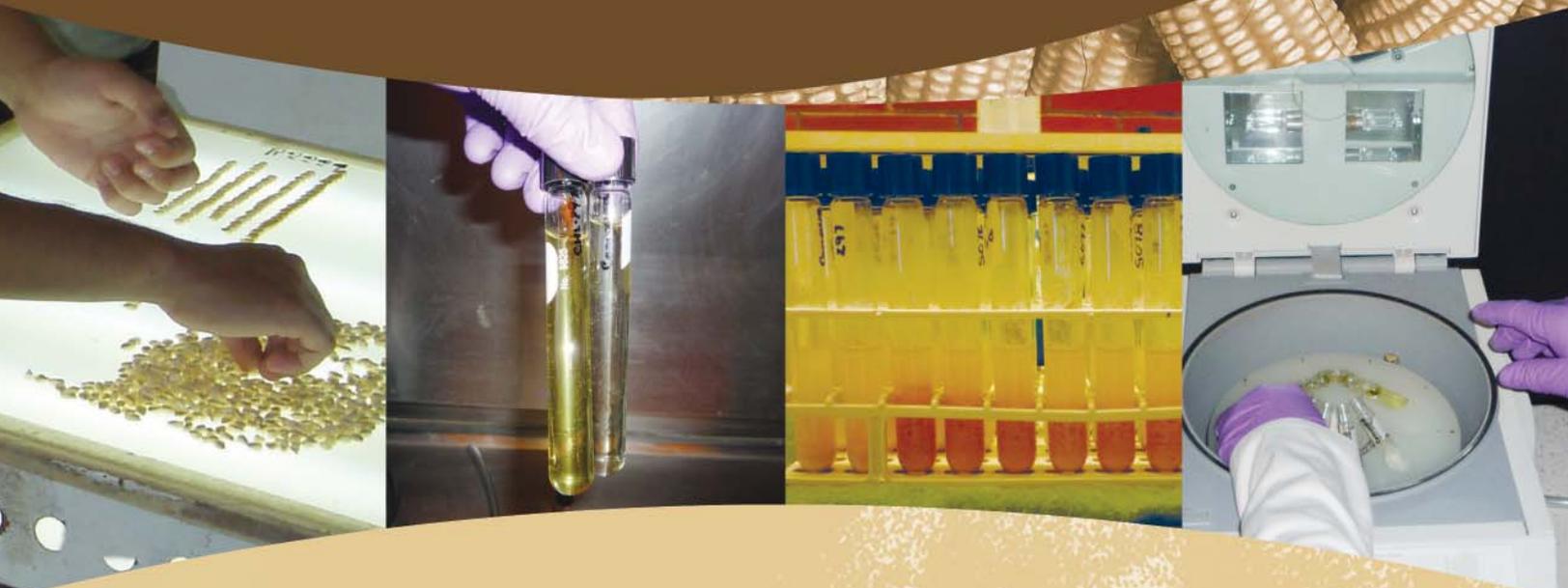


2012 Protocolos de laboratorio



Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal

Luis Galicia, Alejandra Miranda, María Guadalupe Gutiérrez, Octavio Custodio,
Aldo Rosales, Norma Ruíz, Rebecca Surles y Natalia Palacios

Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal

Protocolos de laboratorio 2012

**Luis Galicia, Alejandra Miranda, María Guadalupe Gutiérrez¹, Octavio Custodio,
Aldo Rosales, Norma Ruíz², Rebecca Surlles y Natalia Palacios**

Aprovechamos este espacio para reconocer el esfuerzo de todas las personas que aportaron algo a este manual. Al personal de las Universidades Autónoma del Estado de México y Antonio Narro por ayudar en la edición de los textos y la compilación de los datos durante su estancia en el CIMMYT o por medio de algún proyecto. Asimismo, los compiladores y editores agradecen la valiosa colaboración de sus colegas Miguel Bojorges, Dionicio Zavala, Jorge González y Roberto Aguilar, técnicos del laboratorio de calidad nutricional de maíz.

¹ Universidad Autónoma del Estado de México

² Universidad Autónoma Antonio Narro

Con sede en México, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) es un organismo sin fines de lucro que se dedica a la investigación agrícola y la capacitación. El Centro trabaja para reducir la pobreza y el hambre mediante el aumento sustentable de la productividad del maíz y del trigo en el mundo en desarrollo. El CIMMYT cuenta con el banco de semillas de maíz y trigo más grande del mundo y es conocido en particular por haber iniciado la Revolución Verde que salvó millones de vidas en Asia, hecho que motivó que el Dr. Norman Borlaug, del CIMMYT, recibiera el Premio Nobel de la Paz. El CIMMYT es miembro del Consorcio del CGIAR y recibe fondos de gobiernos nacionales, fundaciones, bancos de desarrollo y otras instituciones públicas y privadas.

© Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) 2012. 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 al estado legal de cualquier país, territorio, ciudad o zona, o de las autoridades de éstos, o respecto a la delimitación de sus fronteras. Las opiniones expresadas son las del (los) autor(es) y no necesariamente representan las del CIMMYT ni las de nuestros aliados. El CIMMYT autoriza el uso razonable de este material, siempre y cuando se cite la fuente.

Cita correcta: Galicia, L., Miranda, A., Gutiérrez, M.G.; Custodio, O., Rosales, A.; Ruiz, N.; Surlles, R., Palacios, N. Laboratorio de calidad nutricional de maíz y análisis de tejido vegetal: *Protocolos de laboratorio* 2012. México, D.F.: CIMMYT.

ISBN: 978-607-95844-5-0

Descriptor AGROVOC: Maíz; estado nutricional; calidad de las semillas semilla; análisis de tejido vegetal; técnicas de laboratorio; métodos

Códigos de categorías AGRIS: F60 Fisiología y bioquímica vegetal
Q01 Ciencia y tecnología alimentaria

Clasificación decimal Dewey: 631.523 GAL 2012

Impreso en México

Índice

Figuras y Cuadros	iv
Abreviaturas y acrónimos.....	v
Introducción	1
Recomendaciones de seguridad.....	2
Preparación de la muestra: consideraciones generales.....	3
Muestreo	3
Lavado para remover contaminantes en tejido vegetal.....	4
Secado en estufa.....	4
Molienda.....	4
Lavado de semillas tratadas.....	4
Separación del endospermo.....	4
Métodos de laboratorio.....	5
Cuantificación de cenizas.....	5
Extracto etéreo (grasa cruda).....	6
Determinación de nitrógeno.....	8
Determinación de triptófano en grano de maíz utilizando ácido glioxílico.....	11
Determinación de lisina en grano de maíz	15
Estimación del contenido de fenoles libres y totales en maíz utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu.....	21
Determinación de azúcares solubles con antrona	25
Determinación de carotenoides en maíz por cromatografía de líquidos.....	29
Determinación de aluminio, hierro y zinc en grano y tejido vegetal de maíz y de trigo mediante digestión con ácido nítrico y perclórico, y su análisis a través del ICP-OES	35
Determinación de antocianinas en granos de maíz pigmentados	38
Determinación de almidón total en granos de maíz usando un ensayo modificado de megazyme	40
Determinación de amilosa en granos de maíz	43
Anexo 1.....	46
Anexo 2.....	48
Anexo 3.....	49
Referencias	50

Figuras

Figura 1. Ilustración del cuarteo de granos para obtener una muestra representativa	3
---	---

Cuadros

Cuadro 1. Materiales y reactivos para la cuantificación de cenizas	5
Cuadro 2. Soluciones a problemas comunes en la determinación de cenizas	5
Cuadro 3. Materiales y reactivos empleados en la cuantificación de grasa cruda	6
Cuadro 4. Soluciones a problemas comunes en la determinación de grasa cruda.....	7
Cuadro 5. Materiales y reactivos que se utilizan en la determinación de nitrógeno	8
Cuadro 6. Soluciones a problemas comunes en la determinación de nitrógeno	10
Cuadro 7. Materiales y reactivos que se utilizan en la determinación de triptófano.....	11
Cuadro 8. Preparación de la curva estándar de triptófano.....	13
Cuadro 9. Soluciones a problemas comunes en la determinación de triptófano	14
Cuadro 10. Reactivos que se utilizan en la determinación de lisina.....	15
Cuadro 11. Preparación de la solución concentrada de lisina.....	17
Cuadro 12. Preparación de la curva estándar de lisina	17
Cuadro 13. Reacción colorimétrica para la determinación de lisina	18
Cuadro 14. Preparación de la curva estándar de lisina en tubos falcón de 15 mL	19
Cuadro 15. Reactivos que se utilizan en la determinación de fenoles.....	21
Cuadro 16. Preparación de la curva estándar de fenoles	22
Cuadro 17. Soluciones a problemas comunes en la determinación de fenoles.....	24
Cuadro 18. Reactivos que se utilizan en la determinación de azúcares solubles	25
Cuadro 19. Escalamiento de la reacción colorimétrica en la determinación de azúcares solubles	26
Cuadro 20. Preparación de la curva estándar de azúcares solubles en tubos.....	26
Cuadro 21. Preparación de la curva estándar de azúcares solubles en microplaca	27
Cuadro 22. Solución a problemas comunes en la determinación de azúcares solubles	28
Cuadro 23. Preparación de fases móviles para el sistema UPLC.....	33
Cuadro 24. Soluciones a problemas comunes en la determinación de carotenoides.....	34
Cuadro 25. Reactivos que se utilizan en la determinación de Al, Fe y Zn.....	35
Cuadro 26. Programa de digestión que se utiliza en la determinación de Al, Fe y Zn, dependiendo del tipo de material	36
Cuadro 27. Preparación de la curva estándar para la determinación de Al, Fe y Zn	37
Cuadro 28. Soluciones a problemas comunes en la determinación de Al, Fe y Zn.....	37
Cuadro 29. Reactivos que se utilizan en la determinación de antocianinas.....	38
Cuadro 30. Preparación de la curva estándar de antocianinas	39
Cuadro 31. Reactivos que se utilizan en la determinación de almidón	40
Cuadro 32. Preparación de la curva estándar de almidón.....	42
Cuadro 33. Solución a problemas comunes en la determinación de almidón	42
Cuadro 34. Reactivos que se utilizan en la determinación de amilosa	43
Cuadro 35. Preparación de la curva estándar de amilosa.....	44

Abreviaturas y acrónimos

°C	grado Celsius
*AACC	Asociación Americana de Química de Cereales
AM	amilosa
*AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
BHT	Butilhidroxitolueno
cm	centímetro(s)
Conc.	Concentración
ddH ₂ O	agua desionizada
d _f o FD	factor de dilución
d _w	peso original de harina
F-C	reactivo Folin-Ciocalteu
g	gramo(s)
g (centrífuga)	aceleración o gravedad
Gall	ácido gálico
h	hora(s)
h _f	factor de hidrólisis de almidón
*HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
I.D.	Identificación
*ICP-OES	Plasma acoplado inductivamente a un espectroscopio de emisión óptica
Inj vol	volumen de inyección
Kg	kilogramo(s)
L	litro(s)
Lys	lisina
M	molar
mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mM	milimolar
N	normalidad (concentración)
ng	nanogramo(s)
*NIRS	Espectrofotometría de reflectancia en el infrarrojo cercano
nm	nanómetro(s)
DO	densidad óptica
Pel	cloruro de pelargonidina
pH	potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
*QPM	maíz con alta calidad proteínica
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo(s)
Stock	concentración stock, solución concentrada
TEA	trietilamina
TFA	ácido trifluoroacético
Trp	Triptófano
U	unidad de actividad enzimática
µg	microgramo(s) = 10 ⁻⁶ gramos
µL	microlitro(s) = 10 ⁻⁶ litros
MTBE	Metil-terbutil éter
*MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico

* Siglas en inglés

Introducción

Los análisis químicos y bioquímicos de semillas y tejido vegetal son esenciales para distintos tipos de programas fitogenéticos que se dedican a mejorar el maíz en sus aspectos industriales, nutricionales, fisiológicos y de patología vegetal.

El Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Análisis de Tejido Vegetal del CIMMYT se dedica a desarrollar y/o adoptar metodologías adecuadas, económicas y rápidas para poder proveer datos precisos que permitan a los investigadores tomar decisiones en el campo en cuanto a las mejoras nutricionales del maíz.

Entre las técnicas que actualmente utilizamos para establecer la plataforma de análisis químicos y bioquímicos están las técnicas químicas con reacciones colorimétricas y de espectroscopía, como la de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y la de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente.

Las metodologías de laboratorio se agrupan de la manera siguiente:

1. Métodos para cuantificar:
 - a) Triptófano
 - b) Lisina
 - c) ProteínaSobre todo en maíz de alta calidad proteínica (QPM)
2. Determinación de provitamina A mediante la cuantificación de carotenoides por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).
3. El análisis de micronutrientos (hierro, zinc y aluminio) mediante el espectroscopio de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).
4. Compuestos de alta energía
 - a) Azúcares
 - b) Almidón
 - c) Amilosa/amilopectina
 - d) Contenido de aceite
5. Compuestos antioxidantes
 - a) Antocianinas
 - b) Perfil de carotenoides
 - c) Fenoles libres y totales
6. Contenido de cenizas

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

Para mayor información, diríjase al Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Análisis de Tejido Vegetal del CIMMYT:

Dra. Natalia Palacios Rojas

n.palacios@cgiar.org

Programa Global de Maíz

CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo)

Tel.: +52 (55) 5804 2004 extensión 1112

Fax: +52 (55) 5804 7558/59

www.cimmyt.org

Recomendaciones de seguridad

En las metodologías aquí descritas se utilizan reactivos químicos que deben ser manipulados con responsabilidad y precaución, y que requieren el uso de equipo de protección personal adecuado.

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, el mínimo equipo de protección que debe portarse consta de bata, guantes y lentes de seguridad. Es muy importante utilizar una campana de extracción durante la preparación de algunos reactivos que son volátiles, tóxicos o corrosivos; en caso de no contar con una campana, utilizar un respirador.

Asimismo, se recomienda al personal leer con mucha atención las hojas de seguridad (MSDS, por sus siglas en inglés) que proporcionan los proveedores de reactivos, ya que de esta manera podrán hacer un uso correcto de los productos, almacenar apropiadamente los químicos y seguir los procedimientos pertinentes, en caso de que llegara a ocurrir algún accidente.

Consideraciones Generales

Preparación de muestra

Muestreo

Las muestras que se utilicen deberán ser representativas del área y del objetivo del estudio, así como del material que se evaluará o analizará (por ejemplo, variedades de maíz de polinización abierta vs. líneas puras). La composición química de los materiales varía según su etapa de crecimiento o su desarrollo, o ambos. Otros factores que causan variaciones son las condiciones ambientales, la etapa fisiológica y el segmento de la planta que se toma como muestra. Por tanto, es recomendable seleccionar con mucho cuidado las muestras del material, guiándose por el diseño experimental y teniendo en mente el propósito del análisis. Cuando el objetivo sea, por ejemplo, evaluar semillas de maíz, se recomienda no utilizar los granos de los extremos (punta y base) de la mazorca.

Cuando se trata de analizar microelementos como hierro y zinc, es importante poner especial cuidado durante el muestreo en campo (Stangoulis, J. y Sision, C., 2008) y tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

1. Asegúrese de que el grupo de trabajo esté consciente de que existe el riesgo de que los materiales se contaminen.
2. Coseche cuando el grano haya alcanzado la madurez fisiológica, pero no deshoje las mazorcas.
3. Ponga las mazorcas (sin quitar las hojas) en una bolsa limpia y evite todo contacto con el suelo, hasta que se asegure de que el área está limpia.
4. Deshoje manualmente las mazorcas. Recuerde que quien recolecte las muestras no deberá usar joyería ni cualquier otro accesorio que pudiera ser fuente de contaminación por metales.
5. Coloque las mazorcas en un recipiente limpio (por ejemplo, en una bolsa tejida de plástico [arpilla] limpia y destinada solo para este propósito).
6. Colóquelas en bandejas de secado limpias (p.ej., plástico limpio) y séquelas a 40 °C durante 5 días en una estufa no contaminante; también puede secarlas al sol, sin quitarles las hojas (sobre una superficie limpia) y deshojarlas después.
7. Con las manos limpias, desgrane las semillas y deposítelas en bolsas de plástico limpias o en sobres de papel, y mézclelas perfectamente.
8. Para obtener una muestra representativa, distribuya de manera uniforme los granos en una superficie limpia, presiónelos para formar una capa y extiéndalos hasta formar un círculo (Figura 1).
9. Muélos finamente (las partículas deben pasar por una malla tamiz 30) en un molino analítico no contaminante (por ejemplo, molino de bola Retsch con recipientes de teflón y bolas de zirconio). Tome una submuestra para el análisis. Tenga mucho cuidado al colocar cada muestra en un sobre de papel o tubo de plástico nuevo, limpio y etiquetado.

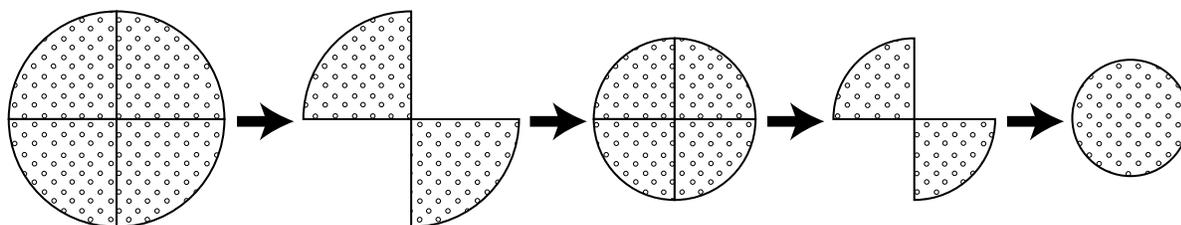


Figura 1. Ilustración del cuarteo de granos para obtener una muestra representativa.

Lavado para remover contaminantes en tejido vegetal

El tejido vegetal debe lavarse en el campo al momento de recolectar las plantas. De no ser esto posible, deberá mantenerse en ambiente frío y húmedo para que permanezca turgente hasta que se pueda lavar en el laboratorio. El lavado debe hacerse antes de iniciar el secado.

Dado que la actividad metabólica altera la composición del tejido vegetal, la muestra deberá conservarse fría, congelada o como materia seca para mantener al mínimo la actividad metabólica.

Secado en estufa

Secar el tejido vegetal en una estufa de circulación forzada, libre de polvo, a una temperatura de 80 °C, para eliminar la humedad pero cuidando de no provocar una descomposición térmica considerable. Si el tejido se seca a temperaturas de menos de 80 °C puede quedar algo de humedad, pero secarlo a una temperatura más elevada podría ocasionar descomposición térmica.

Molienda

Cuando los análisis se hacen en el laboratorio, se recomienda moler mecánicamente el tejido vegetal seco para que la composición de la muestra sea más uniforme.

Triturar primero los granos completos en un molino Wiley con puntos de contacto de acero inoxidable (las partículas deben pasar por una malla de acero inoxidable de 2 mm de diámetro); posteriormente utilizar un molino Tecator Cyclotec con malla de acero inoxidable (con orificios de 0.5 mm de diámetro).

La homogeneidad de la muestra es una condición fundamental para obtener datos confiables en los análisis químicos o en los análisis no destructivos. Asimismo, el tamaño de las partículas es sumamente importante si los análisis se hacen con la técnica de NIRS (espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, por sus siglas en inglés).

Depositar el polvo de las muestras en frascos de vidrio, bolsas de papel o polietileno, cerrarlos muy bien, etiquetarlos con la descripción exacta de su contenido (según sea la característica que se vaya a analizar) y almacenarlos.

Lavado de semillas tratadas

Si las semillas de trigo o maíz que serán analizadas han sido tratadas con algún producto químico o conservador, proceder de la siguiente manera:

- Lavar la semilla con agua de la llave, luego con agua destilada y por último con agua desionizada. Usar equipo de protección personal en caso de que los productos que vayan a lavarse sean tóxicos.
- Colocar las semillas lavadas en bandejas de plástico; asegurarse de que tengan el número de identificación de laboratorio correspondiente y dejarlas secar a temperatura ambiente durante 24 horas.
- Pesar las muestras secas y meterlas en sobres de papel de color amarillo. Asignarles el número de laboratorio correspondiente.

Separación del endospermo

- Para la separación del endospermo, remojar las semillas de 20 a 30 minutos en agua destilada. Quitar el pericarpio y eliminar el germen, con ayuda de unas pinzas y un bisturí.
- Dejar que el endospermo se seque a temperatura ambiente durante la noche.

Métodos de laboratorio

Cuantificación de cenizas

El método químico de referencia es el 08-01 1995 de la AACC para la cuantificación de cenizas totales, que se utiliza también para la determinación de cenizas en granos de maíz. En el laboratorio podemos generar una curva de calibración, utilizando un espectrofotómetro de reflectancia, que nos permite determinar el contenido de cenizas en hojas de maíz.

Cuadro 1. Materiales y reactivos que se utilizan en la cuantificación de cenizas.

Reactivo	Especificaciones	Recomendaciones especiales
Cloruro de calcio	CaCl ₂ (en trozos)	Usar como agente desecante.
Aparatos	Especificaciones	Recomendaciones especiales
Mufla eléctrica	Usar un pirómetro para medir la temperatura.	
Pinzas para mufla		
Crisoles para determinación de cenizas	De platino o silicio, de preferencia.	Utilizar guantes de asbesto al sacar los crisoles de la mufla.
Desecador		Verificar frecuentemente el agente desecante.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra.

Incineración

1. Secar la muestra durante 24 horas a 80 °C.
2. Etiquetar los crisoles para determinación de cenizas de acuerdo con el número de laboratorio.
3. Colocar los crisoles en la mufla durante 1 hora a 600 °C.
4. Enfriar la muestra y los crisoles en un desecador.
5. Pesar los crisoles y anotar su peso.
6. Pesar 2 g de la muestra.
7. Mantener los crisoles con la muestra en una mufla eléctrica a 600 °C de 6 a 8 horas.
8. Sacar los crisoles de la mufla y dejarlos enfriar en un desecador hasta que estén a temperatura ambiente. Pesar el residuo y registrar el dato.

Cálculo:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{peso del residuo}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Cuadro 2. Soluciones a problemas comunes en la determinación de cenizas.

Problema	Solución
Se detecta aumento de humedad durante el registro del peso seco de la harina y/o cuando se pesan las cenizas.	Secar y pesar por lotes. Usar varios desecadores.
Color oscuro o pardo de las cenizas.	Asegurarse de que el incremento de temperatura haya sido gradual.

Extracto etéreo (grasa cruda)

El método químico de referencia es el AACC 30-25, 1995.

Cuadro 3. Materiales y reactivos que se utilizan en la cuantificación de grasa cruda.

Reactivo	Especificaciones	Recomendaciones especiales
Éter de petróleo	Sigma-Aldrich Cat. 184519 CAS 8032-32-4	Utilizar respirador, debido a que se trata de un solvente altamente volátil.
Aparatos	Especificaciones	Recomendaciones especiales
Desengrasador continuo	Tipo Goldfisch	Verificar que el agua del sistema de enfriamiento esté limpia y a temperatura baja.
Pinzas para mufla	Limpias y libres de fuentes de contaminación.	
Dedales de celulosa		Limpiar perfectamente con aire.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra.

Extracción

4. Determinar el peso seco/constante de los vasos.
5. Pesar 2 g de harina deshidratada y colocarla en el interior del cartucho (dedal) de celulosa de extracción (peso seco de la muestra).
6. Encender la bomba y conectarla al sistema de refrigeración. Asegurarse de que la circulación de agua fría es constante.
7. Precalentar los calentadores de 8 a 10 minutos.
8. Seleccionar el nivel de calentamiento indicado (normalmente nivel 5).
9. Colocar los dedales en sus correspondientes tubos condensadores.
10. Acoplar los tubos condensadores en el sistema de recirculación/reflujo.
11. Agregar de 25 a 35 mL de éter de petróleo (solvente) a cada vaso.
12. Fijar los vasos en el sistema, asegurándose de que estén correctamente acoplados.
13. Asegurarse de que todos los vasos estén correctamente instalados y de que no hay no fugas de solvente.
14. Desbloquear los calentadores (parrillas) y empujar hacia arriba hasta que toquen la base de los vasos.
15. Mantener el material en reflujo durante 6 horas.
16. Al terminar de hacer la extracción, separar las parrillas y colocar los cubrecalentadores.
17. Recuperar el solvente (con los tubos de recuperación apropiados).
18. Secar el extracto colocando el vaso inclinado en el portavasos. Después de que se evapore la mayor parte del solvente, mantener el vaso en la estufa de secado durante una hora a 130 °C.
19. Pesar los vasos con la muestra (peso del extracto etéreo).

Cálculo:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{\text{peso del extracto etéreo}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Cuadro 4. Soluciones a problemas comunes en la determinación de grasa cruda.

Problema	Solución
Pérdida o evaporación de solvente al inicio de la extracción.	<ul style="list-style-type: none">• Revisar que los empaques estén bien colocados.• Verificar que los vasos estén en buenas condiciones (que no tengan cuarteaduras ni imperfecciones).
La ebullición/burbujeo no es homogéneo en todos los vasos.	Revisar que las parrillas estén en óptimas condiciones.
Dificultad para limpiar los vasos.	Evitar que el secado del extracto etéreo se prolongue por más de una hora.
Variación/inestabilidad cuando se pesan los vasos que contienen el extracto etéreo.	Asegurarse de que los vasos ya estén a temperatura ambiente.

Determinación de nitrógeno

Como referencia se usa el Método Industrial #334-74, 1977 desarrollado para el Autoanalizador Technicon II (Technicon Autoanalyzer II).

La determinación de nitrógeno se basa en un método colorimétrico en el cual se forma un compuesto de color verde esmeralda por la reacción del salicilato y del hipoclorito con el amoníaco.

El Espectrofotómetro de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) cuenta con una curva de calibración para la determinación de nitrógeno en tejido vegetal molido de trigo y en harina de maíz.

Cuadro 5. Materiales y reactivos que se utilizan en la determinación de nitrógeno.

Reactivo/mezcla de reactivos	Reactivos específicos/especificaciones	Preparación	Recomendaciones especiales
Ácido sulfúrico (grado analítico, 98 %)	JT Baker Cat. B5991-18 CAS 7664-93-9		<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente protegido de la luz.
Mezcla catalítica	<ul style="list-style-type: none"> Sulfato de potasio (Merck Cat. 1.05153.1000) Selenio (Merck Cat. 1.07714.0250) 	<ul style="list-style-type: none"> Mezclar muy bien 1 kg de K_2SO_4 con 5 g de selenio. 	<ul style="list-style-type: none"> Manejar con mucho cuidado, ya que el selenio es un reactivo muy peligroso. Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla 1 de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> Cloruro de sodio (JT Baker Cat. 3624-05 CAS 7647-14-5) Ácido sulfúrico (JT Baker Cat. B5991-18 CAS 7664-93-9) Brij 35 purificado (Pierce Cat. 20806) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 200 g de cloruro de sodio, 15 mL de ácido sulfúrico y 2 mL de Brij 35. Completar el volumen a 2 L con agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla 2 de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> Fosfato dibásico de sodio anhidro (JT Baker 3828) Hidróxido de sodio (JT Baker 3722-05 CAS 1310-73-2) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 71 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 20 g de hidróxido de sodio. Completar el volumen a 1 L con agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente.
Tartrato de sodio y potasio 0.71 M	<ul style="list-style-type: none"> Tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Mallinckrodt Cat. 2367 CAS 1310-73-2) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 200 g de tartrato de sodio y potasio en 1 L de agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente.
Hidróxido de sodio 5 M	<ul style="list-style-type: none"> Hidróxido de sodio (JT Baker 3722-05 CAS 1310-73-2) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 200 g de hidróxido de sodio en 1 L de agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente.
Mezcla 3 de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> Mezcla 2 de reactivos Tartrato de potasio 0.72 M Hidróxido de Sodio 5 M Brij 35 purificado (Pierce Cat. 20806) 	<ul style="list-style-type: none"> Mezclar 400 mL de la mezcla de reactivos 2, 500 mL de tartrato de potasio 0.72M, 500 mL de hidróxido de sodio 5 M y 1 mL de Brij 35. Agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad un máximo de 15 días.
Mezcla 4 de reactivos	<ul style="list-style-type: none"> Salicilato de sodio (Sigma-Aldrich Cat. 058K0010) Nitroprusiato de sodio dihidratado (Merck Cat. 1.06541.1000) Brij 35 purificado (Pierce Cat. 20806) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 300 g de salicilato de sodio y 600 mg de nitroprusiato de sodio. Añadir 2 mL de Brij 35 y agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 2 L. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad.
Hipoclorito de sodio al 6%	<ul style="list-style-type: none"> Hipoclorito de sodio (marca comercial Cloralex) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 6 mL de hipoclorito de sodio y agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 100 mL. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a temperatura ambiente en la oscuridad.
Sulfato de amonio (100 µg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> Sulfato de amonio granular (JT Baker Cat. 0792-01 CAS 7793-20-2) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 10 mg de sulfato de amonio en 100 mL de agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a 4 °C. A esta temperatura se mantiene estable por un mes.

Procedimiento:

Digestión de la muestra

1. Pesar 40 mg de la muestra molida. Incluir dos muestras testigo.
2. Colocar la muestra en el fondo de un tubo de digestión de 75 mL.
3. Incluir uno o dos tubos con blancos (vacíos, sin muestra) por cada digestión.
4. Agregar a cada tubo 2 g de la mezcla catalítica y 2.5 mL de H₂SO₄ concentrado por las paredes de los tubos. Dejar reposar hasta que cese la reacción.
5. Digerir a 380 °C durante 90 minutos en un digestor precalentado, en la campana de extracción.

Análisis de la muestra

6. Sacar la rejilla de tubos del bloque de digestión; dejarlos enfriar a temperatura ambiente y luego agregar 75 mL de agua destilada para evitar formación de cristales. Asegúrese de que la solución de digestión esté totalmente clara.
7. Cerrar bien los tubos con una tapa de hule (goma) y mezclar su contenido invirtiéndolos varias veces.
8. Transferir 2 mL de la solución a los frascos del Analizador Technicon y colocar las muestras en el Autoanalizador.
9. Establecer la línea base ajustando, mediante la bomba, el flujo de cada uno de los cuatro reactivos: las mezclas de reactivos 1, 3, 4 y el hipoclorito de sodio.
10. Ajustar el graficador a 0% utilizando el blanco de digestión.
11. Correr los cuatro tubos con los blancos de digestión y verificar que la línea base indique 0%.
12. Correr cuatro tubos con la muestra estándar de 20 µg/mL y poner el pico a 70% en el graficador.
13. Correr las muestras testigo y las muestras que se van a analizar.

Preparación del estándar de nitrógeno

1. Preparar una solución de sulfato de amonio 100 µg/mL en agua destilada.
2. Cada vez que se analicen muestras, preparar una dilución para obtener una concentración de 20 µg/mL de sulfato de amonio con la solución blanco de la digestión.

Recomendaciones especiales:

- a) Puede utilizar jabón para lavar los tubos de digestión, pero debe eliminar todos los residuos con agua desionizada.
- b) Si fuera necesario, las muestras digeridas se pueden almacenar a temperatura ambiente, protegidas del aire, durante un máximo de 7 días antes de analizarlas. Sin embargo, es mejor analizar las muestras digeridas lo antes posible.
- c) Los frascos del Technicon deben estar limpios. Lavarlos tres o cuatro veces solo con agua deionizada. No utilizar ningún tipo de jabón.
- d) Siempre se incluyen por lo menos dos testigos (normal y QPM) en cada juego de 34 muestras que se analiza.
- e) Calibrar el Technicon cada vez que se hagan análisis.

Cuadro 6. Soluciones a problemas comunes en la determinación de nitrógeno.

Problema	Solución
La línea base es demasiado alta o variable	<ul style="list-style-type: none">• Compruebe que todos los reactivos estén siendo bombeados en el sistema.• Si se preparó un reactivo nuevo, asegúrese de haber seguido el procedimiento correcto.• Prepare nuevos reactivos.
Cambios en los valores de las muestras de verificación	<ul style="list-style-type: none">• Pese las muestras correctamente.• Asegúrese de que las muestras fueron digeridas por completo.• Asegúrese de que la mezcla de reactivos 3 no se haya oxidado.• Si está oxidada, prepare una nueva.• Verifique la calidad de los reactivos.• Prepare reactivos nuevos.
La solución de la digestión no es clara	<ul style="list-style-type: none">• Asegúrese de que tanto la muestra como la mezcla catalizadora se encuentren en el fondo del tubo.• Agregue el ácido sulfúrico, con cuidado haciendo que resbale suavemente por la pared del tubo.
Manchas negras/amarillas en la solución de la digestión	<ul style="list-style-type: none">• Revise la temperatura del bloque de digestión.• Vea que los pozos del bloque de digestión estén limpios.• Aumente 20 minutos al tiempo de digestión.

Cálculo del porcentaje de nitrógeno:

20 $\mu\text{g N}_2/\text{mL}$ corresponde al 70 % en la gráfica

Donde:

1 % en la gráfica = 0.2857 $\mu\text{g N}/\text{mL}$ en la digestión.

$\mu\text{g N}/\text{mL}$ en la digestión = % de lectura en la gráfica \times 0.2857 $\mu\text{g N}_2/\text{mL}$

o

$\mu\text{g N}_2$ en 75 mL en la digestión = % de lectura en la gráfica \times 0.2857 $\mu\text{g N}_2/\text{mL}$ \times 75

$$\text{Factor de cálculo} = \frac{20 \mu\text{g N}/\text{mL}}{\text{divisiones de la gráfica} \times 1,000} \times \text{volumen de digestión} \times 100\%$$

$$\% \text{N}_2 = \frac{2.1427 \times \text{lectura}}{\text{peso de la muestra (mg)}}$$

Determinación de proteína

La cantidad de proteína se puede estimar a partir del valor de nitrógeno; en el caso de maíz, se estima como sigue:

$\% \text{proteína} = \% \text{de nitrógeno} \times 6.25$ (factor de conversión para el maíz)

Determinación de triptófano en grano de maíz utilizando ácido glioxílico

Nurit *et al.*, 2009

Cuadro 7. Materiales y reactivos que se utilizan en la determinación de triptófano.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución de acetato: 01 M CH ₃ COONa•3H ₂ O	Acetato de sodio trihidratado (JT Baker Cat. 3460)	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 13.53 g de acetato de sodio por 1 L de agua destilada. • Ajustar el pH a 7,0 con NaOH. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mantener una solución concentrada a 4 °C en reserva. • Se mantiene estable varias semanas.
Solución de papaína 1 mg/mL	Papaína (Mixim 0.10 MCU)	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 40 mg de papaína para 40 mL de solución. • Se recomienda siempre preparar una mayor cantidad de solución nueva de la que se necesita (3 mL por cada muestra y 1.125 cuando se hace en microtubos). • Disolver la papaína en la solución de acetato de sodio a temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar la solución cada vez que se utilice. • Asegúrese de que la solución amortiguadora de acetato de sodio esté a temperatura ambiente. • Observe 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)	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar un matraz volumétrico de 1000 mL en hielo. • Adicionar 166.7 mL de agua desionizada. • Lenta y cuidadosamente, agregar 833.3 mL de ácido sulfúrico (96 %) y aforar con ddH₂O. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar bajo una campana de extracción.
Reactivo B: ácido sulfúrico 7 N	Ácido sulfúrico (JT Baker Cat. B5991-18 CAS 7664-93-9)	<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar al mismo tiempo 35 mL de ácido sulfúrico 30 N con 115 mL de agua desionizada. • Aforar a 150 mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar bajo una campana de extracción.
Reactivo C: ácido glioxílico 0.1 M	Ácido glioxílico monohidratado (Sigma-Aldrich Cat. G10601 CAS 563-96-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 0.9205 g de ácido glioxílico y colocar en un matraz aforado de 100 mL. • Añadir 50 mL de H₂SO₄ 7 N. • Agitar el matraz muy lentamente hasta que el ácido glioxílico se disuelva completamente. • Aforar a 100 mL con H₂SO₄ 7 N. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • El ácido glioxílico en polvo debe almacenarse en un desecador.
Reactivo D: cloruro férrico 1.8 mM	Cloruro férrico (Sigma-Aldrich Cat. F2877-100G CAS 10025-77-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver 0.050 g de FeCl₃•6H₂O en un matraz volumétrico de 100 mL, utilizando el reactivo C. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • Asegurarse de que se disuelva completamente. • Tener en cuenta que el FeCl₃ es altamente higroscópico.
Reactivo E: reactivo colorimétrico.		<ul style="list-style-type: none"> • 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. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • Proteger de la luz y del oxígeno; usar un frasco de color ámbar.
Solución concentrada de triptófano (100 µg/mL)	DL-Triptófano (Merck Cat. 1.08375.0025)	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver 10 mg de DL-triptófano en 100 mL de agua desionizada. 	<ul style="list-style-type: none"> • 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.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Moler finamente cada muestra; el tamaño de partícula deberá ser igual o menor a 0.5 mm.

Desengrasado

3. Colocar cada muestra en un cartucho de papel filtro comercial (tamaño: 10 x 2 cm, aproximadamente).
4. Desengrasar las muestras durante seis horas, con aproximadamente 300 mL de hexano por matraz balón, en un extractor continuo tipo Soxhlet.
5. Secar las muestras al aire y asegurarse que todo el hexano se ha evaporado.

Digestión

6. Pesar 30 mg de harina desengrasada, de cada muestra, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Se recomienda hacer una repetición técnica por muestra.
7. Agregar 1.125 mL de solución de papaína.
8. Siempre incluir por lo menos 2 blancos, 4 testigos (con una concentración conocida de triptófano: 2 QPM y 2 normales) y la curva de calibración (ver los detalles más adelante).
9. Cierre los tubos.
10. Agitar vigorosamente las muestras en el vórtex y colocarlas en una estufa a 65 °C durante 16 horas (toda la noche). Agitarlas dos veces más, una hora después de colocarlas en la estufa y una hora antes de que termine el período de incubación (16 horas). Asegúrese de que no haya evaporación durante la incubación.
11. Sacar los tubos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
12. Agitar los tubos en el vórtex justo antes de centrifugarlos a 3,600 g durante 10 min. Asegurarse de que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.

Reacción colorimétrica

13. Con mucho cuidado, transferir 50 µL de hidrolizado (sobrenadante) a un tubo de vidrio.
14. Agregar 150 µL del reactivo E (reactivo colorimétrico).
15. En el vórtex, agitar vigorosamente cada muestra de 3 a 5 segundos.
16. Incubar los tubos en la estufa a 64 °C por 30 minutos para que se desarrolle el color.
17. Sacar los tubos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
18. Leer la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro de placas.

Recomendaciones especiales

- a) Es importante desengrasar la harina de maíz para mejorar la precisión y la reproducibilidad de los resultados. Cuando no se desengrasan las muestras, se detecta, en promedio, un 0.8% menos de triptófano con este protocolo.
- b) Después de centrifugar las muestras (paso 12), asegurarse de que no haya partículas adheridas a la pared del tubo o flotando en el sobrenadante. Si hay partículas adheridas, agitar la muestra una vez más en el vórtex y centrifugar por 15 minutos.
- c) Como en todos los métodos analíticos, esta reacción es muy sensible a la precisión del pipeteo. Asegúrese de que las pipetas o los dispensadores estén calibrados correctamente.
- d) Incluya siempre una curva estándar por cada juego de muestras analizadas en un día.
- e) Siempre medir el blanco del mismo lote de papaína. La papaína es una proteína que contiene grandes cantidades de triptófano (cada molécula de papaína contiene 7 unidades de triptófano). Es necesario restar esta cantidad al hacer los cálculos correspondientes a cada muestra.

Curva estándar

Preparar una solución concentrada de 100 µg/mL de triptófano en acetato de sodio 0.1 M con pH 7 (preparar cada semana y almacenar a 4 °C).

En tubos falcón de 15 mL, preparar diariamente diluciones de 0, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL (en acetato de sodio 0.1 M con pH 7). Agitar muy bien en el vórtex antes de usarlas.

Producir una reacción colorimétrica (pasos 13 a 18) utilizando 1 mL de las diluciones.

Cuadro 8. Preparación de la curva estándar de triptófano.

Tubo N°	Solución concentrada de Trp [100µg/mL] (mL)	Acetato de sodio 0.1 N, pH 7.0 (mL)	Volumen total (mL)	Concentración µg Trp/mL
1	0.0	10.0	10.0	0.0
2	1.0	9.0	10.0	10.0
3	1.5	8.5	10.0	15.0
4	2.0	8.0	10.0	20.0
5	2.5	7.5	10.0	25.0
6	3.0	7.0	10.0	30.0

Cálculos:**Curva estándar de triptófano (curva de calibración)**

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de triptófano, desde 0 hasta 30 µg/mL. Graficar las lecturas de absorbancia a 560 nm como una función de la concentración y calcular la pendiente (m) de la curva estándar. Nótese que con la pendiente se usa la unidad DO*mL/µg.

Cálculo del porcentaje de triptófano

La cantidad de triptófano en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Trp} = \frac{\text{OD}^{520\text{nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen hidrolizado}}{\text{peso de muestra}} \times 100\%$$

Ejemplo:

$$\% \text{ Trp } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.5}{0.0095 \frac{\text{OD}}{\mu\text{g/mL}}} \times \frac{3 \text{ mL}}{80,000 \mu\text{g}} \times 100$$

Sin embargo, esta cantidad incluye el triptófano presente en la muestra, más el presente en la papaína. Para calcular el contenido de triptófano en el material biológico (polvo de grano desengrasado), reste el valor de la papaína.

Entonces, el porcentaje de triptófano deberá calcularse a partir del valor corregido de absorción.

$$\% \text{ Trp} = \text{DO}_{560 \text{ nm}} \text{ corregida} \times \text{factor}$$

Donde:

$$\text{DO}_{560 \text{ nm}} \text{ corregida} = \text{DO}_{560\text{nm}} \text{ muestra} - \text{DO}_{560\text{nm}} \text{ promedio de los blancos de papaína}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.00375}{\text{pendiente}}$$

Nótese que:

$$\frac{1.3 \text{ mL}}{80,000 \mu\text{g}} \times 100 = 0.00375$$

En general, una muestra con más de 0.070% de triptófano en grano completo es considerada QPM. No obstante, esta condición depende también del contenido de proteína y, por lo tanto, del valor del índice de calidad (% Trp/proteína).

Cuadro 9. Soluciones a problemas comunes en la determinación de triptófano.

Problema	Solución
No hay desarrollo de color en la reacción. Cambios de valor en la DO de la curva estándar de triptófano.	<ol style="list-style-type: none">1. Probar otro lote del reactivo colorimétrico.2. Verifique la calidad de la curva estándar de triptófano.3. Asegúrese de que el ácido sulfúrico es 30 N.4. Compruebe la calidad de todos los reactivos. Prepare reactivos nuevos.5. Asegúrese de que se está usando la cantidad correcta de cada reactivo.
La DO del blanco de papaína es demasiado alta.	<ol style="list-style-type: none">1. Asegúrese de que se está usando la cantidad correcta de papaína.2. Usar otro lote de papaína.
La DO del blanco de papaína es demasiado baja.	<ol style="list-style-type: none">1. Asegurarse de que se está usando la cantidad correcta de papaína.2. Usar otro lote de papaína.
Valores bajos para las muestras testigo.	<ol style="list-style-type: none">1. Compruebe que las muestras han sido desengrasadas debidamente (se recomiendan 6 horas de desengrasado utilizando hexano).2. Asegúrese de que la digestión de las muestras fue correcta.3. Observe que al terminar la digestión no queden partículas en la pared del tubo. (Si esto ocurre, agite la muestra en el vórtex y centrifúguela de nuevo por 15 minutos).4. Verifique la temperatura (64 °C) y el tiempo de incubación (16 horas).5. Verifique la calidad y cantidad de los reactivos.6. Asegúrese de que la solución concentrada de triptófano sea homogénea antes de hacer las diluciones para la curva estándar de triptófano.7. Mezclar bien la solución concentrada de triptófano antes de hacer las diluciones.8. Preparar más solución concentrada de triptófano.
Las mediciones de DO entre repeticiones varían demasiado.	<ol style="list-style-type: none">1. Asegurarse de que las muestras se han molido correcta y finamente.2. Verificar la precisión con que se pesaron las muestras.3. Compruebe que las repeticiones sean analizadas de la misma manera, utilizando el mismo lote de reactivos.4. Observe que las muestras estén a temperatura ambiente antes de hacer la lectura.5. Calibrar el espectrofotómetro a "cero" y asegurarse de que se mantenga estable antes de hacer las lecturas de las muestras.
La papaína no se disuelve.	<ol style="list-style-type: none">1. Verifique que la solución de acetato esté a temperatura ambiente.

Determinación de lisina en grano de maíz

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. La segunda etapa consiste en la reacción del 2-cloro-3,5-dinitropiridina con el grupo γ -amino de la cadena de lisina protegida, que forma un compuesto coloreado de lisina γ -dinitropiridil que se determina espectroscópicamente a 390 nm.

Cuadro 10. Reactivos que se utilizan en la determinación de lisina.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M, pH 7.4	<ul style="list-style-type: none"> Fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 (JT Baker Cat. 3828 CAS 7558-79-4) Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 (JT Baker Cat. 3246) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 3.19 g de fosfato de sodio en 400 mL de agua desionizada. Disolver 1.04 g de fosfato de potasio en 300 mL de agua desionizada. Mezclar las dos soluciones y obtener un volumen final de 1 L. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. 	<ul style="list-style-type: none"> Mantener como reserva a 4 °C; a esta temperatura se mantiene estable por varias semanas.
Solución de papaína 4 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> Papaína (Mixim 0.10 MCU) 	<ul style="list-style-type: none"> Pesar 1.6 g de papaína por cada 400 mL de solución (siempre preparar una mayor cantidad de solución nueva de la que se necesita, ya que se utilizan 5 mL por muestra). Disolver la papaína en la solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M con pH 7.4 y a temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> Preparar solo la cantidad requerida. Asegurarse de que la solución amortiguadora de fosfatos esté a temperatura ambiente. Asegurarse de que el polvo de papaína se haya disuelto totalmente.
Solución de papaína 5 mg/mL	<ul style="list-style-type: none"> Papaína (Mixim 0.10 MCU) 	<ul style="list-style-type: none"> Pesar 125 mg de papaína para 25 mL de solución (siempre preparar una solución nueva, ya que se necesitan 20 mL para la curva de calibración). Disolver la papaína en la solución amortiguadora de fosfatos 0.03 M con pH a 7.4 y a temperatura ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> Preparar cada vez que se va a usar. Asegurarse de que la solución amortiguadora de fosfatos esté a temperatura ambiente. Asegurarse de que el polvo de papaína se haya disuelto totalmente.
Solución amortiguadora de carbonato 0.6 M pH 9	<ul style="list-style-type: none"> Carbonato de sodio Na_2CO_3 (JT Baker Cat. 3602) Bicarbonato de sodio NaHCO_3 (JT Baker Cat. 3506-05) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 6.36 g de carbonato de sodio en 100 mL de agua desionizada. Disolver 25.2 g de bicarbonato de sodio en 500 mL de agua desionizada. Mezclar ambas soluciones con pH 9. 	<ul style="list-style-type: none"> Mantener como solución de reserva a 4 °C. A esta temperatura se mantiene estable por varias semanas.
Solución buffer de boratos 0.05 M, pH 9	<ul style="list-style-type: none"> Solución de borato de sodio decahidratado $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich Cat. S-9640) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 19.07 g de borato de sodio en 1 L de agua desionizada. 	<ul style="list-style-type: none"> Almacenar a 4 °C; a esta temperatura se mantiene estable por varias semanas.
Suspensión de fosfato de cobre	<ul style="list-style-type: none"> Cloruro cúprico dihidrato, cristal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker Cat. 1792-01). Fosfato de sodio tribásico dodecahidrato $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (J.T. Baker Cat. 3836) 	<ul style="list-style-type: none"> Disolver 2.8 g de cloruro cúprico en 100 mL de agua desionizada. Disolver 13.6 g de fosfato sódico tribásico en 200 mL de agua desionizada. Mezclar ambas soluciones por agitación; dividir el volumen en 8 tubos de centrifuga (aprox. 37.5 mL por tubo). Centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min. Retirar el sobrenadante y resuspender el precipitado (pellet) tres veces con 15 mL de solución amortiguadora de boratos. Eliminar el sobrenadante las tres veces. 	<ul style="list-style-type: none"> Mantener una reserva a 4 °C; a esta temperatura se mantiene estable por varias semanas.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
		<ul style="list-style-type: none"> • Por último, resuspender todos los precipitados en 80 mL de solución amortiguadora de boratos. • Se pueden utilizar 10 mL de solución en cada tubo de centrifuga para recolectar las 8 soluciones. 	
Ácido clorhídrico 1.2 N	Ácido clorhídrico (Merck Cat. 1.00317.2500)	<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar 100 mL de HCl y 300 mL de agua desionizada. • Agregar hasta obtener un volumen de 1 L. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar esta solución bajo una campana de extracción.
Acetato de etilo	Acetato de etilo 99.9% (J.T. Baker 9280)	<ul style="list-style-type: none"> • Usar directamente 	
Mezcla de aminoácidos	DL-aminoácidos (Sigma-Aldrich Cat. 6364)	<ul style="list-style-type: none"> • De los siguientes aminoácidos, pesar las cantidades que se indican: 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. • Mezclar todos los aminoácidos y pesar 100 mg por cada 10 mL de solución amortiguadora de carbonatos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenada a 4°C se mantiene estable por varios meses.
Reactivo 2-cloro-3, 5-dinitropiridina (3% en metanol)	Sigma-Aldrich, Cat. 22.404-9	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver 0.240 g de 2-cloro-3,5-dinitropiridina en 8 mL de metanol. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • Proteger de la luz y del oxígeno. • Asegurarse de que la dinitropiridina se disuelva completamente.
Solución concentrada de lisina (2500 µg/mL)	L-Lisina monoclóhidrato (Nutritional Biochemicals Corp. Cat. 6364)	<ul style="list-style-type: none"> • Para la solución de L-lisina monohidroclorada, disolver 78.125 mg en 25 mL de solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M con pH 9.0. • Para la solución de L-lisina, disolver 62.5 mg en 25 mL de solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M con pH 9.0. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar cada semana y almacenar a 4 °C. • Agitar vigorosamente en el vórtex antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra.

Desengrasado

4. Transferir cada muestra a un cartucho de papel filtro comercial (por ejemplo, de 10 x 11 cm).
5. Desengrasar las muestras con aproximadamente 300 mL de hexano por matraz de bola durante 10 horas en un extractor tipo Soxhlet.
6. Secar las muestras al aire y asegurarse de que todo el hexano se ha evaporado.

Digestión

7. Por cada muestra, pesar 100 mg de harina desengrasada en tubos falcón.
8. Agregar 5 mL de la solución de papaína 4 mg/mL.
9. Siempre incluir al menos 2 blancos, 4 testigos (con una concentración conocida de lisina: 2 QPM, 2 normales).

10. Cerrar los tubos. Agitar las muestras en el vórtex y colocarlas en la estufa a 64 °C durante 16 horas (toda la noche). Si fuera posible, agítelas dos veces más, una hora después de colocarlas en la estufa y una hora antes de que termine el período de incubación (16 horas). Asegurarse de que no haya evaporación durante la incubación.
11. Retirar los tubos de la estufa y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
12. Agitar los tubos en el vórtex justo antes de centrifugarlos a 2,500 rpm durante 5 minutos. Asegurarse que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.

Reacción colorimétrica

13. Transferir 1 mL a un tubo de centrífuga y agregar 0.5 mL de la solución amortiguadora de carbonatos y 0.5 mL de la suspensión de fosfato de cobre.
14. Agitar manualmente durante 5 minutos y centrifugar a 2,000 rpm durante 5 min.
15. Transferir 1 mL del sobrenadante a un tubo nuevo.
16. Agregar 0.1 mL del reactivo 2-cloro-3,5-dinitropiridina y agitar en el vórtex.
17. Mantener los tubos a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 2 horas; agitar cada 30 minutos.
18. Agregar 5 mL de HCl 1.2 N en cada tubo y agitar en el vórtex.
19. Agregar 5 mL de acetato de etilo.
20. Cerrar los tubos y mezclar la solución, invirtiéndolos 10 veces.
21. Retirar la fase superior con una jeringa conectada a un tubo de polietileno. Repetir dos veces más los pasos 20 a 22.
22. Leer la absorbancia a 390 nm en un espectrofotómetro.

Curva estándar

1. Preparar una solución concentrada de lisina a 2500 µg/mL en una solución amortiguadora de carbonatos.
2. En tubos falcón de 15 mL, preparar diluciones de 0, 250, 500, 750 y 1,000 µg/mL (diluir en solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M, con pH 9). Agitar muy bien las diluciones en el vórtex antes de utilizarlas.

Cuadro 11. Preparación de la solución concentrada de lisina.

Tubo N°	Solución concentrada de lisina 2500 µg/mL (mL)	Solución amortiguadora de carbonatos 0.6 M, pH 9.0 (mL)	Volumen total (mL)	Concentración µg Lis/mL
1	0	10.0	10.0	0
2	1	9.0	10.0	250
3	2	8.0	10.0	500
4	3	7.0	10.0	750
5	4	6.0	10.0	1000

3. En tubos falcón nuevos de 15 mL, preparar concentraciones de lisina a partir de la primera solución concentrada. Para las nuevas concentraciones, transferir 1 mL de las soluciones a cada tubo y agregar 4 mL de solución de 5 mg/mL de papaína. Agitarlas muy bien en el vórtex antes de usarlas.

Cuadro 12. Preparación de la curva estándar de lisina.

Tubo N°	Concentraciones de lisina 0-1000 µg/mL (mL)	Solución de papaína 5 mg/mL (mL)	Volumen total (mL)	Concentración con papaína µg Lis/mL
1	1	4	5	0
2	1	4	5	50
3	1	4	5	100
4	1	4	5	150
5	1	4	5	200

- Preparar la reacción colorimétrica (pasos 13 a 22) con 1 mL de las diluciones para desarrollar la curva estándar. Usar la mezcla de aminoácidos para diluir.

Cuadro 13. Reacción colorimétrica para la determinación de lisina.

Tubo N°	Concentración con papaína µg Lys/mL (mL)	Mezcla de aminoácidos en solución amortiguadora de carbonatos 0.6 M, pH 9.0 (mL)	Suspensión de fosfato de cobre (mL)
1	1	0.5	0.5
2	1	0.5	0.5
3	1	0.5	0.5
4	1	0.5	0.5
5	1	0.5	0.5

Cálculo del porcentaje de lisina

La cantidad de lisina en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lisina} = \frac{\text{OD}_{390\text{nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen hidrólisis}}{\text{peso de muestra}} \times 100$$

Ejemplo:

$$\% \text{ lisina } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.25}{0.00165 \frac{\text{DO}}{\mu\text{g/mL}}} \times \frac{5 \text{ mL}}{100,000 \mu\text{g}} \times 100$$

$$\text{Factor} = \frac{0.005}{\text{pendiente}}$$

Nótese que:

$$\frac{5 \text{ mL}}{100,000 \mu\text{g}} \times 100 = 0.00516$$

Escalamiento para digestión en tubos Eppendorf y lectura en microplaca

Procedimiento:

Para la preparación de la muestra (muestreo, molienda y desengrasado) se utiliza el procedimiento descrito en los pasos 1 a 6 (con tubos falcón o Eppendorf), pero a partir de la digestión se hacen algunas modificaciones.

Digestión

- Para cada muestra, pesar 30 mg de harina desengrasada en un tubo Eppendorf de 2 mL.
- Agregar 1.55 mL de la solución de papaína 4 mg/mL.
- Siempre incluir al menos 2 blancos, 4 testigos (de concentración conocida de lisina: 2 QPM, 2 normal).
- Cerrar los tubos y asegurarse de que no haya evaporación durante la incubación.
- Agitar las muestras en el vórtex y colocarlas en la estufa a 64 °C por 16 horas (toda la noche). Agitarlas dos veces más, una hora después de colocarlas en la estufa y una hora antes de que termine el período de incubación (16 horas).
- Saque los tubos de la estufa y déjelos enfriar a temperatura ambiente.
- Agitar los tubos en el vórtex justo antes de centrifugarlos a 14,000 rpm durante 5 minutos. Asegurarse de que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.

Reacción colorimétrica

- Transferir 500 µL a un tubo Eppendorf de 1.5 mL; agregar 250 µL de la solución amortiguadora de carbonatos y 250 µL de la suspensión de fosfato de cobre.
- Agitar manualmente durante 5 minutos y centrifugar a 3,600 rpm durante 5 minutos.
- Transferir 125 µL del sobrenadante a un tubo nuevo.
- Agregar 12.5 µL del reactivo 2-cloro-3,5-dinitropiridina y agitar en el vórtex.
- Mantener los tubos a temperatura ambiente y protegidos de la luz durante 2 horas; agitarlos cada 30 minutos.
- Agregar 625 µL de HCl 1.2 N en cada tubo y agitar en el vórtex.
- Agregar 650 µL de acetato de etilo.
- Cierre los tubos y mezcle la solución, invirtiéndolos 10 veces.
- Retirar la fase superior con una pipeta Pasteur. Repita dos veces los pasos 20 a 22.
- Centrifugar los tubos a 3,600 rpm durante 5 minutos y eliminar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- Mantener abiertos los tubos durante 10 minutos bajo la campana de extracción.
- En una microplaca de 96 pozos, colocar 200 µL de cada muestra por duplicado.
- Leer la absorbancia a 390 nm en el lector de microplacas.

Curva estándar

- Preparar una solución concentrada de lisina a 1000 µg/mL en una solución amortiguadora de carbonatos.
- En tubos Eppendorf de 15 mL, preparar diluciones de 0, 50, 100, 150 y 200 µg/mL (diluir en solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M con pH 9). Agitar muy bien en el vórtex antes de usarlas.

Cuadro 14. Preparación de la curva estándar de lisina en tubos falcón de 15 mL.

Tubo N°	Solución concentrada de lisina 1000 µg/mL (mL)	Solución amortiguadora de carbonatos 0.6 M, pH 9.0 (mL)	Papaína 5 mg/ml (mL)	Concentración µg Lys/mL
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

- Para desarrollar la curva estándar (pasos 14 a 24), utilizar 500 µL de las diluciones de lisina, 250 µL de la solución amortiguadora de carbonatos 0.05 M con pH 9.0 (que contiene la mezcla de aminoácidos) y 250 µL de la suspensión de cobre.

Cálculo para determinar el porcentaje de lisina

La cantidad de lisina en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lys} = \frac{\text{OD}_{390\text{nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen hidrólisis}}{\text{peso de muestra}} \times 100\%$$

Ejemplo:

$$\% \text{ Lys } (\mu\text{g}/\mu\text{g de muestra}) = \frac{0.170}{0.00090 \frac{\text{DO}}{\mu\text{g/mL}}} \times \frac{1.55 \text{ mL}}{30,000 \mu\text{g}} \times 100\%$$

Sin embargo, esta cantidad incluye la lisina de la muestra más la que está presente en la papaína. Para calcular el contenido de lisina en el material biológico (polvo de grano desengrasado), reste el valor de la papaína.

Por tanto, el porcentaje de lisina debe calcularse a partir del valor corregido de absorción.

$$\% \text{ Lis} = \text{DO}_{390\text{nm}} \text{ corregida} \times \text{factor}$$

Donde:

$$\text{DO}_{390\text{nm}} \text{ corregida} = \text{DO}_{390\text{nm}} \text{ muestra} - \text{DO}_{390\text{nm}} \text{ promedio de los blancos de papaína.}$$

Nótese que:

$$\frac{1.55 \text{ mL}}{30,000 \mu\text{g}} \times 100 = 0.00516$$

Estimación del contenido de fenoles libres y totales en maíz utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu

La prueba Folin-Ciocalteu (F-C) se basa en la transferencia de electrones en un medio alcalino, desde los compuestos fenólicos hacia los complejos del ácido fosfomolibdico/fosfotungsténico, los cuales se determinan espectroscópicamente a 765 nm. Esta prueba se realiza en tubos de microcentrífuga y las mediciones se hacen con lectores de placas de 96 pozos.

Cuadro 15. Reactivos que se utilizan en la determinación de fenoles.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Metanol al 50%	Metanol (Sigma-Aldrich Cat. M1775-1GA CAS 67-56-1)	• Mezclar 500 mL de agua desionizada y 500 mL de metanol.	• Preparar cada semana; almacenar a 4 °C para evitar que se evapore.
Ácido clorhídrico 1,2 M en metanol absoluto	Ácido clorhídrico (Merck Cat. 1.00317.2500)	• Agregar 10 mL de HCl en un matraz volumétrico de 100 mL y aforar hasta la marca con metanol absoluto.	• Preparar cada semana; almacenar a 4 °C para evitar que se evapore.
Reactivo Folin-Ciocalteu 25%	Reactivo fenólico Folin - Ciocalteu (Sigma Aldrich Cat. F9252-100)	• Utilizar un matraz volumétrico de color ámbar con tapón. • Mezclar 2.5 mL de F-C 2N y 7.5 mL de agua desionizada; agitar en el vórtex.	• Prepararlo el día que vaya a usarse. • Asegurarse de que el matraz (o botella) esté perfectamente cerrado. • Agitarlo muy bien en el vórtex antes de usarlo.
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) 400 mM	Carbonato de sodio (JT Baker Cat. 3602)	• Disolver 4.25 g de Na ₂ CO ₃ (99.9 %) en 100 mL de agua desionizada.	• Asegúrese de que está completamente disuelto. • Preparar cada semana y almacenar a temperatura ambiente.
Solución concentrada de ácido gálico (100 µg/mL)	Ácido gálico (Sigma-Aldrich Cat. G7384-100G)	• Disolver 20 mg de ácido gálico en 200 mL de metanol al 50%.	• Protéjala de la luz, cubriéndola con papel aluminio o depositándola en un frasco de color ámbar. • Preparar cada semana y almacenar a 4 °C. • Agitarla muy bien en el vórtex antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra; el tamaño de partícula deberá ser igual o menor a 0.5 mm. No guarde la harina de las muestras por más de una semana.

Secado

4. Secar la muestra a 64-65 °C durante 16 horas.

Extracción de fenoles libres o solubles

5. Pesar 20 mg de harina de la muestra en un tubo Eppendorf.
6. Agregar 1.3 mL de metanol al 50%.
7. Cerrar los tubos y asegurarse de que no haya evaporación durante la extracción.
8. Agitar las muestras en el vórtex y luego colocarlas en un termomezclador para microtubos a 65 °C, a 900 rpm, durante 30 minutos.
9. Sacar los tubos del termomezclador y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
10. Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 14,000 rpm. Asegurarse de que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.
11. Producir la reacción colorimétrica.

Extracción de fenoles totales

12. Para cada muestra, pesar 20 mg en un tubo Eppendorf.
13. Agregar 1.3 mL de ácido clorhídrico 1.2 M en metanol.
14. Cerrar los tubos y asegurarse de que no haya evaporación durante la extracción.
15. Agitar las muestras en el vórtex y colocarlas en un termomezclador para microtubos a 42 °C y 1,100 rpm durante 30 minutos.
16. Saque los tubos del termomezclador; déjelos enfriar a temperatura ambiente y protéjalos de la luz.
17. Agitar y centrifugar los tubos durante 5 minutos a 14,000 rpm. Asegurarse de que el sobrenadante no contenga partículas de las muestras; en caso de que las tenga, volver a centrifugar los tubos.
18. Tomar 500 µL del sobrenadante y transferirlo a otro tubo Eppendorf.
19. Evaporar a sequedad y resuspender el precipitado resultante en 1.3 mL de metanol al 50%.
20. Agitar en el vórtex y producir la reacción colorimétrica.

Reacción colorimétrica

21. Tomar 50 µL del sobrenadante y, con mucho cuidado, transferirlo a los pozos de la microplaca.
22. Agregar 40 µL del reactivo Folin-Ciocalteu al 25%. Agregue el reactivo antes que el álcali para evitar la oxidación de fenoles causada por el aire.
23. Dejar que se produzca la reacción durante 6 minutos.
24. Agregar lentamente 110 µL del Na₂CO₃ 400 mM.
25. Cubrir la microplaca con cinta adhesiva de aluminio para evitar salpicaduras de la muestra.
26. En el vórtex, agitar la microplaca a 800 rpm durante 10 segundos.
27. Incube la microplaca a 42 °C durante 9 minutos para que se desarrolle el color.
28. Retire la microplaca de la incubadora y déjela enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 30 minutos); protéjala de la luz directa.
29. Leer la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro.

Curva estándar

1. Preparar una solución concentrada de 100 µg/mL de ácido gálico en metanol al 50% (preparar cada semana y almacenar a 4 °C).
2. En tubos falcón de 15 mL, preparar diariamente diluciones a 0, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL (en metanol al 50 %). Agitar muy bien en el vórtex antes de usarlas.
3. Producir la reacción colorimétrica (pasos 21 a 29) utilizando 1 mL de estas diluciones.

Cuadro 16. Preparación de la curva estándar de fenoles.

Tubo N°	Solución concentrada de ácido gálico 100 µg/mL (mL)	Metanol 50 % (mL)	Volumen total (mL)	Concentración µg ácido gálico/mL
1	0.0	10.0	10.0	0.0
2	1.0	9.0	10.0	10.0
3	1.5	8.5	10.0	15.0
4	2.0	8.0	10.0	20.0
5	2.5	7.5	10.0	25.0
6	3.0	7.0	10.0	30.0

Cálculos:

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de ácido gálico, desde 0 hasta 30 mg/mL. Graficar las lecturas de la absorbancia a 765 nm como una función de la concentración y calcular la pendiente de la curva estándar. Nótese que con la pendiente se usa la unidad DO * mL/µg.

Cálculo del porcentaje de ácido gálico para fenoles libres

La cantidad de ácido gálico para cada muestra se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \text{ ácido gálico} = \frac{OD_{762nm}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen hidrólisis}}{\text{peso de muestra}} \times 100\%$$

Ejemplo:

Sin embargo, esta cantidad incluye la absorbancia presente en la placa y en el metanol. Para calcular el contenido de ácido gálico en el material biológico (harina), reste el valor de la absorbancia de la placa y del metanol.

$$\% \text{ ácido gálico} = DO_{765nm} \text{ corregido} \times \text{factor}$$

$$\% (\text{ácido gálico } (\mu\text{g}/\mu\text{g})) = \frac{0.345}{0.0155 \frac{DO}{\mu\text{g/mL}}} \times \frac{1.3 \text{ mL}}{20,000 \mu\text{g}} \times 100\%$$

Donde:

$$DO = 765 \text{ nm corregido} = DO_{765nm} \text{ muestra} - DO_{765nm} \text{ promedio de los blancos de metanol}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.0065}{\text{pendiente}}$$

Nótese que:

$$\frac{1.3}{20,000} \times 100 = 0.0065$$

Cálculo del porcentaje de ácido gálico para fenoles totales

$$\% \text{ ácido gálico} = \frac{DO_{765nm}}{\text{pendiente}} \times \frac{\frac{\text{volumen de la hidrólisis}}{\text{volumen evaporado}}}{\text{peso de la muestra}} \times 100 \times FD$$

Ejemplo:

$$\% \text{ ácido gálico } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.225}{0.0155 \frac{DO}{\mu\text{g/mL}}} \times \frac{\frac{1.3 \text{ mL}}{0.5 \text{ mL}}}{20,000 \mu\text{g}} \times 100 \times 2.6$$

Sin embargo, esta cantidad incluye la absorbancia de la placa y del metanol. Para calcular el contenido de ácido gálico del material biológico (polvo de grano), reste el valor de la absorbancia de la placa y del metanol.

$$\% \text{ ácido gálico} = DO_{765 \text{ nm}} \text{ corregido} \times \text{factor}$$

Donde:

$$DO = 765 \text{ nm corregido} = DO_{765nm} \text{ muestra} - DO_{765nm} \text{ promedio de los blancos de metanol}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.0338}{\text{pendiente}}$$

Nótese que:

$$\frac{\frac{1.3 \text{ mL}}{0.5}}{20,000} \times 100 \times 2.6 = 0.0338$$

Cuadro 17. Soluciones a problemas comunes en la determinación de fenoles.

Problema	Solución
No hay desarrollo de color en la reacción	Probar con otro lote de reactivos colorimétricos.
Cambios en los valores de la curva del factor/mediciones DO de la curva estándar de ácido gálico	<ol style="list-style-type: none">1. Verificar la calidad de la curva estándar del ácido gálico.2. Asegurarse de que el carbonato de sodio es 400 mM.3. Verificar la calidad de todos los reactivos. Preparar nuevos.4. Asegurarse de que todas las cantidades de reactivos han sido medidas con precisión.
El valor DO del metanol 50% o del blanco es demasiado alto	Verificar que la concentración de carbonato de sodio sea la correcta.
Valores bajos para las muestras de control	<ol style="list-style-type: none">1. Asegurarse de que la extracción de las muestras sea correcta:<ol style="list-style-type: none">a) Asegurarse de que no haya partículas en la pared del tubo después de la extracción de las muestras. Si esto ocurre, agitar la muestra y centrifugar una vez más durante 5 min.b) Verificar que la extracción se efectuó a 65 °C y 900 rpm para fenoles libres y/o a 42 °C y 1100 rpm para fenoles totales.2. Verificar la calidad y cantidad de los reactivos que se utilizan.3. Verificar la calidad de la curva estándar de ácido gálico.4. Verificar que la solución concentrada de ácido gálico esté bien disuelta antes de hacer las diluciones.5. Preparar una nueva solución concentrada de ácido gálico.
Las mediciones de la DO entre repeticiones varían demasiado	<ol style="list-style-type: none">1. Verificar la precisión con que se pesaron las muestras.2. Asegurarse de que las muestras estén a temperatura ambiente antes de hacer la lectura.

Determinación de azúcares solubles con antrona

El espectrofotómetro de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) cuenta con una curva de calibración para la determinación de azúcares en tejido molido de trigo. Como referencia se utiliza el método de la antrona, que se describe a continuación:

El método de la antrona se basa en la reacción que produce este compuesto (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) cuando se combina con la conformación furfural de los carbohidratos (los carbohidratos se someten a un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado) para colorear un hemiacetal, que se determina espectroscópicamente a 630 nm.

Cuadro 18. Reactivos que se utilizan en la determinación de azúcares solubles.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Agua desionizada			
Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico (Merck Cat. 1.00732.2500)		• Utilizar respirador.
Reactivo antrona	Antrona (Merck Cat. 1.01468.0010)	• Pesar 100 mg del reactivo antrona y disolverlo en 50 mL de ácido sulfúrico concentrado grado analítico.	• Una hora antes de que vaya a usarse • Preparar diariamente. • Protegerlo de la luz; mantenerlo en hielo o en refrigeración.
• Solución concentrada de sacarosa (100 µg/mL) • Solución concentrada de sacarosa (30 µg/mL)	Sacarosa (Mallincrodt Cat. N23H14)	• Poner a secar la sacarosa durante 1 hora a 105 °C. • Disolver 25 mg de sacarosa en 250 mL de agua desionizada. • En un matraz aforado de 100 mL, diluir 30 mL de la solución concentrada de 100 µg/mL con agua desionizada.	• Preparar cada semana y almacenar a 4 °C. • Agitarla muy bien en el vórtex antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar una muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra.

Secado

4. Secar las muestras durante 4 horas a 60 °C.

Extracción

(Estas cantidades son para llevar a cabo la reacción en tubos de 15 mL).

5. Por cada muestra, pesar por duplicado, en tubos falcón de 15 mL, 20 mg de la muestra deshidratada.
6. Añadir 4 mL de agua desionizada a los tubos, cerrarlos de inmediato y agitarlos en el vórtex.
7. Colocar la gradilla con los tubos de las muestras en baño María a 70 °C durante 45 min.
8. En el vórtex, agitar muy bien los tubos cada 15 minutos.
9. Después de la incubación, colocar los tubos en hielo.
10. Centrifugar durante 10 minutos a 3,000 rpm.
11. Usar el sobrenadante para hacer las diluciones necesarias, dependiendo del material que se vaya a analizar:
 - Para trigo, en una relación 1:200, por ejemplo, se recomienda preparar primero una dilución 1:20 y luego, a partir de ésta, preparar otra dilución 1:10. Con esto se evita la preparación de volúmenes pequeños y se reduce la probabilidad de error. Ejemplo: En una relación 1:20 se toman 250 µL del sobrenadante en 4.75 mL de agua desionizada y después se realiza la dilución 1:10. En este caso se toman 500 µL del sobrenadante en 4.5 mL de agua desionizada.

Reacción colorimétrica

- Tomar 2.5 mL de la dilución y transferirla con cuidado a otro tubo falcón, que deberá ponerse en agua fría desde antes.
- Agregar poco a poco 5 mL de la solución de antrona a cada tubo. Mantener en movimiento el tubo sumergido en agua con hielo.
- Agitar muy bien cada uno de los tubos en el vórtex.
- Cerrar los tubos y colocarlos en baño María a ebullición durante 7.5 minutos.
- Sacar los tubos del baño María y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro.

Escalamiento de la reacción colorimétrica y recomendaciones especiales para el uso de microplacas

Para el escalamiento en microplacas se preparan las siguientes diluciones:

- Trigo: 1:50 (100 µL del sobrenadante en 4.9 mL de agua desionizada).

Cuadro 19. Escalamiento de la reacción colorimétrica en la determinación de azúcares solubles.

Reactivo	Paso	Tubos de 15 mL	Microplaca
Hidrolizado	Reacción colorimétrica	2.5 mL	50 µL
Reactivo colorimétrico	Reacción colorimétrica	5.0 mL	100 µL

- Cada muestra deberá analizarse por triplicado en la microplaca (tres pozos). Mantener las microplacas de 96 pozos sobre hielo durante 10 minutos.
- Agregar la solución de antrona con una pipeta digital multicanal. Agregarla con mucho cuidado para que se transfieran los 100 µL de reactivo a cada pozo.
- Cubrir la placa con cinta adhesiva de aluminio y agitarla con mucho cuidado en el vórtex hasta que la solución en cada pozo sea homogénea.
- Para muestras de trigo, incubar las placas a 100 °C durante 10 min.
- Enfriar las placas en el congelador durante 10 minutos antes de hacer la lectura a 630 nm en un lector de microplacas.

Curva estándar

- Con agua desionizada, preparar una solución concentrada de 100 µg/mL de sacarosa; secar antes la sacarosa.
- En tubos falcón de 15 mL, preparar diariamente diluciones de 0, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/mL (en agua desionizada). Agitar muy bien en el vórtex antes de usarlas.
- Producir la reacción colorimétrica (pasos 12 a 17) utilizando 2.5 mL de las diluciones.
- Incluir siempre una curva estándar por duplicado por cada grupo de muestras que se analicen en el día.

Cuadro 20. Preparación de la curva estándar de azúcares solubles en tubos.

Tubo N°	Solución concentrada de sacarosa 100 µg/mL (mL)	Agua desionizada (mL)	Volumen total (mL)	Concentración en µg de sacarosa/mL
1	0.0	10.0	10.0	0.0
2	1.0	9.0	10.0	10.0
3	1.5	8.5	10.0	15.0
4	2.0	8.0	10.0	20.0
5	2.5	7.5	10.0	25.0
6	3.0	7.0	10.0	30.0

Curva estándar para microplaca

5. Preparar una solución concentrada de 100 µg/mL y 30 µg/mL de sacarosa puesta a secar previamente.
6. En tubos falcón de 15 mL, preparar diariamente diluciones de 0, 6, 12, 18, 24, 30, 40 y 60 µg/mL. Agitar muy bien en el vórtex antes de usarlas.
7. Producir la reacción colorimétrica (pasos 12 a 17) utilizando 50 µL de las diluciones.
8. Incluir siempre una curva estándar por duplicado para cada grupo de muestras analizadas en el día.

Cuadro 21. Preparación de la curva estándar de azúcares solubles en microplaca.

Tubo N°	Solución concentrada de sacarosa 30 µg/mL (mL)	Agua desionizada (mL)	Volumen total (mL)	Concentración en µg de sacarosa/mL
1	0.0	2.5	2.5	0
2	0.5	2.0	2.5	6
3	1.0	1.5	2.5	12
4	1.5	1.0	2.5	18
5	2.0	0.5	2.5	24
6	2.5	0.0	2.5	30
	Solución concentrada de sacarosa 100 µg/mL (mL)			
7	1.0	1.5	2.5	40
8	1.5	1.0	2.5	60

Cálculos:

Curva de calibración

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de sacarosa, desde 0 a 30 µg/mL (0 a 60 µg/mL en microplaca). Graficar las lecturas de absorbancia a 630 nm como función de la cantidad de sacarosa en µg/mL y calcular la pendiente de la curva estándar. Nótese que con la pendiente se usa la unidad DO/ µg.

Cálculo del porcentaje de sacarosa

La cantidad de sacarosa en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sacarosa} = \frac{\text{DO}_{630\text{nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{dilución}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Ejemplo: Muestra de maíz en microplaca.

$$\% \text{ sacarosa } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.127}{0.110 \frac{\text{DO}}{\mu\text{g}}} \times \frac{4}{20,000 \mu\text{g}} \times 100$$

Para calcular el contenido de sacarosa en el material biológico, reste el valor de la absorbancia de la antrona.

$$\% \text{ sacarosa} = \text{DO}_{630\text{nm}} \text{ corregida} \times \text{factor} \times \text{dilución}$$

Donde:

$$\text{DO} = \text{DO}_{630\text{nm}} \text{ corregida} = \text{DO}_{630\text{nm}} \text{ muestra} - \text{DO}_{630\text{nm}} \text{ promedio de blanco de antrona}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.4}{\text{pendiente}}$$

Cuadro 22. Solución a problemas comunes en la determinación de azúcares solubles.

Problema	Solución
No hay desarrollo de color en la reacción. Cambios en los valores de la curva del factor/mediciones de la DO de la curva de sacarosa.	<ol style="list-style-type: none">1. Probar otro lote de reactivos colorimétricos.2. Verificar la calidad de la curva de sacarosa.3. Verificar la calidad del ácido sulfúrico.4. Verificar la calidad de todos los reactivos. Preparar nuevos.5. Asegurarse de que todas las cantidades de reactivos han sido medidas con precisión.
La DO del blanco de antrona es muy alta (el valor debe ser de entre 0.045-0.06).	<ol style="list-style-type: none">6. Asegurarse de que al preparar el reactivo de antrona se utilizó ácido sulfúrico no oxidado.7. Preparar otro reactivo colorimétrico.8. Preparar el reactivo de antrona con otro lote de ácido sulfúrico.
Valores bajos para las muestras testigo.	<ol style="list-style-type: none">9. Verificar que la extracción de las muestras sea correcta:<ol style="list-style-type: none">a) Asegurarse de que no haya partículas en las paredes del tubo después de la extracción. Si esto ocurre, agitar la muestra en el vórtex y centrifugar una vez más durante 10 minutos.b) Verificar que la extracción se haya efectuado a 60-70 °C.c) Verificar la calidad y cantidad de los reactivos utilizados.10. Verificar la calidad de la curva de sacarosa:<ol style="list-style-type: none">a) Asegurarse de que la solución concentrada de sacarosa esté bien disuelta antes de hacer las diluciones.11. Verificar la calidad y precisión de las diluciones.
Las mediciones de la DO entre repeticiones varían demasiado.	<ol style="list-style-type: none">12. Asegurarse de que todas las cantidades de reactivos han sido medidas con precisión.13. Verificar que las muestras hayan sido enfriadas antes de hacer las lecturas.14. Verificar que el pipeteo se haga correctamente.

Determinación de carotenoides en maíz por cromatografía de líquidos

El siguiente método hace referencia a Kurilich *et al.*, 1999 y a Howe *et al.*, 2006.

Preparación de la muestra:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Si las semillas han sido tratadas, lavar intensamente con abundante agua corriente y después enjuagar con agua destilada. Dejar secar las semillas.
4. Moler la muestra para obtener un tamaño de partícula de 5 micras. Colocar la harina en sobres amarillos de papel.
5. Sellarlos con cinta adhesiva y refrigerar a -20 °C.

Extracción

Las siguientes actividades deben realizarse en un medio con luz amarilla, nunca con luz directa. El extracto de las muestras debe ser analizado inmediatamente después de la extracción.

6. En tubos de vidrio de 15 mL, pesar 600 mg de la muestra.
7. Agregar 6 mL de butilhidroxitolueno (BHT) al 0.1%. Agitar vigorosamente en el vórtex.
8. Incubar a 85 °C durante 5 minutos en baño maría.
9. Añadir 500 µL de KOH al 80%.
10. Agitar vigorosamente en el vórtex.
11. Incubar durante 10 minutos a 85 °C (agitar transcurridos los primeros 5 minutos). (V. **Nota 1**).
12. Colocar los tubos en hielo.
13. Agregar a cada tubo 3 mL de agua desionizada fría y agitar vigorosamente en el vórtex.
14. Agregar 200 µl de solución de apocaroteno y agitar vigorosamente en el vórtex.
15. Agregar 3 mL de hexano, en la campana de extracción, y agitar vigorosamente en el vórtex.
16. Centrifugar las muestras a 3000 rpm durante 2 minutos.
17. Transferir la fase superior a tubos nuevos. Mantener los tubos en hielo. Taparlos inmediatamente.
18. Extraer 2 veces más con hexano (repetir los pasos 16 a 19).
19. Agregar 3 mL de agua desionizada a las 3 fracciones de hexano combinadas.
20. Evaporar a sequedad el hexano colocando los tubos bajo nitrógeno gaseoso o con un sistema Speed Vac.
21. Cubrir inmediatamente los tubos.
22. Al extracto seco agregar 500 µl de una mezcla de metanol (1,2-Dicloroetano (50:50)), filtrar las muestras con acrónico de 0.22 µm, recoger el filtrado en viales debidamente etiquetados e inyectarlas en cualquiera de los sistemas cromatográficos que se vayan a utilizar.

Si no es posible inyectarlas de inmediato, conserve las muestras, sin resuspenderlas, y almacénelas a -20 °C por no más de 24 horas.

Nota 1: Empiece a contar el tiempo después de haber introducido todas las muestras en el baño maría.

Preparación de la solución del estándar interno (apocaroteno)

Para la preparación del estándar interno, hacer lo siguiente:

1. Preparar una solución de butilhidroxitolueno (BHT) al 0.005% en metanol.
2. Pesar 1 mg de apocaroteno y colocarlo en un tubo de vidrio de 15 mL.
3. Adicionar al apocaroteno 10 mL de la solución preparada en el paso 1.
4. Agitar vigorosamente en el vórtex.
5. Tomar 1 mL de la solución y diluirla en 15 mL con BHT al 0.005% en metanol.
6. Tomar la lectura en el espectro a una longitud de onda de 450 nm, en una celda estándar de cuarzo de 1 cm.
7. La respuesta del apocaroteno que se espera obtener corresponde a un valor igual o mayor que 0.80 de absorbancia.

Purificación de los estándares

Luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno, cada uno resuspendido en 5mL de isopropanol.

Se realiza una purificación de los estándares:

1. Se toman aproximadamente 500 μ l de la solución estándar y se vacía en un tubo limpio.
2. Agregar 1 mL de agua, 3 mL de metanol y 3 mL de hexano y luego agitar en el vórtex.
3. Dejar reposar la mezcla unos minutos para que se formen dos capas y a continuación tome la parte superior y colóquela en un tubo limpio.
4. Dependiendo de la intensidad del color de la solución del estándar, realizar las extracciones que sean necesarias.
5. Para las siguientes extracciones siga los pasos 2 y 3, pero solo agregue 3 mL de hexano y luego agítelo en el vórtex.
6. Una vez que concluye el paso anterior, evapore la solución en el Speed Vac aproximadamente 40 min, o el tiempo que sea necesario.
7. Resuspender con 500 μ l de una mezcla de metanol: 1,2-dicloroetano (50:50).
8. Inyectar en el UPLC: para luteína y zeaxantina deberá aplicarse el método de análisis de muestras (se usa el gradiente); para β -criptoxantina y β -caroteno utilizar una mezcla de metanol/MTBE (57:43). En ambos casos deberá equilibrarse el sistema cromatográfico con la fase móvil de trabajo. Ver **Notas 1 y 2**.
9. Realizar una inyección para determinar el tiempo de retención y la altura que representa el pico del estándar.
10. Después de identificar el pico, realizar varias inyecciones con un volumen de inyección de 20 μ l; con ayuda de la línea de salida del detector recolectar en viales el solvente, en el tiempo de retención que mostró el estándar. La purificación de los estándares se realiza para cada uno de los estándares, se sugiere realizar un solo estándar a la vez.
Una vez concluida la purificación, verificar en el espectrofotómetro cuál es la absorbancia presente y registrar el valor.

Nota 1: Para inyectar la curva en el sistema HPLC se utiliza el método de análisis de muestras (se usa el gradiente); realizar inyecciones de 10, 25, 50, 75, 90 μ l por duplicado.

Nota 2: Para inyectar la curva en el sistema UPLC se utiliza el método de análisis de muestras (se usa el gradiente); realizar inyecciones de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 μ l por duplicado.

1. Determinar espectroscópicamente la concentración de los estándares basados en su coeficiente de extinción (E1%) y la máxima longitud de onda (450 nm) del carotenoide. En una celda estándar de cuarzo de 1 cm, los E1% son:
 β -caroteno: 2592
 β -criptoxantina 2386
Zeaxantina: 2348
Luteína: 2550

Concentración del estándar (ng/ μ l) = absorbancia x 10 000 + E1%

2. Generar una curva estándar que incluya el área del pico del carotenoide del maíz. Usar una regresión lineal para obtener una ecuación que convierta el área del pico en una cantidad de carotenoides.

Ejemplo de cómo hacer los cálculos para la curva en los sistemas cromatográficos **Alliance 2695** y **UPLC**:

Obtener el valor g/100 mL de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ABS STD}}{\text{E1\%}} = \text{g/100 mL}$$

Transformar el valor obtenido en ng/L con la siguiente fórmula:

$$(\text{g/100 mL}) (10^{10}) = \text{ng/L}$$

Sustituyendo valores:

$$\frac{1.148}{2.386} = 0.00048113998 \text{ g/100 mL}$$

$$(0.00048113998) (10^{10}) = 4811399.8 \text{ ng/L}$$

Después de calcular el valor en ng/L de cada uno de los volúmenes y para cada uno de los estándares inyectados se pueden graficar los ng/L obtenidos vs el área; mediante una regresión lineal se obtiene una curva estándar que sirve para calcular la cantidad de carotenos que están presentes en la muestra.

$$(\text{Volumen inyectado}) (\text{ng/L}) (10^{-6}) = \text{ng}$$

Ejemplo:

$$(10 \mu\text{L}) (4811399.8 \text{ ng/L}) (10^{-6}) = 48.11 \text{ ng}$$

Volumen de la inyección (μL)	Área	(ng)
10	764163	48.11
25	1869738	120.28
50	3749935	240.57
75	5570713	360.85

Regresión lineal obtenida:

$$y = 0.000065x - 1.641820$$

$$R^2 = 0.999955$$

Cálculos para los sistemas cromatográficos:

Ejemplo 1. Con los sistemas cromatográficos **Alliance 2695** y **UPLC usado como HPLC**; la sustitución de valores para una muestra se hará de acuerdo con la siguiente tabla:

Muestra	Peso muestra en (g)	Eficiencia extracción (EE)	Apocaroteno	Área pico interés en la muestra	ng/g	corr ng/g	corr μg/g
1	0.600	Área apocaroteno sin realizar extracción/área apocaroteno en la muestra	Área apocaroteno en la muestra	Área pico interés en la muestra	Área pico interés en la muestra x regresión lineal x 10/peso muestra	Valor de ng/g / EE	Valor corr ng/g /1000

Sustituyendo valores:

Muestra	Peso muestra en (g)	Eficiencia extracción (EE)	Apocaroteno	Área pico interés en la muestra	ng/g	corr ng/g	corr µg/g
1	0.600	1.18375866	973063.6	525460.7	541.88547	457.76684	0.4577668

Ejemplo 2. Con el sistema UPLC, utilizar los valores de la regresión lineal de la curva generada para el UPLC: sustituyendo los valores en una muestra de acuerdo con la siguiente tabla:

Muestra	Peso muestra en (g)	Eficiencia extracción (EE)	Apocaroteno	Área pico interés en la muestra	ng/g	corr ng/g	corr µg/g
1	0.600	Área apocaroteno sin realizar extracción/ área apocaroteno en la muestra	Área apocaroteno en la muestra	Área pico interés en la muestra	Área pico interés en la muestra x regresión lineal x 250/peso muestra	Valor de ng/g / EE	Valor corr ng/g /1000

Sustituyendo valores:

Muestra	Peso muestra en (g)	Eficiencia extracción (EE)	Apocaroteno	Área pico interés en la muestra	ng/g	corr ng/g	corr µg/g
1	0.6005	1.0007034	102429	19405	143.88464	143.7835	0.1437835

Condiciones cromatográficas para HPLC:

El Sistema Alliance 2695 consta de tres módulos: Alliance 2695, Detector de diodos (PDA) y horno para columnas.

Estación de trabajo Empower

Sistema de bombeo

Flujo: 0.9 mL/min.

Tiempo de corrida: 40 minutos.

Sistema de bombeo: Gradiente

Fase Móvil A: Acetato de amonio 10 mM en una mezcla de metanol/Agua (95:5). Filtrar con membrana de 0.45 µm y desgasificar.

Fase móvil B: Metiliterbutil éter (MTBE). Filtrar con membrana de 0.45 µm y desgasificar.

Time	Flow	%A	%B	Curve
0	0.9	85	15	-
25	0.9	63	37	6
35	0.9	37	63	6
36	0.9	37	63	6
37	0.9	85	15	6
40	0.9	85	15	6

Sistema de inyección

Volumen de inyección, 50 µL

Temperatura de columna: sin temperatura

Temperatura de muestras: 10 °C

Solución de lavado: Metanol: agua (50:50)

Sistema de detección

Longitud de onda: escaneo de 210-500 nm

Proporción de muestra: 5

Tiempo de filtrado: normal

Sistema de separación

Columna: YMC Carotenoid 3 μm , 4.6 x 250 mm column, No Parte: CT99S032546WT

Pre-columna: YMC Carotenoid 5 μm , 4.0 x 2.0 Guard Cartridge, No. Parte: CT99S050204WDA

Cuadro 23. Preparación de fases móviles para el sistema UPLC.

Reactivo/Mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Fase móvil A: Acetato de amonio 10 mM en una mezcla de agua/isopropanol (90:10).	<ul style="list-style-type: none">• 2-Propanol (J.T. Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0)• Acetato de Amonio (Merck, Cat. 1.01116.1000, CAS 631-61-8)• Acetato de Amonio• El agua que se utiliza en este procedimiento se obtiene por sistema Direct-Q3UV millipore. Ambos grado HPLC.	<ol style="list-style-type: none">1. Pesar 0.3854 g de acetato de amonio y vaciar en un frasco de vidrio de 500 mL.2. Con una probeta, medir 450 mL de agua y transferirlos al frasco que contiene el acetato de Amonio.3. Agitar el frasco hasta que el acetato de amonio esté completamente disuelto.4. Adicionar 50 mL de metanol.5. Agitar el frasco para que se mezclen.	<ul style="list-style-type: none">• Preparar el día de la extracción.• Filtrar por membrana de 0.2 μm y degasificar en ultrasonificador de 5 a 10 min.
Fase móvil B: ACN/isopropanol (90:10).	<ul style="list-style-type: none">• 2-Propanol (J.T. Baker, Cat. 9084-03, CAS 67-63-0)• Acetonitrilo (EMD Omnisolv Cat. AX0142-1 CAS 75-05-8)	<ol style="list-style-type: none">1. Con una probeta, medir 50 mL de isopropanol y transferirlos a un frasco de 500 mL.2. Adicionar 450 mL de acetonitrilo.3. Agitar el frasco para que se mezclen.	<ul style="list-style-type: none">• Preparar el día de la extracción.• Filtrar por membrana de 0.22 μm y degasificar en ultrasonificador de 5 a 10 min.

Condiciones cromatográficas para UPLC

El Sistema Acquity UPLC consta de varios módulos: Binary Solvent Manager, Sample Manager, horno para columnas de 30 cm y Detector de diodos (PDA).

Estación de trabajo Empower

Sistema de bombeo

Flujo: 0.3 mL/min.

Tiempo de corrida: 10 minutos.

Sistema de Bombeo: Gradiente

Fase móvil A: : Acetato de amonio 10 mM en una mezcla de agua/isopropanol (90:10).

Fase móvil B: Acetonitrilo/isopropanol (90:10).

Time	Flow	%A	%B	Curve
0.0	0.3	30.0	70.0	-
2.0	0.3	30.0	70.0	6
2.5	0.3	13.0	87.0	6
6.0	0.3	13.0	87.0	6
6.5	0.3	3.5	96.5	6
9.5	0.3	3.5	96.5	6
10.0	0.3	30.0	70.0	6

Sistema de inyección

Volumen de inyección: 2 μL .

Modo de inyección: Partial Loop with Needle Overfill.

Temperatura de columna: 35 °C

Temperatura de muestras: 10 °C

Solución de lavado débil: Agua: metanol 90:10 (900 μL)

Solución de lavado fuerte: Metanol: agua 90:10 (600 μL)

Sistema de detección

Longitud de onda: escaneo 300-498 nm

Proporción de muestra: 20

Tiempo de filtrado: Normal

Sistema de separación

Columna: Acquity UPLC BEH C8, 1.7 μ m 2.1 x 100 mm (No. Parte: 186002878)

Pre-columna: ACQUITY UPLC Col. In-Line Filter (No. Parte: Kit 205000343)

Cuadro 24. Soluciones a problemas comunes en la determinación de carotenoides.

Problema	Solución
Se observa variación en la coloración después de agregar KOH.	<ul style="list-style-type: none">• Verificar que se está agregando el volumen correcto.• Calibrar la pipeta.
Variación en los volúmenes de las soluciones durante la extracción.	<ul style="list-style-type: none">• Verificar que los tapones y empaques de los tubos estén bien colocados para evitar pérdidas por evaporación.
Evaporación incompleta o nula.	<ul style="list-style-type: none">• Programar períodos cortos (de pocos minutos) hasta completar todo el proceso.• Evitar evaporación con el uso de muestras muy frías (recién sacadas del refrigerador).• Verificar que el empaque de la tapa de la cámara de evaporación está colocado correctamente.
Presencia de película blanca semitransparente.	<ul style="list-style-type: none">• La película se genera cuando se agrega agua a las fracciones de hexano.• Evitar que la película pase a la solución que se va a evaporar, porque ensucia la columna y esto a la vez ocasiona que la presión del sistema aumente.• Asegurarse de que al concluir la centrifugación no se haya formado película. <p>Si esto ocurre, centrifugar una vez más.</p>
Presencia de líquido en los tubos después de la evaporación.	<ul style="list-style-type: none">• Asegurarse de que no se transfirió agua junto con el hexano.
Presencia de polvo amarillo en la tapa y el empaque de la cámara de evaporación.	<ul style="list-style-type: none">• Revisar que el empaque esté colocado correctamente y que la bomba se encuentre funcionando adecuadamente.
Presencia de burbujas en el cromatógrafo.	<ul style="list-style-type: none">• Verificar que los solventes se degasifican correctamente.• Purgar el UPLC.• Verificar que los filtros de las líneas de solvente se encuentren completamente sumergidos y no haya presencia de burbujas en dicha línea; de ser así, volver a purgar el UPLC.
Turbidez al resuspender la solución evaporada.	<ul style="list-style-type: none">• Evitar que pase agua al transferir el hexano.• Asegurarse de que no pasen partículas de harina durante la extracción.• Asegurarse de que la película blanca que se forma cuando se agrega agua al hexano no pase a la solución.
Ruido en los cromatogramas o no hay picos.	<ul style="list-style-type: none">• Verificar que el vial tenga suficiente volumen de la muestra.• 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.
Presión alta constantemente y aumento gradual de presión en la HPLC, o ambos.	<ul style="list-style-type: none">• Lavar la columna con agua y solvente orgánico sin sales al finalizar los análisis.• 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.	<ul style="list-style-type: none">• Verificar que los solventes se hayan degasificado y filtrado correctamente.• Purgar las líneas del HPLC.• 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 nuevamente.

Determinación de aluminio, hierro y zinc en grano, tejido vegetal de maíz y de trigo mediante la digestión con ácidos nítrico y perclórico y su análisis a través del ICP-OES

Con este procedimiento se lleva a cabo la determinación de Al, Fe y Zn en grano y tejido vegetal de maíz y de trigo por medio de digestión con una mezcla de ácidos nítrico y perclórico, así como análisis posterior con ICP-OES (plasma acoplado inductivamente a un espectroscopio de emisión óptica).

Cuadro 25. Reactivos que se utilizan en la determinación de Al, Fe y Zn.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Detergente neutro al 2%	Marca Citranox, Valconox, NJTSRN 1,800	A 20 mL de detergente agregarle un litro de agua desionizada.	<ul style="list-style-type: none"> • Usar equipo de protección (guantes de nitrilo y lentes de seguridad) porque el detergente es muy irritante para la piel y los ojos.
Mezcla ácida para la digestión (nítrico: perclórico en una relación 9:1)	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido nítrico al 70%, OmniTrace, EMD UN2031 CAS 7697-37-2 o equivalente. • Acido perclórico al 70%. Mallinckrott 2766, CAS 7601-90-3 	En una probeta de 1 L, colocar 100 mL de ácido perclórico y agregar ácido nítrico hasta obtener un volumen de 1 L.	<ul style="list-style-type: none"> • Usar equipo de protección porque es un reactivo muy peligroso que produce quemaduras graves en la piel. • Preparar en campana de extracción. • Utilizar recipientes de plástico (de preferencia, de polipropileno). • Almacenar a temperatura ambiente durante 2 meses como máximo.
Solución de ácido nítrico al 0.7%	Ácido nítrico al 70%, OmniTrace, EMD UN2031 CAS 7697-37-2 o equivalente	Diluir 10 mL de ácido nítrico en 1 litro de agua desionizada.	<ul style="list-style-type: none"> • Usar equipo de protección, porque este es un reactivo muy peligroso que produce quemaduras graves en la piel. • Preparar en una campana de extracción. • Utilizar recipientes de plástico (de preferencia, de polipropileno). • Almacenar a temperatura ambiente durante 2 meses como máximo.
Estándar intermedio de Al, Fe y Zn con una concentración de 100 mg/L	Estándares de Al, Fe y Zn. Perkin Elmer Pure Atomic Spectroscopy, 1000 µg/mL en una solución al 1% de HNO ₃	En un matraz aforado de 50 mL, agregar 5 mL de cada estándar (Al, Fe y Zn) y aforar con HNO ₃ al 1%.	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizar recipientes de plástico o de vidrio destinados solo para este propósito. • Almacenar a 4 °C durante 2 meses como máximo.
Argón	Argón ultra alta pureza 99.999 g/mol/mol mínimo Infra o equivalente		<ul style="list-style-type: none"> • Los tanques deberán permanecer fuera del área de trabajo para evitar contaminación y accidentes.

Procedimiento:

Acondicionamiento del área de trabajo y materiales utilizados en el análisis

1. Limpiar perfectamente la campana de extracción antes de cada predigestión.
2. Verificar que los digestores estén calibrados.
3. El lugar donde se coloque el ICP-OES debe estar perfectamente limpio y cerrado para evitar contaminación aérea.
4. El material que se utilice en este proceso deberá ser exclusivo para ICP.
5. Todo el material que vaya a utilizarse debe ser previamente inspeccionado para asegurarse de que no son una fuente de contaminación.

Molienda y secado de la muestra

6. Moler las muestras en un molino de bolas con recipientes de óxido de zirconio para evitar contaminación. Incluir siempre muestras testigo. Cuando se analicen granos de trigo no es necesario molerlos.
7. Transferir la harina a tubos de plástico limpios, que deberán inspeccionarse previamente para asegurarse de que no son fuente de contaminación.

8. Secar las muestras a 70 °C durante 24 horas en una estufa, debidamente acondicionada, para evitar contaminación.

Pesado y digestión

9. Colocar las muestras en un desecador y dejarlas enfriar a temperatura ambiente.
10. Pesar 600 mg de cada testigo y de cada muestra y colocarlos en los tubos de digestión. Los tubos deberán rotularse previamente.
11. Mantener los tubos cubiertos todo el tiempo con película plástica (Kleen Pack) antes de añadirles el ácido para la digestión, con el fin de que no se contaminen.
12. Colocar el grupo de tubos en el interior de la campana de extracción y agregarles 10 mL de la mezcla de ácidos nítrico y perclórico. Se recomienda usar dispensadores especiales para ácidos.
13. Dejar los tubos en la campana de extracción toda la noche (12-14 horas) para una predigestión en frío.
14. Después de la predigestión, en el vórtex, agitar los tubos para asegurarse de que la muestra se mezcle completamente con el ácido.
15. Colocar los tubos en los bloques de aluminio del digestor a temperatura ambiente y llevar a cabo la digestión ácida con el programa de digestión.
16. El intervalo de temperatura que se utilice dependerá del peso y del tipo de muestra. Normalmente, se aplica el régimen de temperaturas siguiente:

Cuadro 26. Programa de digestión que se utiliza en la determinación de Al, Fe y Zn, dependiendo del tipo de material.

Secuencia	Grano de trigo/harina de maíz	Tejido vegetal de trigo/maíz
1	Llegar a 80 °C	Llegar a 90 °C
2	Mantener a @ 20 min.	Dejar a @ 90 min.
3	Llegar a 100 °C	Llegar a 96 °C
4	Mantener a @ 20 min.	Mantener @ 96 min.
5	Llegar a 120 °C	Llegar a 100 °C
6	Mantener @ 120 min.	Permanecer @ 100 min.
7	Llegar a 130 °C	Llegar a 106 °C
8	Mantener @ 60 minutos	Mantener @ 106 min.
9	Llegar a 140 °C	Llegar a 116 °C
10	Mantener @ 30 minutos	Mantener @ 116
11	Llegar a 150 °C	Llegar a 120 °C
12	Mantener @ 50 minutos	Mantener @ 120 minutos
13	Llegar a 170 °C	Llegar a 126 °C
14	Mantener @ 40 minutos	Mantener @ 126 minutos
15	Llegar a 180 °C	Llegar a 145 °C
16	Mantener @ 15 minutos	Mantener @ 145 minutos
17	Llegar a 225 °C	Llegar a 160 °C
18	Mantener @ 7 minutos	Mantener @ 160 minutos
19	Fin	Fin

17. Al concluir el ciclo, retirar los tubos del digestor y dejar que se enfríen a temperatura ambiente.
18. Añadir 6.4 mL de ácido nítrico al 1%.
19. Cubrirlos con película plástica (Kleenpack) y dejarlos toda la noche en un lugar a temperatura constante (20-22 °C).
20. Al día siguiente, con ayuda de una pipeta aforar a 20 mL con ácido nítrico.
21. Mezclar muy bien las muestras diluidas. (Asegurarse de que el líquido se agite desde la base del tubo).
22. Transferir las soluciones a tubos de plástico de 50 mL, los cuales se rotulan con los mismos datos de la muestra y se almacenan a temperatura ambiente hasta que se analicen. Se pueden utilizar tubos de cualquier volumen, siempre y cuando éste sea de 30 mL en adelante, y después de haber verificado que no son fuente de contaminación.

23. Marcar tubos falcón de 15 mL de la misma manera que se hizo con los de 50 mL y añadirles 10 mL de las diluciones de cada muestra.
24. Inyectar las soluciones en el ICP-OES.
25. Las soluciones se analizan y se reportan como se indica a continuación.

Cálculos:

Curva de calibración

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de cada elemento analizado, en un intervalo de 0 a 3 mg/L. Dado que cuando la digestión concluye queda un sobrante de ácido perclórico de aproximadamente 1 mL al que hay que agregar 20 mL de ácido nítrico al 1%, la curva estándar deberá desarrollarse con una matriz igual a la de las muestras (5% de HClO₄ y HNO₃ al 1%). En el Cuadro 27 se indica cómo preparar 100 mL para cada punto de la curva.

Cuadro 27. Preparación de la curva estándar para la determinación de Al, Fe y Zn.

Concentración del estándar (mg/L)	Volumen de HClO ₄ al 100% (mL)	Volumen del estándar intermedio (mL)
0.0	5	0.0
0.5	5	0.5
1.0	5	1.0
2.0	5	2.0
3.0	5	3.0

Notas

- Homogeneizar y aforar a 100 mL con HNO₃ al 1%.
- Este es un paso crítico en el análisis porque, quien lo realice, deberá asegurarse de que la curva estándar se genere correctamente. Se recomienda verificar que las pipetas estén calibradas correctamente antes de usarlas.

Cálculo de la concentración de Al, Fe y Zn

El ICP-OES genera valores en mg/L de la concentración de cada muestra. Los valores se exportan a una hoja de cálculo y ahí se procesan de la manera siguiente:

1. Se determina la concentración de la muestra inyectada.

$$\text{Concentración final en la muestra (mg/L)} = \text{Concentración según resultados del equipo (mg/L)} - \text{Concentración del blanco (mg/L)}$$

2. Se calcula la concentración de cada elemento por kilogramo de muestra.

$$\text{Concentración (mg/Kg de muestra)} = \frac{\text{concentración final de la muestra (mg/L)} \times \text{dilución (mL)} \times 1000}{\text{peso de la muestra (mg)}}$$

Cuadro 28. Soluciones a problemas comunes en la determinación de Al, Fe y Zn.

Problema	Solución
Color amarillo de la solución al final de la digestión	<ul style="list-style-type: none"> • La digestión no ha llegado a su término. Dejarla 5 minutos más será suficiente.
Cristales de perclorato en la dilución después de la digestión	<ul style="list-style-type: none"> • Colocar los tubos en los bloques de digestión a 50 °C de 2 a 5 minutos para que se disuelvan los cristales de perclorato. • Los cristales de perclorato deberán disolverse cuando la solución esta tibia.
Problemas con el ICP	<ul style="list-style-type: none"> • Consultar el manual del equipo.

Determinación de antocianinas en granos de maíz pigmentados

Cuadro 29. Reactivos que se utilizan en la determinación de antocianinas.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Metanol al 80%	Metanol (Sigma-Aldrich Cat. M-1775-1GA CAS CAS 67-56-1)	• Mezclar 80 mL de metanol y 20 mL de agua desionizada.	• Preparar cada semana y conservar a 4 °C en una botella cerrada.
Ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en metanol al 80% con pH 1.4	TFA (Pierce Cat. 28901)	• Mezclar 1 mL de TFA con 90 mL de metanol al 80%. En un matraz volumétrico de 100 mL y aforar. • Ajustar el pH a 1.4 con HCl.	• Preparar cada semana y conservar a 4 °C en una botella cerrada.
Solución concentrada de cloruro de pelargonidina (100 µg/mL)	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% con pH 1.4.	• Proteger de la luz cubriendo el recipiente con papel aluminio y guardar en una botella cerrada. • A 4 °C se conserva hasta por un mes.

Procedimiento:

Muestreo y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Moler finamente cada muestra.

Secado

4. Secar las muestras durante 16 horas a 64-65 °C.

Extracción

5. Para cada muestra, pesar 20 mg de harina en un tubo Eppendorf.
6. Agregar 1.3 mL de TFA al 1%.
7. Tapar los tubos.
8. Agitar las muestras en el vórtex y colocarlas horizontalmente sobre hielo (4 °C) por una hora.
9. Agitar las muestras durante 90 minutos a 150 rpm.
10. Después de la incubación en hielo, centrifugar los tubos a 14,000 rpm durante 5 minutos. Asegurarse de que no haya partículas flotando en el sobrenadante; si esto ocurriera, centrifugue de nuevo.
11. Lea la absorbancia a 520 nm (primera extracción).
12. Vuelva a extraer el pellet con 1.3 mL de TFA al 1%.
13. Repetir los pasos 7 a 10.
14. Leer la absorbancia a 520 nm (segunda extracción).

Lectura de muestras en el espectrofotómetro:

15. Para cada extracción, tomar 200 µL del sobrenadante y transferirlo con mucho cuidado a la microplaca. La transferencia se hace por duplicado (dos pozos).
16. Siempre incluir muestras blanco (que corresponden al TFA al 1%) y muestras testigo con valores conocidos.
17. Cubrir la microplaca con cinta adhesiva de aluminio.
18. Agitar en el vórtex la microplaca a 800 rpm por 5 segundos.
19. Leer la absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro.
20. Para calcular el contenido total de antocianinas haga una suma de la cantidad de ambas extracciones.

Curva estándar

1. Preparar una solución concentrada de 100 µg/mL de cloruro de pelargodinina en TFA al 1%.
2. Preparar diariamente diluciones de 0, 1, 3, 5, 10 y 15 µg/mL (en TFA al 1%) en tubos de vidrio de 5 mL.
3. Agitarlas adecuadamente en el vórtex antes de usarlas.

Cuadro 30. Preparación de la curva estándar de antocianinas.

Tubo N°	Volumen de la solución concentrada de cloruro de pelargodinina 100 µg/mL (µL)	TFA al 1 % (µL)	Volumen total (mL)	Concentración de cloruro de pelargodinina µg/mL
1	0	2,500	2.5	0.0
2	25	2,475	2.5	1.0
3	75	2,425	2.5	3.0
4	125	2,375	2.5	5.0
5	250	2,250	2.5	10.0
6	375	2,125	2.5	15.0

Cálculos:

Curva de calibración

Desarrollar una curva de calibración usando cantidades conocidas de pelargodinina, en un intervalo de 0 a 15 µg/mL. Graficar las lecturas de la absorbancia a 520 nm en función de la concentración y calcular la pendiente de la curva estándar. Nótese que con la pendiente se usa la unidad DO*mL/µg.

Porcentaje de pelargodinina

La cantidad de pelargodinina en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Pel } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{\text{DO}_{520\text{nm}}}{\text{pendiente}} \times \frac{\text{volumen de la hidrólisis}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

Ejemplo:

$$\% \text{ Pel } (\mu\text{g}/\mu\text{g}) = \frac{0.225}{\frac{0.032 \text{ DO}}{\mu\text{g}/\mu\text{g}}} \times \frac{1.3 \text{ mL}}{20,000 \mu\text{g}} \times 100$$

Sin embargo, esta cantidad incluye la absorbancia de la placa y del metanol. Para calcular el contenido de pelargodinina en el material biológico (la harina), reste el valor de la absorbancia de la placa y el metanol (blancos).

$$\% \text{ pel} = \text{DO } 520 \text{ nm corregida} \times \text{Factor}$$

Donde:

$$\text{DO } 520 \text{ nm corregida} = \text{DO }_{520\text{nm}} \text{ muestra} - \text{DO }_{520\text{nm}} \text{ promedio de los blancos}$$

$$\text{Factor} = \frac{0.0065}{\text{pendiente}}$$

Nótese que:

$$\text{Factor} = \frac{1.3 \text{ mL}}{20,000} \times 100 = 0.0065$$

Determinación de almidón total en granos de maíz usando un ensayo modificado de megazyme

En la determinación de almidón megazyme se utiliza una digestión enzimática para extraer el polímero. En el presente protocolo, la hidrólisis de almidón se lleva a cabo en dos etapas. En la primera, el almidón es parcialmente hidrolizado y totalmente solubilizado; en la segunda, la mayoría de las dextrinas del almidón son hidrolizadas a glucosa por la amiloglucosidasa. La glucosa, entonces, se cuantifica colorimétricamente con el reactivo de antrona.

Cuadro 31. Reactivos que se utilizan en la determinación de almidón.

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)	<ul style="list-style-type: none"> • Agregar 10.46 g de MOPS (Sigma cat. No. M1254) en 900 mL de agua desionizada. • Ajustar el pH a 7.0 agregando la solución de hidróxido de sodio 1 M (4 g/100 mL). Se necesitan aproximadamente 28 mL. • Agregar 0.74 g de cloruro de calcio dihidratado y disolver. Ajustar el volumen a 1 L y almacenar a 4 °C. 	
Solución amortiguadora de acetato de sodio (200 mM pH 4.5)	Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich Cat. A-6283-250ML)	<ul style="list-style-type: none"> • Agregar 11.4 mL de ácido acético glacial (1.05 g/mL) a 900 mL en agua desionizada. • Ajustar el pH a 4.5 agregando la solución de hidróxido de sodio 2 M (8 g/100 mL). Se necesitan aproximadamente 50 mL. • Ajustar el volumen a 1 L. 	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenar a 4 °C.
α-amilasa (30 mL, 100 U/mL)	α-amilasa (Sigma-Aldrich Cat. 10070 CAS 9000-90-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver 61 mg de α-amilasa (Sigma cat. No. 10070, de <i>Bacillus subtilis</i>. 51.5 Unidades/mg), en 30 mL de solución amortiguadora MOPS (50 mM, pH 7). 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente y almacenar a 4 °C. • Agitar en el vórtex antes de usar la solución.
Amiloglucosidasa (2 mL, 200 U/mL)	Amiloglucosidasa (Sigma-Aldrich Cat. 10115)	<ul style="list-style-type: none"> • Disolver 5 mg de amiloglucosidasa (Sigma 10115, de <i>Aspergillus niger</i>), en 2 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio (200 mM, pH 4.5). 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente y almacenar a 4 °C. Agitar en el vórtex antes de usar la solución.
Ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico (Merck Cat. 1.00732.2500)		
Reactivo de antrona	Antrona (Merck Cat. 1.01468.0010)	<ul style="list-style-type: none"> • Una hora antes de usarlo, pesar 100 mg de antrona y disolverla en 50 mL de ácido sulfúrico concentrado grado analítico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • Proteger de la luz, mantener en hielo o en refrigeración.
Solución concentrada de glucosa (100 µg/mL)		<ul style="list-style-type: none"> • Secar la glucosa durante 1 hora a 105 °C. • Disolver 50 mg de glucosa en 100 mL de agua desionizada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar cada semana y almacenarlo a 4 °C. Agitarla en el vórtex con mucho cuidado antes de preparar las diluciones para la curva estándar.

Recomendaciones para el reactivo de antrona

- a) El ácido sulfúrico deberá ser de grado analítico y almacenarse en la oscuridad.
- b) El reactivo antrona deberá transferirse a un tubo tipo falcón. El tubo deberá cubrirse con papel aluminio y conservarse a 4 °C en refrigeración.
- c) Las medidas de seguridad para la preparación de antrona incluyen el uso de ropa protectora, guantes y una campana de extracción.

Procedimiento:

Toma de muestras y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Si las semillas han sido tratadas, lavarlas intensamente con agua de la llave y luego enjuagarlas con agua destilada. Dejar que se sequen.
4. Moler finamente cada muestra. Si es posible, usar un molino ciclónico con una malla de 0.5 mm.

Desengrasado

5. Transferir cada muestra a un cartucho de papel filtro comercial (por ejemplo, de 10 x 11 cm).
6. Desengrasar las muestras durante 6 horas, con aproximadamente 300 mL de hexano en cada matraz bola y en un extractor tipo Soxhlet.
7. Secar las muestras al aire y asegurarse de que se evapore todo el hexano.

Extracción

8. Para cada muestra, pesar 20 mg de polvo en un tubo de vidrio (20 x 150 mm). Golpear suavemente el tubo para asegurarse de que todas las partículas caigan en el fondo del tubo.
9. Incluir siempre dos tubos con el estándar de almidón.
10. Humedecer con 40 μ L de etanol acuoso al 80 % (V/V) para mejorar la dispersión; esperar 5 min y mezclar en un vórtex.
11. Agregar inmediatamente 600 μ L de α -amilasa en amortiguador MOPS (50 μ M, pH 7.0) y agitar vigorosamente el tubo en el vórtex. Incubar el tubo en baño María, con agua hirviendo, durante 6 min, sacar los tubos después de 2 min y 4 min, agitar vigorosamente en el vortex para evitar la formación de grumos y obtener una suspensión homogénea.
12. Colocar los tubos en baño maría a 50 °C (esperar 5 min a que se enfríen a 50 °C); agregar amortiguador de acetato de sodio (800 μ L, 200 mM, pH 4.5) y luego la amiloglucosidasa (20 μ L, con una pipeta digital). Agitar cada tubo en el vórtex e incubar a 50 °C por 30 min.
13. Transferir el contenido del tubo de ensayo a un tubo Corning de plástico de 50 mL. Con una pipeta tomar 540 μ L de agua desionizada y enjuagar con ésta el tubo de vidrio. Mezclar el contenido y transferirlo a un tubo plástico Corning de 50 mL. Con 6 mL de agua desionizada en un dispensador, enjuagar 3 veces el tubo de vidrio (mezclar muy bien cada vez que se enjuague) y trasferir el contenido al tubo de plástico Corning.
14. Centrifugar el tubo Corning de 50 mL a 3,000 rpm durante 10 min. Asegurarse de que no haya partículas flotando en el sobrenadante. Si esto ocurriera, centrifugar otra vez.
15. Tomar 1 mL del hidrolizado (sobrenadante) y transferirlo con cuidado a un tubo de vidrio (20*150 mm).
16. Agregar 9 mL de agua desionizada, cubrir inmediatamente y agitar en el vórtex.

Reacción colorimétrica

17. Con una pipeta digital, tomar 50 μ L de la dilución y transferir a una microplaca de 96 pozos. Después de transferir todas las alícuotas, colocar la microplaca sobre una capa de hielo durante 10 minutos.
18. Cada muestra se debe analizar por triplicado (tres pozos).
19. Agregar 100 μ L de la solución de antrona utilizando una pipeta multicanal digital.

Nota: Es muy importante asegurarse de agregar 100 μ L, ya que la solución es viscosa. La antrona debe agregarse lentamente para que la reacción no sea muy violenta.

20. Cubra las microplacas con cinta adhesiva de aluminio, para evitar salpicaduras, y colóquelas en un agitador hasta obtener una solución homogénea en cada pozo.
21. Incubar la microplaca a 100 °C durante 10 minutos.
22. Enfriar las microplacas en un refrigerador durante 10 min y luego agitarlas muy bien en el vórtex, antes de leer la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro.

Curva estándar

1. Preparar una solución concentrada de 0.5 mg/mL de glucosa seca en agua desionizada (se prepara cada semana y se almacena a 4 °C).
2. En tubos de vidrio de 50 mL, preparar diariamente diluciones 0, 12.5, 25, 37.5, 75 y 100 µg/mL (en agua desionizada). Agitarlas muy bien en el vórtex antes de usarlas.
3. Producir la reacción colorimétrica (pasos 17 a 22) usando 50 µL de las diluciones.
4. Incluir siempre una curva estándar por duplicado para cada grupo de muestras que se analizan en el día.

Cuadro 32. Preparación de la curva estándar de almidón.

Tubo N°	Solución concentrada de glucosa 100 µg/mL (mL)	Agua desionizada (mL)	Solución concentrada de glucosa 100 µg/mL (mL)	Volumen total (mL)	Concentración µg glucosa/mL
1	0.0	19.5	0.5	20.0	0.0
2	0.5	19.0	0.5	20.0	0.0125
3	1.0	18.5	0.5	20.0	0.025
4	1.5	18.0	0.5	20.0	0.0375
5	3.0	16.5	0.5	20.0	0.075
6	4.0	15.5	0.5	20.0	0.100

Cálculos:

Curva de calibración

Desarrollar una curva de calibración utilizando cantidades conocidas de glucosa, que van de 0 a 0.1 mg/mL. Hacer las lecturas de la absorbancia a 630 nm en función de la concentración y calcular la pendiente de la curva estándar. Nótese que con la pendiente se usa la unidad DO* mL/mg.

Cálculo del porcentaje de glucosa:

La cantidad de glucosa en cada muestra se estima utilizando la siguiente ecuación:

1. Definir la ecuación de regresión relacionando la concentración de glucosa en las soluciones estándar con la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro. Para la regresión se utiliza la siguiente fórmula: $Y_g = b(x)$

Donde Y_g son las unidades de absorbancia 630 nm, b es la pendiente y x la concentración de glucosa.

2. Calcular la cantidad de glucosa en la muestra, 1) restando el valor del blanco de la lectura de absorbancia de la muestra; y 2) dividiendo la absorbancia corregida entre la pendiente. Para calcular la cantidad del porcentaje de glucosa, utilizar la ecuación general siguiente:

$$\text{Almidón (mg/100 mg) de harina} = x \cdot d_f \cdot v \cdot h_f \cdot 100 / d_w$$

Donde:

- x = concentración de glucosa (mg/mL)
- d_f = factor de dilución (por ejemplo, 10 para una dilución 1:9)
- v = volumen original del extracto de almidón (20 mL)
- d_w = peso original de la harina (20 mg)
- h_f = factor de hidrólisis del almidón, 0.9.

Para expresar los resultados en porcentaje de peso seco, considerar el contenido de humedad aplicando la fórmula siguiente:

$$= \% \text{ almidón (valor)} \times (100) / (100 - \text{contenido de humedad}) (\% \text{ w/w})$$

Cuadro 33. Solución a problemas comunes en la determinación de almidón.

Problema	Solución
Formación de grumos y la solución no es homogénea en la extracción.	Asegurarse de que el baño María tiene suficiente agua para que la muestra no se esparza hacia la parte superior del tubo, ya que esto afecta la eficiencia de la extracción.

Determinación de amilosa en granos de maíz

El almidón, que es el componente principal de los granos maduros de maíz, está formado por dos macromoléculas de diferente estructura: la amilosa —un polímero lineal de glucosas unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucosídico, y ocasionalmente por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow6)$ — y amilopectina —un polímero altamente ramificado.

La amilosa en presencia de una solución de Lugol (triyoduro) forma un complejo de color azul con λ_{max} a 620 nm. Este protocolo propone utilizar la reacción de yoduro para cuantificar el contenido de amilosa en almidón de maíz, en una longitud de onda de 620 nm.

Cuadro 34. Reactivos que se utilizan en la determinación de amilosa.

Reactivo/mezcla	Reactivos específicos	Preparación	Recomendaciones especiales
Etanol, 95 % (V/V)	Etanol (Merck Cat. 1.00983.2500)		
Hidróxido de sodio 1 M	Hidróxido de Sodio (Merck Cat. 1.06498.500)	Disolver 4 g de hidróxido de sodio en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada y llevar al aforo.	
Hidróxido de sodio 0.1 M		Diluir 10 mL NaOH 1 M en un matraz volumétrico de 100 mL con agua desionizada y llevar al aforo.	
Ácido acético 1 M	• Ácido acético glacial (Sigma-Aldrich Cat. A-6283-100ML)	5.67 mL en 100 mL de agua desionizada.	
Solución de Lugol	• Yoduro de potasio (J.T. Baker 3162) • Yodo (W.H. Curtin & Co. Cat. 35030)	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 2 g de KI. Agregar un poco de agua desionizada hasta formar una solución saturada; a continuación, agregar 0.2 g de I_2. • Asegurarse de que todo el yodo se haya disuelto antes de transferir la mezcla a un matraz volumétrico de 100 mL. • Agregar agua desionizada para completar el volumen y homogenizar la solución. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar diariamente. • Proteger de la luz.
Estándar de amilosa 1 mg/mL	Amilosa de papa tipo III. Cat. Sigma No. A0512-5G	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar 100 mg de amilosa en un matraz volumétrico de 100 mL. • Agregar 1 mL de etanol al 95 % y tratar de que se deslice por las paredes del matraz. • Agregar 9 mL de hidróxido de sodio 1 M y dejar reposar la mezcla de 20 a 24 h a temperatura ambiente. • Al día siguiente ajustar el volumen a 100 mL con agua desionizada y agitar vigorosamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparar cada semana y almacenar a 4 °C.

Procedimiento:

Toma de muestras y molienda

1. Tomar al azar de 20 a 30 semillas como muestra representativa del material.
2. Asegurarse de que todas las semillas de la muestra tengan un contenido de humedad similar.
3. Si las semillas han sido tratadas, lavarlas intensamente con agua de la llave y luego enjuagarlas con agua destilada. Dejar que se sequen.
4. Moler finamente cada muestra. Si es posible, usar un molino ciclónico de 0.5 mm.

Desengrasado

1. Transferir cada muestra a un cartucho de papel filtro comercial (por ejemplo, de 10 x 11 cm).
2. Desgrasar las muestras con aproximadamente 300 mL de hexano por matraz balón, en un extractor continuo de tipo Soxhlet, durante 6 horas.
3. Secar las muestras al aire y asegurarse de que todo el hexano se ha evaporado.

Extracción

4. Pesar 20 mg de cada muestra de polvo desengrasado en un tubo Corning de 50 mL.
5. Siempre incluir dos tubos con los estándares de amilosa.
6. Agregar 0.2 mL de etanol al 95 % y tratar de que se deslice por las paredes del tubo.
7. Agregar 1.8 mL de hidróxido de sodio 1 M y dejar reposar a temperatura ambiente de 20 a 24 h (no agitar el tubo).
8. Al día siguiente, ajustar el volumen a 20 mL con agua desionizada (18 mL) y agitar con fuerza el tubo.

Nota: Dejar reposar y continuar con la reacción colorimétrica hasta que disminuya la cantidad de espuma que se formó.

Reacción colorimétrica

9. Tomar 1 mL de solución y transferirla a un tubo Corning de 50 mL.
10. Agregar 2 mL de ácido acético 1 M y agitar con fuerza.
11. Después, agregar 0.4 mL de solución de Lugol y ajustar el volumen a 20 mL (18.4 mL de agua desionizada). Agitar la mezcla y dejar que se desarrolle color por 20 minutos (proteger la mezcla de los tubos de luz).
12. Pipetear 200 μ L tanto de la solución de la curva estándar como de cada muestra y transferir el producto a una placa de 96 pozos. Haga una lectura a 620 nm en un espectrofotómetro.

Nota: No agitar las muestras antes de transferirlas a la placa para no alterar los resultados.

Curva estándar

1. Preparar una solución concentrada de 1 mg/mL de amilosa en agua desionizada (almacene a 4 °C).
2. En tubos de 50 mL, preparar diariamente diluciones 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g de amilosa, con un volumen final de 20 mL. Agítelas en el vórtex antes de usarlas.
3. Preparar la reacción colorimétrica (pasos 13 a16) utilizando 200 μ L de las diluciones.
4. Siempre incluir una curva estándar por duplicado por cada grupo de las muestras analizadas en un día.

Cuadro 35. Preparación de la curva estándar de amilosa.

Tubo núm.	Sol. concentrada de amilosa 1 mg/mL (mL)	Ácido acético (1 Mol/mL) (mL)	Solución de yodo (mL)	NaOH (0.09 M) (mL)	Agua desionizada (mL)
1	0.0	0.2	0.4	1	18.40
2	0.2	0.04	0.08	0	19.68
3	0.4	0.08	0.16	0	19.36
4	0.6	0.12	0.24	0	19.04
5	0.8	0.16	0.32	0	18.72
6	1.0	0.20	0.40	0	18.40

Cálculos:

Curva estándar de amilosa (curva de calibración)

Desarrollar una curva de calibración con cantidades conocidas de amilosa, de 0 a 1 mg. Graficar las lecturas de absorbancia a 620 nm como una función de la cantidad y calcular la pendiente de la curva estándar.

Cálculo del porcentaje de amilosa

La cantidad de amilosa en cada muestra se estima utilizando las ecuaciones siguientes.

1. Determinar la ecuación de regresión relacionando la cantidad de amilosa en la solución estándar con la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro. Aplicar la fórmula de regresión siguiente:

$$Y_g = a(x) + b$$

Donde **Y_g** son las unidades de absorbancia a 620 nm; **a** es la pendiente; **x** la cantidad de amilosa; y **b** la intersección (esto corresponde a la AP "aproximación de absorción").

2. Para calcular la cantidad de amilosa en la muestra: 1) reste el valor del blanco al de la lectura de absorbancia de la muestra; 2) reste la intersección; y 3) divida la absorbancia corregida por la pendiente. La ecuación general para calcular la cantidad del por ciento de amilosa es:

$$\% \text{ AM} = (x * d) * (100/f)$$

Donde:

x = cantidad de amilosa (mg)

d = factor de dilución (por ejemplo, 20 para una dilución 1:19); y

f = peso original de la harina (20 mg).

Anexo 1

Intervalo de lecturas esperado en concentraciones estándar.

3. Determinación de triptófano con ácido glioxílico (lectura en microplacas).

Concentración estándar (µg/mL)	Intervalo de lecturas
0	0.04-0.05
10	0.075-0.09
15	0.095-0.120
20	0.125-0.145
25	0.155-0.175
30	0.195-0.215

Si se emplean estos valores, el factor de la curva deberá tener un valor de 0.6818 a 0.7332.

4. Contenido de fenoles libres y totales en maíz utilizando el reactivo F-C (extracción en tubos Eppendorf y lectura en microplacas).

Concentración estándar (µg/mL)	Intervalo de lecturas
0	0.045-0.055
10	0.195-0.215
15	0.265-0.285
20	0.345-0.370
25	0.400-0.420
30	0.495-0.515

5. Determinación de azúcares solubles en trigo utilizando el reactivo antrona (extracción en tubos grandes y lectura en microplacas).

Concentración estándar (µg sacarosa/mL)	Concentración estándar (µg de sacarosa en 2.5 mL)	Intervalo de lecturas
0	0	0.05-0.07
6	0.3	0.090-0.115
12	0.6	0.145-0.165
18	0.9	0.190-0.210
24	1.2	0.250-0.270
30	1.5	0.290-0.310
40	2.0	0.360-0.390
60	3.0	0.510-0.540

6. Antocianinas con 1% de TFA y pH 1.4 (extracción en tubos grandes y lectura en microplacas).

Concentración estándar (µg Pel/mL)	Intervalo de lecturas
0	0.040-0.045
1	0.085-0.095
3	0.165-0.175
5	0.255-0.275
10	0.485-0.525
15	0.710-0.780

7. Determinación de almidón (lectura en microplacas).

Concentración estándar (μg glucosa/mL)	Lectura aproximada
0	0.05
1	0.136
3	0.218
5	0.300
10	0.540
15	0.700

8. Determinación de amilosa (lectura en microplacas).

Concentración estándar (μg amilosa/mL)	Lectura aproximada
0	0.04
1	0.166
3	0.316
5	0.449
10	0.569
15	0.738

Anexo 2

Resumen de los análisis realizados en el Laboratorio de Calidad Nutricional de Maíz y Tejido Vegetal.

Análisis	Instrumento	Cantidad de grano (g)	Especificación del grano	Recomendaciones
Proteína (por digestión)	Technicon Autoanalyzer II	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Proteína por NIR	NIRS 6500	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Triptófano	Método colorimétrico en micro placa	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio
Lisina	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Almidón	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Amilosa/ amilopectina	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
% Cenizas	Método gravimétrico	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Carotenoides	HPLC Alliance, UPLC Acquity	3-5	Grano completo	Evitar la luz y mantener en refrigeración.
Aceite	Extractor Goldfisch, Soxtec 2050	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio.
Fenoles libres	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio, evitar la luz.
Fenoles totales	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio, evitar la luz.
Antocianinas totales	Método colorimétrico en microplaca	3-5	Grano completo o partido	Usar viales de plástico o vidrio, evitar la luz.
Micronutrientes (Fe, Al, Zn, Ti)	ICP-OES Optima DV 3000	3-5	Grano completo	Evitar contacto con metales.

Recomendaciones

- a. Para obtener resultados más confiables es mejor utilizar grano completo.
- b. La cantidad de grano que aparece en la tabla sirve para realizar el respectivo análisis de una muestra; para un análisis completo se necesitan 10 g de grano de cada muestra.

Anexo 3

a) Especificaciones para análisis de alta calidad proteínica (QPM).

Análisis	Límite inferior (%)	Especificación (%)	Límite superior (%)
Proteína	<8.0	8-11	>11
Proteína por NIRS	<8.0	8-11	>11
Triptófano	<0.06	0.06-0.070	>0.07
Lisina	<0.20	0.20-0.30	>0.30

b) Especificaciones para el análisis de micronutrientes en trigo.

Análisis	Límite inferior (mg/Kg)	Especificación (mg/Kg)	Límite superior (mg/Kg)
Fe	<25	25-32	>32
Zn	<23	23-40	>40
Al (indicador de contaminación)		No mayor de 3.5	
Ti (indicador de contaminación)		No mayor de 0.4	

c) Especificaciones para el análisis de micronutrientes en hoja de maíz.

Análisis	Límite inferior (mg/Kg)	Especificación (mg/Kg)	Límite superior (mg/kg)
Fe	<14	14-25	>25
Zn	<15	15-30	>30
Al (indicador de contaminación)		No mayor de 2	
Ti (indicador de contaminación)		No mayor de 0.4	

d) Especificaciones de otros análisis.

Análisis	Límite inferior (%)	Especificación (%)	Límite superior (%)
Azúcares solubles en paja	<10.0	10-25	>25.0
Azúcares por NIRS en paja de trigo molido	<10.0	10-25	>25.0
Almidón	<60.0	60-70	>70.0
Amilosa/amilopectina	<15.0	15-25	>25.0
Cenizas			
Cenizas por NIRS en hojas de maíz molido			
Contenido de aceite	<3.5	3.5-5.5	>5.5

Análisis	Límite inferior (µg/g)	Especificación (µg/g)	Límite superior (µg/g)
Antocianinas totales	<300	300-500	>500

Análisis	Límite inferior (µmol/g)	Especificación (µmol/g)	Límite superior (µmol/g)
Fenoles libres	<5	5-10	>10
Fenoles totales	<15	15-25	>25

Recomendaciones:

- Antes de considerar estos intervalos deberá tenerse en cuenta el tipo de muestra, el experimento y la etapa de crecimiento de la planta de la cual proviene la muestra.
- El contenido de almidón y de aceite no pueden ser analizados en harina debido a la oxidación.

Referencias

- American Association of Cereal Chemists (AACC). 1976. Approved methods of the AACC, St. Paul, MN.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1975. 7th Ed. Washington, D.C.
- Braverman, J.B.S. Introducción a la bioquímica de alimentos. Traducción por Sanz, P.B. y Justino B.G, 1967, Ediciones Omega, Barcelona, España.
- Chitchumroonchokchai C., Schwartz S.J., Failla, M.L. Assessment of lutein bioavailability from meals and a supplement using simulated digestion and Caco-2 human intestinal cells. *J. Nutr.* 2004; 134:2280-2286.
- Dubois, M.K. *et al.*, Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1965, 28: 350-356.
- Ferruzzi, M.G., Failla, M.L., Schwartz, S.J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2082-2089.
- Garrett, D.A., Failla, M.L., Sarama R.J. Development of an *in vitro* digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 4301-4309.
- Howe, J.A. y Tanumihardjo, S.A. Evaluation of Analytical Methods for Carotenoid Extraction from Biofortified Maize (*Zea mays* sp.). *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54:7992-7997.
- Joslyn, M.A. Methods in food analysis. Academic Press., New York, 1976, 2nd. Edition Chapter XVI: 475–509.
- Kurilich, Anne C. y Juvik, John A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47: 1948-1955.
- Megazyme, AMYLOSE/AMYLOPECTIN assay procedure.
- M. Sene, C. Thevenot y J.L.Prioul. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Amylose and Amylopectin in Starch from Maize Kernel by Multi-wavelength Analysis. *Journal of Cereal Science*, 1997, 26: 211-221.
- Nurit, E., Tiessen, A., Pixley, K., Palacios-Rojas, N. A reliable and inexpensive colorimetric method for determining protein-bound tryptophan in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57:7233-7238.
- Oomen, A.G., Rompelberg, C.J.M., Bruil, M.A., Dobbe C.J.G., Pereboom, D.P.K.H., Sips, A.J.A.M. Development of an *in vitro* digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003; 44:281-287.
- Salinas Moreno, Y., Vázquez Carrillo, G. (Eds). Metodologías de análisis de calidad nixtamalera-tortillera en maíz. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto técnico No. 1, 2006.
- Stangoulis, J., Sison, C. (Eds). Crop sampling protocols for micronutrient analysis. HarvestPlus Technical monograph, 7:2008.

ISBN: 978-607-95844-5-0



Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

Apartado Postal 6-641, 06600 México, D.F., MEXICO.

Sito web: www.cimmyt.org