



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS EN
MANZANA POR CROMATOGRAFIA DE GASES Y
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA
EFICIENCIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
LUIS EDGARDO VELASCO ROSAS



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO.



EXAMENES PROPRIETARIOS
FAC. DE QUÍMICA

Presidente	Prof. Patricia Elizalde Galván.
Vocal	Prof. Josefina Vlades Trejo.
Secretario	Prof. Fernando León Cedeño.
1er. Suplente	Prof. Blas Flores Pérez.
2do. Suplente	Prof. Lucía Cornejo Barrera.

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA.

Dpto. Química Orgánica. Lab. 201 División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor:

Patricia Elizalde Galván
Q. Patricia Elizalde Galván.

Supervisor Técnico:

Elba Rojas Escudero
Q. Elba Rojas Escudero.

Sustentante:

Luis Edgardo Velasco Rosas
Luis Edgardo Velasco Rosas.

DEDICATORIAS.

Con mucho amor y agradecimiento a Yanira, por todo lo que hemos y seguiremos compartiendo. Gracias.

A mi pequeña Karen, ilusión de mi vida.

A mis padres, por darme la vida y crear a un ser de provecho.

Especialmente a ti mamá por haberme dado más de lo que merecía, por apoyarme en todas mis desiciones y sobre todo por tu amistad a lo largo de esta vida.

A mis mejores amigos Yara y Alejandro, por el apoyo que siempre me han brindado y por darme la oportunidad de ser parte de su vida.

A todas aquellas personas que me han brindado su amistad y su apoyo. Gracias.

A Dios...

AGRADECIMIENTOS.

A Paty, Elba y Lety por su amistad, apoyo, y confianza durante todo este tiempo y sobre todo por su valiosa e inmejorable asesoría en la realización de nuestro trabajo. Gracias por todo.

Al Dr. David Díaz por facilitarnos la columna Carbohydrate Analysis

Al H. Jurado por su colaboración en la revisión de esta tesis.

INDICE.

	PAG.
I. OBJETIVO.	1
II. INTRODUCCION.	2
III. ANTECEDENTES.	4
Cromatografía	5
Cromatografía de Gases	7
Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	13
Análisis Cualitativo	20
Análisis Cuantitativo	23
Interpretación Cuantitativa de un cromatograma	24
Normalización Interna	25
Técnica de Bracketing	26
Utilización de los Factores de Respuesta del Detector	28
Estándar Externo	30
Estándar Interno	32
IV. MATERIAL Y METODOS.	34
Condiciones Cromatográficas	35
Extracción de azúcares	36
Formación del derivado silylado	38
Cuantificación de los carbohidratos en manzana por CG	38
Cuantificación de los carbohidratos en manzana por CLAE	40

V. RESULTADOS.	44
VI. DISCUSION DE RESULTADOS.	56
VII. CONCLUSIONES.	58
VIII. BIBLIOGRAFIA.	59

I. OBJETIVO.

Establecer las condiciones cromatográficas y metodología adecuada para resolver eficientemente los carbohidratos presentes en la manzana, así como efectuar el análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos por cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, como técnicas de análisis comparativos.

II. INTRODUCCION.

Los carbohidratos son importantes en los alimentos ya que representan la principal fuente de energía, forman parte de tejidos de frutos y vegetales. Además, de acuerdo a su estructura química participan en las características de sabor, viscosidad, estructura y color (1). Es por esta razón que el análisis de mezclas de estos compuestos en alimentos es generalmente una parte importante del control y aseguramiento de la calidad.

La determinación de los carbohidratos se ha llevado a cabo tradicionalmente por métodos físicos indirectos (refractometría, polarimetría, hidrometría) o por métodos químicos semi-empíricos (análisis volumétrico, gravimetría, colorimetría). Estos métodos están basados en la formación de productos o intermediarios coloridos, que son el resultado de reacciones de degradación o condensación de estos compuestos en ácidos minerales fuertes con varios compuestos orgánicos. La formación de estos productos o intermediarios se basa en las propiedades reductoras del grupo carbonilo (prueba de Fehling) (2); o en un rompimiento oxidativo de grupos hidroxilos vecinos (2,3). También se han utilizado métodos enzimáticos, pero estos están limitados a unos cuantos carbohidratos (4-7) y otras técnicas como cromatografía en papel, en capa fina o en columna (8).

La caracterización de estos compuestos mediante técnicas más sofisticadas, como CG (Cromatografía de Gases), no era posible debido a la falta de volatilidad de estos compuestos.

Los primeros análisis de carbohidratos por CG datan de 1958, e implicaban la aplicación de la técnica de trimetilsililización, por medio de la cual un compuesto puede hacerse volátil al hacer el derivado apropiado del grupo hidroxilo (9).

La CG llegó a ser la técnica líder para el análisis de carbohidratos en alimentos hasta la mitad de 1970 cuando surgieron las primeras aplicaciones de CLAE (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia), que es una técnica más versátil, debido a la rapidez del análisis, pues permite la inyección directa de la muestra sin previa derivatización y no requiere de altas temperaturas (10,11).

En el presente trabajo se efectuó un análisis cualitativo y cuantitativo de los carbohidratos presentes en la manzana variedad Starking, que es una de las más consumidas en nuestro país. Este análisis se llevó a cabo mediante CLAE y CG como métodos comparativos.

III. ANTECEDENTES.

La clasificación de los carbohidratos de importancia en alimentos, se puede hacer de acuerdo con cuatro diferentes criterios: a) por su estructura química, b) por su abundancia en la naturaleza, c) por su uso en alimentos, y d) por su poder edulcorante. La forma más comunmente empleada es la que se refiere a su estructura química, la cual se basa en el tamaño de la molécula o el número de átomos de carbono que contenga. Así tenemos que los carbohidratos pueden ser simples (mono y disacáridos), oligosacáridos y polisacáridos (12).

Comunmente se encuentran fracciones de carbohidratos simples en frutos (sacarosa, glucosa y fructosa), en productos lácteos (galactosa y lactosa). Algunas fracciones de oligosacáridos de la familia de la rafinosa se encuentran en las leguminosas y algunos polisacáridos constituyen la fibra dietética y gomas, otros como el almidón constituyen el endospermo de algunas semillas (10).

Estos compuestos han sido analizados por diversas técnicas, y entre las más recientes se encuentran CG y CLAE (8,13). Para ser analizados por CG se requiere formar un derivado del carbohidrato con el objeto de hacerlo volátil, lo cual se logra empleando la reacción de silylación. Dicha reacción consiste en reemplazar un átomo de hidrógeno activo por el grupo trimetilsililo. En teoría, pueden ser trimetilsililados todos los compuestos que contengan en su estructura grupos hidroxilo, amino y sulfhidrilo (9,14-18).

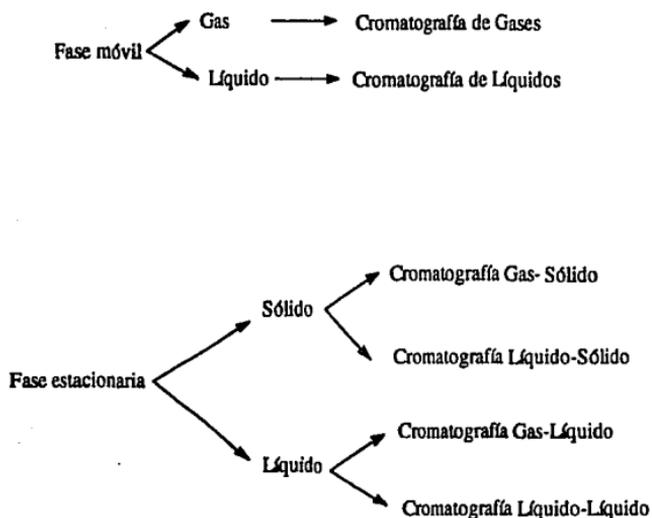
Los reactivos más utilizados para efectuar la trimetilsililación sobre grupos hidroxilos son: combinaciones de Hexametildisilazano (HMDS) y Trimetilclorosilano (TMCS), N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N,O-Bis (trimetilsilil) acetamida (BSA), N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), (Isopropeniloxi) trimetilsilano (IPOTMS), N-(trimetilsilil) dimetilamina (TMSDMA) y N-(trimetilsilil) imidazol (TMSIM) (14,19,20).

La combinación de HMDS y TMCS es la preferida porque la derivatización ocurre rápidamente a temperatura ambiente con rendimientos virtualmente cuantitativos, además produce un solo pico para cada carbohidrato y su costo es menor.

CROMATOGRAFIA.

La palabra cromatografía se deriva de los vocablos griegos "khromatos", que significa color y "graphos" que significa escritura. La cromatografía fué descubierta por el botánico Tswett (1903), al separar por primera vez pigmentos de plantas utilizando una columna de vidrio empacada con material adsorbente (21). Desde entonces han sido desarrolladas diversas técnicas cromatográficas basadas en el principio de adsorción o partición.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes de la muestra se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria que presenta una gran superficie de contacto y una fase móvil que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria (22). De acuerdo a las características de estas dos fases existen los siguientes tipos de cromatografía (23,24,25):



El uso de técnicas cromatográficas en la industria alimentaria, permite determinar compuestos de gran interés, entre los cuales podemos citar a los carbohidratos, ácidos carboxílicos, proteínas, aminoácidos, aflatoxinas y vitaminas entre otros compuestos, en forma rápida y sencilla (26).

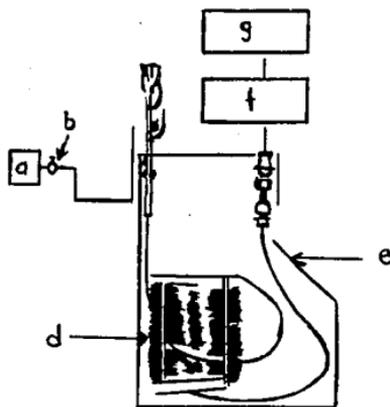
CROMATOGRAFIA DE GASES (CG).

En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas y la estacionaria puede ser un líquido o un sólido. Cuando la fase estacionaria es un líquido adsorbido en un sólido, se le llama cromatografía gas-líquido (CGL); y el mecanismo de separación es por partición. Cuando la fase estacionaria es un sólido se le llama cromatografía gas-sólido (CGS) y el mecanismo de separación es por adsorción (27).

La cromatografía de gases es una técnica que sirve para llevar a cabo la separación de sustancias volátiles por medio del paso de una corriente de gas inerte sobre la fase estacionaria, así los componentes a separar son llevados a través de la columna por el gas acarreador o portador. Bajo estas condiciones la muestra se reparte entre el gas portador y la fase estacionaria, la cual retiene selectivamente los componentes de la muestra de acuerdo a sus coeficientes de distribución hasta que estos formen bandas separadas en el gas portador, las cuales salen de la columna en la corriente del gas y se registran como una función de tiempo por el detector. El registro gráfico obtenido se denomina cromatograma (28).

Un cromatógrafo de gases consta de las siguientes partes (29):

- a) Depósito de la fase móvil.
- b) Medidor de flujo.
- c) Sistema de inyección.
- d) Columna.
- e) Horno.
- f) Detector.
- g) Registrador.



La fase móvil o gas portador, es un gas de gran pureza que se suministra a alta presión, los gases más utilizados en Cromatografía de Gases son: Hidrógeno, Helio, Nitrógeno y Argón. Las principales consideraciones en la elección de la fase móvil son (30):

- a) Que sea inerte.
- b) De bajo costo.
- c) Alta seguridad.
- d) Compatible con el detector.

El regulador de presión con dos indicadores ayuda a controlar el flujo de gas portador. El indicador de presión del regulador, más cercano al cilindro, indica la presión de distribución en el sistema. El cromatógrafo debe disponer de algún sistema para la introducción de la muestra en la columna. Generalmente, este sistema consiste en una jeringa hipodérmica y un tapón de silicon "septa". La aguja de la jeringa es introducida a través del "septa" en el tubo central. La longitud de la aguja es tal que casi toca la columna. El sistema de inyección se calienta para producir la evaporación de la muestra líquida. Generalmente el horno es calentado a 30°C por encima del punto de ebullición del compuesto de la muestra que lo tenga más alto. Esto garantiza que muestras pequeñas de líquido sean vaporizadas instantáneamente y sean llevadas rápidamente dentro de la columna. Cuando deben ser analizadas muestras gaseosas a presiones distintas de la atmosférica puede usarse una válvula para muestra gaseosas (30).

Una vez que es introducida la muestra, ésta pasa por la columna cromatográfica, las cuales se clasifican en dos grandes grupos: columnas rellenas o empacadas y columnas capilares. Una columna rellena se prepara llenando una determinada longitud de un tubo de 1/8" de diámetro externo; también se usan otros diámetros, más grandes o pequeños. Los materiales más utilizados son aceros inoxidable y vidrio (30).

El relleno se prepara por revestimiento de pequeñas partículas del llamado soporte con un líquido adecuado de baja volatilidad. Los soportes típicos son partículas tamizadas de 100 a 200 mallas y tierra de diatomáceas tratada químicamente. Estas partículas tienen un área superficial de 1 m²/g. La superficie del soporte está cubierta por una fina capa de fase estacionaria. La fase estacionaria es un líquido de elevado punto de ebullición; esto hace que tenga una presión de vapor pequeña a las temperaturas que se utiliza normalmente (30).

Las columnas capilares están preparadas con vidrio o sílice fundida, la parte externa se recubre con políimida, como protección del tubo capilar. Normalmente tienen 0.8 mm de diámetro externo y 0.25 mm de diámetro interno. Las longitudes más usadas son las de 30 y 60 m. Las columnas capilares difieren de las columnas rellenas o empacadas en que en las primeras no está presente el soporte y solo existe una fina película de la fase móvil sobre la pared del tubo capilar. Algunas veces las columnas capilares se llaman columnas tubulares de paredes recubiertas (30).

El espesor de la película es controlado en el proceso de fabricación. Algunas fases estacionarias pueden estar unidas químicamente a las paredes del capilar, otras están unidas a la columna mediante tensión superficial. Estas columnas pueden operar a un flujo de alrededor de 2 ml/ min, por lo que son consideradas como columnas de alta resolución y análisis rápidos. La columna cromatográfica es el elemento principal de un cromatógrafo y en la cual se realiza la separación. Dentro de la misma se encuentra la fase estacionaria, que puede ser un relleno sólido o un líquido, dispuesto sobre un relleno sólido o sobre el lado interior de la pared del propio tubo (22,30) .

La columna se encuentra situada dentro de un horno ya que la temperatura influye de modo importante en la retención de los componentes, y por tanto, en la separación de los mismos; por ello, interesa que la temperatura sea constante a lo largo de toda la columna. Existen diversos diseños de hornos, pero por lo general, son de tal diseño, que la columna se encuentra plegada en su interior. A la salida de la columna la corriente gaseosa pasa al detector, que se utiliza para realizar el análisis de los componentes ya separados por la columna o simplemente para indicar la salida de los mismos si no se desea su análisis (22).

El fundamento genérico de la mayoría de los detectores es la medida de una propiedad de los gases, realizando una comparación entre el gas portador puro y el gas que sale de la columna integrado por gas portador y el o los componentes que salgan de la columna ya separados (22).

El detector suele estar construido de forma que la medida comparativa que realiza de la propiedad de los gases en que se basa, se ponga de manifiesto en forma de una señal de tipo eléctrico, que se transmite mediante un circuito adecuado, a un colector y amplificador de la señal. Este sistema proporciona una señal eléctrica amplificada, de la cual se puede hacer diversos usos: indicarla, registrarla gráficamente, utilizarla como dato para elaboración posterior, aplicarla al accionamiento de algún dispositivo mecánico, etc. (22).

Los detectores más utilizados en la CG son los siguientes: Detector de Ionización de Flama, Detector de Captura de Electrones, Detector de Fotolonización, Detector de Conductividad Electrolítica, Detector de Conductividad Térmica, Detector Espectrométrico de Masas, Detector de Infrarrojo (31,32,33). Solo se explicará el fundamento del detector utilizado en el presente trabajo.

Detector de Ionización de Flama.

El Detector de Ionización de Flama (DIF), es el más usado en el análisis de cromatografía de gases, ya que es sensible a todos los compuestos orgánicos, es de fácil manejo, tiene un amplio intervalo lineal, proporciona un tiempo de respuesta rápido y su línea base es estable.

En el detector los compuestos orgánicos son eluidos de la columna para que posteriormente sean pasados a la flama compuesta de una mezcla de Aire/Hidrógeno para que ahí se lleve a cabo la ionización. Los iones son producidos mediante la acción de un voltaje aplicado y son atraídos por el electrodo colector, produciéndose una corriente que es proporcional a la concentración del componente separado. La temperatura del detector deberá estar arriba de 100° C para evitar la condensación del agua dentro de él. La flama se produce empleando un flujo de 30 y 300 ml/min de una mezcla de Aire/Hidrógeno, respectivamente (34).

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

Fué a mediados de los sesenta cuando se hicieron las primeras descripciones de los cromatógrafos de líquidos de alta eficiencia que permitan separaciones comparables a las logradas por los cromatógrafos de gases (35,36,37).

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación en donde se realiza la partición de cada uno de los componentes de una mezcla entre dos fases: una fase estacionaria con gran área de superficie y una fase móvil líquida que se percola sobre la fase estacionaria. En esta técnica la fase estacionaria del sistema está empacada dentro de una columna y la fase móvil circula a través de ella.

Si los componentes de una mezcla presentan diferencias entre sus coeficientes de partición, cada uno de ellos se distribuirá y desplazará con velocidades distintas a lo largo de la columna, permitiendo así su separación (38).

La fase móvil es un líquido que fluye a través del empaque de la columna, gracias a la cual eluyen los componentes de la mezcla, los cuales son selectivamente retenidos por la fase estacionaria. El flujo de la fase móvil se mantiene constante a través de todo el proceso y de esta manera se logra que cada uno de los componentes de la mezcla sean eluidos de la columna, cada uno como un compuesto puro, disuelto en la fase móvil (38).

La fase móvil se controla en cuanto a su presión, flujo y composición. Las características que debe presentar toda fase móvil para cromatografía de líquidos son las siguientes (26):

1. Disolver la muestra.
2. No degradar o disolver la fase estacionaria.
3. Disminuir la viscosidad.
4. Ser compatible con el tipo de detector utilizado.

La separación de los componentes en CLAE puede llevarse a cabo mediante un gradiente de elución, es decir, que la fase móvil cambiará su composición durante el análisis, o bien, isocráticamente lo que significa que la composición de la fase móvil será la misma durante el análisis.

La CLAE utiliza columnas de diámetro reducido, las cuales están empacadas con fase estacionaria la cual tiene un tamaño de partículas entre 5-10 μm . de diámetro. Estas columnas son eficientes pero ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea que presentan una gran caída de presión. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (6000 psi.) que hagan fluir la fase móvil a través de la columna (39,40).

La detección del compuesto eluído a la salida de la columna de cada uno de los componentes se realiza mediante detectores específicos que proporcionan un registro continuo de la composición del eluato, lo que permite obtener cromatogramas que se utilizan para identificar y cuantificar los componentes de la mezcla (26,40).

El propósito de los detectores en la CLAE es monitorear la composición del líquido que eluye en la columna, la cual es registrada y analizada por sistemas de datos o integradores. La utilización del detector depende de la aplicación específica que se esté realizando.

Los detectores pueden ser clasificados en dos tipos (26,40):

1. Detectores que miden alguna propiedad física del eluato de la columna (constante dieléctrica o índice de refracción). Estos detectores tienen respuesta para un amplio intervalo de sustancias y con la mayoría de ellas presentan aproximadamente los mismos ordenes de sensibilidad.

Estos detectores son llamados Detectores Universales o no específicos.

2. Detectores que son selectivos en su respuesta.

Estos miden alguna propiedad física o química que es característica para cada soluto (absorción por UV-Visible, fluorescencia, electroquímico).

Las características que necesitan ser consideradas para un detector, son las siguientes (26):

1. Cumplir con un diseño de tal forma que los compuestos que han sido separados no se mezclen cuando pasen a través del detector.

2. Presentar niveles muy bajos de ruido, de tal forma que pequeñas cantidades de componentes en el eluyente puedan ser observadas.

3. Tener un tiempo de respuesta rápido.

4. Tener un amplio intervalo lineal para poder realizar análisis cuantitativo.

5. Ser relativamente insensible a cambios en la velocidad de flujo, composición y temperatura.

Los detectores más utilizados en la CLAE son el espectrofotómetro UV-Visible, Fluorómetro y Refractómetro Diferencial. Existen otros detectores de aplicación más reducida como son los Detectores Electroquímicos, de Radiactividad, Conductividad y Arreglo de Diodos (41,42,43). Solo se explicará el fundamento del detector utilizado en el presente trabajo.

Detector de Índice de refracción.

El detector de índice de refracción o refractómetro diferencial toma como principio el hecho de que la mayoría de los líquidos presentan diferencias en los índices de refracción. Los sistemas de detección miden esta diferencia entre la fase móvil pura y el soluto que eluye de la columna. Es considerado de uso universal, sin embargo, presenta algunas desventajas (26):

a) Generalmente presenta menor sensibilidad que los detectores de UV o fluorescencia.

b) Es sensible a variaciones en la temperatura. Esto es usualmente debido a que el índice de refracción de cualquier líquido depende de la temperatura.

c) Normalmente no puede ser usado para gradiente de elución ya que la composición de la fase móvil cambia durante el análisis, lo cual significa que se presentarán cambios en el índice de refracción.

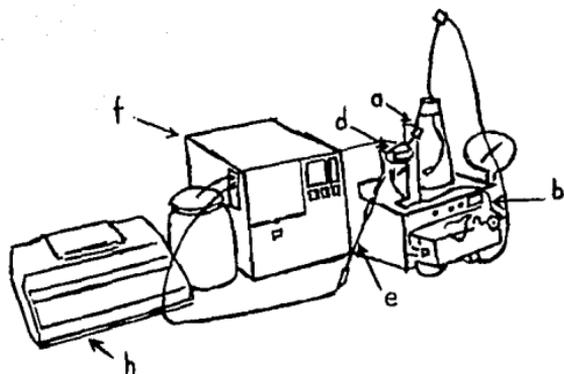
La CLAE permite el análisis de compuestos líquidos y sólidos de muy variada naturaleza: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes (30).

A continuación se mencionan las características de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (26,38):

Requerimiento de la muestra:	Soluble.
Tipo de muestra:	Sólida y líquida, soluble en la fase móvil seleccionada
Cantidad mínima detectable:	10^{-9} g
Tiempo de análisis práctico:	mín.

Un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia consta de las siguientes partes (29,38):

- a) Un depósito para la fase móvil.
- b) Bomba.
- c) Programador de la fase móvil (Opcional).
- d) Sistema de inyección.
- e) Columna.
- f) Detector.
- g) Horno para la columna y el detector (Opcional).
- h) Sistema de registro de datos (Registrador, Integrador o Computadora).



ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO.

El propósito de la mayoría de las investigaciones cromatográficas es analizar la muestra. La determinación de cuales o cuántos componentes están en la muestra compete al análisis cualitativo, mientras la evaluación de cuanto está presente de algunos o todos los componentes se refiere al análisis cuantitativo (26).

Análisis Cualitativo.

En las cromatografías en papel y capa fina, la posición final en que se encuentran las sustancias una vez que la fase móvil ha recorrido todo el soporte es una característica propia, conocida como R_f o R_x (26).

En la cromatografía en columna, resulta más difícil encontrar este parámetro, ya que sería necesario introducir una sustancia que fuera soluble únicamente en la fase móvil, que serviría como referencia. En este caso se maneja el tiempo que tarda o el volumen de sustancia que emerge, después de realizada la aplicación incluyendo la CG (26).

En nuestro caso en particular, la identificación de los carbohidratos presentes en la manzana, se llevó a cabo mediante la comparación de sus t_r (tiempos de retención), con los t_r de estándares puros, analizados bajo las mismas condiciones de trabajo.

La presencia de estos compuestos se comprobó mediante el análisis de los mismos por Cromatografía de Gases/Espectroscopía de masas (CG/EM).

Uso de Datos de retención.

Bajo condiciones determinadas, el tiempo de retención de una cierta sustancia sobre una columna seleccionada, es característico de una sustancia en particular. Los datos de retención pueden ser usados para propósitos de identificación. Se deberá entender que la reproducibilidad de los datos de retención absoluto dependen de las condiciones instrumentales.

El tiempo de retención (t_r) y el tiempo de retención corregido (t_r') son comunmente utilizados para propósitos de identificación (26,28). La definición de los términos más utilizados son los siguientes:

Tiempo de retención (t_r): El tiempo o distancia entre el punto de inyección y el máximo del pico.

Tiempo de retención observado de un compuesto no retenido (t_m): Tiempo o distancia desde el momento de inyección al máximo del pico de un material no retenido (frente del disolvente).

Tiempo de retención ajustado (t_r'): Tiempo o distancia del máximo del pico correspondiente a un soluto no retenido con respecto al máximo del pico de interés.

$$t_r' = t_r - t_m.$$

que multiplicado por la velocidad de flujo (F_c), nos dan los volúmenes de retención:

$$V_r = t_r F_c$$

Volumen de retención ajustado

$$V_r' = t_r' F_c$$

Volumen de la fase móvil en la columna, también llamado volumen muerto o volumen intersticial

$$V_m = t_m F_c$$

Adición de un compuesto a la muestra.

La manera más fácil para comparar tiempos de retención, es mezclar una porción de la muestra, sucesivamente con las sustancias puras las cuales supuestamente se encuentran también en la muestra. Esto da como resultado un pico deberá ser relativamente más grande que el cromatograma original (26).

Análisis Cuantitativo.

Este tipo de análisis se refiere a la determinación de la cantidad o concentración presente de alguno o todos los componentes de la muestra, una vez que se realizó la identificación.

Esta determinación se basa en algunos de los siguientes parámetros:

Altura del pico.

Todos los detectores usados en cromatografía producen una señal eléctrica la cual es registrada en un integrador o sistema de datos.

A mayor cantidad de material que pasa a través de la celda del detector, mayor será la señal registrada, de tal forma que la altura del pico puede ser usada como un indicador de la cantidad (22,26,28).

Las ventajas de usar la altura del pico para la evaluación cuantitativa es la simplicidad y rapidez de los cálculos; las desventajas son la tendencia de que la altura del pico varía mucho más que el área si las condiciones cromatográficas no son estables. Por otro lado se pierde información si el pico se sale de la escala (26).

Medición del área del pico.

El uso del área del pico (A) para efectuar mediciones cuantitativas se basa en el hecho de que la concentración (C) de un compuesto de la muestra es directamente proporcional a su área. El requisito es que la forma del pico deberá ser Gaussiana, a menos que se cuente con un integrador automático (26).

Métodos de medición de área (23,24,29,38):

a) Planimetría.

El pico se sigue manualmente con un planímetro. El planímetro es un dispositivo mecánico que mide superficies recorriendo el perímetro del pico. La superficie se registra digitalmente sobre un cuadrante. Esta técnica es tediosa, lenta y menos precisa que muchas otras. La reproducibilidad obtenida entre diferentes personas es deficiente. Se puede mejorar la precisión recorriendo cada pico varias veces y sacando un valor promedio.

b) Triangulación.

La altura se mide desde la línea base hasta la intersección de las dos tangentes del pico. La base se toma como la intersección de las dos tangentes con la línea base. Se calcula el área mediante la fórmula del triángulo:

$$A = \frac{b \cdot h}{2}$$

Donde:

b=Base del pico

h=Altura del pico

Este método es lento, pero permite obtener una precisión razonable, siempre que la forma de los picos sea susceptible de medición adecuada, es decir, que sea de forma gaussiana.

c) Corte y pesado.

El área de los picos se determina cortando el pico del cromatograma y pesando el papel en una balanza analítica. Este método es lento, pero puede ser bastante preciso, particularmente en el caso de los picos asimétricos. Una de sus desventajas es la destrucción de los datos cromatográficos. Los picos deben ser cortados cuidadosamente y el espesor y el contenido de humedad del papel de la gráfica deben ser constantes.

d) Integración.

La medición de la altura de los picos es más rápida que la del área de los picos, sin embargo las gráficas de la altura de los picos en función del tamaño de las muestras tiene un intervalo lineal más limitado que las correspondientes gráficas para las áreas de los picos. Frecuentemente las alturas y anchuras de los picos dependen del tamaño de la muestra y el volumen de muestra inyectada; sin embargo, no es así para el área de los picos.

La altura del pico se mide en mm. tomando la distancia desde la línea base hasta la máxima del pico. El área del pico depende menos que su altura de las condiciones de funcionamiento. Definitivamente, constituye la medida más usada en la actualidad.

INTERPRETACION CUANTITATIVA DE UN CROMATOGRAMA.

Después de que se determinó el área de los picos individuales, el siguiente paso es establecer la cantidad o concentración de cada componente de la muestra.

Los métodos más usados con este fin son los siguientes (26,28,38,40):

Normalización Interna.

En este método de cuantificación se asume que:

- 1) Cada componente de la muestra produce un solo pico.
- 2) El detector da la misma área para cada componente de la muestra si esta presente en la misma concentración.

La normalización se realiza dividiendo el área de cada pico por el área total (menos el área del frente del solvente) y se multiplica por 100.

$$A_1 + A_2 + \dots + A_i + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n$$

$$C_i\% = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \cdot 100$$

Técnica de Bracketing.

En esta técnica, primero se establece una composición aproximada de la muestra. Posteriormente una muestra sintética de composición similar es preparada y analizada bajo condiciones idénticas. Las áreas de los picos son comparadas con las obtenidas en la muestra original para efectuar la cuantificación.

$$\frac{C_s}{C_{st}} = \frac{A_s}{A_{st}} \quad (1)$$

$$C_s = \frac{A_s \cdot C_{st}}{A_{st}} \quad (2)$$

Donde

Cs=Concentración de la muestra.

Cst=Concentración de la muestra sintética.

As=Area del pico de la muestra.

Ast=Area del pico de la muestra sintética.

Si se desea conocer la concentración:

$$Cs\% = \frac{Cs * 100}{Wst} \quad (3)$$

$$Cst\% = \frac{Cst * 100}{Wst} \quad (4)$$

sustituyendo la ecuación 3 y 4 en la 2 se obtiene la siguiente expresión:

$$C_s\% = \frac{A_s * W_{st} * C_{st}\%}{A_{st} * W_s}$$

Donde

W_{st} =Peso del estándar.

W_s =Peso de la muestra.

Utilización de los factores de respuesta del detector.

El factor de respuesta del detector (f_i) establece la relación entre el área del pico (A_i) y la concentración (C_i):

$$C_i = f_i * A_i$$

La manera más sencilla para determinar estos factores es la de analizar una mezcla de estándares que contenga cada uno de los compuestos en concentraciones iguales. Si se asume que la mezcla tiene tres componentes, al analizar esta muestra, se obtienen las áreas respectivas para cada pico A_1 , A_2 , y A_3 .

Para cada componente se tiene:

$$C_1 = f_1 A_1$$

$$C_2 = f_2 A_2$$

$$C_3 = f_3 A_3$$

Si las concentraciones son iguales :

$$C_1 = C_2 = C_3$$

$$f_1 A_1 = f_3 A_3$$

$$f_2 A_2 = f_3 A_3$$

$$\frac{f_1}{f_3} = \frac{A_3}{A_1}$$

$$\frac{f_2}{f_3} = \frac{A_3}{A_2}$$

Si se establece el tercer componente como la "norma" asignándole un valor de respuesta de $f_3=1$. Los factores de respuesta relativos pueden ser calculados como la relación de áreas de los picos

$$f_1 = \frac{A_3}{A_1}$$

$$f_2 = \frac{A_3}{A_2}$$

Cuando se analiza una muestra que contiene estos tres componentes en concentraciones desconocidas, las siguientes áreas de picos son obtenidas:

$$A^*1, A^*2, A^*3$$

*Las concentraciones correspondientes (C%) son calculadas de la siguiente manera, utilizando los factores de respuesta predeterminados:

$$A_1^* f_1 + A_2^* f_2 + \dots + A_i^* f_i + \dots + A_n^* f_n = \sum_{i=1}^n A_n^* f_n$$

$$C_i\% = \frac{A_i^* f_i}{\sum_{i=1}^n A_i^* f_i}$$

Estándar Externo.

Este método consiste en preparar una solución estándar del compuesto de interés. Esta solución se prepara en una concentración semejante a la del compuesto a cuantificar. Del cromatograma del estándar se procede a calcular el factor de respuesta para cada pico de interés, el cual nos da la concentración del componente que produce un factor de respuesta de uno, asignado de manera arbitraria:

$$\text{Factor de Respuesta} = \frac{\text{Concentración del componente}}{\text{Altura o área del pico}}$$

Entonces, en el cromatograma podremos calcular la concentración de cada componente de interés, multiplicando la altura del pico o el área por el factor de respuesta apropiado.

Este método requiere que la respuesta del detector sea lineal para cada compuesto en el intervalo de concentración usado, así como de inyectar la misma cantidad de muestra en ambas determinaciones.

ESTANDAR INTERNO.

Los métodos de estándar interno, son generalmente usados cuando el analista está interesado solamente en la concentración de uno o pocos componentes. Existen tres métodos de estándar interno de uso común.

1) Método clásico. Donde una porción pesada del estándar es combinada con la muestra pesada.

2) Método de la solución de "Stock". Se usa cuando los mismos materiales son analizados frecuentemente y una solución de "Stock" de los estándares es pipeteada dentro de la muestra o es usada como diluyente de la muestra.

3) Método de calibración. Donde una serie de estándares son analizados para determinar su valor de área y con ello elaborar una curva de calibración.

Método de calibración (Gráfico de Estándar Interno).

En este método se analiza una serie de mezclas de estándares que contienen la misma cantidad de estándar interno, pero cantidades variables del compuesto de interés obteniéndose sus áreas en el cromatograma. De esto

resulta que las relaciones de Área de soluto/Área de Estándar interno (A_s/A_{EI}) correlacionará con la relación de pesos específicos. Es importante señalar que se deberá trabajar en el intervalo lineal del detector y no se deberá sobrecargar la columna, para lograr una gráfica lineal.

Esta gráfica es entonces usada para cuantificar al compuesto de interés presente en la muestra. Una cantidad equivalente del estándar interno es adicionada a cada muestra, las mezclas son analizadas bajo las mismas condiciones, para posteriormente calcular la relación de áreas. Con esto se puede leer directamente la relación de pesos correspondiente y la cantidad del compuesto de interés puede ser calculada.

IV. MATERIAL Y METODOS.

Las manzanas (variedad Starking) que se emplearon en este estudio fueron obtenidas de supermercados locales.

Los estándares de carbohidratos (Xilosa, Fructosa, Glucosa, Sacarosa, Maltosa y Arabinosa) son de grado analítico (Merck).

Como disolvente se utilizó Piridina (Aldrich).

Los reactivos de derivatización usados fueron: Hexametildisilazano (HMDS) y trimetilclorosilano (TMCS) (Chemical Company).

Para la fase móvil se utilizó Acetonitrilo grado HPLC y agua destilada.

Para filtrar las soluciones se utilizaron filtros de 0.45µm de diámetro interno (Millipore) .

El análisis por CG se realizó en un cromatógrafo de gases Varian 3300, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Tabla No. 1

Condiciones experimentales por CG.

Columna:	Capilar DB-1701 (fenil ciano propil metil silicón) 30m x 0.25mm x 0.25 μ .
Temperatura de la columna:	
Primera rampa:	200°C hasta 235°C a 10°C/ min
Segunda rampa:	235°C hasta 290°C a 50°C/ min
Fase móvil:	Hidrógeno 1 ml/min
Detector:	Ionización de flama a 290°C
Inyector:	Split a 250°C

El análisis de los carbohidratos por CLAE se realizó en un cromatógrafo modular marca Waters, bajo las siguientes condiciones experimentales:

Tabla No. 2

Condiciones experimentales por CLAE

Columna:	Carbohydrate analysis (10 μ y 125 A ^o) de 3.9 x 300mm (base de sílice enlazada con n-propil amina).
Fase móvil:	Acetonitrilo 85%/Agua 15% (v/v)
Flujo:	1.5 ml/min.
Detector:	Índice de refracción.
Inyector:	Manual U6K.

Extracción de azúcares:

Para llevar a cabo la extracción de los azúcares se separó el mesocarpio (pulpa) del pericarpio (cáscara) y se pesaron aproximadamente 5g de cada uno de estos tejidos, posteriormente se cortaron finamente con un cuchillo y se maceraron en un mortero.

A cada uno de estos tejidos se adicionó un volumen de 25 ml de etanol acuoso al 96%, se llevó a cabo la extracción durante 10 min. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo las soluciones se filtraron a través de papel Whatman No. 4 recibiendo los filtrados en matraces. A estas soluciones se les adicionó 1 ml de solución acuosa de Maltosa a cada uno, en una concentración de 20 mg/ml; esta solución fué la utilizada como estándar interno; posteriormente se aforaron a un volumen final de 25 ml (44). De esta manera se obtienen las soluciones I y II, extracto de mesocarpio y pericarpio respectivamente, las cuales se utilizaron para el análisis cuantitativo de los carbohidratos por CLAE, inyectándose 20µl de cada una.

Para el análisis por CG se utilizó la técnica anteriormente descrita con aproximadamente 5 g de los mismos tejidos, los filtrados obtenidos se aforaron a 25 ml obteniéndose las soluciones III y IV, extracto de mesocarpio y pericarpio respectivamente. Posteriormente se procedió a evaporar el etanol en un rotavapor.

De los extractos secos se pesaron aproximadamente 5 mg de cada uno en un matraz aforado de 5 ml, se disolvieron con piridina seca, posteriormente se les adicionó 1 ml de solución de estándar interno y se aforaron con el mismo disolvente (Solución III' y IV').

El carbohidrato utilizado como estándar interno para la determinación por CG fué Arabinosa en una concentración de 8 mg/ml en piridina seca.

Para el análisis cuantitativo de los carbohidratos por CG se tomaron alícuotas de 1 ml de las soluciones III' y IV', se colocaron en un vial y se les adicionaron los reactivos de derivatización. La técnica para formar el derivado siliado consiste en disolver 5 mg de los carbohidratos en 1 ml de Piridina seca; con la adición subsecuente de 0.2 ml de Hexametildisilano (HMDS) y 0.1 ml de Trimetilclorosilano (TMCS), la mezcla se agita vigorosamente durante aproximadamente 30 seg, seguida de un reposo de 5 min, si la muestra no se disuelve totalmente se calienta a 80° C durante 10 min en baño maría (9).

Como subproducto de la reacción se forma un precipitado de cloruro de amonio que no interfiere en la cuantificación, la muestra puede inyectarse directamente en el cromatografo de gases aunque es recomendable eliminar dicho precipitado ya que puede tapar la jeringa. De cada solución sinyectó 0.5µl.

Cuantificación de Carbohidratos por CG.

1. Preparación de las Soluciones.

Para cuantificar los carbohidratos por CG se prepararon soluciones para cada carbohidrato con las siguientes concentraciones:

Tabla No. 3

Soluciones para elaborar curva de calibración en CG.

Carbohidrato:	Concentración (mg/ml)			
Xilosa	0.2	0.3	0.4	3.0
Fructosa	1.6	3.2	6.4	8.0
Glucosa	2.0	4.0	8.0	10.0
Sacarosa	0.64	2.24	3.20	4.80
Arabinosa	8.0	8.0	8.0	8.0

Con estas soluciones (Tabla 3) se elaboró la curva de calibración en la que se relaciona el área del soluto a cuantificar con respecto al área del estándar interno en función de la relación concentraciones del soluto a cuantificar y del estándar interno.

2. Elaboración de la gráfica

De cada una de las anteriores soluciones se tomaron alícuotas de 1 ml para obtener el derivado siliado del carbohidrato. Se inyectaron 2 μ l de cada una de ellas. De los cromatogramas obtenidos se determinaron las áreas de cada componente, las cuales se utilizaron para elaborar la gráfica de A_s/A_{EI} vs C_s/C_{EI} , para cada carbohidrato.

3. Cuantificación de carbohidratos en manzana.

De las soluciones III' y IV' se tomaron alícuotas de 1 ml para formar el derivado siliado del carbohidrato. Posteriormente se inyectó una muestra de 0.5 μ l para así determinar el área del carbohidrato y la del estándar interno. Se procedió a calcular la relación entre ellas y se interpoló en la gráfica de A_s/A_{EI} vs C_s/C_{EI} para obtener su correspondiente C_s/C_{EI} . Debido a que C_{EI} es conocida se puede calcular la concentración del compuesto a cuantificar (C_s).

Análisis Cuantitativo por CLAE.

1. Preparación de las soluciones.

Para poder cuantificar los carbohidratos por CLAE se preparó un volumen de 10 ml de una solución "stock" que contenía a los carbohidratos previamente identificados en las siguientes concentraciones:

Tabla No. 4

Solución "Stock" de Carbohidratos.

Carbohidrato	Concentración (mg/ml)
Xilosa	10
Fructosa	23
Glucosa	15
Sacarosa	15

De estas soluciones se tomaron alícuotas de 1, 2 y 5 ml, se colocaron en matraces aforados de 10 ml y se les adicionó 1 ml de estándar interno, posteriormente se aforaron con agua de tal manera que finalmente se obtuvieron cuatro soluciones para cada carbohidrato con las siguientes concentraciones:

Tabla No. 5

Soluciones para elaborar curva de calibración en CLAE.

Carbohidrato:	Concentración (mg/ml)			
Xilosa	1.0	2.0	5.0	10.0
Fructosa	2.3	4.6	12.5	23.0
Glucosa	1.5	3.0	7.5	15.0
Sacarosa	1.5	3.0	7.5	15.0
Maltosa	20	20	20	20

Con estas soluciones, al igual que por CG, se elaboró la curva de calibración para la cuantificación del soluto de interés.

2. Elaboración de la curva de calibración.

La curva de calibración es el resultado de graficar la relación de áreas en función de la relación de concentraciones (A_s/A_{Ei} vs C_s/C_{Ei}) y se obtuvo inyectando 20 μ l de las soluciones previamente preparadas (Tabla 5), de tal manera que se obtuvieron cuatro cromatogramas para cada carbohidrato de interés.

3. Cuantificación de Carbohidratos en manzana.

De las soluciones I' y II' se tomaron de 20 μ l de cada una y se analizaron bajo las mismas condiciones de trabajo. Se obtuvo el registro de áreas para los carbohidratos a cuantificar y el área del estándar interno; posteriormente se calculó la relación de áreas (A_s/A_{EI}) y mediante la interpolación de este dato en la curva de calibración se obtiene la correspondiente relación de concentraciones (C_s/C_{EI}), como C_{EI} es conocida se puede calcular la concentración del soluto, la cual multiplicada por el volumen total de solución, nos da los mg totales del carbohidrato en la muestra.

V. RESULTADOS.

Mediante el análisis cualitativo tanto por CG y CLAE se identificaron cuatro carbohidratos tanto en el mesocarpio como en el pericarpio con el siguiente orden de elución:

Tabla No. 6

Tiempos de retención de los compuestos identificados.

Carbohidrato.	tr (min)	
	CG	CLAE
Xilosa	2.09	3.98
Fructosa	2.61	5.12
Glucosa	2.71	6.18
Sacarosa	6.04	10.14

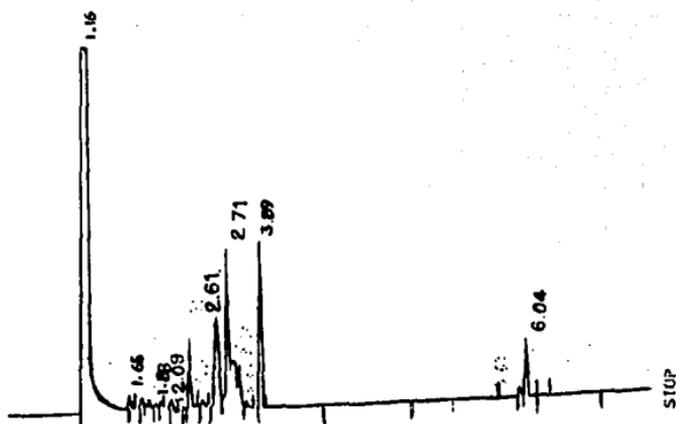
Los tr no reportados en la tabla No.6 corresponden a subproductos de la reacción de formación del derivado sililado (Cromatograma I y II).

En los cromatogramas I y II se muestran los carbohidratos identificados en el mesocarpio y pericarpio respectivamente por CG.

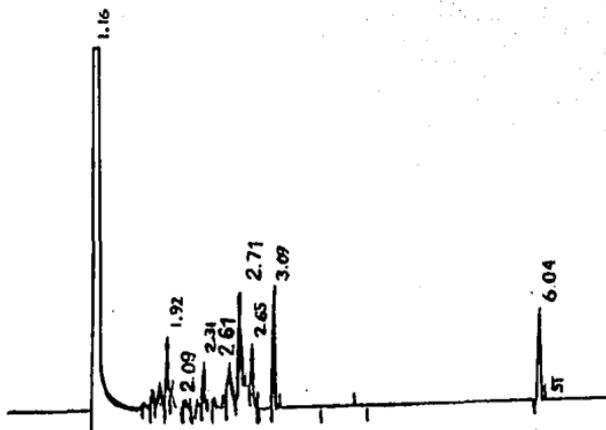
Los cromatogramas III y IV presentan los carbohidratos identificados por CLAE en los mismos tejidos.

Los cromatogramas III y IV presentan los carbohidratos identificados por CLAE en los mismos tejidos.

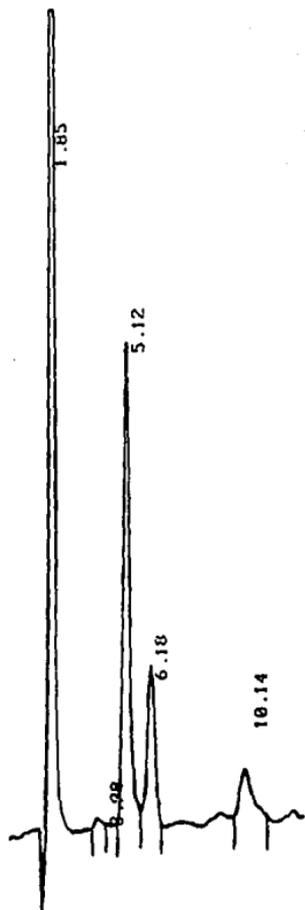
La mezcla de estándares analizados por CG y CLAE se presentan en los cromatogramas V y VI respectivamente.



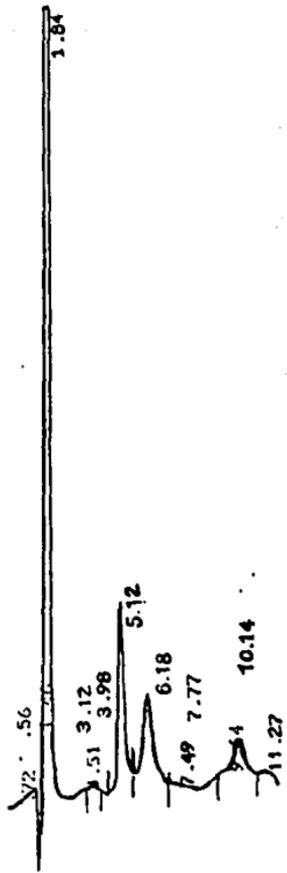
Cromatograma I



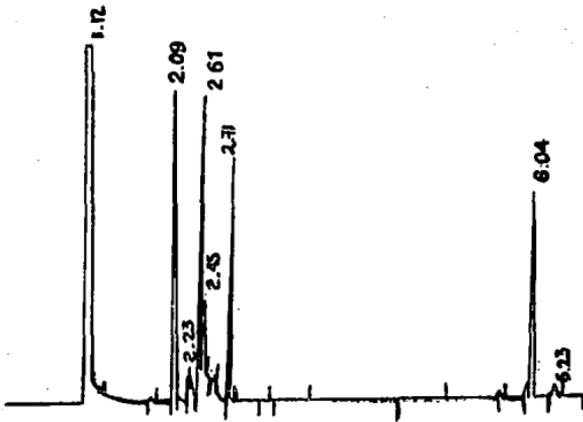
Cromatograma II



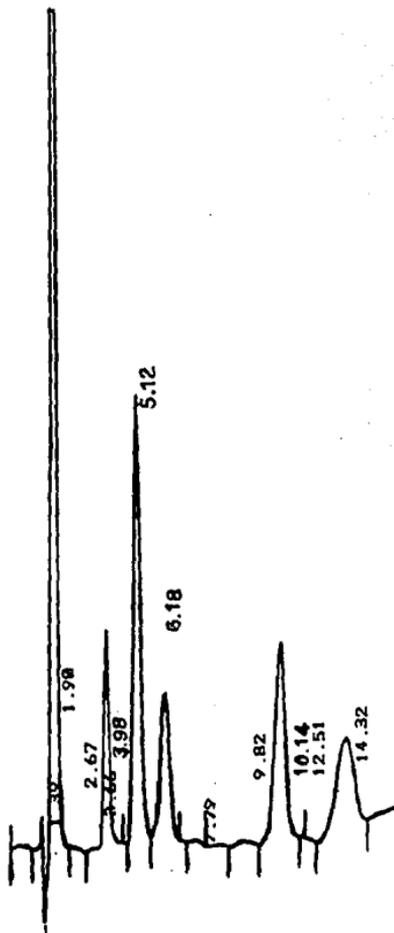
Cromatograma III



Cromatograma IV



Cromatograma V



Cromatograma VI

Las datos para la elaboración de las curvas de calibración para cada carbohidrato por CG, se presentan en la siguiente tabla.

Tabla No. 7
Curvas de calibración por CG.

XILOSA		FRUCTOSA		GLUCOSA		SACAROSA	
Ax/Aa	Cx/CA	Af/Aa	Cf/CA	Aa/Aa	Ca/CA	As/Aa	Cs/CA
0.8	0.375	0.5861	1.0	2.2429	1.25	0.6817	0.6
0.0714	0.05	0.4401	0.8	1.5204	1.0	0.4568	0.4
0.0507	0.0375	0.211	0.4	0.9179	0.5	0.3922	0.28
0.0485	0.025	0.0836	0.2	0.38	0.25	0.1127	0.08

En la tabla No. 8 se presentan los valores promedios de tres réplicas de la relación de áreas obtenidas en el mesocarpio y pericarpio por CG.

Tabla No. 8

Relaciones de Area en Mesocarpio y Pericarpio por CG.

	Mesocarpio.	Pericarpio
Ax/AA	0.0162	0.0612
AF/AA	0.3759	0.3970
AG/AA	0.8356	0.4477
AS/AA	0.1717	0.4592

La curva de calibración para la cuantificación por CLAE se trazó graficando la relación de área del soluto/área del estándar interno (A_s/A_{EI}) en función de la relación de concentración del soluto/concentración del estándar interno (C_s/C_{EI}), (Tablas No. 9 y 10).

Tabla No. 9

Relación de áreas.

Dilución	Ax/AM	AF/AM	AG/AM	AS/AM
Stock	0.7113	1.9916	1.0677	0.8855
5/10	0.3295	0.7528	0.5074	0.3816
2/10	0.1303	0.2762	0.1542	0.2115
1/10	0.0523	0.0912	0.0368	0.0257

X=Xilosa

G=Glucosa

M=Maltoza

F=Fructosa

S=Sacarosa

Tabla No. 10

Relación de concentraciones.

Dilución	Cx/CM	Cf/CM	Cg/CM=Cs/CM
Stock	0.510	1.150	0.750
5/10	0.255	0.575	0.375
2/10	0.102	0.230	0.150
1/10	0.051	0.115	0.075

Las relación de áreas obtenidas para los carbohidratos en los tejidos analizados, mesocarpio y pericarpio, por CLAE se presentan en la tabla No. 11

Tabla No. 11

Relación de áreas en mesocarpio y pericarpio.

	Mesocarpio.	Pericarpio.
AX/AM	0.0823	0.0916
AF/AM	1.9923	1.2056
AG/AM	0.6391	0.8343
AS/AM	0.1733	0.1124

Interpoladas las relaciones de áreas (A_s/A_{Ei}) del mesocarpio y pericarpio en sus respectivas curvas de calibración se obtuvieron los siguientes % de cada carbohidrato:

Tabla No. 12
% de los Carbohidratos identificados.

Carbohidrato.	% en Pericarpio.		% en Mesocarpio.	
	CLAE	CG	CLAE	CG
Xilosa	5.02	2.23	3.83	1.09
Fructosa	48.63	50.11	61.12	61.54
Glucosa	38.53	19.70	25.30	31.41
Sacarosa	7.80	27.34	9.74	6.49

Nota: Los % son el resultado de realizar el análisis por triplicado.

VI. DISCUSION DE RESULTADOS.

La determinación cualitativa de los azúcares presentes en la manzana resultó más sencilla por CLAE que por CG, ya que en los cromatogramas obtenidos de los extractos de mesocarpio y pericarpio por CG se registró un número mayor de picos cromatográficos, como posible consecuencia de que la reacción de formación del derivado siliado se haya llevado a cabo con la formación de varios subproductos (picos pequeños). Por otra parte, durante el análisis por CLAE al no ser necesario la formación del derivado siliado, se obtuvieron cromatogramas en los que se registró un solo pico para cada componente, lo cual facilita la identificación de los compuestos separados.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que la Fructosa es el azúcar que se encuentra en mayor proporción seguida de la Glucosa, Sacarosa y Xilosa, lo cual es una consecuencia propia del metabolismo del fruto, ya que durante el proceso de maduración, se ve favorecido el aumento de los carbohidratos como consecuencia de la disminución del contenido de ácidos; siendo los monosacáridos (Fructosa y Glucosa), los carbohidratos que aumentan en una mayor proporción, de los cuales, la Fructosa por tener mayor poder edulcorante resulta ser el principal componente de impartir el sabor dulce propio de este fruto, es por esto que se encontró en mayor cantidad en el mesocarpio que en el pericarpio.

Por otra parte, durante el mismo proceso de maduración, la Sacarosa sufre una reacción de hidrólisis favoreciendo aun más en el contenido de Fructosa y Glucosa.

De los compuestos identificados la Xilosa fué el carbohidrato que se cuantificó en un % menor por ambas técnicas, siendo en el mesocarpio donde se encontró la menor cantidad. La presencia de este carbohidrato en los frutos no es común, sin embargo, el inicio de una posible reacción de fermentación podría explicar su presencia en la manzana.

En cuanto a los % de los carbohidratos reportados, puede observarse que fué en el pericarpio donde estos resultados presentaron variaciones mayores. Además, se observa que estas variaciones no pueden deberse a errores durante la reacción de formación del derivado sililado, ya que esta prueba se realizó por triplicado obteniéndose resultados semejantes. Por lo tanto, las variaciones en los resultados, pueden deberse al hecho de haber trabajado con dos técnicas diferentes, lo cual implica trabajar con dos fases móviles diferentes, un gas para el análisis por CG y un líquido para el análisis por CLAE, además, se utilizaron fases estacionaria cuyas propiedades y mecanismo de separación de los carbohidratos no es el mismo, también, se emplearon dos detectores cuyo fundamento de detección es diferente, por lo cual, la sensibilidad ante los compuestos por separar son las mismas en ambas técnicas de análisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que CLAE es más recomendable que CG para el análisis de estos compuestos, ya que no depende de factores externos, es decir, no depende de la cuantitividad de la reacción de formación del derivado.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

VII. CONCLUSIONES.

1. Se pueden utilizar ambas técnicas (CG y CLAE) para la identificación y cuantificación de los carbohidratos.

2. Se lograron identificar cuatro carbohidratos en el mesocarpio y en el pericarpio con el siguiente orden de elución: Xilosa, Fructosa, Glucosa y Sacarosa usando ambas técnicas cromatográficas.

3. El uso de CG es más complicado, ya que requiere de formar un derivado con los carbohidratos para hacerlos volátiles y además requiere emplear temperaturas elevadas, sin embargo el tiempo de análisis es más corto.

4. La identificación de los carbohidratos es más sencilla por CLAE pues no se necesita hacer la reacción de derivatización y se evita el empleo de altas temperaturas.

5. No se puede establecer cual de las dos técnicas es más confiable ya que el procedimiento para determinar a los carbohidratos es diferente en ambas técnicas de análisis.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Badui S. Química de los Alimentos. Edit. Alhambra. pag: 41-56. México (1989).
2. Plumer D.T. An Introduction to Biochemistry. Edit. Mc Graw-Hill. pag: 173-192. Maidenhead (1978).
3. Fieser L.F. and Fieser M. Reagents for Organic Synthesis. John Wiley & Sons. pag: 815. New York (1963).
4. Bergmeyer H.U. and Bernt E. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press. pag: 127. New York (1963).
5. Sempere J.M., Gancedo C. and Senio C.A. Anal. Biochem., **12**: 509. (1965).
6. Postel W., Drawert F. and Hagen W. Dtsch. Lebensm. Rundsch. **67**: 107. (1971)
7. Zurcher F. and Hadorn A. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., **68**: 200. (1977).
8. Robards K. and Whitelaw M. J. of Chromatogr. **373**: 81-110 (1986).
9. Sweeley C., Bentley R. and Makita M. J. Am. Chem. Soc. **85**: 2497-2507. (1963).
10. Gordon M. Principles and Applications of Gas Chromatography in Food Analysis. Ellis Horwod. pag: 111. Canada (1990).
11. Eero Rajakila. J. of Chromatogr. **353**: 1-12 (1986).
12. Lachance P. Food Prod. Devel. **7**: 6-29. (1973).

13. Armstrong D. and Jin L. J.of Chromatogr. **462**: 219-232. (1989).
14. Gas Chromatography Biochemicals and Standards Reagents. Catalog 22. Applied Science Division. pag: 82,83. USA (1979).
15. Bayer E. Gas Chromatography. Second Edit. Spring-Verlag. pag: 134. Berlín (1962).
16. Laker F. J. of Chromatogr. **184**: 457-470. (1980).
17. Knapp R. Handbook of Analytical Derivatization Reaction. Wiley-Interscience. pag: 5-20. New York (1979).
18. Pierce E. Silylation of Organic Compounds. Pierce Chem. Co. Rockford, IL. pag: 4-55. (1977).
19. Tesarik K. J.of Chromatogr. **65**: 295-305. (1972).
20. Haverkamp J. J. of Chromatogr. **59**: 281-296. (1971).
21. Tsweet M. Proc. Warsaw. Soc. Nat. Sci. **14**: 16-31. (1903).
22. Storch de Gracia y Asencio. Fundamentos de la Cromatografía de Gases. Edit Alhambra. pag: 1,12-15. España (1975).
23. Grob R. Modern Practice of Gas Chromatography. John Wiley & Sons. pag: 5,167-176,386-394. USA (1972).
24. Clement R. Gas Chromatography: Biochemical, Biomedical and Clinical Applications. Edit.Mc Graw-Hill. pag: 349,369. USA (1990).
25. Galen E. Instrumental methods of Chemical Analysis. 5ª Edit. Mc Graw-Hill. pag: 349,360-369. USA (1990).
26. Iturbe A. Curso Teórico-Práctico: Aplicaciones de la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión en Alimentos. pag: 41-43,46-52,54-57. C.U. (1992).
27. Skoog. Fundamentos de Química Analítica. Edit. Reverte. pag: 882,883. USA (1977).

28. Gerhard S. Gas Chromatography. Weinheim VHC. pag: 16-18,32-45,85,111-115,118-122. Alemania (1992).
29. Hobart W. Métodos Instrumentales de Análisis. Edit. Iberoamérica. pag: 581. USA (1991).
30. Gary T. Métodos Instrumentales de Análisis en Química Clínica. Edit. Acriba. pag: 225-232. España (1992).
31. Allenmark S. Chromatographic enantioseparation methods and applications. Ellis Horwood. pag: 43 England (1991).
32. Dolphin R. J. of Chromatogr. **122**: 259-268. (1976).
33. Szakasits J. Anal. Chem. **46**: 1648-1652. (1974).
34. Ravindranath B. Principles and Practice of Chromatography. Ellis Horwood. pag: 43. Great Britain (1989).
35. Kirkland J. J. of Chromatogr. Sci. **7**: 7-12. (1969).
36. Huber J. J. Chromatogr. Sci. **7**: 85-93. (1965).
37. Hovart G. Anal. Chem. **39**: 1422-1428. (1967).
38. Lindsay. High Pressure Liquid Chromatography. Second Edit. John Wiley & Sons. pag: 69-99,229-239. Great Britain (1972).
39. Basey A. J. of Chromatogr. **251**: 265-268. (1982).
40. Snyder L. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Second Edit. John Wiley & Sons. pag: 90,126,127,545-559. USA (1976).
41. Fleet B. J. Chromatogr. Sci. **12**: 747-754. (1967).
42. Polesuk J. J. Chromatogr. Sci. **11**: 226-233. (1973).
43. Engelhardt H. High Performance Liquid Chromatography. Spring-Verlag. Berlín (1979).
44. Chapman W., and Hovart R. J. Agric. Food Chem. **37(4)**: 947-950. (1989).