16	65

Tomado de Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Cheftel J. C.; Cheftel H. Ed. Acribia, 1976. p. 199

AMINOACIDOS EN JUGOS DE FRUTA

Composición de los productos cítricos

La composición química de un jugo está directamente relacionada con las condiciones de cultivo y con los parámetros de procesamiento. En la tabla II se puede observar la composición porcentual del jugo de naranja y de toronja¹. Es importante señalar que en jugos de cítricos, solamente del 5 -15% del nitrógeno total es proteínas, mientras que del 50 - 70% proviene de los aminoácidos libres².

TABLA II

Composición porcentual de jugo de Naranja y de Toronja.

	Naranja	Toronja
Carbohidratos	10.70	10.90
Sólidos	11.80	11.80
Cenizas	0.38	0.32
Proteínas*	0.65	0.56
Fibra Cruda	0.05	0.04
Extracto Etéreo	0.06	0.04

* El contenido de Nitrógeno total, determinado por el método Kjeldahl, se multiplica por el factor 6.25 y el resultado se reporta como proteínas. El nitrógeno total en jugos incluye proteínas, aminoácidos, aminas fenólicas, amidas, nucleótidos, ácidos nucleicos, fosfolípidos, vitaminas y sales inorgánicas².

Tomado de Elementos de Tecnología de Alimentos. Desrosier N. W. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V. Sexta Impresión. 1989. p. 278.

Determinación de aminoácidos libres

Entre las diferentes sustancias constituyentes de frutas y vegetales, los aminoácidos han tomado gran importancia y, por diferentes razones, su determinación analítica es cada vez más necesaria. Además del valor nutritivo que proveen a los alimentos, los aminoácidos juegan un papel muy importante en el campo de las bebidas de frutas, en donde han resultado ser un parámetro de caracterización⁴.

La determinación de aminoácidos en bebidas ha sido utilizada con diferentes propósitos. Estas aplicaciones han sido reportadas y podríamos clasificarlas de la siguiente manera:

1) Indicadores del tiempo de cosecha.

Uno de los problemas más difíciles e importantes relacionados con la elaboración de los jugos de fruta es juzgar el tiempo en el cual la fruta está en condiciones óptimas para producir un jugo con las características de sabor y aroma deseados². Algunos de los procedimientos tradicionales utilizados para juzgar el grado de madurez son:

- a) Apariencia (color y textura).
- b) Relación entre el contenido de azúcar y acidez. (°Brix / Acidez).
- c) El rendimiento del jugo.

Una alternativa para evaluar el tiempo de cosecha es la determinación de los aminoácidos libres en la fruta. La concentración de estos aminoácidos durante el madurado de las frutas cambia significativamente^{5,6}, de manera que se ha sugerido la determinación de su concentración como un parámetro alternativo para estos fines⁵.

Por otro lado, la determinación del contenido de aminoácidos en diferentes frutas, entre ellas naranja, piña y manzana, resultó ser una prueba rápida de evaluación con el fin de aceptar o rechazar una carga de materia prima antes de que ésta sea descargada en la planta⁷.

2) Parámetro de control de calidad para la fabricación de productos fermentados.

Los aminoácidos son una parte importante en la nutrición de los microorganismos que realizarán la fermentación^{5,8}. Se ha comprobado que durante és-

ta y otras formas de actividad microbiana ocurren muchos cambios entre las concentraciones de los diferentes aminoácidos. Estos tienden a desaparecer y más tarde a reaparecer en pequeñas cantidades, pero en mayor variedad, como resultado de la excreción de las levaduras y su autólisis. Los aminoácidos también influyen en el contenido de compuestos volátiles (alcoholes superiores y ésteres) los cuales pueden causar cambios en el sabor.

En la elaboración de la cerveza la determinación de aminoácidos libres en mosto es de gran importancia, ya que las levaduras metabolizan a cada uno de ellos en una manera diferente y las deficiencias de lisina, histidina, arginina y leucina en el mosto pueden traer consigo importantes cambios en el metabolismo inducido de las levaduras sobre el nitrógeno, disminuyendo, de esta manera, la calidad última de la cerveza⁹.

3) Como parámetro de control de calidad en jugos de fruta procesados.

El control de calidad de productos cítricos es un factor vital en la aceptación del consumidor y en el incrementado consumo de estos productos. La calidad ha sido determinada por muchos factores como el sabor, los grados Brix, la acidez titulable, estabilidad física, etc. Sin embargo, se propone la determinación de aminoácidos libres como análisis alternativo. Esta ha sido reportada como una prueba altamente sensible y confiable para llevar al cabo el control de calidad y la detección de a) adulteraciones y b) alteraciones.

a) Adulteraciones.

Un alimento se considera adulterado cuando su naturaleza, composición o calidad no corresponde a la presentación con que se etiquete, anuncie, se expendan o suministre; además cuando no corresponda a lo especificado en las reglamentaciones y cuando haya sufrido tratamiento que disimule su alteración o se encubran defectos en su proceso o en la calidad.

La detección de adulteraciones en jugos de fruta ha sido por mucho tiempo un problema de gran importancia, tanto para las industrias que procesan el producto como para las agencias gubernamentales que controlan la calidad del mismo. Este punto también es de interés para el consumidor¹⁰⁻¹⁶.

Existen parámetros químicos bien establecidos utilizados en la evaluación de la autenticidad de un jugo¹⁰, entre los que se encuentran la determinación del

Se conoce desde hace mucho tiempo, que los aminoácidos existen en el jugo de los cítricos en estado libre y no como parte componente de una molécula de proteína. El ácido glutámico, el ácido aspártico, la glutamina, asparagina, alanina y serina son aminoácidos que están presentes en cantidades considerables⁶.

Contamos con fuentes bibliográficas que demuestran que los aminoácidos libres proporcionan una gran cantidad de información, tanto de la fruta natural como de sus productos derivados, tales como jugos, sidras, etc. En jugos de fruta, las adulteraciones son fácilmente reconocidas realizando la determinación del perfil de aminoácidos libres. Esto es posible gracias a que los perfiles de aminoácidos son diferentes en las distintas frutas^{4,10,11} y además, la adición de adulterantes mencionados anteriormente, principalmente hidrolizado de proteína, aumentan la concentración de aminoácidos que normalmente se encuentran en cantidades muy pequeñas como la isoleucina, la tirosina y la fenilalanina¹⁰.

Debe tomarse en consideración que la concentración de aminoácidos libres en la fruta está esencialmente determinada por la especie de la fruta, su grado de madurez, su variedad y su origen¹¹. De hecho, existen reportes acerca de los cambios composicionales en el jugo de naranja que ocurren debido al cultivo, al origen geográfico y la estación del año en que se recoge la fruta para la elaboración del jugo^{5,11,12,14}. Por este motivo, es difícil establecer valores absolutos de concentración de cada aminoácido en la fruta. Algunos autores, entre ellos Ooghe y de Waele, han recomendado obtener las relaciones de concentración entre los mismos^{8,10,12,16}, lo cual representa una mayor probabilidad en la detección de adulteraciones. Sin embargo, también existen numerosos trabajos en donde se reportan valores absolutos de concentración y sus intervalos^{5,6,12,15}.

Métodos para el análisis de aminoácidos

Moore y Stein en 1958 fueron los primeros en realizar un estudio sistemático de la separación y cuantificación de aminoácidos. Emplearon la cromatografía de intercambio iónico (CII), utilizando columnas empacadas con resina sintética Dowex-50 para la separación de aminoácidos en hidrolizados de proteínas. Esta resina también fue aplicada a una gran variedad de problemas de interés bioquímico. A partir de este trabajo se desarrolló el analizador automatizado de aminoácidos¹³. La detección de aminoácidos se realizó por medio de una reacción post-columna con ninhidrina. Los compuestos formados por la reacción

contenido de potasio, de fósforo, de betaínas (derivados metilados de glicina), la determinación de extracto libre de azúcar y la determinación del título de formol. Esta última prueba se fundamenta en la reacción, en medio neutro, del grupo amino de los aminoácidos con el formol, para formar el grupo metilenoimio, $-N=CH_2$. Durante la reacción se liberan protones los cuales se titulan¹⁷. Esta prueba es la más utilizada para el control de calidad de jugos, sin embargo, determina únicamente el contenido total de aminoácidos, sin identificarlos.

Las pruebas anteriores pueden ser fácilmente manipuladas. Por ejemplo, si a un jugo diluido se añaden sales, como fosfato de sodio, los valores de los parámetros anteriores se normalizan. De manera similar, los falsificadores han encontrado diversas maneras de normalizar el título de formol adicionando, por ejemplo, hidrolizados de proteína, aminoácidos de bajo costo, etanolamina, sales de amonio o bien, mezclando con otros jugos más baratos.

b) Alteraciones.

Se considera un alimento alterado aquel que por la acción de causas naturales haya sufrido modificación en su composición intrínseca, de manera que reduzca su poder nutritivo, lo convierta nocivo para la salud o modifique sus características fisicoquímicas u organolépticas .

Un jugo de fruta natural es obtenido de la fruta por procedimientos mecánicos, y es un jugo no fermentado que muestra las características de color, aroma y sabor de la fruta a partir de la cual se elaboró¹¹. También se considera un jugo de fruta natural a un producto hecho a partir de un jugo concentrado añadiendo solamente la cantidad de agua removida durante el proceso. El producto deberá tener las mismas características organolépticas y analíticas que el jugo de fruta natural¹¹.

Por lo tanto, el encontrar alguna diferencia organoléptica o analítica en un jugo concentrado con respecto a uno natural, indicaría que ha sufrido alguna alteración y que ésta puede haber ocurrido durante el proceso de concentración.

de aminoácidos con ninhidrina son de color púrpura que absorben a 570 nm. Con iminoácidos como la prolina, el complejo formado absorbe a 440 nm²⁰ (figura 2).

Lamkin y Gehrke reportaron los primeros estudios cuantitativos en el análisis de aminoácidos por cromatografía de gases (CG) utilizando N- trifluoroacetil- (N-TFA) n-butil ésteres de aminoácidos como derivados para su determinación. Existe información acerca del éxito en el desarrollo y el análisis de nuevos derivados como los N-TFA metil ésteres, N-acetil ésteres y N-TFA n-butil ésteres aplicados a una gran variedad de muestras¹⁹.

El advenimiento de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) dió lugar a un gran avance en la metodología para el análisis de aminoácidos que, frente a las anteriores técnicas, ofrecía una mayor sensibilidad y rapidez de análisis. Las técnicas cromatográficas incluyen dos tipos de análisis:

- a) Separación de los aminoácidos y una detección post-columna.
- b) Derivatización pre-columna y detección de los derivados separados.

En general, la derivatización pre-columna y separación de los derivados en columnas, comunmente de fase inversa, ofrece mayor eficiencia, facilidad de uso y mayor velocidad de análisis, además de un costo menor de equipo⁹, por lo que ha sido la técnica mayormente empleada.

Algunos de los reactivos que se han utilizado para realizar la derivatización pre-columna son los siguientes:

Yang y Sepúlveda publicaron una técnica de separación de aminoácidos en donde utilizaban fenilisotiocianato (PITC) como reactivo derivatizante formando feniltiocarbamil aminoácidos (PTC-aa) (figura 3) los cuales fueron separados a través de una columna de fase inversa empleando gradiente de elución. La detección de los derivados se realizó espectrofotométricamente a 254 nm y se detectaron concentraciones menores a picomoles^{19,20}. Existen numerosos trabajos en donde se emplea este reactivo para la derivatización²⁰⁻²⁵.

Se ha empleado también el cloruro de N', N dimetilaminonaftalen-5-sulfonil, conocido como cloruro de dansilo, (DANS) como agente derivatizante. El DANS forma derivados con aminoácidos primarios y secundarios. La detección de los derivados se realiza por fluorescencia. La reacción consume tiempo y el reactivo es fluorescente por si mismo⁵. Las condiciones para la dansilación son extremada-

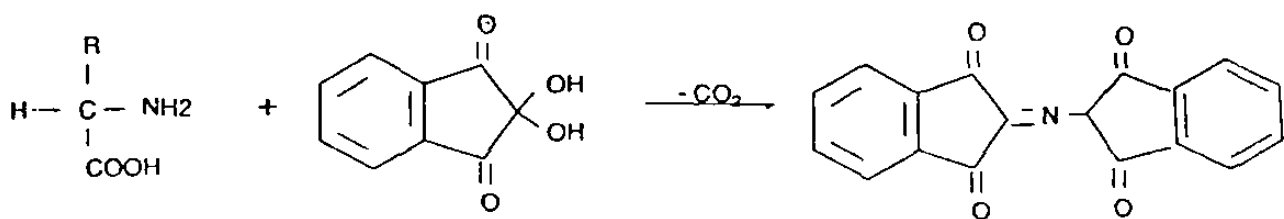


Figura 2. Reacción de los aminoácidos con el reactivo ninhidrina para producir derivados de color.



Figura 3. Reacción de aminoácidos con el reactivo PITC para producir derivados feniltiocarbamil-aminoácidos. Los derivados se detectan espectrofotométricamente a 254 nm.

mente variables. El exceso de cloruro de dansilo interfiere con las separaciones cromatográficas, por lo que debe ser removido. Además existen dudas acerca de la formación incompleta o de múltiples derivados^{7,18}.

Otro de los reactivos empleados para la derivatización es el cloruro de dabsilo o cloruro de 4, N,N, dimetilaminoazobenceno 4' -sulfonilo (DABS). El DABS forma derivados cromóforos que se detectan a 436 nm²⁶. Ha sido reportado como un método de derivación con alta reproducibilidad, exactitud y sensibilidad²⁷. Al respecto de este método, contamos solo con un reporte de su aplicación en aminoácidos con la técnica de cromatografía en capa delgada en hojas de poliamida y con otro reporte en donde se utilizó la técnica CLAR²⁸.

Uno de los reactivos más utilizados para el análisis pre-columna es el ortoftaldehído^{5,7,9,20} (OPA). En presencia de un mercaptano, como el 2 mercaptoetanol (2 ME), el OPA reacciona rápidamente con los aminoácidos primarios formando derivados isoindol altamente fluorescentes⁹ (figura 4). La reacción es rápida, sencilla, se lleva al cabo en medio acuoso y a temperatura ambiente.

Además de los reactivos mencionados anteriormente, otros reactivos derivatizantes que se han utilizado son el naftalen 2,3 dicarboxialdehído, en donde la detección de los derivados se lleva al cabo por medición amperométrica^{29,30} y el reactivo de Marfey (1 fluoro 2,4 dinitrofenil-5-alaninamida) con detección UV a 340 nm¹².

Determinación de aminoácidos libres en frutas

El primer estudio cromatográfico cualitativo para determinar aminoácidos en plantas fue realizado por Rockland, Underwood y Beavens⁶ y Underwood y Rockland^{6,15}. Estimaron los aminoácidos en filtrados de jugo de naranja, naranja-tangerina, limón, lima, mandarina y un híbrido de naranja-limón, por medio de cromatografía en papel^{6,15}. Además de asparagina, ácido aspártico, glutamina, arginina e histidina, que habían sido reportados anteriormente, fueron detectados y reportados por primera vez la alanina, serina, el ácido glutámico y la prolina. La mayoría de estos constituyentes han sido encontrados en todos los jugos de cítricos. Se señaló el ácido γ -aminobutírico (GABA) como un constituyente en todas las variedades de cítricos comerciales. El GABA es un

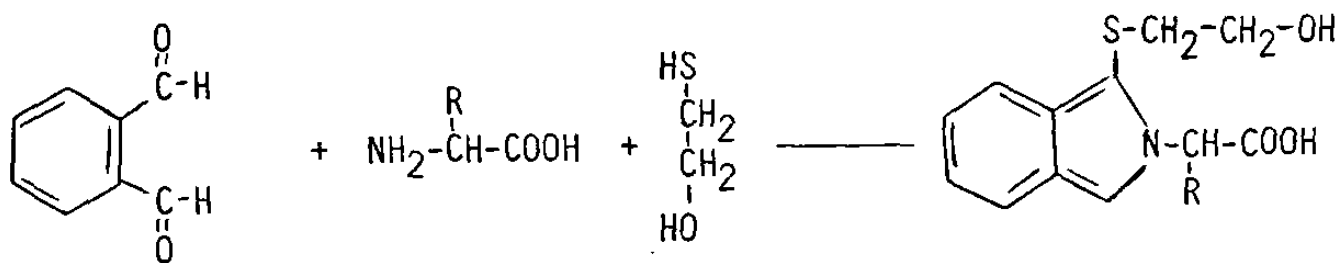


Figura 4. Reacción de aminoácidos con el reactivo OPA/2 ME para producir derivados isoindol fluorescentes.

producto de la α -descarboxilación del ácido glutámico por la glutámico descarboxilasa y está universalmente presente en la mayoría de las plantas⁶.

Elahi y Khan realizaron estudios en jugos de cítricos. Estos estudios incluían azúcares, acidez titulable, pH, grados Brix y título de formol. También reportaron una estimación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos libres determinados por cromatografía en papel utilizando diferentes sistemas de solventes³¹.

Los datos experimentales mencionados anteriormente fueron obtenidos por métodos que no son tan exactos ni sensibles como las nuevas técnicas cromatográficas en columna de líquidos de alta resolución o de gases. Estas técnicas fueron desarrolladas y comenzaron a tener aplicación en el análisis de aminoácidos en plantas.

Vandercook y Price reportaron la concentración de aminoácidos encontrados en jugos comerciales de naranja y de limón. Utilizaron la cromatografía de intercambio iónico con una columna Aminex Q 150-S. La detección de los aminoácidos separados se realizó por medio de una reacción post-columna con ninhidrina¹⁵. Otros autores también han utilizado esta técnica para la determinación de aminoácidos libres en frutas, en plantas²⁰, y aminoácidos de proteínas en otras muestras^{8,18,32}.

Fernández Flores y colaboradores emplearon la cromatografía de gases como técnica instrumental para la determinación de aminoácidos libres en frutas y jugos de frutas¹³. Los aminoácidos fueron derivatizados y analizados como N-trifluoroacetil n- butilésteres.

La determinación de aminoácidos libres por CLAR en bebidas alcohólicas y no alcohólicas se realizó por un método de inyección directa con una columna de fase normal LiChrosorb NH₂³³. La detección se llevó al cabo por UV. Debido a que no se realizó un paso previo de preparación de la muestra, se pensó que otras sustancias podrían interferir en la separación. Sin embargo, fue posible la separación y el reporte muestra los cromatogramas de separación e identificación de aminoácidos, mezclados con vitaminas, con una buena resolución.

La determinación de aminoácidos se ha hecho en jugos de uva, vinos, leche, queso, youghurt y café^{5,34} utilizando el reactivo DANS para la derivatización. El reactivo PITC se ha empleado en la determinación de aminoácidos libres de la cerveza, así como los provenientes de la hidrólisis de proteínas en alimentos como la soya, queso, plantas y semillas^{18,21}.

El reactivo derivatizante OPA/2 ME ha sido ampliamente utilizado para el análisis de aminoácidos libres en jugos de fruta y otras bebidas^{5,7,9}.

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, el material y recursos con los que contamos en la Facultad y en el Departamento de Química Analítica, decidimos establecer el siguiente objetivo general y sus particulares ya que consideramos de gran interés el contar con un método para el control de calidad en el área de alimentos y particularmente en los jugos de naranja y de otras frutas.

OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis de aminoácidos libres en jugos de naranja natural y procesado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para establecer si existen diferencias cualitativas y/o cuantitativas entre ellos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estandarizar el método CLAR en fase inversa con el método OPA/2 ME para la determinación de aminoácidos en jugos de fruta natural y procesado.
- 2) Seleccionar el método de extracción de aminoácidos en jugos de fruta natural procesado.
- 3) Comparar la relación de aminoácidos libres presentes en los jugos de naranja natural y procesado para evaluar posibles alteraciones durante el proceso de elaboración.
- 4) Establecer un perfil de aminoácidos que caracterice el jugo de naranja para, de ser posible, en un futuro, aplicar el método en la detección de adulteraciones.

MATERIAL

EQUIPO

- * Cromatógrafo de Líquidos Beckman System Gold.
Bomba modelo 166.
- * Detector de Fluorescencia.
Filtro de Excitación de 356 nm.
Filtro de Emisión de 450 nm.
- * Interfase modelo 406.
- * Columna de fase inversa ultrasphere ODS Beckman de 4.6 mm X 150 mm,
con tamaño de partícula de 5µm.
- * Equipo para filtrar solventes y portafiltros para filtrar muestras Millipore.
- * Membranas para filtrar solventes acuosos y muestras acuosas Millipore con
tamaño de poro de 0.45 µm.
- * Potenciómetro Beckman SelectIon 2000. Ion Analyzer.
- * Baño de ultrasonido para la desgasificación de los eluentes BRANSON 50/60
Hz.
- * Agitador Vortex Mixer S7P modelo S8223-1
- * Columnas Sep Pak-C₁₈ para extracción en fase sólida.

REACTIVOS

- * Estándares de aminoácidos (SIGMA): Acido aspártico, (asp); ácido glutámico, (glu); asparagina, (asn); serina, (ser); histidina, (his); glicina, (gli); arginina, (arg); treonina, (thr); alanina, (ala); ácido γ-aminobutírico, (GABA); tirosina, (tir); metionina, (met); valina, (val); triptófano, (trp); fenilalanina, (phe); isoleucina, (ile); leucina, (leu); lisina, (lis) y ácido diaminopimélico (DAP). Este último se utilizó como estándar interno.

- * Ortoftaldehído (SIGMA).
- * 2-Mercaptoetanol (SIGMA).
- * Tetrahidrofurano (PQM).
- * Acetonitrilo (PQM).
- * Metanol (PQM).
- * Borato de Sodio (PQM).
- * Fosfato ácido de potasio anhidro (PQM).
- * HCl (PQM).
- * NaOH (PQM).
- * Metanol grado cromatográfico.
- * Agua filtrada con el sistema Milli-Q.

Preparación de soluciones:

- * Estándares de aminoácidos: Se prepararon estándares individuales de los aminoácidos a una concentración de 100 $\mu\text{mol/mL}$ en HCl 0.3N.
- * Mezcla de estándares: De las soluciones de aminoácidos individuales se preparó una mezcla de estándares y diluciones de ésta para trabajar a diferentes concentraciones.
- * Buffer de boratos: Se preparó una solución saturada de tetraborato de sodio en agua y se ajustó el pH de la solución a 9 con NaOH 3N.
- * Reactivo de derivatización Se diluyeron 250 mg de ortoftaldehído en 10 mL de metanol. De esta solución se tomó 1 mL, se añadió 1 mL de metanol y 50 μL de 2 mercaptoetanol (2ME) y se aforó a 5 mL con solución saturada de borato de sodio a pH 9.

* Solución buffer de fosfatos 0.018 M a un pH de 7.2: Se disolvieron 2.56 g de fosfato ácido de potasio anhidro en un litro de agua y se ajustó esta solución a un pH de 7.2 con HCl 3N.

METODO

ESTANDARIZACION.

Se trabajó la mezcla de estándares a una dilución 1 a 100 (10 nmol/mL) y de esta dilución se tomaron diferentes cantidades para poder trabajar en un intervalo de 1 a 5 nmol/mL.

DERIVACION

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 µL de la mezcla de estándares, se adicionaron 50 µL de agua y 30 µL de la solución OPA/2 ME. Esta solución se agitó en forma manual durante 60 seg, se cargó en el loop del cromatógrafo de capacidad de 20 µL y se inyectó a la columna a los 120 seg.

SEPARACION DE LOS DERIVADOS

Para la separación de los derivados se empleó un gradiente de elución. El sistema de eluentes fue el siguiente:

Eluente A: Metanol : Buffer de fosfatos 0.018 M pH 7.2 : Tetrahydrofurano, en una proporción de 12:85:3

Eluente B: Metanol : Buffer de fosfatos 0.018 M pH 7.2 : Tetrahydrofurano, en una proporción de 55:42:3

Ambos eluentes se ajustaron a un pH de 7.2 con HCl 3N y se filtraron y desgasificaron antes de su uso.

El programa de gradiente empleado se muestra en la tabla III.

DETECCION

La detección se llevó al cabo por fluorescencia. La sensibilidad del detector fue de 0.05 RFU (1 RFU = 10 mV).

TABLA III

Programa de gradiente utilizado para la separación de aminoácidos derivatizados con el reactivo OPA/2 ME

Tiempo min.	%B	Duración min.
0	100	0
7	20	2
9	70	22
31	80	2
33	90	10
43	100	5
58	0	5

Velocidad de flujo: 1ml/min

Eluente A: Metanol: Buffer de fosfatos 0.018 M: THF (12:85:3)

Eluente B: Metanol: Buffer de fosfatos 0.018 M: THF (55:42:3)

Columna: Fase Inversa de ODS (150 X 4.6 mm, partícula 5 µm)

Detección: Fluorescencia

$\lambda_{ex} = 350 \text{ nm.}$

$\lambda_{em} = 450 \text{ nm.}$

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Identificación de los aminoácidos

Se inyectaron los estándares de los aminoácidos individuales y se obtuvieron sus tiempos de retención, después se inyectó la mezcla de estándares y la identificación de los aminoácidos se llevó al cabo por sus tiempos de retención y por el orden de elución.

Factores de respuesta

Se calcularon los factores de respuesta relativos al estándar interno, DAP, de la siguiente manera:

$$\text{Factor de Respuesta} = \frac{h_{aa}}{h_{ei}}$$

Donde h_{aa} es la altura de pico del aminoácido y h_{ei} es la altura del estándar interno.

Precisión

Se determinaron los coeficientes de variación o desviaciones estándar relativas para los tiempos de retención, áreas y altura de los picos:

$$\text{C. V.} = \frac{s}{\bar{X}}$$

donde s es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de los datos obtenidos.

Porcentajes de recuperación

Se determinó la exactitud del método a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos. Para esta determinación se utilizaron muestras de jugo, previamente cuantificadas, a las cuales se les adicionó una cantidad conocida de la mezcla de estándares.

Todos los cálculos se hicieron tomando como base la altura de pico y relativa al estándar interno (DAP).

Linealidad

Se realizaron curvas de calibración para establecer el intervalo de respuesta lineal del detector para los aminoácidos.

ANALISIS DE LOS PERFILES DE AMINOACIDOS LIBRES EN JUGOS DE NARANJA.

OBTENCION DE MUESTRAS

Las muestras de jugo natural y jugo procesado fueron proporcionadas por la empresa ORANJUGOS, ubicada en Guadalupe, N.L. La producción de jugos durante el mes de marzo fué de 31 lotes, de los cuales nos fueron proporcionadas 20 muestras de jugo natural con sus correspondientes 20 de jugo procesado*. El jugo de naranja natural lo obtuvieron directamente de la extracción de la fruta, y el jugo procesado correspondía al jugo de naranja natural concentrado a 65 grados Brix. Para el análisis, el jugo procesado fue reconstituído utilizando un volumen de jugo con seis de agua.

Una vez obtenidas, las muestras fueron almacenadas en congelación hasta el momento del análisis.

Las naranjas provenían de Veracruz principalmente.

EXTRACCION DE AMINOACIDOS

Para la extracción de aminoácidos libres en los jugos se probaron 3 métodos:

El primero de ellos es el que utilizó Blanco Gomis y colaboradores⁵ en donde el jugo se puso a reflujo con metanol durante una hora, después se filtró, se concentró y se aforó a 25 ml. Para eliminar los pigmentos y otras sustancias interferentes y alargar así la vida de la columna, Richmond y colaboradores sugieren filtrar la muestra por columnas Sep-Pak C₁₈³⁶, por lo que este procedimiento también se realizó.

Otro de los métodos que se probaron para la extracción es el propuesto por Fernández-Flores y colaboradores¹³, en donde la preparación de la muestra se realizó pesando una determinada cantidad de muestra, y añadiendo alcohol al 80%, se dejó reposar la muestra un tiempo de una hora.

* El número mínimo de muestras requeridas para una población de 31 lotes es de 8 a 13 muestras³⁵

El tercer método, que fue el que finalmente se escogió para procesar las muestras, fue el de Chaytor⁷ con modificaciones en los volúmenes de muestra y reactivo. El método fue el siguiente: Se tomó 1 mL de jugo de naranja y se añadieron 2 mL de la mezcla de extracción metanol-acetonitrilo preparada 1:1. Se adicionaron también 100 μ L de solución de DAP (estándar interno). Esta solución se agitó 1 minuto en agitador Vortex y después se centrifugó. Del sobrenadante se tomaron 20 μ L, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se completó a 1 mL con agua. A la solución resultante se le llamó extracto (Figura 5).

DERIVACION

Para la derivación se tomaron 10 μ L del extracto; se añadieron 60 μ L de agua y 30 μ L de la solución derivatizante OPA/2 ME. Esta solución se agitó durante 60 seg en forma manual, se cargó el loop del cromatógrafo de capacidad de 20 μ L y se inyectó a los 120 seg (Figura 6).

Las condiciones de análisis cromatográfico fueron las mismas que las que se utilizaron para los estándares de aminoácidos.

CALCULO DE LAS CONCENTRACIONES

Las concentraciones de los aminoácidos presentes en los jugos fueron calculadas por interpolación de las curvas de calibración con el método de estándar interno, utilizando el DAP como estándar interno.

COMPARACION DE LOS DATOS DE CONCENTRACION

Los datos de concentración obtenidos del análisis de los jugos muestra tanto natural como procesado, fueron comparados con la prueba estadística "t" de Student para establecer si existía diferencia significativa entre ambos datos.

EXTRACCION DE AMINOACIDOS

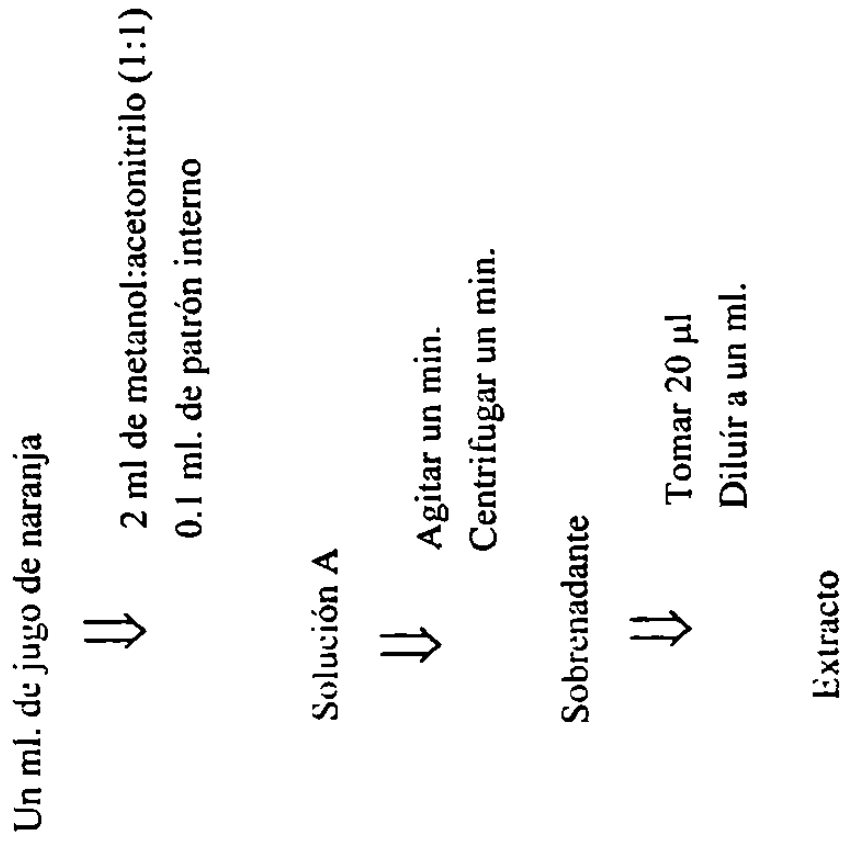


Figura 5. Extracción de aminoácidos libres del jugo de naranja

PREPARACION Y DERIVACION DE LA MUESTRA

10 μ l del extracto



Tubo Eppendorf de 1.5 ml

60 μ l de agua

30 μ l de OPA/2 ME

Agitar exactamente 60 seg.



Derivado

Cargar el loop del cromatógrafo (20 μ l) e inyectar en la columna a los 120 seg.

Figura 6. Procedimiento para realizar la derivación de aminoácidos con el reactivo OPA/2 ME.

RESULTADOS

ESTANDARIZACION DEL METODO

En la figura 7 se observa el cromatograma correspondiente a la mezcla de estándares a una concentración de 2 nmol/mL que corresponden a una cantidad de inyección de 40 pmol, excepto el DAP (80 pmol). El orden de elución fue el siguiente: aspártico, glutámico, asparagina, serina, histidina, glicina, arginina, treonina, alanina, tirosina, ácido diaminopimélico, metionina, valina, triptófano, fenilalanina, isoleucina y leucina. El orden en el que aparecieron los aminoácidos fue siempre constante. La lisina no se detectó a esta concentración.

En la figura 8 se observa un cromatograma de la misma mezcla de estándares pero a una concentración de 6 nmol/mL (80 pmol de inyección), con excepción del DAP el cual está en una concentración de 20 nmol/mL (400 pmol de inyección). En el cromatograma es posible detectar la presencia de la lisina con un tiempo de retención de 56 minutos. Las señales correspondientes a la glicina, arginina y treonina comienzan a perder resolución.

En ambos cromatogramas se observa el pico número 19 que corresponde a la fase móvil.

En la tabla IV se muestran los coeficientes de variación de los tiempos de retención para cada uno de los aminoácidos los cuales tuvieron un valor desde 0.1 para la valina hasta 0.8 para el aspártico y el glutámico.

Se obtuvieron los factores de respuesta del detector para cada uno de los aminoácidos con respecto al estándar interno, DAP. Los resultados se muestran en la tabla V. El ácido aspártico es el aminoácido que tiene mayor respuesta al detector mientras que la lisina tiene el valor mas pequeño.

Los resultados de los coeficientes de variación de la altura de pico de cada uno de los aminoácidos, calculados con inyecciones repetidas de la mezcla de estándares a una concentración de 4 nmol/mL, se muestran en la tabla VI. Las inyecciones se realizaron el mismo día, a la misma temperatura y con el mismo sistema de eluentes. Para todos los aminoácidos se obtuvieron coeficientes de variación menores de un 10%, excepto para la arginina y el triptófano cuyos coeficientes obtenidos se muestran en la tabla VII.

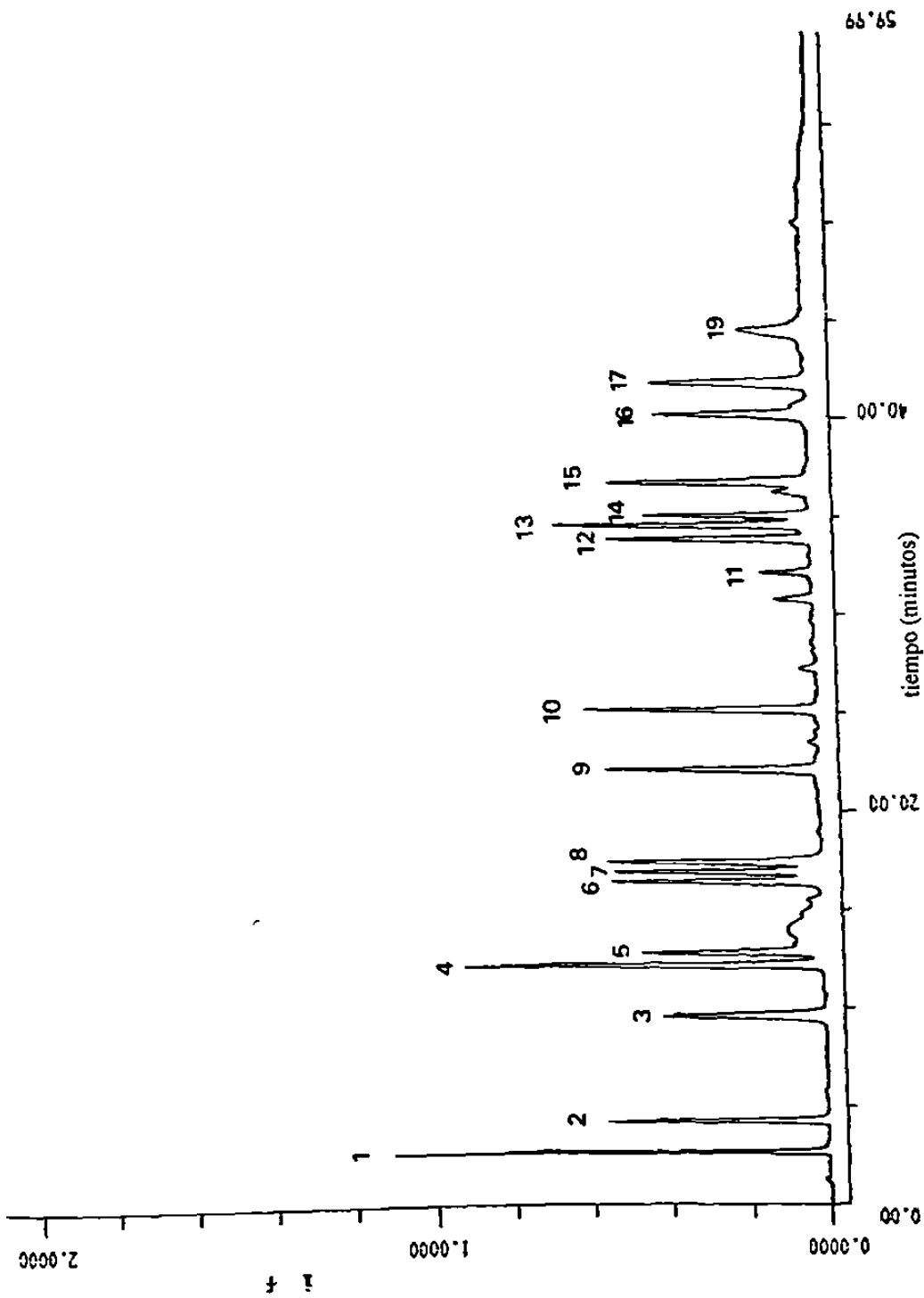


Figura 7. Cromatograma de la mezcla de estándares de aminoácidos.
 1) Asp 2) Glu 3) Asn 4) Ser 5) His 6) Gli 7) Arg 8) Thr 9) Ala 10) Tir 11) DAP 12) Met 13) Val 14) Trp 15) Phe 16) Ile
 17) Leu 19) Fase móvil. Todos los aminoácidos, excepto el DAP (80 pmol), a una cantidad de inyección de 40
 picomoles. Las condiciones de separación se muestran en la tabla III.

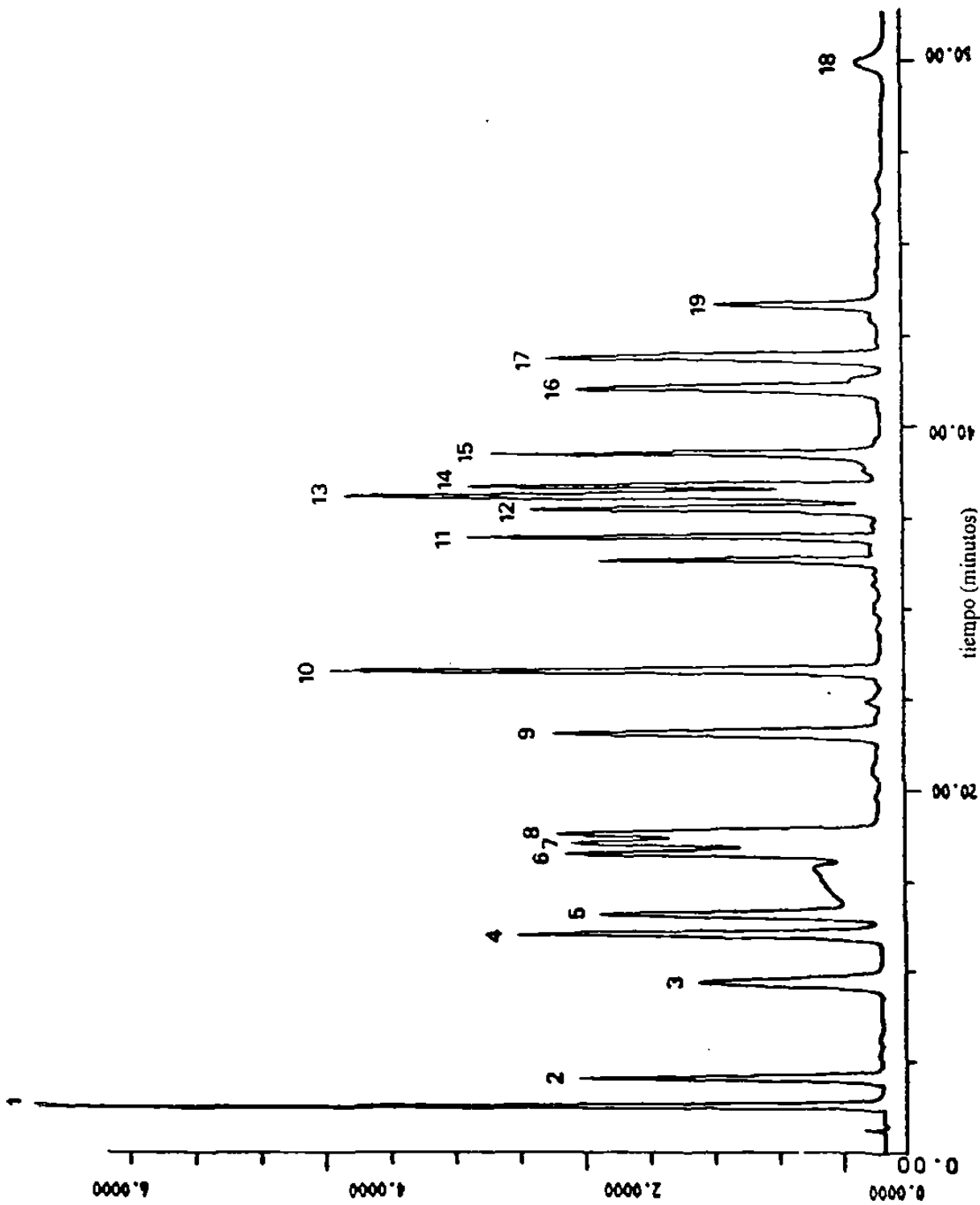


Figura 8. Cromatograma de la mezcla de estándares de aminoácidos.

1) Asp 2) Glu 3) Asn 4) Ser 5) His 6) Gli 7) Arg 8) Thr 9) Ala 10) Tir 11) DAP 12) Met 13) Val 14) Trp 15) Phe 16) Ile 17) Leu 18) Lis 19) Buffer. Todos los aminoácidos, excepto el DAP (400 pmol), a una cantidad de inyección de 80 picomoles. Las condiciones de separación se muestran en la tabla III.

TABLA IV

Coeficientes de variación de los tiempos de retención de los aminoácidos*

n = 5

AMINOACIDO	tr min	C.V. %
Asp	2.65	0.8
Glu	4.17	0.8
Asn	9.52	0.3
Ser	12.16	0.6
His	12.88	0.4
Gli	16.35	0.6
Arg	17.13	0.2
Thr	17.33	0.6
Ala	22.05	0.6
GABA	23.85	0.8
Tir	25.20	0.4
Met	33.87	0.2
Val	34.58	0.1
Trp	35.12	0.2
Phe	36.80	0.3
Ile	40.27	0.3
Leu	41.92	0.2

* Obtenidos de cromatogramas de la mezcla de estándares, analizados en el mismo día y con el mismo eluente.

TABLA V

Factores de respuesta al detector de los aminoácidos*

AMINOACIDOS	F.R.
Asp	8.35
Glu	3.90
Asn	2.75
Ser	6.30
His	2.90
Gli	3.90
Arg	3.58
Thr	3.75
Ala	3.85
GABA	3.48
Tir	4.04
Met	3.53
Val	4.35
Trp	3.10
Phe	3.48
Ile	2.65
Leu	2.65

* Obtenidos en base a la altura de los picos utilizando DAP como estándar interno.

TABLA VI

Coefficientes de variación de altura de los picos*

n = 5

AMINOACIDO	C.V. %
Asp	1.43
Glu	1.47
Asn	5.18
Ser	3.75
His	2.67
Gli	3.12
Thr	3.69
Ala	3.06
Tir	1.67
Met	3.03
Val	8.40
Phe	2.14
Ile	1.59
Leu	1.40

* Obtenidos de cromatogramas de la mezcla de estándares, analizados en el mismo día y con el mismo eluente. Se inyectó una cantidad de 80 picomoles.

TABLA VII

Coefficientes de variación de
altura de los picos*
 $n = 5$

AMINOACIDO	C.V. %
Arg	11.00
Trp	13.00

* Obtenidos de cromatogramas de mezclas de estándares, analizados en el mismo día y con el mismo eluente. Se inyectó una cantidad de 80 picomoles.

En la tabla VIII se reportan los coeficientes de regresión para las curvas de calibración obtenidos al trabajar en un intervalo de 0.5 a 8 nmol/mL equivalente a 10 a 160 pmol inyectados. Las curvas también se calcularon tomando como base la altura de los picos y relativa el estándar interno (DAP).

En la tabla IX se presentan las recuperaciones obtenidas para cada aminoácido con sus respectivos coeficientes de variación. El análisis se realizó 4 veces.

MUESTRAS DE JUGO

Jugo de naranja natural.

La figura 9 corresponde al cromatograma del perfil de aminoácidos obtenido del jugo de naranja natural. Destacan las señales del aspártico, glutámico, asparagina, serina, glicina, arginina, alanina y ácido γ -aminobutírico. El resto de los aminoácidos también fueron detectados pero están presentes en menor proporción.

Jugo de naranja procesado.

La figura 10 corresponde al cromatograma del perfil de aminoácidos del jugo de naranja procesado. El cromatograma obtenido es muy semejante al del jugo natural solamente con ligeras variaciones en las alturas de los picos.

Los cromatogramas anteriores representan a los obtenidos para las 14 muestras de jugo analizadas. Para el análisis cuantitativo tomamos en cuenta solo los 8 aminoácidos mencionados anteriormente.

Los resultados de las concentraciones de los aminoácidos presentes en los jugos se muestran en la tabla X. Para el cálculo de las concentraciones se tomó en cuenta el factor de recuperación obtenido a partir de los porcentajes de recuperación. Las concentraciones están dadas en mmol/L. Además se muestra el intervalo de variación encontrado en los jugos analizados. Los resultados son muy semejantes para ambos jugos. En la tabla XI se muestran los resultados obtenidos al comparar las concentraciones de cada aminoácido en jugo natural y jugo procesado con la prueba "t" de Student. El valor "t" calculado a partir de cada par de datos es menor que el valor "t" de tablas³⁷. Esto indica que no existe diferencia significativa entre ambos grupos analizados.

TABLA VIII

Coefficientes de regresión
Curva 10,40,80,120,160 pM inyectados

AMINOACIDO COEFICIENTE DE REGRESION

Asp	0.994
Glu	0.992
Asn	0.992
Ser	0.994
His	0.992
Gli	0.999
Arg	0.995
Thr	0.991
Ala	0.998
GABA	0.998
Tir	0.999
Met	0.999
Val	0.995
Trp	0.998
Phe	0.999
Ile	0.997
Leu	0.990

TABLA IX

Valores de recuperación para los diferentes aminoácidos

AMINOACIDO	RECUPERACION %	C.V. %
Glu	99.8	1.3
Asn	93.0	14.9
His	90.2	7.7
Ile	89.2	5.7
Asp	88.3	13.9
Ala	87.9	9.1
Ser	84.4	16.3
Arg	84.3	10.1
Trp	79.0	9.1
Met	77.0	5.5
Val	75.1	5.8
Thr	72.0	13.0
Phe	65.8	15.0
Gli	65.3	11.9
Tir	63.0	10.9
GABA	62.6	2.0
Leu	58.1	6.0

* Obtenidos a partir de muestras adicionadas con la mezcla de estándares. El análisis se realizó 4 veces. En el caso del GABA únicamente se trabajó con 2 muestras.

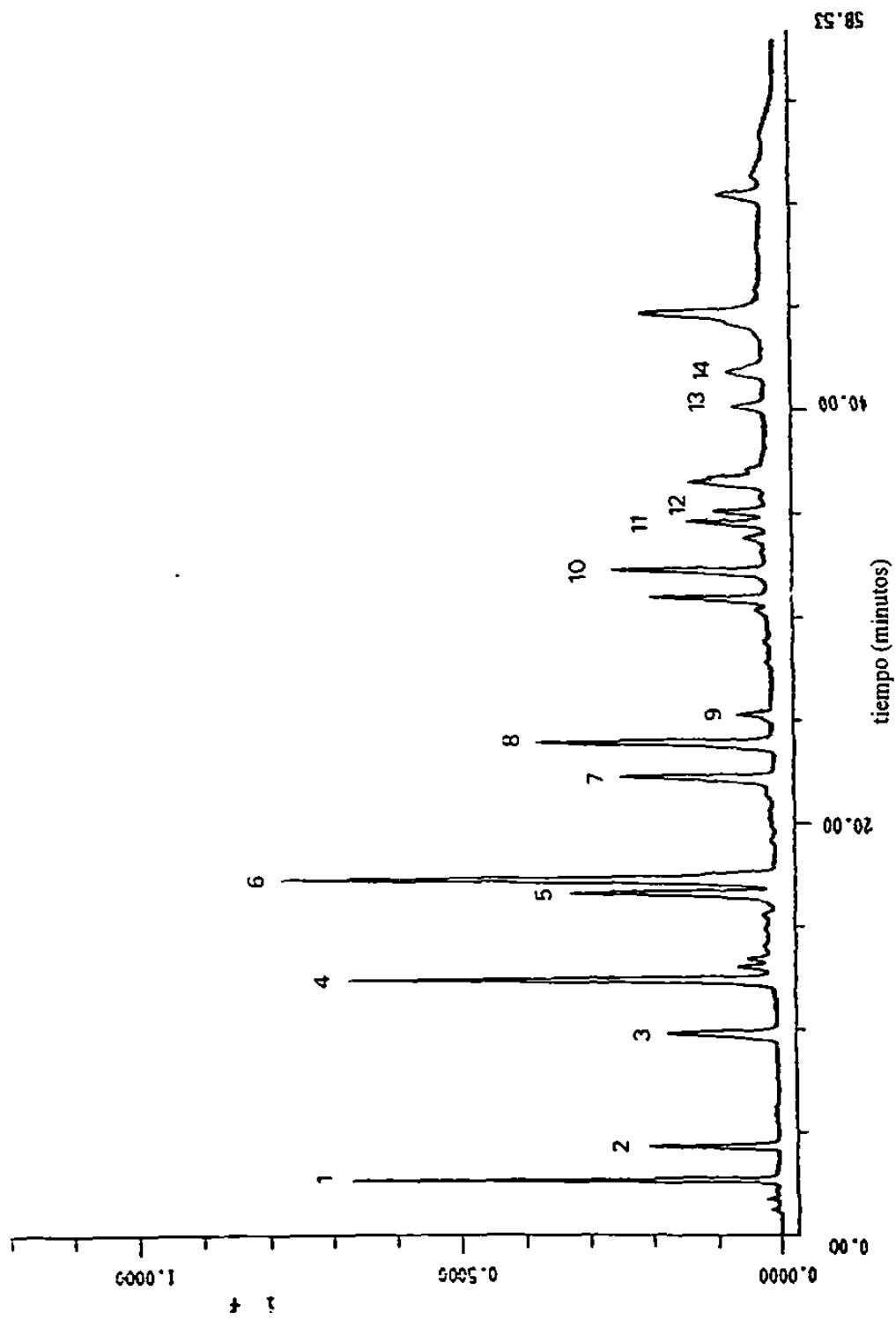


Figura 9. Cromatograma del perfil de aminoácidos obtenido de jugo de naranja natural. 1) Asp 2) Glu 3) Asn 4) Ser 5) Gli 6) Ala 8) GABA 9) Tir 10) DAP 11) Val 12) Trp 13) Ile 14) Leu 15) Buffer. Las condiciones de separación se muestran en la tabla III.

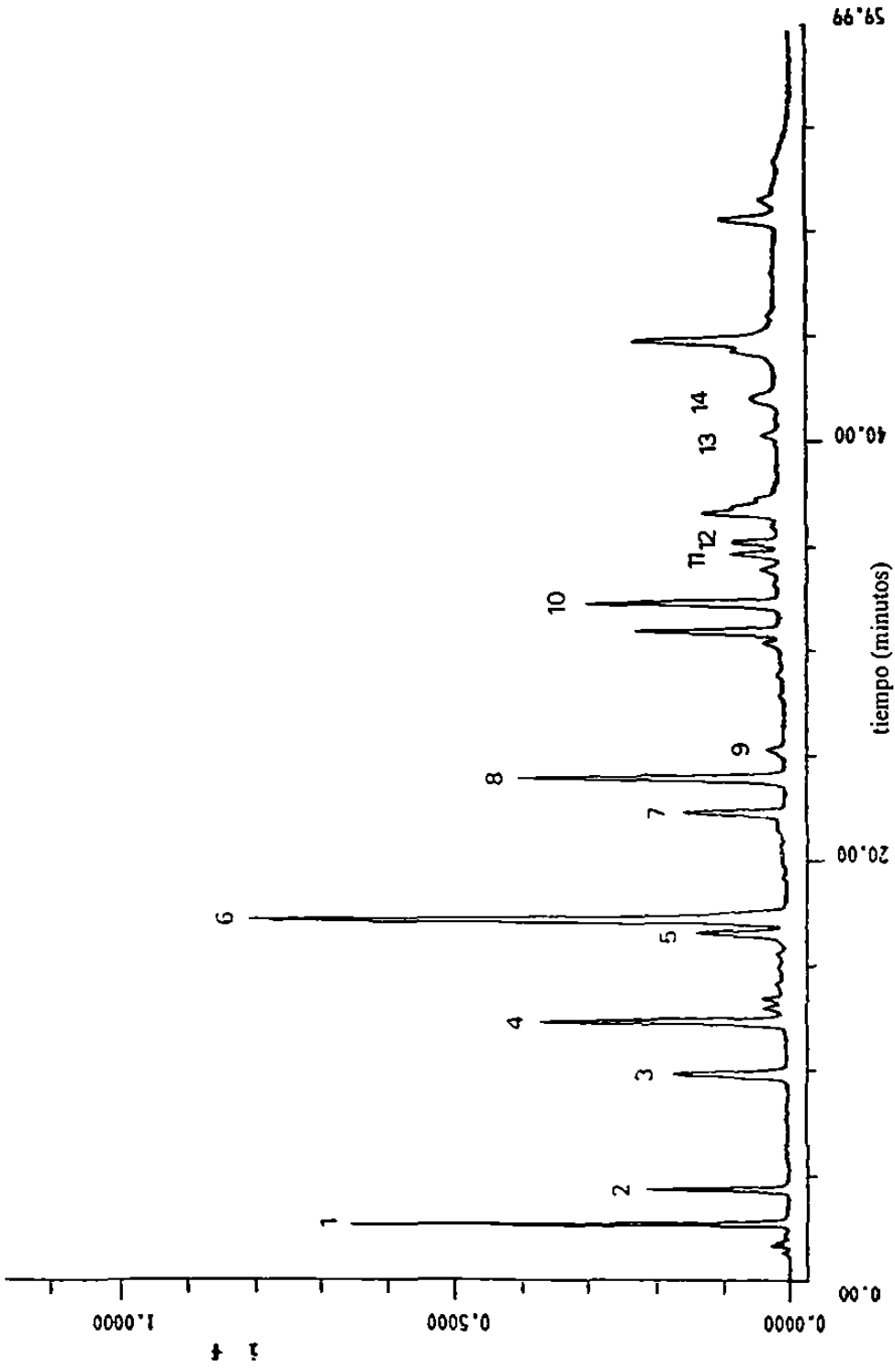


Figura 10. Cromatograma del perfil de aminoácidos obtenido de jugo de naranja procesado. 1)Asp 2)Glu 3)Asn 4)Ser 5)Gli 6)Arg 7)Ala 8)GABA 9)Tir 10)DAP 11)Val 12)Trp 13)Ile 14)Leu 15)Buffer. Las condiciones de separación se muestran en la tabla III.

TABLA X

Concentraciones encontradas en los jugos analizados*

Jugo natural

milimoles/litro

AMINOACIDO	\bar{X}	INTERVALO
Asp	2.25	1.25 - 2.97
Glu	1.11	0.81 - 1.41
Asn	2.06	1.03 - 3.08
Ser	3.05	0.93 - 5.17
Gli	2.26	0.08 - 4.60
Arg	4.83	3.54 - 6.12
Ala	1.85	0.34 - 4.04
GABA	5.35	4.54 - 6.16

Jugo Procesado

AMINOACIDO	\bar{X}	INTERVALO
Asp	2.28	1.58 - 2.97
Glu	1.09	0.68 - 1.50
Asn	1.86	1.44 - 2.29
Ser	2.82	1.53 - 4.10
Gli	1.83	0.78 - 2.89
Arg	4.84	3.87 - 5.81
Ala	1.45	0.52 - 2.38
GABA	5.26	4.76 - 5.85

* n = 14

TABLA XI

Comparación de aminoácidos en jugos naturales (n) y procesados (p)*

AMINOACIDO	\bar{X} mmol/L	t_c	t_t
Asp _n	2.25	-0.14	2.05
Asp _p	2.28		
Glun	1.11	0.21	2.05
Glup	1.08		
Asn _n	2.06	0.67	2.05
Asn _p	1.86		
Ser _n	3.05	0.37	2.05
Ser _p	2.82		
Glin	2.26	0.73	2.06
Glip	1.83		
Arg _n	4.83	-0.30	2.05
Arg _p	4.84		
Ala _n	1.85	0.61	2.05
Ala _p	1.45		
GABA _n	5.35	0.44	2.22
GABA _p	5.25		

* Prueba estadística t de Student: t de tablas (t_t) es mayor que t obtenido (t_c) al comparar los pares de datos de concentración para cada aminoácido. Se concluye que no existe diferencia significativa entre estos pares de datos.

Con las concentraciones obtenidas y de acuerdo con la literatura^{8,10,12,16}, se calculó la relación porcentual para cada aminoácido, tomando en cuenta la concentración de cada uno de los 8 aminoácidos analizados con respecto al total de la concentración de ellos, con lo cual obtuvimos el perfil de aminoácidos para los jugos de naranja analizados. Ya que no existe diferencia significativa entre los datos de concentración de aminoácidos en jugo natural y jugo procesado, el perfil puede calcularse con los datos de cualquiera de los dos jugos. En este caso el perfil se calculó con datos de jugo natural. Este perfil obtenido se muestra en la tabla XII y en la figura 11.

TABLA XII

Perfil de aminoácidos en jugo de naranja*

AMINOACIDO	%	INTERVALO
Asp	10.09	7.81 - 12.35
Glu	5.03	4.15 - 5.91
Asn	8.80	6.61 - 10.99
Ser	12.93	6.78 - 19.08
Gli	9.79	3.99 - 15.59
Arg	22.45	17.13 - 27.77
Ala	7.39	2.77 - 12.61
GABA	24.14	18.59 - 29.69

* Perfil calculado a partir de datos de jugo natural.

AMINOACIDOS EN JUGO DE NARANJA

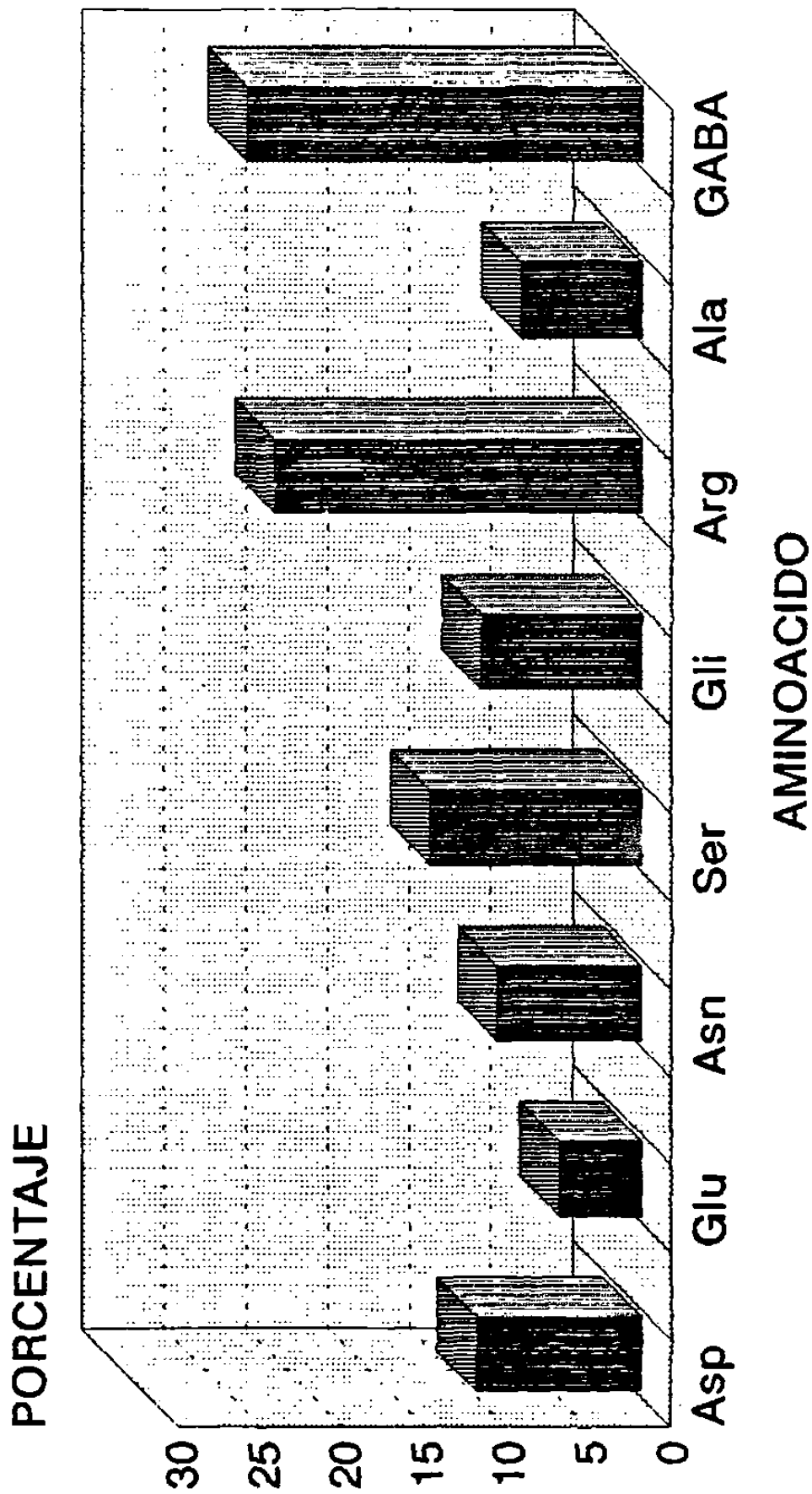


Figura 11. Perfil de aminoácidos obtenido de jugo de naranja.

DISCUSION

En el presente trabajo se propone un método cromatográfico para la determinación de aminoácidos libres en jugos de fruta.

Al revisar la literatura encontramos que todos los reactivos derivatizantes presentan tanto ventajas como limitaciones. Para nuestro trabajo decidimos utilizar el OPA/2 ME ya que la reacción de derivatización es rápida, se lleva al cabo a temperatura ambiente y en medio acuoso, no es necesario eliminar el exceso de reactivo, como ocurre con otros reactivos (DABS, PITC), ya que no afecta el análisis; tampoco es necesario utilizar altas temperaturas para que se lleve al cabo la reacción de derivatización (DANS). Durante el trabajo pudimos comprobar la rapidez y facilidad del procedimiento así como la alta fluorescencia de los derivados. Otra de las ventajas de la reacción OPA/2 ME es que los resultados cuantitativos son precisos.

La estabilidad de los derivados es uno de los inconvenientes de esta reacción. Se ha reportado^{19,22} que ésta varía dependiendo de cada uno de los aminoácidos por lo que la reproducibilidad y sensibilidad del procedimiento, y del método en general, son directamente afectados si los tiempos de reacción y de inyección no son controlados. Nosotros observamos estos mismos efectos, por lo que nos apegamos estrictamente a la técnica de la reacción.

Otra de las características de la reacción es la estabilidad del reactivo OPA/2 ME. Se ha reportado que el reactivo es indefinidamente estable a temperatura ambiente y que requiere ocasionales adiciones de 2 ME^{9,38}. Sin embargo, en nuestro caso no sucedió así ya que el reactivo se descomponía a temperatura ambiente e incluso en congelación, en el transcurso de una y media a dos semanas. La descomposición podía observarse fácilmente ya que la solución derivatizante tomaba un ligero color amarillo y, además, en el cromatograma aparece una señal entre la asparagina y la alanina y que, de acuerdo a lo reportado⁹, corresponde a un producto de degradación del reactivo.

Los principales factores que afectan la cromatografía en fase reversa son la composición del solvente, la concentración del buffer y el pH³⁹. Para el presente trabajo, la elución se realizó en un principio, con el programa de gradiente reportado por Garza Ulloa⁹; sin embargo, en el transcurso de la estandarización del

método, el programa se modificó en varias ocasiones con el fin de lograr la separación del grupo glicina-arginina-treonina y metionina-valina-triptófano. Además fueron probados cambios en la composición de la fase móvil los cuales no mejoraron la resolución. Finalmente se estableció el programa de gradiente mostrado en la tabla III con la composición original de las fases.

Se trabajó a 25°C y se observó que si la cromatografía se realizaba a temperaturas mas bajas, la resolución disminuía, incluso se perdía para la glicina-arginina-treonina y metionina-valina-triptófano. Si se realizaba el trabajo a temperaturas mayores los tiempos de retención eran, en general, más cortos.

Uno de los problemas que se encontraron durante la separación y al trabajar con las muestras fue el uso de la pre-columna que, si bien, se recomienda para alargar la vida de la columna, en nuestro caso se observó un aumento de la presión y una disminución de la resolución, por lo que decidimos no utilizarla.

Para la detección de los derivados se utilizó inicialmente el detector UV a una λ de 440 nm ya que se reporta que los derivados también absorben en esta región^{6,16}. En la figura 12 se observa el cromatograma obtenido. En este caso se utilizó una columna microbore de 10 cm x 2.1 mm de diámetro interno y con tamaño de partícula de 5 μ m. El programa de gradiente de elución tenía una duración de 30 minutos. Bajo las condiciones trabajadas se obtiene buena resolución pero una sensibilidad relativamente baja (cientos de picomoles). Además, el reactivo por sí solo presenta señales a la longitud de onda de detección de 440 nm. que pueden confundirse con los derivados de los aminoácidos.

Por lo anterior se decidió trabajar con el detector de fluorescencia. La columna utilizada fue la reportada en EQUIPO. La sensibilidad obtenida por nuestro método fue de 0.6 nmol/mL (12 pmol inyectados), aunque algunos aminoácidos como arginina, metionina, tirosina y fenilalanina presentaron respuesta a 0.2 nmol/mL. (4 pmol de inyección). La excepción fue la lisina la cual fue detectada hasta los 4 nmol/mL. (80 pmol de inyección).

ANALISIS CROMATOGRAFICO

En los resultados de los cromatogramas se obtuvo el mismo orden de elución que el reportado en otros trabajos^{9,18} excepto para el par treonina-arginina que en

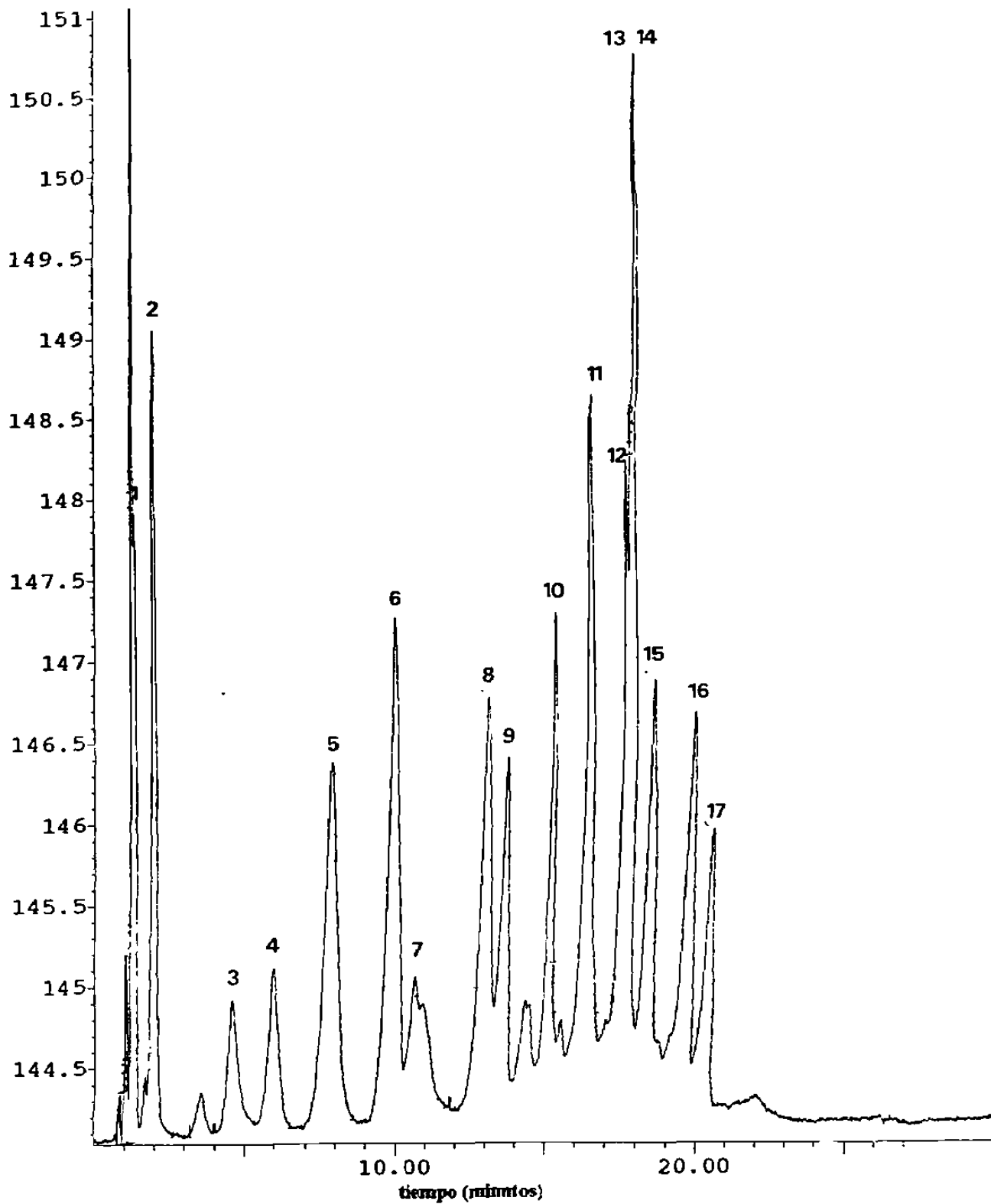


Figura 12. Cromatograma de la separación de aminoácidos por el método OPA/2ME

Velocidad de flujo: 0.3 ml/min

Eluente A: Metanol: Buffer de fosfatos 0.18 M: THF (12:85:3)

Eluente B: Metanol: Buffer de fosfatos 0.18 M: THF (55:42:3)

Columna: Fase Inversa de ODS (100 X 2.1 mm, partícula 5 µm)

Detección: 440 nm

nuestro caso el orden fue arginina-treonina, lo cual fue comprobado inyectando estos aminoácidos en diferentes proporciones.

Aunque se presentaron variaciones en los tiempos de retención en el análisis cromatográfico de la mezcla de estándares, el orden de elución de todos los aminoácidos fue siempre el mismo. Los tiempos de retención obtenidos al analizar las muestras fueron un poco mayores que los obtenidos con la mezcla de estándares; estas variaciones en los tiempos de retención pueden deberse a efectos de la matriz. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, siempre se mantuvo el orden de elución.

En cuanto a la altura de los picos, se obtuvieron coeficientes de variación menores del 10% excepto para la arginina y el triptófano debido probablemente a que la resolución para ellos era muy dependiente de la temperatura y de la vida de la columna, por lo que en algunas ocasiones no fue posible resolverlas de la treonina y la valina respectivamente y esto producía variaciones en la señal.

La lisina presentó algunos problemas. Por un lado, debido a su baja respuesta no era detectada; después, se observó que, aunque la concentración inyectada teóricamente estaba dentro de los límites de detección, en algunas ocasiones no se lograba ver su señal. Por lo tanto y tomando en cuenta que este aminoácido está presente en los jugos en muy pequeñas cantidades, no se tomó en cuenta para el análisis ni para obtener los parámetros analíticos. Además, en las muestras nunca fue detectada su señal.

Se ha reportado límite de detección menor a 8 pmol de inyección. En nuestro caso se trabajó también a 8 y hasta 4 pmol de inyección sin embargo, la variación en la respuesta para algunos aminoácidos inyectados a esta concentración, es muy grande. De esta manera, se decidió trabajar dentro del intervalo de 10 hasta 160 pmol de inyección.

En lo que se refiere a los resultados de recuperación puede observarse que los porcentajes obtenidos son muy variados entre los diferentes aminoácidos. Sin embargo, los valores de los coeficientes de variación son aceptables⁴⁰. Además, no pudimos encontrar alguna correlación entre el porcentaje de recuperación y la naturaleza fisicoquímica del aminoácido y/o su peso molecular.

EXTRACCION DE AMINOACIDOS LIBRES

Los métodos de Blanco Gomis y Richmond y de Fernández Flores, que fueron probados inicialmente, resultaron ser tardados, tediosos e implicaban un gasto considerable de metanol, además de que la recuperación observada era baja. Por esta razón se seleccionó y utilizó el método propuesto por Chaytor ya que, además de ser sencillo, rápido y económico, obtuvimos mayores recuperaciones.

Tanto el área como la altura de pico son parámetros que pueden utilizarse para el análisis cuantitativo. La altura, medida como la distancia desde la línea de base al máximo del pico es, posiblemente, el método de integración más sencillo. Se ha reportado una mejor precisión midiendo la altura en lugar del área, siempre y cuando los picos sean simétricos y las condiciones de operación se mantengan constantes⁴¹, de lo contrario, existe la tendencia de las alturas a variar, más que el área, si las condiciones cromatográficas varían. De la misma manera, resulta más conveniente medir altura en el caso de picos parcialmente resueltos o de los que presenten un coqueo muy marcado; en el análisis de trazas si la línea base es muy ruidosa y cuando los picos cromatográficos son muy agudos^{41,42}. En nuestro caso utilizamos la altura de pico como parámetro cuantitativo ya que, además de ser obtener señales muy agudas, al trabajar con el área obteníamos coeficientes de variación mayores.

El uso de estándar interno para compensar los errores de inyección es prácticamente obligado en cromatografía de gases porque el error de inyección es grande, pero tiene menor sentido en la técnica CLAR en donde éstos son menores. Las opiniones respecto a la utilidad del estándar interno son bastante diversas. Muchos autores recomiendan su uso para obtener precisiones analíticas aceptables mientras que otros mencionan que su utilización no es necesaria⁴¹. En nuestra experiencia, y ya que el método presentaba variaciones en la intensidad de fluorescencia, inclusive de un día para otro, decidimos utilizar el método de estándar interno. De esta manera, además de reducir al mínimo esta variación en la intensidad de la señal, quedaron reducidas las variaciones del método debidas al proceso de extracción, a las diluciones realizadas para la extracción y preparación de la muestra y las variaciones debidas a la reacción y a la derivación, entre las principales variables.

En cuanto a la columna cromatográfica, es muy importante que, cuando se trabaja con soluciones buffer, las sales queden totalmente eliminadas ya que éstas pueden precipitar dentro de las columnas, filtros o tuberías del equipo cromatográfico. La

eliminación de estas sales se logra con agua pura pero luego el agua debe removerse con metanol para evitar el crecimiento de bacterias dentro del instrumento⁴¹. Se recomienda también utilizar agua a 60°C para aumentar la solubilidad de las sales y después lavar con metanol.

A lo largo de nuestro trabajo se observó que la columna cromatográfica comenzaba a perder resolución. Cuando esto sucede se recomienda una limpieza y revaloración de la columna^{41,43}. Este procedimiento también fue realizado.

Para la selección del aminoácido que se utilizaría como estándar interno se probaron los aminoácidos que han sido reportados en otros trabajos^{9,12} como la homoserina, la citrulina y la norleucina, pero cada uno de ellos resultaron tener tiempos de retención muy cercanos a los de otros aminoácidos del análisis (glicina, treonina y leucina respectivamente), impidiendo su resolución; de manera que no se pudieron utilizar. Finalmente se probó el DAP, el cual tuvo tiempos de retención diferentes a los de los demás aminoácidos por lo que fue el que se utilizó como estándar interno.

Es recomendable utilizar 2 ó 3 estándares internos cuando la naturaleza química de los diferentes componentes de la muestra es distinta, como lo es en el caso de los aminoácidos (ácidos, básicos y neutros), y cuando se trabaja con gradiente de elución. Sin embargo para nosotros no fue posible utilizarlos ya que no se disponía de más estándares y solo se introdujo el DAP. Este presenta 2 señales o picos con tiempos de retención promedio de 30.79 y 33.02 minutos respectivamente, debidas probablemente a la formas isoméricas de este ácido (formas D,L y forma meso). Para el análisis cuantitativo tomamos como base los datos del segundo pico.

Antes de realizar el análisis cuantitativo es importante verificar las condiciones de trabajo para disminuir, en lo posible, los errores implicados en el uso de la CLAR. En el capítulo 13 de libro de Quattrocchi⁴¹ así como en el manual de Mc. Nair⁴³ se encontrará una guía completa acerca de las recomendaciones, así como problemas instrumentales y sus posibles soluciones que se presentan al realizar esta técnica.

AMINOACIDOS EN MUESTRAS DE JUGOS

De las 20 muestras de jugo obtenidas, 6 fueron utilizadas tanto para la selección del método de extracción como para la estandarización de la técnica analítica. Una vez establecidas las condiciones, se trabajó con los 14 restantes para la obtención de los datos de concentración y comparación de éstos. En los 14 jugos frescos analizados, con sus correspondientes concentrados, siempre se encontraron presentes y en cantidades cuantificables los 8 aminoácidos señalados en los resultados. Ooghe y de Waele y Kuneman^{10,12} reportaron estos mismos aminoácidos además de la prolina, como los principales y los tomados como criterio para confirmar la autenticidad de jugos de naranja, manzana, uva y toronja. Por lo tanto, y de acuerdo con nuestros resultados, decidimos tomar en cuenta solo estos aminoácidos para el análisis cuantitativo; además, incluimos a la glicina ya que en todas las muestras se encontró presente y en cantidades cuantificables por nuestro método. La prolina no se incluyó ya que no puede ser detectada por el OPA/2 ME. Para poder detectarla es necesario oxidarla primero con hipoclorito de sodio⁴⁴.

Con los resultados obtenidos en este trabajo será posible utilizar la determinación de aminoácidos para llevar al cabo el control de calidad en jugos de naranja y de otras frutas, tanto durante el proceso de extracción, como para la detección de adulteraciones. La determinación también puede ser aplicada para el análisis de otras bebidas y alimentos, para conocer su valor nutritivo o también para control de calidad.

Por otra parte esta técnica también podrá ser utilizada en otros campos de interés, como por ejemplo en Microbiología, en Bioquímica, o en Química Clínica, en donde el análisis de aminoácidos ha resultado de gran ayuda en la detección de enfermedades metabólicas.

CONCLUSIONES

1. Se cuenta con un método analítico sensible y reproducible para la determinación de aminoácidos libres en jugos de naranja y jugos de otras frutas.
2. No existe diferencia significativa entre los principales aminoácidos libres cuantificados en jugo de naranja natural y jugo de naranja procesado por lo que consideramos que el proceso de concentración no afecta este parámetro analítico.
3. Se propone un perfil con los valores de las concentraciones relativas de los principales aminoácidos encontrados en jugo de naranja.

BIBLIOGRAFIA

1. Desrosier N.W. *Elementos de Tecnología de Alimentos*. Compañía Editorial Continental S.A. de C.V. Sexta impresión. pp 267-279, 1989.
2. Peterson M.S., Johnson A. *Encyclopedia of Food Science*. The Avi Publishing Company. Inc. Vol. 3, pp 332-338, 1978.
3. Cheftel J-C, Cheftel H. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp 184-207, Vol. 1, 1976.
4. Vasconcelos, A.M., Chávez das Neves, H.J. Characterization of Elementary Wines of *Vitis Vinifera* Varieties by Pattern Recognition of free Amino Acid Profiles. *J. Agric. Food Chem.* 37, (4), 931-937, 1989.
5. Blanco Gomis D., Picinelli Lobo A.M., Gutiérrez Álvarez M.D. Determination of Amino Acids in Apple Extracts by High Performance Liquid Chromatography. *Cromatographia* 29, (3/4), 155-160, 1990.
6. Sinclair W. *The Biochemistry and Phsicology of the Lemon and other Citrus Fruits*. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources 1984.
7. Chaytor, P. The Analysis of Amino Acids in Fruit Juices by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 37, 1019-1026, 1986.
8. Marcy, J.E., Carroll, D.E., Young, T.C. Changes in Free Aminoacid and Total Nitrogen Concentrations During Maturation of Moscadine Grapes (*v. rotundifolia*). *Journal of Food Science* 46, 543-547, 1981.
9. Garza Ulloa H, Garza Cantú R., Canales Gajá A.M. Determination of Amino Acids in Wort and Beer by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *AS BC Journal* 44, (2), 47-51, 1986.
10. Ooghe, W., Waele, A. Detection of Dilutions and Adulteration of Fruit Juice Through Amino Acid Standard Values. *Flussiges Obst.* 49, (11), 618-624, 1982.

11. Bielig, H. Standard Values and Ranges of Specific Reference Numbers for Orange and Grapefruit Juice. *Confructa* 29, 191-207, 1985.
12. Kuneman D., Braddock J. Mc. Chesney L. HPLC Profile of Amino Acids in Fruit Juices as their (1-fluoro-2,4 dinitrophenyl)-5-L-alanine Amide Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 36, 6-9, 1988.
13. Fernández-Flores, E., Kline, D., Johnson, A. . Quantitative and Qualitative GLC Analysis of Free Amino Acids in Fruit and Fruit Juices. *Journal of the AOAC* 53, (6), 1203-1208, 1970.
14. Park, G. Characteristics of California Navel Orange Juice and Pulpwash. *Journal of Food Science* 48, 627-632, 1983.
15. Vandercook, C.E., Price, R.L. The Application of Amino Acid Composition to the Characterization of Citrus Juice. *Journal of Food Science* 37, 384-386, 1972.
16. Vandercook C.E. Statistical Evaluation of Data for Detecting Adulteration of California Navel Orange Juice. *Journal of Food Science* 48, 636-640, 1983.
17. Egan H., Kirk R., Sawyer R. *Análisis Químico de los Alimentos*. Editorial Continental S.A. de C.V. p. 31. 1988.
18. Blackburn S. *Amino Acid Determination. Methods and Techniques*. 2a. Edición. 1978.
19. Gehrke, Ch. Sample Preparation for Chromathograpy of Amino Acids: Acid Hidrolysis of Proteins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68, (5), 811-821, 1985.
20. Salazar Cavazos M. L. Aminoácidos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. Estudio de Perfiles en Frutos de diferentes especies de Karwinskia. Tesis. U.A.N.L. Monterrey, N.L. 1993.
21. Bidlingmeyer, B. A New, Rapid, High-Sensitivity Analysis of Amino Acids in Food Type Samples. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70, (2), 241-247, 1987.

22. Bidlingmeyer, B. Rapid Analysis of Amino Acids Using Pre-column Derivatization. *Journal of Chromatography* 336, 93-104, 1984.
23. DiMari, S., Robinson, P.J., Hash, J. Use of a Ternary Gradient for the Separation of Phenylthiohydantoin-Amino Acids, Including the Methyl Esters of Aspartic and Glutamic Acids, by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography* 213, 71-97, 1981.
24. Henderson, L., Copeland, T., Oroszlan, S. Separation of Amino Acid Phenylthiohydantoins by High Performance Liquid Chromatography on Phenylalkyl Support. *Analytical Biochemistry* 102, 1-7, 1980.
25. Tarr, G. E. Rapid Separation of Aminoacid Pheyltithiohydantoins by Isocratic High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Biochemistry* 111, 27-32, 1981.
26. Stocchi, V., Cucchiaroni, L. Complete High-Performance Liquid Chromatographic Separation of 4, N,N- Dimethylaminoazobenzene-4'-Thiohydantoin and 4 Dimethylaminoazobenzene-4'-Sulfonyl Chloride Amino Acids Utilizing the Same Reversed Phase Column at room Temperature. *Journal of Chromatography* 349, 77-82, 1985.
27. BECKMAN Instruments, Inc. Amino Acid Analysis Kit. Bulletin 5966. 1989
28. Chang, J., Creaser, E.H. Separation of 4-N,N dimethylaminoazobenzene-4'-Sulfonyl aminoacids on Polyamide Sheets. *Journal of Chromatography* 116, 215-217, 1976.
29. Oates, D., Cooper, B., Jorgenson J. Quantitative Amino Acid Analysis of Individual Snail Neurons by Open Tubular Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 62, (15), 1573-1577, 1990.
30. Oates, M., Jorgenson, J. Quantitative Amino Acid Analysis of Subnanogram Levels of Protein by Open Tubular Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 62, (15), 1990.
31. Elahi, M., Khan, N. The Free Amino Acids of Fresh Juices of Pakistani Citrus Fruits. *J. Agr. Food Chem.* 19, (2), 260-262, 1971.

32. Spitz, H. A New Approach for Sample Preparation of Protein Hydrolyzates for Amino Acid Analysis. *Analytical Biochemistry* 56, 66-73, 1973.
33. Schuster R. Determination of Free Aminoacids by HPLC. *Analytical Chemistry* 52, 617-620, 1980.
34. G. Palla. Capillary GC and RP-HPLC of D-Amino Acids in Food. *Journal of Chromatography*, 475, 45-53, 1989.
35. Miller A. *Estadística para Ingenieros*. Ed. Limusa. p. 388. Tabla XIII y XIV
36. Richmond M. Analysis of Simple Sugars and Sorbitol in Fruit by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food. Chem.* 29, (1), 4-7, 1981.
37. Wayne D. *Bioestadística*. Editorial Limusa. 1987
38. Cooper, H.D.J., Ogden, G. The Stability of the o-Phthalaldehyde 2-mercaptoethanol Derivatives of Amino Acids: An Investigation. *Analytical Biochemistry* 142, 98-102, 1984.
39. Kan, T.A., Shipe, W.F. Modification and Evaluation of a Reverse Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Amino Acid Analysis. *Journal of Food Science* 47, 338-339, 1981.
40. Horwitz, W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry* 1, (54), 67A-76A, 1982.
41. Quattrocchi, O.A., Abelaira, S., Laba, R. *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Editorial La Argentina. 1992
42. García de Marina A., del Castillo B. *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Noriega Editores. Primera edición 1988.
43. Mc Nair H. *High Performance Liquid Chromatography. Manual*. México. 1991.
44. Ishida, Y., Fujita, T., Asai, K. New Detection and Separation Method for Aminoacids by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography* 204, 143-148, 1981.

