

00567

3
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

**DESARROLLO DE UN METODO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIENCIA PARA EL ANALISIS QUIMICO DE NIXTAMAL Y POZOL.**

SANTILLANA HINOJOSA MARIA DEL ROCIO

ASESORA DE LA TESIS:
M.C.MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE

ASESORA TÉCNICA:
DRA. LUZ ELENA VERA AVILA

M. en Ciencia de Alimentos (Química de Alimentos).

1995.



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5681

U.N.A.M. 00567

$\frac{3}{28}$

FACULTAD DE QUIMICA

'Desarrollo de un...'

MAESTRIA EN CIENCIA

DE ALIMENTOS (QUIMICA

DE ALIMENTOS).

PRESENTA:

Santillana Hinojosa,

Maria del Rocío.

1995

SANTILLANA HINOJOSA MARIA DEL ROCIO

JURADO ASIGNADO

Presidente: M.en C. Santiago Capella Vizcaíno
PrimerVocal: Dra. Luz Elena Vera Avila
Secretario: Dra. Amanda Gálvez Mariscal
1er. Suplente: M. en C. Francisca Aída Iturbe Chiñas
2do. Suplente: Dr. Octavio Paredes López

Trabajo que se desarrollo en el

**Lab 324 del Edificio de Alimentos y Biotecnología del Conjunto "E"
de la Facultad de Química de la UNAM**

Director de la Tesis

M.C. María del Carmen Wachter Rodarte

Asesora Técnica

Dra. Luz Elena Vera Avila

Sustentante

Q.F.B. María del Rocío Santillana Hinojosa

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT proyectos 894308 y 0655-N9110 por el apoyo financiero otorgado.

A la Dirección General de Intercambio Académico UNAM por apoyar una estancia de investigación en la Universidad de Reading, Gran Bretaña.

A la Fundación Internacional para la Ciencia Suecia

Al Consejo Británico

A la M. en C. Ma. del Carmen Wachter Rodarte por su dirección para la realización de este trabajo.

A la Dra. Luz Elena Vera y Al Dr. Michel Thibert por su asesoría técnica para la realización de este trabajo

Al M. en C. Francisco Rojo por sus asesorías.

Al Dr. J. David Owens.

Al Q.F.B. Francisco Belmar de Perkin Elmer por su paciencia y continuo soporte técnico en el manejo del cromatógrafo de líquidos.

Al Ing. Gilberto Fábila, por su apoyo en el análisis de regresión múltiple, aunque finalmente no pudo ser incluido.

A mis maestros y sinodales

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Idalia, Martha Giles, Andrea Trejo, Tere, Gloria por los buenos y no tan buenos momentos vividos juntos.

A todos aquellos quienes de alguna manera colaboraron para que esto fuera posible.

A la UNAM y de manera muy especial a la Facultad de Química

INDICE

| | página. |
|--|----------|
| Introducción | 1 |
| Objetivo General | 3 |
| Objetivos particulares | 3 |
| Generalidades | 4 |
| Alimentos fermentados tradicionales | 4 |
| Fermentaciones ácido lácticas | 5 |
| Estudio de los alimentos fermentados tradicionales | 5 |
| El pozo! | 7 |
| Separación de carbohidratos | 13 |
| Separación de ácidos orgánicos | 13 |
| Características de la Cromatografía de Intercambio Iónico | 13 |
| Separación de azúcares en sílicas aminadas | 18 |
| Limpieza de las muestras | 19 |
| Certificación de métodos | 21 |
| Análisis de alimentos y productos fermentados por HPLC | 22 |
| Materiales y métodos | |
| Equipoy materiales empleados | 29 |
| Disolventes y Reactivos | 30 |
| Disoluciones de estándares | 30 |
| Preparación de eluyentes | 31 |
| Limpieza de la columna Aminex | 31 |
| Regeneración de la columna Aminex | 32 |
| Lavado de la columna aminada | 32 |
| Regeneración de la columna aminada | 32 |
| Lavado del detector | 32 |
| Separación | 33 |
| Curvas de calibración | 33 |
| Toma de muestras | 34 |
| Preparación de las muestras | 35 |
| Extracción | 35 |
| Métodos alternativos de clarificación | 35 |
| Homogeneidad de la masa | 36 |
| Limpieza de la muestra | 37 |
| Porcentaje de recuperación de estándares de glucosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético | 37 |
| Elución de estándares de ácidos láctico y acético por el cartucho Sep-Pak C18 | 38 |
| Elución de estándares de glucosa y sacarosa por el cartucho Sep-Pak C18 | 38 |

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| Tabla 9 | Porcentaje de recuperación de estándares de azúcares y ácidos en extractos clarificados de masas con estándares después de ser pasados por cartuchos Sep-Pak C18 | 67 |
| Tabla 10 | Datos estadísticos para la repetibilidad del método | 68 |
| Tabla 11 | Porcentajes de recuperación de estándares en masas a las que se le añadieron diferentes concentraciones de cada estándar. | 72 |
| Tabla 12 | Datos estadísticos para calcular la exactitud del método | 73 |
| Tabla 13 | Concentraciones de azúcares y ácidos en muestras de maíz, masa de nixtamal y pozol | 75 |

INTRODUCCION

Existen en México una amplia variedad de alimentos tradicionales fermentados indígenas que no han sido estudiados en detalle, a diferencia de otros alimentos fermentados orientales, como la salsa de soya. el miso, el tempeh y algunos alimentos africanos como el mageu y el ogi.

En las áreas rurales de México el cereal que más se consume es el maíz, el cual proporciona el 70% de las calorías y cerca del 50% de las proteínas de la dieta diaria (Paredes y col., 1981). En términos de volúmen, el maíz es el grano más importante que se produce en México, representando de esta manera la principal fuente alimenticia.

Los alimentos fermentados en México se han producido desde tiempos prehispánicos y puesto que el maíz es la base de nuestra alimentación, resulta evidente que la mayoría de los alimentos fermentados tradicionales son preparados a partir de este cereal.

Es importante el estudio y caracterización de estos alimentos, así como su proceso de producción, ya que se elaboran de materias primas disponibles y de bajo costo , en forma relativamente simple y sin requerimientos de equipo sofisticado. Entre los beneficios de la fermentación se pueden mencionar la conservación de productos animales y vegetales , la conversión de materiales desagradables al gusto en alimentos apetecibles, la destrucción de componentes indeseables, la disminución del tiempo requerido para cocción y la reducción del riesgo de ingerir microorganismos patógenos o sus toxinas. Además estos alimentos fermentados tradicionales han sido consumidos desde tiempos inmemoriales y son aceptados culturalmente (Steinkraus 1983).

El pozol es una bebida refrescante de origen maya, preparada por fermentación de masa de maíz nixtamalizada, que suspendida en agua es consumida como alimento básico por algunos grupos étnicos del sur y sureste de México, como Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y en menor escala en Veracruz y Oaxaca.

Es necesario realizar investigaciones detalladas sobre las relaciones precisas que existen entre la actividad biológica de los microorganismos y los cambios químicos del sustrato en condiciones controladas, para así determinar las cepas de microorganismos cuya acción resulta en propiedades sensoriales adecuadas.

Es una fermentación sólida en la que están involucrados un sustrato complejo que contiene carbohidratos, lípidos y proteínas y una flora microbiana compleja. El grupo microbiano predominante y que inicia la fermentación es el de las bacterias lácticas. Este género está caracterizado por bacterias gram positivo, catalasa, negativo, microaerófilos, o aerobios facultativos, la glucosa es metabolizada ya sea en forma homofermentativa y el producto final de la fermentación es ácido láctico, y en el metabolismo heterofermentativo, es el ácido láctico, CO₂ y etanol o ácido acético. Para comprender su acción sobre el sustrato es necesario desarrollar una técnica analítica que permita medir el consumo de carbohidratos, así como la producción de metabolitos (ácido láctico, ácido acético y etanol), en este sustrato tan complejo.

Se han empleado técnicas cromatográficas en la determinación de estos compuestos en medios de fermentación bien definidos o complejos, así como en alimentos. Entre ellos la cromatografía en papel o en capa fina, pero estos se han reemplazado por métodos instrumentales como la cromatografía de gases o de líquidos (Robards y col. 1986).

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), es un método rápido, selectivo y específico para analizar azúcares individuales, ácidos orgánicos y etanol.

Este trabajo forma parte de una línea de investigación sobre el pozol, cuyo objetivo global es la caracterización de las bacterias participantes en la fermentación, así como las relaciones que existen entre la actividad biológica de los microorganismos y de los cambios químicos del sustrato. Estos conocimientos permitirán mejorar la comprensión del proceso de fermentación, y así podrán ser aplicados en el mejoramiento y control de la misma.

Específicamente esta investigación está orientada hacia el desarrollo de una metodología analítica, por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, para la determinación de azúcares y ácidos orgánicos en nixtamal y el consumo de azúcares, así como la producción de metabolitos como el ácido láctico, acético, y el etanol en pozol.

| | |
|---|----|
| Elución de estándares adicionados a masa de nixtamal extraída, clarificada y pasada por el cartucho Sep-Pak C18 | 38 |
| Recuperación de diferentes concentraciones de estándares en masa de nixtamal | 39 |
| Análisis de maíz crudo y pozoles | 40 |
| Análisis estadístico | 40 |

Resultados y Discusión

| | |
|--|----|
| Separación | 47 |
| Separación de carbohidratos | 47 |
| Separación de ácidos orgánicos | 47 |
| Extracción | 55 |
| Clarificación de la muestra | 58 |
| Homogeneidad en la composición de la masa de nixtamal | 61 |
| Limpieza de la muestra: Extracción y Clarificación | 62 |
| Recuperación de estándares de glucosa y sacarosa pasados por el cartucho Sep-Pak C18 | 65 |
| Porcentajes de recuperación de estándares adicionados a masa de nixtamal, incluida la limpieza con el cartucho Sep-Pak C18 | 66 |
| Recuperación de diferentes concentraciones de estándares añadidos a masa de nixtamal | 72 |
| Conservación de las muestras | 74 |
| Análisis de maíz crudo y pozoles | 74 |
| Conclusiones | 77 |
| Recomendaciones | 79 |
| Bibliografía | 80 |

Índice de Figuras

| Figura | Descripción | página |
|--------|---|--------|
| Fig. 1 | Diagrama de elaboración de pozol en los Altos de Chiapas | 9 |
| Fig. 2 | Toma de muestra en el experimento de homogeneidad de la masa | 37 |
| Fig. 3 | Curva de calibración de glucosa en columna aminada en equipo No. 3 | 42 |
| Fig. 4 | Curva de calibración de sacarosa en columna aminada en equipo No. 3 | 42A |
| Fig. 5 | Curva de calibración de ácido láctico en columna Aminex en equipo No. 3 | 42B |
| Fig. 5 | Curva de calibración de ácido acético en columna Aminex en equipo No. 3 | 42C |
| Fig. 7 | Diagrama del procedimiento de extracción y clarificación propuesto | 40 |
| Fig. 8 | Diagrama del proceso de limpieza de la muestra propuesto | 41 |

| | | |
|---------|--|----|
| Fig. 9 | Cromatograma típico de estándares de los azúcares sacarosa y maltosa en la columna Aminex, eluyente H ₂ SO ₄ a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1 | 49 |
| Fig.10 | Cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex, eluyente H ₂ SO ₄ a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1 | 50 |
| Fig.11 | Cromatograma típico de masa de nixtamal sola (sin estándares) en la columna Aminex, eluyente H ₂ SO ₄ a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1 | 51 |
| Fig. 12 | Cromatograma típico de masa de nixtamal con estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex, eluyente H ₂ SO ₄ a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No.1 | 52 |
| Fig. 13 | Cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa en la columna aminada, eluyente acetonitrilo/agua 80/20 a un flujo de 1.0 ml/min, en equipo No. 2 | 53 |
| Fig. 14 | Cromatograma típico de masa de nixtamal con estándares de los azúcares glucosa y sacarosa en la columna aminada, eluyente acetonitrilo/agua 80/20 a un flujo de 1.0 ml/min, en equipo No. 2 | 54 |
| Fig. 15 | Diagrama del procedimiento de extracción y clarificación establecido | 70 |
| Fig. 16 | Diagrama del procedimiento de limpieza de la muestra establecido | 71 |

Índice de Tablas

| Tabla | Descripción | página |
|---------|--|--------|
| Tabla 1 | Concentraciones de las soluciones stock de los estándares | 31 |
| Tabla 2 | Concentraciones de los estándares añadidos a la masa de nixtamal | 39 |
| Tabla 3 | Porcentaje de recuperación de estándares en masa de nixtamal empleando diferentes volúmenes de agua para la extracción. | 56 |
| Tabla 4 | Porcentaje de recuperación de estándares en masas congeladas durante 4 días y descongelando en días sucesivos. | 62 |
| Tabla 5 | Porcentaje de recuperación de estándares en 2 muestras de la masa 1 y 3 muestras de la masa 2. | 58 |
| Tabla 6 | Porcentajes de recuperación de estándares en masa de nixtamal: Extracción y Clarificación | 62 |
| Tabla 7 | Porcentaje de recuperación de estándares de los ácidos láctico y acético después de ser pasadas soluciones de los mismos por cartuchos Sep-Pak C18 | 64 |
| Tabla 8 | Porcentaje de recuperación de estándares de azúcares en cartuchos Sep-Pak C18 | 65 |

OBJETIVO GENERAL

Establecer una técnica analítica para la determinación en el consumo de azúcares, o sustrato (nixtamal) así como la producción de metabolitos como ácidos orgánicos y etanol en pozol por cromatografía de líquidos de alta resolución, para el seguimiento de fermentaciones tradicionales de pozol o fermentaciones asépticas controladas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar condiciones de extracción, clarificación y limpieza de la muestra.
- 2) Determinar condiciones de separación de los analitos en una o varias columnas.
- 3) Cuantificar azúcares en masa de nixtamal y azúcares y productos de fermentación en algunos pozoles tradicionales.

GENERALIDADES

ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

Los alimentos fermentados pueden ser clasificados en los siguientes grupos, dependiendo del sustrato que se utilice:

- 1) Aquéllos elaborados a base de granos (maíz, sorgo, mijo, arroz, y trigo), como pozol (México), kenkey, ogi y mageu (Africa).
- 2) Aquéllos elaborados de nueces y otras semillas como el ontjom (Indonesia)
- 3) Aquéllos elaborados de tubérculos, como el gari (Africa).
- 4) Aquéllos elaborados de frutas y vegetales como el gundruk (Nepal)
- 5) Bebidas derivadas de savia de arboles, como el pulque (México).

Muchos de los alimentos fermentados de plantas se preparan por procesos de fermentación en estado sólido, en las cuales se permite que el sustrato fermente espontáneamente (usualmente procesos latinoamericanos y africanos) o por adición de inóculos microbianos (procesos asiáticos).

Los cereales son productos básicos para la alimentación en muchos países y la fermentación de granos de cereales, para preparar una amplia variedad de alimentos tiene una larga historia. Los alimentos fermentados de maíz se encuentran en Africa y Centro y Sudamérica, los de mijo en Africa y el sur de Asia. Los alimentos fermentados basados en arroz se consumen en India, China, y el sureste de Asia y el Lejano Oriente, mientras que aquéllos de trigo son particularmente importantes en el Medio Este de Turquía y el Lejano Oriente (Aidoo, 1992).

Fermentaciones Ácido Lácticas

Las bacterias lácticas tienen un papel esencial en la conservación y producción de alimentos saludables. Producen ácido láctico si son homofermentativas y además de este compuesto ácido acético y etanol si su metabolismo es heterofermentativo a partir de azúcares. Las fermentaciones lácticas son generalmente baratas y con frecuencia no requieren de energía para su preparación. Los alimentos fermentados con bacterias lácticas, juegan un papel importante en la alimentación de muchas poblaciones en cada continente. Las fermentaciones lácticas tienen como ventajas, conferir a los alimentos resistencia a la descomposición y a la producción de toxinas, así como modificar el sabor de los ingredientes originales y con frecuencia mejorar su valor nutritivo.

Como los alimentos enlatados y/o congelados son muy caros y no accesibles para millones de personas en el mundo, la fermentación láctica y el salado son de los métodos más prácticos de conservación y con frecuencia resaltan las cualidades sensoriales y nutricionales de los vegetales frescos, de los cereales y de las mezclas de leche con cereales (Steinkraus, 1992).

Estudio de los alimentos fermentados tradicionales

De acuerdo con Yong Fook-Min L. (1992), los países en vías de desarrollo, para hacer un uso total de la biotecnología en sus alimentos fermentados tradicionales, deben conocer y adquirir experiencia en las siguientes áreas:

El arte de la fermentación: sin el conocimiento del arte de los alimentos fermentados tradicionales, un investigador no puede dar una explicación científica del proceso y dar asistencia para mejorarlo.

Microbiología: es esencial conocer qué microorganismos involucrados en la fermentación son útiles y cómo afectan a su fisiología y metabolismo los ambientes físico y químico de la fermentación y cómo sus actividades microbiológicas afectan el proceso de fermentación. Los microorganismos normalmente hidrolizan los carbohidratos, proteínas y lípidos presentes en los materiales crudos a fermentarse por liberación de enzimas en el medio. Conforme los materiales son hidrolizados, el ambiente cambia. A veces esto se refleja por una caída en el pH y los productos de fermentación como péptidos y aminoácidos pueden posteriormente ser convertidos en pequeñas moléculas de compuestos volátiles que mejoran las características de sabor de los alimentos fermentados.

Bioquímica: el entendimiento de las actividades bioquímicas de los microorganismos participantes en la fermentación puede ayudar a explicar el cambio en la textura, así como el origen de las sustancias de sabor frecuentes en los alimentos fermentados. El sabor y la textura son propiedades importantes de los alimentos fermentados.

EL POZOL

Los alimentos fermentados en México, se han producido desde tiempos prehispánicos y siendo el maíz la base de la alimentación, la mayoría de los alimentos fermentados tradicionales son preparados a partir de este cereal.

Dentro de estos alimentos se encuentra el pozol, que es una bebida refrescante de origen maya preparada por fermentación de masa de maíz nixtamalizado, la cual es suspendida en agua y se consume como alimento básico por algunos grupos étnicos del sur y sureste de México: chontales y choles de Tabasco, mayas de Campeche y Yucatán, lacandones, tzotziles o chamulas, tzeltales, zoques, choles y mames de Chiapas y zapotecos de Oaxaca.

Este alimento es preparado, en forma doméstica, ya sea en pequeñas cantidades, para consumo de la misma familia que lo elabora, o en una cantidad un poco mayor para ser vendido en el mercado, de acuerdo a la manera tradicional que ha sido pasada de generación en generación.

El proceso de elaboración para el pozol indígena y/o mestizo se presenta en la Figura 1, los granos de maíz preferentemente blanco (*Zea mays L.*) son hervidos durante aproximadamente una hora en agua conteniendo cal (alrededor de 1% de hidróxido de calcio peso/volumen). Cuando los granos se han hinchado y sus pericarpios se pueden quitar fácilmente con los dedos, los granos enfriados se frota con las manos y se enjuagan con agua 3 o 4 veces, se dejan en remojo un tiempo y una vez escurrido el exceso de agua, se obtiene el nixtamal. Este es molido en un metate o en un pequeño molino de mano para obtener una masa martajada. La masa es entonces moldeada en bolas de varias formas y tamaños, algunas de ellas hasta de un kilo, las cuales son envueltas preferentemente, en hojas de plátano (*Musa spp*), de platanillo (*Heliconia spp*), o de hoja blanca con el objeto de reducir la desecación durante el tiempo que dure la fermentación.

La fermentación varía de uno a cinco días o más, algunos grupos indígenas como los lacandones y chamulas, dejan fermentar el pozol dos o más semanas y lo consumen ya enmohecido. El pozol es suspendido en agua en proporción de 1:2 o 1:3 (masa:agua) aproximadamente, y es bebido sólo o adicionado de sal, azúcar, de miel o de diversas clases de chiles secos (*Capsicum annum* L) que han sido tostados y molidos (Ulloa 1981). En Tabasco añaden semillas de cacao molidas a la masa de nixtamal recién hecha, antes de que fermente. Esta variedad de pozol es denominada chorote.

El pozol también ha sido utilizado con fines medicinales: los lacandones utilizan el pozol adicionado de miel de abeja para disminuir la fiebre y controlar la diarrea y otros padecimientos intestinales. Los mayas utilizaban cataplasmas de pozol enmohecido para curar infecciones superficiales y heridas. También ha tenido una gran importancia ceremonial, pues ya desde tiempos prehispánicos se usaba como ofrenda en las diversas festividades mayas relacionadas con el cultivo y la cosecha del maíz.

Como consecuencia de la introducción de nuevos productos procesados por la industria alimentaria, el consumo de pozol ha ido disminuyendo en las poblaciones rurales, a pesar de ser éste un alimento básico para dichas poblaciones y está siendo reemplazado por bebidas embotelladas de menor valor nutritivo.

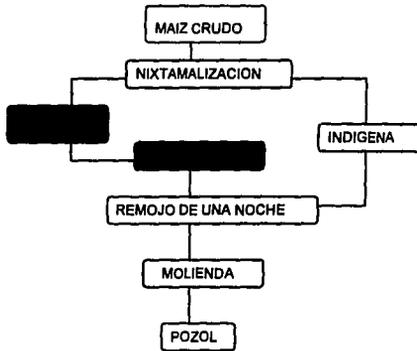


Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración de pozol indígena o mestizo en los Altos de Chiapas. Tomado de Cañas 1991.

Dada la importancia de esta bebida en la dieta de los grupos étnicos mencionados anteriormente, Cravioto y col. (1955) realizaron el primer estudio científico sobre el pozol. En éste se comparó la composición del pozol con la de granos de maíz usados en su preparación. El análisis mostró un aumento de la concentración de proteína cruda, de algunos aminoácidos como la lisina y el triptófano y de ciertas vitaminas como la niacina y la riboflavina en el pozol con respecto al maíz. No obstante otras como la tiamina y el fósforo disminuyeron. Además comprobaron el incremento en el valor biológico de las proteínas de la masa de maíz fermentada, en relación con el maíz no fermentado.

Ulloa en 1974 estudió la microflora en muestras de pozol de Tabasco y observó que existen varias especies de mohos y levaduras que están casi siempre presentes en el pozol. Esto podrían

estar relacionado con el tipo de sustrato y con las condiciones ambientales que prevalecen en los lugares donde se prepara este alimento. *Geotricum candidum*, *Trichosporon cutaneum* y varias especies de *Candida* están con frecuencia asociados al pozol de pocas horas de fermentación, mientras que algunos mohos, como *Cladosporium cladosporoides*, *Cl. herbarum*, *Monilia sitophila* y *Mucor rouxianus* o *Mucor racemosus*, aparecen en el pozol cuando su superficie se va secando y su pH va disminuyendo. Otros mohos que se han aislado del pozol son *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium monoliforme*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viridae* y algunas especies de *Penicillium* (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

Entre las bacterias aisladas se encuentran *Bacillus cereus*, *Paracolobactrum aerogenoides*, *Escherichia coli var. napolitana*, *Agrobacterium azotophilum*, *Achromobacter pozolis*, *Pseudomonas mexicana* y *Aerobacter aerogenes* (Ulloa y Herrera 1976-1982), y varias especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Cañas, 1991).

Se ha observado que *Agrobacterium azotophilum* presenta antagonismo sobre varias especies de bacterias, levaduras y mohos, algunas de ellas patógenas para el hombre, lo cual podría ser una explicación del uso medicinal que se le ha dado a este alimento (Ulloa y Herrera 1976-1982).

Taboada y col. (1971) demostraron la presencia de fijación de nitrógeno que nunca había sido observada en alimentos fermentados y se piensa que este fenómeno puede contribuir al incremento de proteína durante la fermentación.

Leal y colaboradores (1987) corroboraron el incremento de proteína durante la fermentación de masa de maíz nixtamalizado y encontraron que la suplementación con fuentes de nitrógeno proteicas, la concentración inicial de proteínas de la masa y la nixtamalización son factores que influyen en la producción de proteína durante esta fermentación. Determinaron asimismo el

efecto positivo de la fermentación láctica en la fijación de nitrógeno, medida como el aumento en la relación proteína/cenizas durante la fermentación del pozol.

Wacher y col. (1993) realizaron un estudio para determinar las diferencias microbiológicas entre dos tipos de pozol elaborado en la zona de los Altos de Chiapas, así como las fuentes de inóculo en las etapas de elaboración del mismo, encontrando que no existían diferencias globales significativas entre muestras de los dos tipos de pozol y que la fuente de inóculo más importante fue la molienda.

Ramírez (1987) reportó incrementos en las concentraciones de proteína, lisina, triptofano y niacina en varias muestras de pozoles del sureste de México, asimismo llevo a a cabo estudios con cultivos puros y mixtos aislados del pozol con sustratos esterilizados en autoclave y con dióxido de etileno y en condiciones ambientales controladas. El reporta que en la fermentación de la masa inoculada con el cultivo mixto ocurre una fermentación láctica en los 3 primeros días y en los siguientes se lleva a cabo una interacción compleja de la flora, produciéndose cambios organolépticos y un aumento en la concentración de niacina.

La predominancia de *Leuconostoc spp* y *Lactobacillus spp* homofermentativos sugiere que estos microorganismos juegan un papel importante en la fermentación del pozol. Algunas de las bacterias lácticas mostraron actividad hidrolítica sobre el almidón a pesar de que en el Manual Bergeys esta actividad esta asociada sólo a algunas especies de lactobacilos (Nuraida 1988).

La mayoría de los estudios reportados sobre el pozol están relacionados con la identificación y sucesiones microbianas durante la fermentación. Desde el punto de vista científico sería de gran interés el estudio sobre las relaciones que existen entre la actividad biológica de los microorganismos y los cambios químicos del sustrato.

Para esto es necesario establecer un método para analizar cualitativa y cuantitativamente los azúcares y productos de fermentación en el nixtamal y pozol.

Separación de carbohidratos

Las primeras separaciones de azúcares se realizaron por medio de la cromatografía en papel. La primera columna usada para la separación de estos compuestos fue la filtración en gel y posteriormente fueron remplazados por el intercambio iónico, populares en la década de los 70s pero su desventaja son los largos tiempos del análisis y la necesidad de trabajar a altas temperaturas, así como el hecho de que haya pares de carbohidratos que no separen. Posteriormente se utilizaron las fases polares químicamente enlazadas, principalmente la amino, (fase normal) esta fase debe ser compatible con una amplia variedad de fases móviles polares en donde el agua se espera como un componente importante, para asegurar la adecuada solubilidad de los azúcares. En la mayoría de reportes que utilizan esta columna, la fase móvil empleada son mezclas de acetonitrilo-agua, en una proporción 80/20 si se utiliza para separar azúcares simples y en una proporción 40/60 si se utiliza para separar oligosacáridos (Macrae 1985).

Separación de ácidos orgánicos

La separación de ácidos orgánicos se ha llevado a cabo a través de columnas con fases polares químicamente enlazadas C18 (fase reversa) o por intercambio iónico, particularmente intercambio catiónico, siendo este último ampliamente utilizado. La separación de ácidos por cromatografía de líquidos se considera un problema resuelto, excepto para los ácidos que se encuentran en concentraciones trazas, pues no existen detectores lo suficientemente sensibles a estos, siendo necesario concentrar las muestras (Gomis 1992).

Características de la Cromatografía de Intercambio Iónico. Separación de azúcares y ácidos orgánicos en intercambiadores iónicos.

La cromatografía de intercambio iónico es utilizada principalmente para la separación de iones y sustancias ionizables, es decir sustancias que forman iones por manipulación del pH o complejación. En esta cromatografía una de las principales contribuciones a la retención es la atracción electrostática de los iones de la fase móvil, ambos los iones de la muestra y del eluyente, por los centros iónicos de carga opuesta inmovilizados en la fase estacionaria. Los iones de la muestra se separan, basándose en las diferencias en su afinidad relativa por los centros iónicos de la fase estacionaria comparado con los contraiones de la fase móvil en un sistema dinámico de intercambio, en la cual los iones

de la muestra y del eluyente interactúan con los centros iónicos de la fase estacionaria conforme pasan por la columna (Poole 1991).

Desde un punto de vista global la retención en la cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo con empaques que poseen grupos funcionales cargados. El mecanismo de retención más común es un simple intercambio de iones de la muestra X por los iones de la fase móvil asociados con los grupos cargados R de la fase estacionaria



En esta cromatografía los cationes de la muestra X^+ compiten con los iones de la fase móvil Y^+ por los sitios iónicos R^- del intercambiador iónico. Los iones de la muestra que interactúan débilmente con el intercambiador iónico (en presencia de los iones que compiten de la fase móvil) serán débilmente retenidos en la columna y eluyen primero en el cromatograma. Los iones de la muestra que interactúan más con el intercambiador iónico pueden ser más fuertemente retenidos y eluir después (Snyder 1982).

Sin embargo esta es una representación pobre del proceso de retención, éste depende de factores otros que las interacciones entre las fuerzas coulombicas. Con iones orgánicos y biopolímeros, por ejemplo las interacciones de sorción entre la muestra y las regiones no iónicas del soporte son importantes. La fase móvil con frecuencia es de gran fuerza iónica, esto favorece las interacciones hidrofóbicas por la disminución en la solubilidad de la muestra. Para los biopolímeros los efectos de exclusión por tamaño pueden ser importantes, puesto que se desarrollan potenciales de membrana de Donnan en los soportes cargados, los iones que tienen la misma carga pueden ser excluidos del volumen de poro por repulsión iónica (Kihara y col. 1987 y Poole 1991).

La cromatografía de intercambio iónico ha utilizado 3 diferentes tipos de empaques

- Resinas poliméricas porosas (resinas convencionales de intercambio iónico)
- Resinas pelliculares
- Sílices intercambiadoras de iones

Historicamente los polímeros porosos han sido ampliamente utilizados en la separación de muestras como aminoácidos, péptidos y carbohidratos. Estos empaques consisten de

esferas microporosas con un diámetro de 10 μm y son hechas del copolímero de poliestireno-divinilbenceno sustituido con grupos funcionales iónicos. Aunque estos polímeros se siguen utilizando para la separación de pequeñas moléculas, las columnas son menos eficientes por la difusión lenta de las moléculas de la muestra en los microporos de la matriz del polímero.

Las resinas poliméricas se hinchan en presencia de fase móviles acuosas y este hinchamiento determina su porosidad y habilidad para funcionar como intercambiador de iones con moléculas grandes. El hinchamiento es controlado por el divinil benceno entrecruzado, a mayor concentración de este se obtienen partículas más rígidas que se hinchan menos y que son más fuertes. Estas resinas contienen aproximadamente 8.0 % de divinil benceno.

Las resinas pelliculares consisten de partículas o esferas de vidrio que son recubiertas con el polímero intercambiador de iones, donde hay una difusión más rápida con la capa fina del polímero. El resultado es un considerable mejoramiento en la eficiencia de la columna.

Las sílices intercambiadoras de iones, son sílices viniladas las que reaccionan con estireno y luego se sulfonan para obtener un intercambiador de cationes. Estas sílices resisten muy bien la presión, se pueden obtener en partículas esféricas de granulometría pequeña y reproducible y presentan una gran superficie de contacto por lo que están desplazando a los otros empaques mencionados.

Existen 3 variables de la fase móvil que afectan a la retención de un soluto iónico en una columna de intercambio iónico: la fuerza iónica, el pH y la presencia de modificadores orgánicos. La más importante es el control de la fuerza iónica, que se efectúa con las sales del tampón.

La fuerza iónica está relacionada con la concentración y la carga de los iones disueltos en el eluyente, el control de esta fuerza es crítico, puesto que esta fuerza no es más que una medida del número de contraiones presentes en la fase móvil. Este número de contraiones debe controlarse, ya que es quien establece el delicado equilibrio entre los sitios activos del intercambiador y la muestra, permitiendo que ésta sea atraída y desplazada alternativamente durante su recorrido a lo largo de la columna. Si la concentración de los contraiones en la fase móvil es demasiado elevada, los iones de la muestra no encontrarán

sitios activos disponibles y no serán retenidos, por el contrario si la concentración de los contraiones es demasiado baja, los iones de la muestra no se eluirán de la columna.

La retención de la muestra puede ser controlada a través de la variación del pH de la fase móvil, una disminución en el pH, reduce particularmente la ionización de los intercambiadores catiónicos débiles.

El efecto de la adición de disolventes orgánicos, es reducir la retención de la muestra con el incremento en la cantidad del disolvente adicionado. Además se producen cambios en la selectividad, los disolventes que se han usado en el intercambio iónico incluyen al metanol, etanol, acetonitrilo y dioxano.

Otra variable que puede afectar la separación en cromatografía de intercambio iónico es la temperatura, un aumento en la temperatura, reduce la viscosidad de la fase móvil y nos proporciona una separación más eficiente, además disminuye los valores de las k' de la muestra.

La eficiencia de las columnas de intercambio iónico se mejora si son operadas a 60°C y algunos estudios han mostrado que un cambio en el pH o la adición de pequeño porcentaje de disolventes orgánicos en la fase móvil puede producir un mejoramiento en la eficiencia de la columna y en la simetría de las bandas cromatográficas.

Si algunos compuestos presentes en la muestra o contaminantes de la fase móvil son fuertemente retenidos en las columnas de intercambio iónico esto provoca que los valores de k' disminuyan y por lo tanto disminuya la eficiencia de la columna. Esto puede solucionarse con el uso de precolumnas, un adecuado tratamiento de la muestra o regeneración de la columna. Esta última es llevada a cabo a través de un lavado de la columna con un disolvente fuerte, seguido de un lavado extenso con la fase móvil empleada (Snyder 1982 y Yost 1980).

La separación de carbohidratos por intercambio iónico es un método bien establecido que ha sufrido un rápido desarrollo técnico por el uso de modernos empaques y por nuevas técnicas de separación.

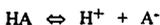
El método más antiguo y común de separar mezclas de carbohidratos es el intercambio de ligantes usando resinas de intercambio iónico poliméricas cargadas con iones metálicos como calcio, recomendado para alcoholes de azúcares y con plata para determinar la distribución de oligómeros, utilizando agua desmineralizada o soluciones de disolventes orgánicos como fase móvil. La retención en este caso es gobernada por una combinación de exclusión estérica y atracción electrostática entre el átomo de oxígeno electronegativo

y los cationes del metal electropositivos. Los carbohidratos también se han separado a través de la formación de complejos negativos estables formados entre los grupos vecinales diol de los azúcares con el anion borato. Los carbohidratos son ácidos débiles (pKa 11.9-12.5) y pueden ser separados por cromatografía de intercambio aniónico utilizando empaques poliméricos peliculares a pHs mayores de 12 y en soluciones acuosas de hidróxido de sodio o de hidróxido de sodio/acetato de sodio como eluyente. En los carbohidratos se espera una carga negativa singular por unidad de sacárido y eluyen en orden al incremento en su tamaño y al grado de ionización efectiva. El desarrollo del detector amperométrico de pulsos, más sensible que el detector de índice de refracción (IR), ha contribuido al incrementado interés en el análisis de carbohidratos, además el detector amperométrico de pulsos es compatible con la elución por gradiente.

La cromatografía de exclusión de iones es una técnica valiosa para la separación de sustancias neutras o debilmente ácidas o básicas de compuestos iónicos, basada en un mecanismo de exclusión de Donnan más que un intercambio iónico. Un empaque de intercambio iónico con la misma carga formal inmovilizada que los iones de la muestra se selecciona para este propósito y la retención depende del grado de acceso de la muestra al volumen de los poros del empaque. Los iones con la misma carga que el empaque son repelidos y eluyen en el volumen intersticial, mientras los materiales no iónicos o debilmente iónicos son retenidos y separados por partición entre el disolvente en el volumen del poro y el volumen intersticial. La cromatografía de exclusión de iones es particularmente útil para la separación de ácidos orgánicos utilizando un intercambiador de cationes tipo ácido fuerte en la forma de hidrógeno y un eluyente que contenga un ácido fuerte. Y en menor extensión estos sistemas se utilizan también para la separación de azúcares, alcoholes, fenoles y ciertos compuestos inorgánicos debilmente ionizados.

La retención de los ácidos orgánicos en la cromatografía de exclusión de iones depende principalmente de la disociación del ácido (ellos generalmente eluyen en el orden de sus valores de pKa) así como la extensión de las interacciones de sorción (polares o no polares) del ácido con la fase estacionaria. Se ha encontrado que los ácidos dibásicos o ramificados son menos retenidos que los de cadena lineal. (Poole 1991).

La cromatografía de intercambio catiónico es comunmente empleada para la separación de ácidos orgánicos que pueden existir como iones en condiciones adecuadas de pH.



La ionización de los ácidos en un sistema de cromatografía de intercambio iónico se controla variando el pH de la fase móvil. Un incremento del pH permite un incremento en la ionización de los ácidos, y viceversa por una disminución de pH. Un incremento en la ionización provoca una disminución en la retención de la muestra. Los intercambiadores catiónicos más comunes consisten de una fase estacionaria polimérica con grupos funcionales como el $-\text{SO}_3^-$.

Separación de azúcares en sílicas aminadas

La separación de los principales azúcares en alimentos como la fructosa, glucosa, sacarosa, maltosa y lactosa se ha llevado a cabo utilizando columnas aminadas (Scott 1992). Una mezcla de agua y acetonitrilo es utilizada como eluyente, la popularidad de este empaque está relacionado con:

- La sílica es más resistente a la presión que los intercambiadores de iones.
- Hay un rápido intercambio de masa entre la fase móvil y la estacionaria, lo que permite utilizar flujos de eluyente grandes sin pérdida significativa de resolución.
- No se necesita derivatización de la muestra.

El proceso de separación en este material fue establecido por Meagher and Furst como una cromatografía de fase inversa, a su vez Rabel y col. la consideran como fase normal (porque al incrementar la polaridad de la fase móvil se disminuyen los tiempos de retención). Hetinger y Majors indican una interacción competitiva del agua en el eluyente y los azúcares inyectados en la columna con la fase polar. Majors reportó que los azúcares son retenidos porque sus grupos hidroxilo reaccionan con los grupos amino de la columna. Jones y col. encontraron que los valores de k' son proporcionales a la cantidad de grupos amino y se vuelven constantes a altas cantidades de estos grupos. Aitzetmuller ha investigado las modificaciones físicas de la sílica por recubrimiento con aminas. La sílica impregnada *in situ* es más barata que las sílicas modificadas químicamente y más estable además los tiempos de retención no cambian aún después de un uso prolongado, pues la amina es adicionada en el eluyente. Wheals, White y sus colaboradores investigaron la influencia de diferentes aminas en la retención de azúcares, y encontraron que la retención y la eficiencia en la separación parece estar influenciada por el tipo de amina.

Veerhaar y col. investigaron la influencia del grupo amino en las sílicas químicamente modificadas sobre la velocidad de mutarotación de los azúcares, así como la composición de la fase estacionaria a diferentes proporciones de acetonitrilo/agua en la fase móvil.

Sus resultados, utilizando una columna μ Carbohydrate indican que no hay diferencia entre la amplitud de los picos o los tiempos de retención, utilizando acetonitrilo/agua como eluyente y a una concentración de amina de 0.003M, esto puede ser por que las formas α y β de los azúcares tienen el mismo factor de capacidad k' o que la mutarotación procede rápidamente en este sistema. Además los grupos amino son responsables de la alta velocidad de reacción de la mutarotación e indican que el mecanismo de separación es una partición líquido-líquido por que la composición de la fase estacionaria parece ser más rica en agua que en la fase móvil.

Samuelson por su parte concluye que la retención aumenta con el tamaño molecular del azúcar, hay más retención para las aldosas que para las cetosas y mayor retención para los anómeros β que para los α .

Las fases aminadas también tienen la propiedad de comportarse como intercambiadores de aniones débiles y un control cuidadoso del pH puede ser importante especialmente para compuestos iónicos, la elución de los compuestos se da de acuerdo al incremento en su polaridad. La fuerza de la fase móvil se incrementa con el aumento en la proporción de agua, el componente más polar de la mezcla (Macrae 1985).

Limpieza de la muestra

La preparación de la muestra es importante en cualquier análisis químico. Una forma de obtener muestras representativas si son semisólidas es homogenizar con un mezclador, las muestras más complejas requieren más tratamiento.

La preparación de la muestra depende de la matriz del alimento y el tipo de cromatografía a utilizar.

Para el análisis de carbohidratos se debe tener en mente lo siguiente: los azúcares son higroscópicos y los estándares deben secarse antes de ser utilizados, la temperatura de las muestras no debe exceder los 80°C para evitar hidrólisis durante el molido, secado o la extracción, los disacáridos particularmente la sacarosa pueden ser hidrolizados en ácidos diluidos, o con las enzimas presentes en ciertos alimentos, las soluciones diluidas de los azúcares se deben mantener en congelación y las soluciones acuosas de glucosa pueden

presentar tautómeros y anómeros y en soluciones alcalinas pueden sufrir enolización y degradación (Scott 1992).

La limpieza necesaria antes del análisis cromatográfico, depende de factores como la complejidad de la matriz del alimento o producto, el disolvente de extracción y la concentración de los analitos de interés con respecto a compuestos de interferencia. Una vez elegido el método a utilizar es necesario que el porcentaje de recuperación sea determinado. Algunas técnicas comunmente empleadas en la limpieza de la muestra son las siguientes:

-Precipitación con disolventes

En los casos en que el agua es el único disolvente utilizado, el extracto puede estar muy contaminado con compuestos polares como aminoácidos, sales y macromoléculas solubles en agua. Estas pueden ser removidas por simple precipitación con disolventes orgánicos como etanol o acetonitrilo, pero esto puede causar que los azúcares de interés se adsorban en el precipitado. En alimentos con alto contenido de lípidos, el etanol acuoso puede extraer una proporción de los lípidos en adición a los carbohidratos con frecuencia en forma de una emulsión. Si el extracto alcohólico-acuoso a su vez es extraído con cloroformo, los lípidos y una porción del etanol se pueden quedar en la fase orgánica y obtener un extracto acuoso libre de estos compuestos. La fracción lipídica puede ser removida por extracción del alimento seco con éter de petróleo antes de la extracción de los azúcares.

-Agentes clarificantes

El uso de estos agentes ha sido amplio en el análisis tradicional de carbohidratos, pero se debe de tener cuidado de que no se use en exceso y pueda interferir en el análisis cromatográfico. En algunos casos se ha utilizado el reactivo de Carrez (ferrocianuro de zinc).

-Cartuchos Sep-Pak

Cuando un extracto acuoso es pasado por un cartucho Sep-Pak C18, (pequeñas columnas cromatográficas que tienen fase estacionaria C18) cualquier molécula con características hidrofóbicas puede ser retenida y los azúcares pasar. Esta técnica ha sido empleada con

ventaja en extractos complejos obtenidos por extracción directa de cereales o cafés instantáneos. Este proceso es relativamente caro, pero simple de usar y la recuperación de los azúcares es buena (Macrae 1985).

Certificación de métodos

Cualquier método que sea nuevo deberá ser certificado para comprobar su efectividad. Los parámetros de la certificación se eligen en base a la concentración del analito dentro de la matriz y al tipo de producto que se esté analizando.

En general los parámetros que se evalúan son linealidad, exactitud, precisión (reproducibilidad y repetibilidad) y límite de detección. Este último parámetro se calcula cuando la concentración del analito se encuentra dentro del nivel de trazas.

-Precisión del método

La precisión de un método analítico es el grado de repetibilidad de un resultado de una serie de experimentos, por un analista con reactivos y equipo idéntico. La precisión del método es usualmente expresada como la desviación estándar relativa de los resultados de un procedimiento analítico (preparación de la muestra y análisis). La precisión recomendada para productos farmacéuticos utilizando el área de los picos, es $\leq 2.0\%$ si se realizan 6 réplicas y si se realizan 5 réplicas es de $\geq 2.0\%$ (Dong 1992).

Análisis químico de azúcares y ácidos orgánicos en alimentos y productos fermentados por HPLC

Los recientes avances en la química y bioquímica de los carbohidratos está muy asociada con el desarrollo de la cromatografía de alta eficiencia. Sin embargo la diversidad de tipos de carbohidratos como los monosacáridos que comprenden aldosas, cetosas, alditoles y ácidos aldónicos así como la combinación de estos monosacáridos para tener di, tri y oligosacáridos ha dado como resultado una amplia investigación en el desarrollo de metodologías aplicadas en este campo.

Honda y col. (1984) y Robars y col en 1986 realizaron una revisión sobre el análisis de carbohidratos por HPLC, indicando que debido a la multiplicidad de estructuras de estos compuestos, y a pesar de la gran cantidad de estudios realizados, no se han establecido condiciones que permitan el análisis simultáneo de los diferentes tipos de carbohidratos. Sin embargo señalan las fases más utilizadas para la separación de carbohidratos, entre ellas la de intercambio aniónico por formación de complejos con boro como una de los primeros métodos empleados en la separación de estos compuestos. La cromatografía de partición en fase reversa ha sido una de las más empleadas en la separación de carbohidratos, su ventaja frente a la formación de complejos con boro es que los picos son afilados, pero la resolución es muy pobre. La sílica gel alquilaminada es ampliamente utilizada como fase estacionaria para la separación de azúcares a pesar de la corta vida de estas fases, pero su selectividad para los carbohidratos es muy buena Otro tipo de fase estacionaria frecuentemente utilizada son los intercambiadores iónicos hechos de polimeros porosos, y la resolución es comparable con la sílica gel alquilaminada. Los polimeros porosos (intercambiadores catiónicos) son utilizados con muestras especiales como las de procesos de fermentación y de la industria alimentaria, en estas fases la elución es con agua y la durabilidad de la columna es excelente.

Dada la importancia del análisis individual de carbohidratos en algunos alimentos a través de un método simple y rápido por cromatografía de líquidos varios grupos de investigación han trabajado al respecto.

Un estudio colaborativo para validar un método para la determinación de azúcares como la fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa por HPLC en cereales precocidos, fue comparado con el método para la determinación de azúcares Lane-Eynon del AOAC por el grupo de Zygmunt y col. en 1982. Utilizaron una columna aminada con una fase móvil de

acetonitrilo/agua 80/20 y un detector de índice de refracción (IR). Extrajeron la muestra con una mezcla de etanol-agua y la pasaron por cartucho Sep-Pak C18 para eliminar compuestos que puedan interferir en el análisis cromatográfico quizás compuestos hidrofóbicos si no se realiza primero la extracción de la grasa en la muestra. Algunos colaboradores reportan que desengrasaron la muestra a través de una extracción con éter de petróleo, pero algunos otros no tuvieron problemas en el análisis cromatográfico en sus muestras sin desengrasar. Se observó mucha variación entre los analistas cuando las concentraciones de fructosa y glucosa presentes en algunos de los cereales fueron muy pequeñas y algunos de ellos no las detectaron, también. Encontraron que se tiene la misma precisión con este método que con el del AOAC Lane-Eynon y se adoptó como método oficial.

Las leches hidrolizadas o con bajo contenido de lactosa son importantes para las industrias de lácteos, para preparar productos que puedan ser consumidos por personas que son intolerantes a la lactosa, por ello es importante el desarrollo de un método simple y rápido para el análisis simultáneo de glucosa, galactosa y lactosa, en leche con bajo contenido de lactosa a través de la cromatografía líquida de alta eficiencia. Para esto Pirisino en 1983 empleó una columna Aminex HPX-87C a 80°C, con agua como fase móvil a un flujo de 0.6 ml/min, y un detector de índice de refracción. A la muestra se le precipitó la proteína, se desengrasó con acetonitrilo y se clarificó con membrana de 0.45 µm. Reporta que con este sistema es posible separar los 3 azúcares, pero si esta presente sacarosa o maltosa en otro producto lácteo con bajo contenido en lactosa no es posible utilizar este método pues la columna no separa estos 2 disacáridos de la lactosa.

Por su parte Brons y col. en 1983 realizaron un estudio para la separación de azúcares reductores como la glucosa, galactosa y lactosa por HPLC aplicado a la determinación de lactosa en leche descremada. A la muestra le hicieron un tratamiento de limpieza con una mezcla de buffer de acetatos y acetonitrilo para precipitar las proteínas, pero a diferencia del estudio anterior ellos compararon 3 tipos de columnas aminadas a diferentes temperaturas en el análisis de los azúcares reductores. Concluyeron que en las columnas aminadas a mayores temperaturas se favorece la formación de bases de Schiff, indicando que esta reacción puede ser evitada empleando una columna diol y señalando que la selectividad de esta columna es equivalente a la aminada. Emplearon también la columna Aminex HPX-87C y en ésta como se utiliza agua como fase móvil mencionan que no se tienen problemas con la solubilidad de los azúcares en la fase móvil, en esta columna utilizaron una precolumna con intercambiador de aniones y de cationes para desalar las

muestra pues encontraron que la lactosa y el cloruro de sodio tienen el mismo tiempo de retención, lo mismo se observó con la muestra tratada con el buffer de acetatos pero el pico de este compuesto se eliminó con la precolumna. El límite de detección para la lactosa en esta columna fue de 0.5 µg. Recuperaciones del 99.5% de lactosa en leche en la columna diol fueron posibles de obtener con el empleo de la limpieza con el acetonitrilo y buffer de acetatos así como de la precolumna.

Una posible relación se ha establecido entre el consumo de carbohidratos y algunas enfermedades como la diabetes mellitus, obesidad, desórdenes coronarios, caries dentales y desórdenes de absorción, por ello Martín-Villa y col. en 1984 determinaron la glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y rafinosa en verduras crudas y cocidas por HPLC como medio para tener mayor información respecto al contenido individual de estos azúcares en estos alimentos y poder así elaborar dietas para pacientes con las enfermedades mencionadas. Utilizaron una columna µBondapak/Carbohydrate con una fase móvil de acetonitrilo/agua 75/25 a un flujo de 1.0 ml/min y un detector de índice de refracción. La preparación de la muestra consistió en una extracción con agua y una decoloración pasando la muestra por un cartucho Sep-Pak C18. La cantidad mínima encontrada de fructosa fue de 0.03 g/100 g materia fresca, para glucosa de 0.07 g/100 g muestra fresca y de 0.01 g/100 g de muestra fresca, y señalan que existe una tendencia general a que disminuyan los azúcares en los vegetales cocidos con respecto a los crudos.

En este sentido Picha en 1985 realizó la determinación de azúcares como la glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa en papas crudas y cocidas, para esto empleó una columna Aminex HPX-87C a 75°C con H₂O como eluyente para las papas crudas y la columna Bio-Sil NH₂ SS a 21°C y acetonitrilo/agua 70/30 como fase móvil para las papas cocidas. La extracción fue llevada a cabo con etanol al 80 % y filtraron con membrana de 0.45 µm, los estándares recibieron el mismo tratamiento que la muestra. Encontró que la extracción es mejor con el etanol que con agua. y que los azúcares presentes en las papas crudas fueron fructosa, glucosa y sacarosa y en las papas cocidas, además de éstos últimos, la maltosa. Las recuperaciones encontradas fueron mayores del 95%.

En estos estudios se puede observar que aunque existen lineamientos generales para el análisis de azúcares en alimentos por cromatografía de líquidos, no existe un método universal y que dependiendo del alimento o producto a analizar se deben seleccionar cuidadosamente la columna y las condiciones a emplear así como el tratamiento de la muestra.

El interés en el estudio de diferentes tipos de ácidos orgánicos en alimentos y en productos de fermentación a aumentado también en los últimos años, pues en el estudio simultáneo de estos ácidos no volátiles y volátiles era necesario la derivatización de las muestras que eran analizadas por cromatografía de gases. La cromatografía de líquidos se ha vuelto una herramienta poderosa en el análisis de estos ácidos como medio para seguir perfiles de fermentaciones, los metabolitos producidos en ellas y en alimentos donde es importante la presencia de estos ácidos.

El seguimiento de efluentes de fermentación, así como el perfil de metabolitos de algunos microorganismos como *Salmonella*, *Clostridia* y *Lactobacillus*, ha sido estudiado por Adams y Col en 1984. La columna empleada fue una de Aminex HPX-87H a 50°C con H₂SO₄ 0.003M en acetonitrilo 90/10 (v/v), y un detector de UV a 210 nm. Los ácidos analizados fueron pirúvico, láctico, acético, propiónico y fenilacético. La extracción de la muestra fue con éter dietílico, seguida de centrifugación y filtración con membrana de 0.45 o 0.22 µm, los estándares recibieron el mismo tratamiento que la muestra. Los resultados encontrados son cualitativos y semicuantitativos pero dan gran información del perfil de ácidos en una fermentación. Señalan además la importancia de este estudio en la determinación simultánea de varios tipos de ácidos.

El desarrollo de un método simple para la determinación simultánea y cuantitativa de los ácidos fórmico, láctico, acético, propiónico, isobutírico e isovalérico para evaluar la calidad del ensilaje, así como determinar cuantitativamente el ácido fórmico que es empleado como aditivo en el ensilaje fue llevado a cabo por Canale y col. en 1984. Utilizaron una columna Aminex HPX87-H a 41°C con H₂SO₄ 0.0025M como eluyente y un detector de UV a 210 nm. La preparación de la muestra fue a través de una extracción con la fase móvil y una posterior filtración con membrana de 0.2 µm, la cantidad mínima determinada para el ácido fórmico fue de 8 µg. Las recuperaciones fueron del 89 al 103%.

En algunos alimentos los ácidos orgánicos son componentes naturales de éstos, pero en otros alimentos los ácidos son empleados como acidulantes como en las bebidas carbonatadas, en el queso, en los productos lácteos, cárnicos y en productos naturalmente fermentados como el vinagre, los pepinillos, mayonesas o aderezos para ensalada, por ello el grupo de Ashoor y col. en 1984 desarrollaron un método para el análisis de ácido cítrico, láctico y acético en alimentos por HPLC. Emplearon una columna Aminex HPX-

87H con H_2SO_4 0.009N y un detector de UV a 210 nm. Las muestras líquidas se filtraron con membrana de 0.45 μm y se llevaron a un volumen conocido adicionándoles Na_2EDTA para obtener una concentración final de 0.01%. A las muestras semisólidas se les realizó una extracción con agua, se centrifugaron, reextrajeron y volvieron a centrifugar, los sobrenadantes se juntaron y se les adicionó una solución de Na_2EDTA para obtener una concentración final de 0.01%. Esta sal disódica del ácido etilendiaminetetraacético se empleó para evitar que iones metálicos presentes en la muestra se adhirieran a la columna, los extractos se filtraron con membrana de 0.45 μm . Las cantidades mínimas determinadas de ácido cítrico fueron de 0.1% con una recuperación del 98 al 101%, para el ácido láctico la cantidad mínima determinada fue de 0.2% y las recuperaciones encontradas fueron del 93 al 95%, para el ácido acético la cantidad mínima determinada fue del 0.1% y las recuperaciones fueron del 93 al 102%.

Poca información ha sido publicada para el análisis de ácidos orgánicos en el jugo de caña a través de cromatografía líquida de alta resolución como una herramienta analítica útil en los ingenios azucareros para el análisis rápido del jugo de caña. Para determinar los ácidos naturalmente presentes como el cítrico, aconítico y el málico en el jugo, así como el fórmico, láctico y glicólico que son producto de contaminación microbiológica o degradación química. A pesar de que muchas publicaciones describen el uso amplio de la columna Aminex HPX-87H, muchos investigadores han experimentado problemas de coelución e identificación así como de picos poco resueltos, por esta razón Blake y col. en 1987 utilizaron dos columnas Aminex HPX-87H en serie para mejorar los problemas mencionados, emplearon H_2SO_4 0.05M como eluyente y un detector de índice de refracción, porque señalan que el detector UV no es adecuado para el análisis de sus muestras. A éstas últimas colectadas de la fábrica, las conservaron con cloruro mercuríco (10 mg/ml) y congelación. Para eliminar los compuestos de interferencia, los ácidos se retuvieron en una resina de intercambio aniónico, equilibrada con ácido isobutírico y se eluyeron con ácido sulfúrico, se filtraron con membrana de 0.45 μm y se inyectaron en la columna. La resolución aumenta con el uso de las 2 columnas utilizadas en serie y equilibradas a temperaturas de 35 y 85°C.

El análisis simultáneo de azúcares y ácidos orgánicos en alimentos y productos de fermentación por cromatografía líquida de alta eficiencia se ha ido incrementando también en los últimos años. Por esta razón ha sido necesario el desarrollo de métodos simples para la determinación de éstos compuestos ya sea con el empleo de una sola columna como en el caso del método desarrollado por Bouzas y col. en 1991, aplicado a

quesos Cheddar en diferentes días de maduración (0, 8, 48 y 60 días de maduración), utilizaron la Aminex HPX-87H a 41°C con H₂SO₄ 0.009 N a un flujo de 0.7 ml/min y dos detectores en serie UV a 220 o 285 nm para detectar los ácidos e IR para los azúcares. La preparación de la muestra consistió en una extracción con el eluyente, una centrifugación y filtración con membrana de 0.2 μm. Reportaron que la concentración de lactosa disminuye con el tiempo, sus recuperaciones van del 80 al 100% y que este método puede ser empleado también para otros productos lácteos, además señalan que la principal ventaja del método es la preparación de la muestra simple así como el bajo costo del disolvente de extracción y de la fase móvil (agua).

En otro estudio para la determinación simultánea de azúcares y ácidos en 3 diferentes cultivos de la fruta Loquat (*Eryobotrya japonica Lindl*), se emplearon dos columnas, la μ Bondapak/Carbohydrate para separar los azúcares con una fase móvil de acetonitrilo/agua 85/15 a un flujo de 2.7 ml/min y un detector de índice de refracción (IR). Para separar los ácidos utilizaron una columna μBondapak C18, con una fase móvil de NH₄H₂PO₄ al 2.0% ajustado a un pH de 2.4 con H₃PO₄ y un detector de ultravioleta (UV) a 254 nm. La preparación de la muestra consistió en una extracción con agua y le agregaron un conservador a base de cloranfenicol y cicloheximida, filtraron con membrana de 3 μm y concentraron a presión reducida, una alícuota del extracto se pasó por cartuchos Sep-Pak C18, para el análisis de los azúcares y otra alícuota fue pasada a través de un columna de intercambio catiónico y después por una columna con una resina de intercambio aniónico, la cual se lavó con agua para remover los azúcares y después con 50 ml de ácido fórmico 6M seguido de 75 ml de agua para remover los ácidos, este extracto de 125 ml se llevó a sequedad a 65°C bajo presión reducida y una corriente de nitrógeno y después se redisolvió en 10 ml de NH₄H₂PO₄ al 2% y se empleó para el análisis cromatográfico de los ácidos orgánicos. Como se puede observar en este caso con el empleo de dos columnas la preparación de la muestra es más laboriosa. Encontraron que los cultivos difieren en el contenido de azúcares y ácidos y determinaron estos cambios de contenido durante el proceso de maduración, reportan que la recuperación de los ácidos fue de 97 % (Shaw y Col 1981).

Otros estudios se han llevado a cabo en el análisis de ácidos o de azúcares con el objeto de establecer los mecanismos de separación en las columnas comúnmente empleadas. Para ello Kihara y col. en 1987 estudiaron la separación de estándares de ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos utilizando una columna de intercambio catiónico tipo ácido fuerte (YEW SC5-252) y un detector de conductividad y encontraron que la elución de éstos es

de acuerdo al número de átomos de carbono, que los ácidos pequeños son excluidos y que los grandes son fuertemente retenidos en estas fases.

Para la separación de carbohidratos en productos de fermentación por HPLC Plaga y col. en 1989, utilizaron y compararon 3 tipos de columnas. La primera Nucleosil-NH₂, con una fase móvil de acetonitrilo/agua 75/25 a un flujo de 1.0 ml/min a temperatura ambiente, en esta columna la glucosa y el manitol coeluyen. La segunda columna fue una LiCrosorb-diol con una fase móvil de acetonitrilo/agua 75/25 a un flujo de 1.0 ml/min a temperatura ambiente en esta columna la glucosa y el manitol coeluyen, además la fructosa y la arabinosa eluyen como picos dobles. La última columna fue una Aminex HPX-87C con una fase móvil de agua y un flujo de 0.3 ml/min a 85 °C, y un detector de índice de refracción a 40 °C. Pero en esta columna la arabinosa, la fructosa y el inositol coeluyen, así como la sacarosa, maltosa y lactosa. La preparación de la muestra consistió sólo en una centrifugación y filtración. Indican que la columna Aminex no separa sacarosa de maltosa y las otras dos columnas sí, el límite de detección para la columna aminada fue de 20-40 mg/l y para las otras columnas fue de 50-100 mg/l.

Dado el constante desarrollo tecnológico de la cromatografía de líquidos, en el análisis de carbohidratos también se han empleado nuevos empaques como las α y β ciclodextrinas, para evaluar la separación de diferentes estándares de mono, di y trisacáridos, Armstrong y col. en 1989 probaron dos columnas con estos empaques. La fase móvil empleada fue acetonitrilo/agua 78/22 y acetona/agua en forma isocrática con el detector de índice de refracción y con gradiente en un detector de UV a 195 nm. Encontraron que estas fases son ligeramente más eficientes y selectivas que las aminadas y que las de intercambio iónico. La retención es mayor en la columna alfa que en la beta y aumenta al adicionar un modificador a la fase móvil, lo mismo ocurre con las columnas aminadas y diol. Se detectan cantidades de 40 μ g de los estándares con IR, eluyen primero los mono luego los di y finalmente los trisacáridos. En general el detector UV es diez veces más sensible que el IR para monosacáridos, los 2 detectores son iguales para trisacáridos pero el detector de IR es más sensible para azúcares grandes. La elección de la detección por UV o IR depende de la fase móvil empleada y del peso molecular de los carbohidratos.

En resinas de amonio cuaternario bajo condiciones alcalinas, Paskach y col. en 1991, separaron 93 azúcares y alcoholes de azúcares de 1 a 4 unidades de monosacárido. La fase móvil fue NaOH 0.1N a un flujo de 1.0 ml/min a una temperatura cercana a los 25°C y

un detector amperométrico de pulsos. Encontraron que los factores de capacidad son menores para los azúcares que para los alcoholes y que además aumentan con el número de átomos de carbono o con el número de grupos hidroxilo en compuestos de estructura similar. Este sistema de intercambio aniónico y detector amperométrico de pulsos es más sensible que los métodos convencionales y posiblemente en el futuro sea el más empleado.

También ha existido la inquietud de comparar métodos analíticos, tal es el caso de la comparación entre el ensayo con glucosa oxidasa y el análisis por HPLC, para el análisis de glucosa en muestras de biomasa, para ello Paynter y col en 1986 utilizaron una columna Aminex HPX-87C a 85°C con H₂O como fase móvil a un flujo de 0.67 ml/min, y un detector de índice de refracción a 35°C. La preparación de la muestra consistió en una extracción con etanol al 50%, y centrifugación, lavado, recentrifugación y evaporación del etanol con vacío, resuspensión en agua y filtración con membrana de 0.45 µm. Reportaron que la concentración menor encontrada de glucosa fue de 1.0%. y que no existe diferencia significativa entre los dos métodos.

MATERIALES Y METODOS

Equipo y materiales empleados

1) Cromatógrafo de Líquidos programable Beckman modelo 110 A, inyector Rheodyne con loop de 20 y 50 μl .

Columna Aminex HPX-87H de Bio-Rad

Detector de Índice de Refracción (IR) Altex Mod. 156

Integrador Spectraphysics

Durante el desarrollo de la tesis se adquirió un detector de índice de refracción Perkin Elmer por lo que parte de los experimentos con sus correspondientes curvas de calibración, se realizaron con el siguiente sistema.

2) Cromatógrafo de Líquidos programable Beckman modelo 110 A, inyector Rheodyne con loop de 20 μl para columna Aminex (intercambio catiónico) y loop de 50 μl para columna Aminada.

Columna Aminex HPX-87H de Biorad y Aminada de Phase Separations a temperatura ambiente.

Detector de Índice de Refracción Perkin Elmer mod. LC-30

Integrador personal Perkin-Elmer modelo 1020S

Columna Aminex HPX-87H de Biorad y Aminada de Phase Separations a temperatura ambiente.

Posteriormente se adquirió una bomba Perkin Elmer, por lo que parte de los experimentos así como las correspondientes curvas de calibración se realizaron con el siguiente sistema.

3) Cromatógrafo de Líquidos Isocrático Perkin Elmer series 250, inyector Valco con loop de 20 ó 50 μl .

Detector de Índice de Refracción Perkin Elmer modelo LC-30

Integrador personal Perkin-Elmer modelo 1020S.

Columna Aminex HPX-87H de Biorad, con un tamaño de partícula de 9 μm y una longitud de 300 X 7.8 mm de diámetro interno.

Precolumna catión H^+ de Bio-Rad

Columna aminada Spherisorb Sep de tamaño de partícula de 3 ó 5 μm y 15 cm de largo.

Baño ultrasónico (Cavitator Ultrasonic Cleaner Mettler Electronics Corp)
Homogenizador de alta velocidad (Ultra-Turrax Janke & Kunke) a velocidad media (aprox 10 000 UpM)
Tubos de centrifuga de 50 ml (Nalgene)
Jeringa de plástico Plastipak (B-D)
Cartucho Sep-Pak C18 Millipore
Prefiltro de fibra de vidrio Millipore
Membranas de acetato de celulosa de 0.45 µm Sartorius
Papel Whatman No. 4.

Disolventes y reactivos

Acetonitrilo grado HPLC Chromanorm Prolabo y/o Mallinckrodt
 H_2SO_4 reactivo analítico J.T. Baker
Glucosa reactivo analítico Técnica Química S.A.
Sacarosa reactivo analítico Mallinckrodt
Lactato de litio reactivo analítico Sigma(L+ Lactic Acid Lithium Salt
Acetato de sodio reactivo analítico Productos Químicos Monterrey
Cloroformo Mallinckrodt
Alcohol etílico absoluto J. T. Baker
Reactivo de Carrez.- Consta de 2 soluciones; (Sol. A: 21.9 g de acetato de zinc ($Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot H_2O$) 3 ml de ácido acético glacial, aforar a 100 ml con agua destilada. Sol B: solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 10.6%.
Agente Desproteinizante.- Mezcla de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ al 10.0% y NaOH 1 N.
Ácido cítrico reactivo analítico Merck
Alcohol isopropílico J.T. Baker
Acetona Mallinckrodt
Cloroformo J.T. Baker
Harina de maíz (Quaker Oats Company Chicago Ill. USA)

Disoluciones de Estándares

Se prepararon disoluciones patrón de cada estándar de la siguiente forma:

Las disoluciones se prepararon pesando el reactivo en balanza analítica y se llevaron a 100 ml con agua destilada en un matraz aforado, de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 1. Concentraciones de las soluciones stock de los estándares.

| Compuesto | Cantidad pesada (g) | Concentración (g/100 ml) |
|------------------|---------------------|--------------------------|
| Glucosa | 9.0 | 9.0 |
| Sacarosa | 17.1 | 17.1 |
| Lactato de litio | 10.0 | 10.0 |
| Acetato de sodio | 12.3 | 12.3 |

Estas disoluciones se mantuvieron en congelación a -20°C y se tomaron alícuotas después de descongelar para preparar la masa con estándares o para preparar las soluciones de la curva de calibración.

Preparación de eluyentes

Se preparó una disolución patrón 1N del ácido sulfúrico

Para preparar 1 litro del eluyente de ácido sulfúrico 0.01 N, empleado en la separación en la columna Aminex, se tomaron 10 ml de la solución patrón y se llevaron a 1 litro en matraz volumétrico con el agua desionizada previamente filtrada para tener una concentración final de 0.01N y se desgasificó utilizando vacío.

El eluyente empleado en la columna aminada para separar los azúcares fue acetonitrilo-agua 80/20 y se preparó de la siguiente forma: Para preparar 500 ml, se tomaron 400 ml de acetonitrilo y se llevaron a 500 ml en un matraz volumétrico con 100 ml de agua desionizada previamente filtrada y desgasificada.

Una vez aforada se colocó en el recipiente utilizado en el cromatógrafo y se desgasificó por ultrasonido, hasta que al agitar ya no se observaran burbujas.

Limpieza de la columna Aminex

Con el objeto de evitar que se queden retenidas sustancias en la columna y por lo tanto su deterioro, el fabricante recomienda lavar la columna Aminex pasando el H_2SO_4 0.025 M

filtrado y desgasificado, a un flujo de 0.2 ml/min de 4 a 12 hrs a 65°C y/o con mezclas de 5 % o 30% de acetonitrilo en el ácido sulfúrico 0.005 M. filtrado y desgasificado de 4 a 12 hrs a 65°C, hasta obtener una línea base estable.

Regeneración de la columna Aminex

La columna Aminex se regeneró con el H₂SO₄ 0.025 M filtrado y desgasificado a un flujo de 0.2 ml/min de 4 hrs a toda la noche o hasta que se obtuviera una línea base estable. Este procedimiento lo recomienda el fabricante para evitar la posible contaminación de la columna por el eluyente, la bomba, el inyector o por contaminación microbiana. Durante el desarrollo del proyecto se regeneró aproximadamente cada 6 meses.

Lavado de la columna Aminada

La columna aminada se lavó con el eluyente, es decir acetonitrilo-agua 80/20 filtrado y desgasificado, a un flujo de 0.5 ml/min hasta obtener una línea base estable. Esto se realizó aproximadamente cada 6 meses, para evitar en lo posible que compuestos que estén presentes en la muestra de nixtamal se vayan quedando retenidos en ésta.

Regeneración de la columna Aminada

Para regenerar la columna se enjuagó con ácido acético 20 mM filtrado y desgasificado y después con agua desionizada, filtrada y desgasificada, esto se realizó aproximadamente cada 6 meses.

Lavado del Detector

Durante el tiempo que se mantiene la muestra en congelación, es decir durante la clarificación, se observó un anillo de grasa en el hielo o muestra congelada, comprobado además por que los extractos de la muestra extraídos con acetonitrilo y cloroformo dieron muestras claras. Con el objeto de evitar que éstas grasas ensucien la celda del detector y no se obtenga una respuesta constante de éste, se decidió a lo largo de la experimentación se decidió darle un tratamiento de limpieza, el cual se describe a continuación. Se pasó la siguiente lista de disolventes: agua filtrada y desgasificada, ácido cítrico 0.001 M, H₂SO₄ 0.025 M, alcohol isopropílico, acetonitrilo, acetona y cloroformo a un flujo de 0.5 ml/min durante 20 min para pasar un volumen de 10 ml de cada disolvente y después invertir el

orden de polaridad de los disolventes y pasar nuevamente estos, empezando por el cloroformo y terminando con el agua.

Separación

Para separar los ácidos orgánicos como el acético y el láctico y eventualmente etanol se empleó una columna de intercambio catiónico denominada Aminex HPX-87H y su precolumna catión H^+ de Bio-Rad. El eluyente fue ácido sulfúrico 0.01 N a un flujo de 0.6 ml por min.

Para separar los azúcares se empleó inicialmente la columna Aminex de Bio-Rad pero debido a que no separa sacarosa de maltosa, posteriormente se empleó una columna aminada Spherisorb Sep. El eluyente fue acetonitrilo-agua 80/20 a un flujo de 1 ml por min.

Curvas de Calibración:

En Columna aminada y Aminex

Glucosa: Se partió de una solución patrón del 9.0 g/100 ml. Se tomaron alícuotas para tener las disoluciones con una concentración final de 0.2 g/100 ml, 0.4 g/100 ml, 0.6 g/100 ml, 0.8 g/100 ml y 1.0 g/100 ml. Fue necesario también realizar diluciones para obtener concentraciones finales entre 0.00652 g/100 ml y 0.5 g/100 ml. Todas las disoluciones se guardaron en congelación a $-20^{\circ}C$.

Sacarosa: Se partió de una solución patrón con 17.1 g/100 ml. Se tomaron alícuotas para tener las disoluciones con una concentración final de 0.2 g/100 ml, 0.4 g/100 ml, 0.6 g/100 ml, 0.8 g/100 ml y 1.0 g/100 ml. Fue necesario también realizar diluciones para obtener concentraciones finales entre 0.00652 g/100 ml y 0.5 g/100 ml. Todas las disoluciones se guardaron en congelación a $-20^{\circ}C$.

Lactato de Litio: Se partió de una solución patrón con 10.0 g/100 ml. Se tomaron alícuotas para tener las disoluciones con una concentración final 0.2 g/100 ml, 0.4 g/100 ml, 0.6 g/100 ml, 0.8 g/100 ml y 1.0 g/100 ml, (la concentración expresada como ácido láctico es de 0.18 g/100 ml, 0.37 g/100 ml, 0.55 g/100 ml, 0.74 g/100 ml y de 0.92 g/100

ml). Se realizaron diluciones decimales hasta llegar a una concentración de 0.01 g/100 ml y también se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales entre 0.00652 g/100 ml y 0.5 g/100 ml. Todas las disoluciones se guardaron en congelación a -20°C.

Acetato de Sodio: Se partió de una solución patrón con 12.3 g/100 ml. Se tomaron alícuotas para tener disoluciones con una concentración final de 0.2 g/100 ml, 0.4 g/100 ml, 0.6 g/100 ml, 0.8 g/100 ml y 1.0 g/100 ml, (la concentración expresada como ácido acético es 0.14 g/100 ml, 0.29 g/100 ml, 0.43 g/100 ml, 0.58 g/100 ml y 0.73 g/100 ml). Se realizaron diluciones decimales hasta llegar a una concentración de 0.01 g/100 ml y también se realizaron diluciones para obtener concentraciones finales entre 0.00652 g/100 ml y 0.5 g/100 ml. Todas las disoluciones se guardaron en congelación a -20°C.

Cada disolución se inyectó en el cromatógrafo por duplicado. Las áreas obtenidas se graficaron en el eje de las ordenadas y las concentraciones en el eje de las abscisas. Estas gráficas se usaron para interpolar las áreas de las muestras y así conocer su correspondiente concentración.

En las figuras 3 y 4 se muestran algunas de las curvas de calibración de glucosa y sacarosa en la columna aminada, empleadas durante la experimentación y, en las figuras 5 y 6 se muestran algunas de las curvas de calibración de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex empleadas durante la experimentación, en ellas se observa que cumplen con la linealidad en el intervalo de concentración seleccionado. A lo largo de la experimentación cada vez que se iba a inyectar muestra en el cromatógrafo, se inyectaba 3 o 4 veces el estándar correspondiente a uno de los puntos de las curvas de calibración, si no se observaba el área obtenida en la curva \pm un 5%, ese día se preparaba otra curva de calibración y con ella se interpolaban los datos de las muestras para saber sus correspondientes.

Toma de muestras

Se tomaron 5 g de masa recién elaborada en el laboratorio o 5 g de masa congelada a -20°C y descongelada a temperatura ambiente.

Masa con estándares. Se preparó en la proporción 1:1.25 harina/agua. Se pesaron 20 g de la harina de maíz y se le adicionaron 25 ml de agua destilada, conteniendo los estándares con las siguientes concentraciones: glucosa 0.45 g/100 ml; sacarosa 0.855

g/100 ml, lactato de litio 0.50 g/100 ml como lactato y de 0.463 g/100 ml como ácido láctico y acetato de sodio 0.615 g/100 ml como acetato y de 0.442 g/100 ml como ácido acético.

Preparación de las muestras

La preparación de las muestras consta de un proceso de extracción, clarificación y limpieza, que se describen a continuación.

-Extracción

Se empleó agua como el disolvente de extracción. La extracción se probó con 3 diferentes volúmenes de agua y se realizó de la siguiente forma: Se pesaron 5 g de masa húmeda con o sin estándares, en un tubo de centrifuga de 50 ml, se le adicionaron 10, 20 o 30 ml de agua destilada a 65°C, se mezclaron en un homogenizador de alta velocidad a velocidad media (aprox 10 000 UpM) durante 3 min. Se lavó el émbolo del homogenizador con 2 ml de agua destilada y se mezcló con el homogenizado. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 min, se separó el sobrenadante y se aforó a un volumen de 25 y/o 35 ml con agua destilada. Las concentraciones finales en el extracto de la masa con estándares fueron: glucosa 0.20 g/100 ml, sacarosa 0.33 g/100 ml, lactato de litio 0.22 g/100 ml y como ácido láctico 0.20 g/100 ml, acetato de sodio 0.27 g/100 m y como ácido acético 0.19 g/100 ml.

-Métodos alternativos de clarificación

Agentes clarificantes.-

a) Reactivo de Carrez.- Se utilizó este reactivo el cual consta de 2 soluciones; (Sol. A: 21.9 g de acetato de zinc ($Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot H_2O$) 3 ml de ácido acético glacial, aforar a 100 ml con agua destilada. Sol B: solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 10.6%. Se añadieron 2 ml de cada solución al extracto, se centrifugó y filtró.

Agente Desproteizante.- También se probó el uso de una mezcla de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ al 10.0% y NaOH 1 N, Se tomaron 10 ml del extracto y se le añadieron 2 ml de la solución de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ al 10.0% y NaOH 1 N, se filtró con papel Whatman No. 4.

c) Etanol. Se mezclaron volúmenes iguales del extracto y etanol al 95%, y se filtraron.

d) Se realizaron extracciones con acetonitrilo y cloroformo.- Se tomaron 10 ml de extracto y se le añadieron 10 ml de cloroformo y /o acetonitrilo, 2 veces, se juntaron los extractos acuosos y se filtraron con membrana de 0.45 μm .

e) Congelación.- Se observó que se obtenían muestras claras a partir de los extractos congelados por 4 días a -20°C , después de descongelarse, centrifugarse y filtrarse con prefiltro de vidrio y membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm .

El extracto se vació a un frasco o vial de 40 ml y se congeló a -20°C por 4 días al menos observándose en la superficie de la muestra congelada un anillo de grasa. Al descongelar el extracto se observó en el fondo del vial la separación de partículas sólidas muy finas, por lo que se tomó una alícuota y se centrifugó a 13200 rpm durante 1 minuto con el objeto de facilitar la filtración con prefiltro y con membrana de 0.22 μm . Esta muestra puede inyectarse en el cromatógrafo.

El diagrama de extracción y clarificación propuesto se muestra en la Figura 7.

-Homogeneidad de la Masa

A 20 g de harina de maíz se le añadieron 25 ml de agua destilada o de la mezcla de los estándares y se mezcló para obtener 45 g de masa. Se formó una tortilla de acuerdo con la figura 2. Se tomaron 2 muestras M1 y M2 de 5 g de masa cada una de ellas, se prepararon extractos de cada una de acuerdo a la metodología propuesta (figura 7). Se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos y se obtuvo el porcentaje de recuperación de cada estándar

Se preparó otro lote de 45 g de masa con estándares, pero se tomaron 3 muestras, de 5 g cada una de ellas, denominadas MA, MB y MC. Se hizo la extracción y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos, para obtener el porcentaje de recuperación de cada estándar.

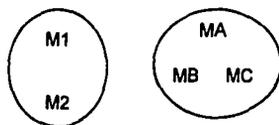


Figura 2. Toma de muestras en el experimento de homogeneidad de la masa.

-Limpieza de la Muestra

En el experimento de homogeneidad de la masa, se observó que las áreas obtenidas en las M1 y M2 fueron mayores que las áreas obtenidas en las muestras MA, MB y MC, es decir que éstas áreas disminuyeron de un experimento a otro, basandonos en la observación de que la muestra extraída y congelada mostró un anillo de grasa, así como que las extracciones con éter y cloroformo dan extractos claro se concluyó que las grasas presentes en la muestra ensucian la celda del detector, y por lo tanto los resultados no eran reproducibles, por esta razón se decidió darle un tratamiento de limpieza a la muestra con cartuchos Sep-Pak C18, para que se retengan los compuestos hidrofóbicos de la muestra y que éstos no ensucien la celda del detector y no interfieran en la determinación cromatográfica.

-Porcentaje de recuperación de estándares de glucosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético

La mezcla de estándares probada, contenía sacarosa, glucosa, lactato de litio y acetato de sodio al 0.2%. con esta mezcla se realizaron pruebas de elución en el cartucho.

Los pHs a los que se ajustó la mezcla de estándares fueron de 7 y 4 con NaOH 1 N ó H₂SO₄ 1 N. Las diferentes proporciones de agua-acetonitrilo empleadas para eluir la mezcla de estándares fueron de 90/10, 70/30 y 85/15.

El cartucho se activó de la siguiente forma: se pasaron por él 2 ml de agua-acetonitrilo 90/10 se dejó reposar unos minutos y después se pasaron 5 ml de agua.

Se tomaron 5 ml de la mezcla de estándares ajustando el pH a 4 a 7 o sin ajustar. Con una pipeta automática (Gilson) se colocaron en el barril de una jeringa de plástico conectada al cartucho Sep-Pak C18 por el que se pasaron , recibiendo en un matraz volumétrico de

10 ml. Se eluyó con 1 ml de agua destilada, luego con 1 ml de agua destilada o 1 ml de la mezcla agua-acetonitrilo 85/15, 70/30 o 90/10, después se pasaron 2 ml de agua destilada y 5 ml de aire (para ayudar a arrastrar lo que hubiera quedado) y se aforó el eluato a 10 ml con agua destilada. Estas muestras se inyectaron en el cromatógrafo por duplicado y se determinó el porcentaje de recuperación de cada estándar, para seleccionar las condiciones de elución que dieran mejores porcentajes de recuperación.

-Elución de estándares de ácidos láctico y acético por el cartucho Sep-Pak C18

Se pasaron 5 ml de la mezcla de estándares sin ajustar el pH. Se eluyó con 1 ml de agua destilada, luego con 1 ml de agua-acetonitrilo 85/15. Después se pasaron 2 ml de agua destilada y 5 ml de aire y posteriormente se aforó a 10 ml con agua destilada. Esta muestra se inyectó en el cromatógrafo con la columna Aminex y se determinó el porcentaje de recuperación de cada estándar.

-Elución de estándares de glucosa y sacarosa por el cartucho Sep-Pak C18

Se pasaron 5 ml de la mezcla de estándares sin ajustar el pH. Se eluyó con 1 ml de agua destilada, luego con 1 ml de agua-acetonitrilo 85/15. Después se pasaron 2 ml de agua destilada. y 5 ml de aire y posteriormente se aforó a 10 ml con agua destilada. Esta muestra se inyectó en el cromatógrafo con la columna aminada utilizando un loop de 20 µl., (Proceso 1) y se determinó el porcentaje de recuperación de cada estándar.

Como las áreas obtenidas en el experimento anterior fueron muy pequeñas se cambió el loop del inyector a 50 µl (Proceso 2) para inyectar más muestra, y también se cambió el volumen de mezcla de los estándares de 5 a 2 ml pasados por el cartucho, para tener más volumen de elución o lavado y se utilizó el loop de 50 µl (Proceso 3).

-Elución de estándares adicionados a masa de nixtamal, extraída, clarificada y pasada por el cartucho Sep-Pak C18

Se preparó masa de nixtamal con estándares con el procedimiento establecido anteriormente se realizó la extracción, clarificación (Figura 7) y la limpieza de la siguiente forma: Por el cartucho Sep-Pak se pasaron e ml del extracto clarificado sin ajustar el pH. Se eluyó con 1 ml de agua destilada, luego con 1 ml de agua-acetonitrilo

85/15. Después se pasaron 2 ml de agua destilada, y 5 ml de aire y posteriormente se aforó a 10 ml con agua destilada. Esta muestra se inyectó en el cromatógrafo con la columna Aminex y un loop de 20 µl para los ácidos láctico y acético y la columna aminada utilizando un loop de 50 µl para la glucosa y la sacarosa y se determinó el porcentaje de recuperación de cada estándar. Este experimento se realizó por triplicado y se considera como la repetibilidad del método.

En la figura 8 se muestra el diagrama del procedimiento de limpieza de la muestra propuesto.

-Recuperación de diferentes concentraciones de estándares en masa de nixtamal.

Establecida la metodología, se prepararon cuatro muestras de masa de nixtamal a las que se les añadieron estándares de glucosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético.

Se preparon mezclas de estándares en un matraz aforado de 25 ml. Se pesaron 20 g de harina de maíz y se le añadieron 25 ml de la mezcla de estándares del matraz aforado. Se tomaron 5 g de masa se extrajo, clarificó y limpió de acuerdo a los procedimientos previamente mencionados. Las concentraciones teóricas en la disolución final obtenida (concentraciones adicionadas) fueron:

Tabla 2 Concentraciones de los estándares añadidas a la masa de nixtamal.

| Muestra | Concentraciones g/100 ml (p/v) base húmeda | | | |
|---------|--|----------|-------------|-------------|
| | Glucosa | Sacarosa | Ac. Láctico | Ac. Acético |
| 1C | 0.0240 | 0.1320 | 0.0110 | 0.0142 |
| 2C | 0.1000 | 0.1100 | 0.0220 | 0.0300 |
| 3C | 0.0026 | 0.0018 | 0.1780 | 0.1700 |
| 4C | 0.0400 | 0.0660 | 0.0400 | 0.3800 |

Estas muestras se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo y se les determinó el porcentaje de recuperación. Los resultados se utilizan para calcular la exactitud del método.

Análisis de maíz crudo y pozoles

Se analizó una muestra de maíz amarillo, obtenida en el mercado de "Tizapán". Se molió en un molino de café, se tomaron 5 g y se le realizó la extracción con 20 ml de agua destilada a 65 °C, de acuerdo a los procedimientos propuestos en las figuras 7 y 8.

También se tomaron 5 g de muestra de pozol indígena y 5 g de pozol ladino de la zona de los Altos de Chiapas y se les realizó la extracción, clarificación, limpieza y se inyectaron en las columnas Aminex y aminada para determinar las concentraciones de azúcares y ácidos.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete SPSS-PC, para el análisis de variancia, así como para realizar pruebas de rango múltiple.

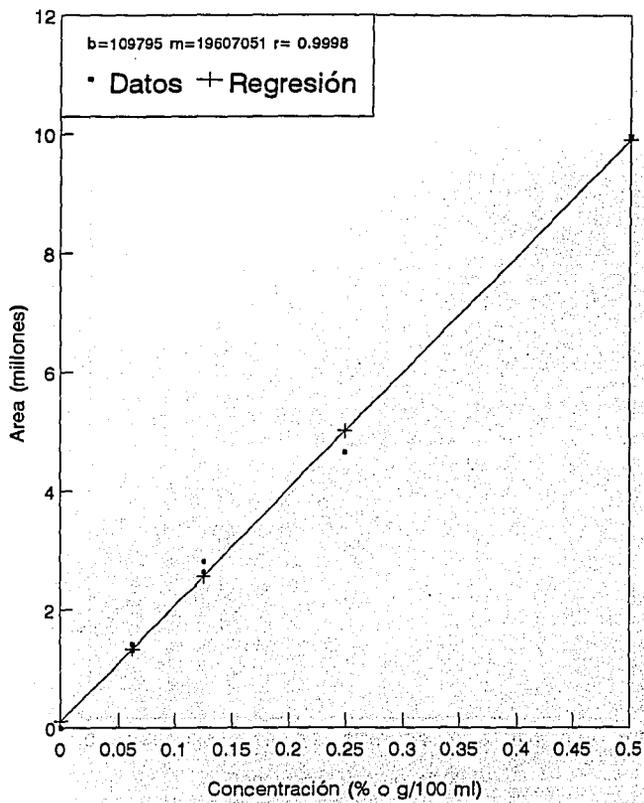


Figura 3 Curva de calibración de glucosa en columna aminana Spherisorb (Phase-Sep) bomba, detector e integrador Perkin -Elmer

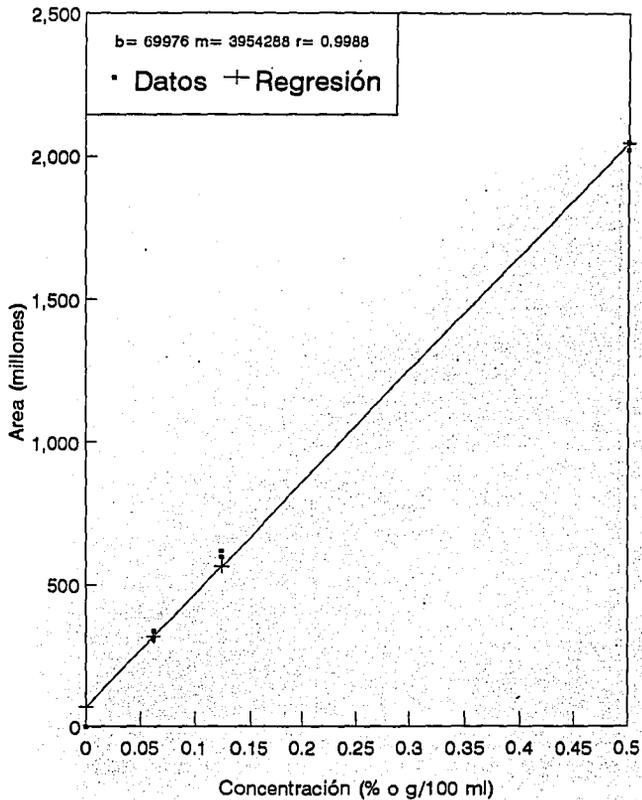


Figura 4 Curva de calibración de sacarosa en columna aminana Spherisorb (Phase-Sep) bomba, detector e integrador Perkin -Elmer

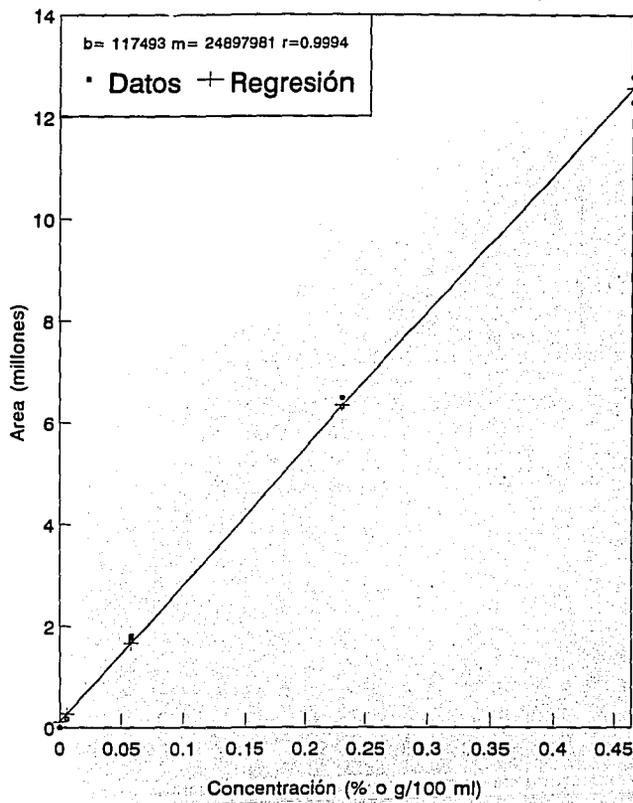


Figura 5 Curva de calibración de ácido láctico en columna Aminex (Bio-Rad) bomba, detector e integrador Perkin -Elmer

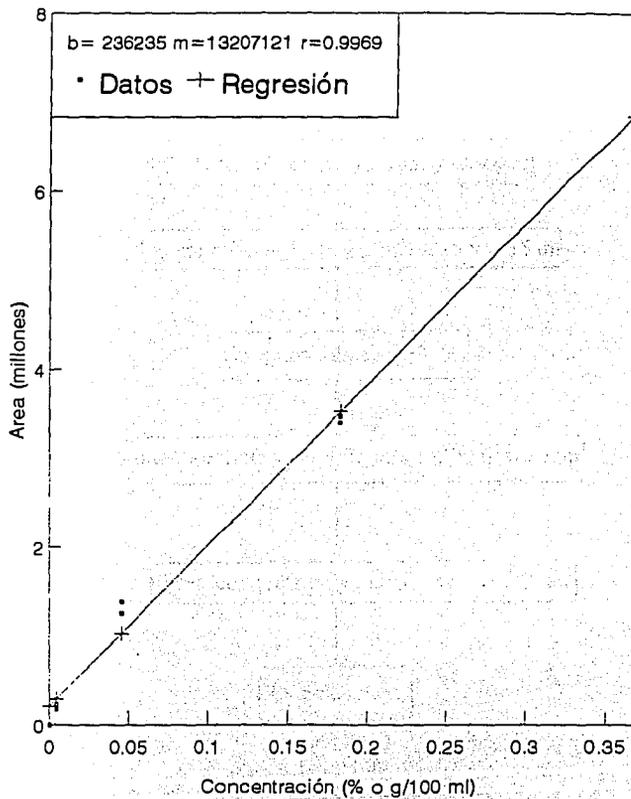


Figura 6 Curva de calibración de ácido acético en columna Aminex (Bio-Rad) bomba, detector e integrador Perkin -Elmer

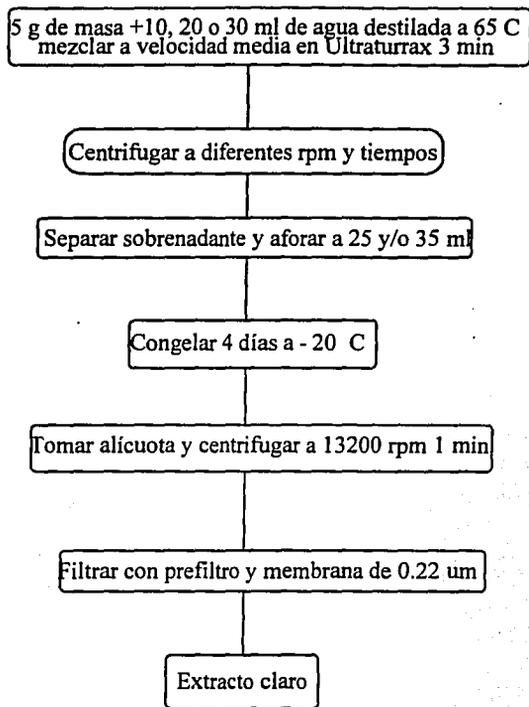


Figura 7 Diagrama del procedimiento de extracción y clarificación propuesto

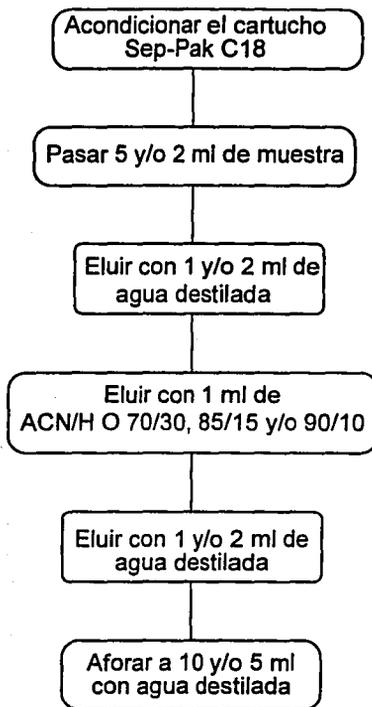


Figura 8 Diagrama del procedimiento de limpieza de la muestra propuesto

RESULTADOS Y DISCUSION

SEPARACION

-Separación de carbohidratos

En este trabajo, para separar los azúcares se empleó en principio, una columna de intercambio catiónico denominada Aminex HPX-87H con las condiciones establecidas en la metodología. Como esta columna no separa sacarosa de maltosa (figura 9), ni rafinosa de maltotriosa, azúcares que podrían estar presentes en el maíz, nixtamal y/o pozol, se decidió emplear la columna aminada Spherisorb-Sep.

-Separación de ácidos orgánicos

En este trabajo, para separar los ácidos orgánicos como el acético y el láctico y eventualmente etanol se empleó una columna de intercambio catiónico denominada Aminex HPX-87H de Bio-Rad y su precolumna catión H^+ , con las condiciones establecidas en la metodología.

Aunque la detección con ultravioleta hubiera sido más sensible, se realizó con un detector de índice de refracción, pues como la muestra es un alimento con una matriz muy compleja, con el detector de luz ultravioleta se observaban una serie de picos no resueltos lo que hacía muy difícil la cuantificación de los analitos de interés. Por su parte Blake y col. (1987) analizaron los ácidos orgánicos presentes en el jugo de caña de azúcar, utilizando un detector de índice de refracción.

En las siguientes figuras se muestran algunos de los cromatogramas típicos de la separación de los azúcares glucosa y sacarosa, así como de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex y en la columna aminada.

-Columna Aminex

A pesar de que esta columna no es específica para azúcares, se ha empleado con éxito en estas separaciones en algunos alimentos y productos de fermentación.

En la figura 10. se muestra un cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min y en el equipo No. 1. Como se puede observar los 2 primeros picos que corresponden a la sacarosa y glucosa no se separan hasta la línea base, sin embargo están bien resueltos ($R=2.56$). Los ácidos láctico y acético se ven bien resueltos ($R=3.92$), si se separan a la línea base pues esta columna está recomendada para la separación de ácidos orgánicos en muestras de alimentos y productos de fermentación.

En la figura 11. se muestra un cromatograma típico de masa de nixtamal sola (sin añadir estándares) en la columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1.

En la figura 12. se muestra un cromatograma típico de masa de nixtamal a la que se le añadió estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1. Como se puede observar al principio del cromatograma hay 2 picos antes de los de glucosa y sacarosa que corresponden a otros compuestos presentes en el nixtamal que pueden ser producto de la hidrólisis del almidón y que eluyen antes que los monosacáridos, los 2 siguientes picos corresponden a la sacarosa y glucosa no se separan hasta la línea base, los picos están razonablemente integrados y bien resueltos ($R=1.77$), a su vez los ácidos láctico y acético se ven bien resueltos ($R=2.69$), si se separan a la línea base.

-Columna Aminada

En la figura 13 se muestra un cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa en la columna aminada (Spherisorb-Sep), eluyente acetonitrilo/agua a un flujo de 1 ml/min, en equipo No. 2. Se puede observar que estos azúcares si se separan a la línea base ($R=1.14$) y por esto no hay problemas para su correspondiente integración.

En la figura 14. se muestra un cromatograma típico de masa de nixtamal con estándares de glucosa y sacarosa en la columna aminada (Spherisorb-Sep), eluyente acetonitrilo/agua a un flujo de 1 ml/min, en equipo No. 2. Se puede observar que los picos están bien resueltos ($R=5.06$), pues esta columna es específica para la separación de estos compuestos.

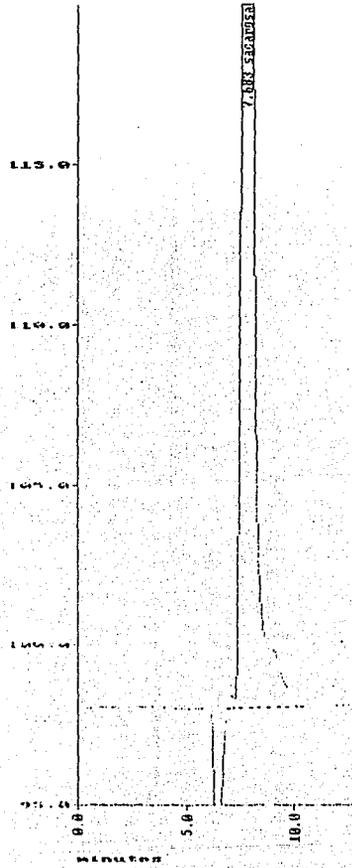


Figura 9. Cromatograma típico de estándares de los azúcares sacarosa y maltosa en la columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min y en el equipo No. 1.

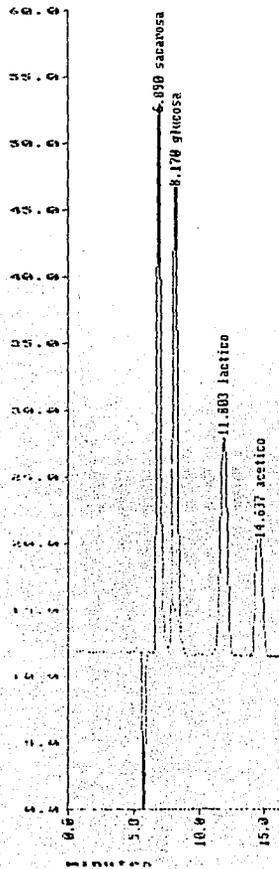


Figura 10. Cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en la columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min y en el equipo No. 1.

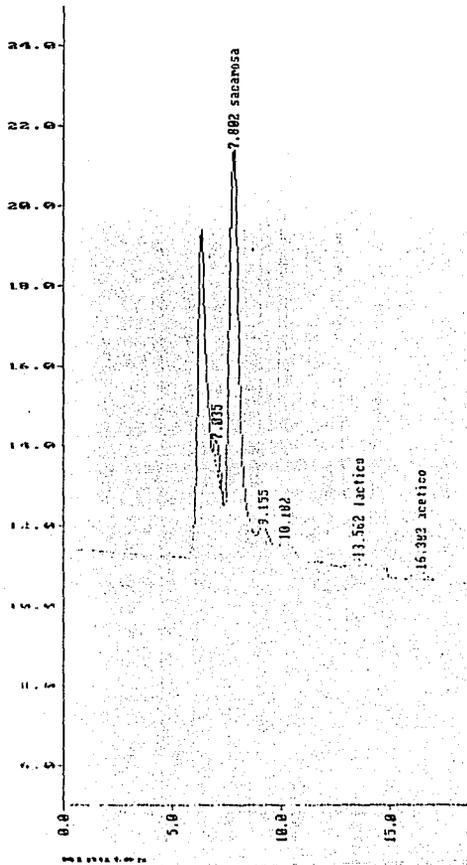


Figura 11.-Cromatograma típico de masa de nixtamal sola (sin añadir estándares) en columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1.

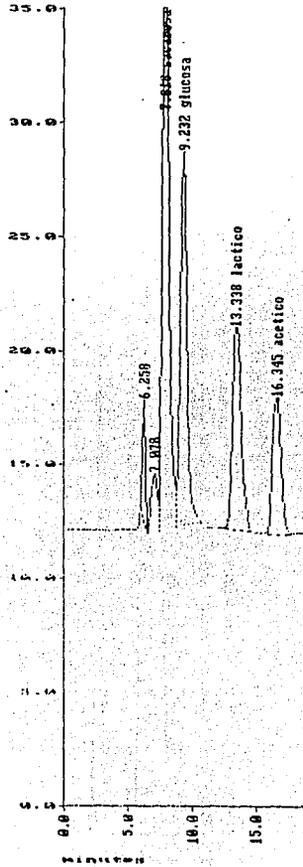


Figura 12. Cromatograma típico de masa de nixtamal con estándares de los azúcares glucosa y sacarosa y de los ácidos láctico y acético en columna Aminex, eluyente H_2SO_4 a un flujo de 0.6 ml/min, en equipo No. 1.

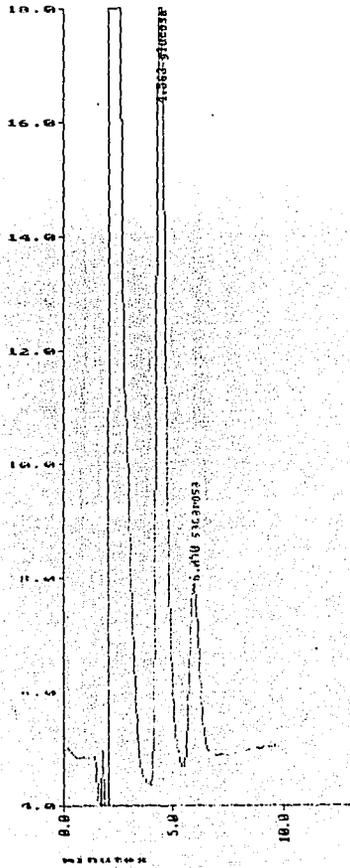


Figura 13 Cromatograma típico de estándares de los azúcares glucosa y sacarosa en la columna aminada (Spherisorb-Sep), eluyente acetonitrilo/agua a un flujo de 1 ml/min, en equipo No. 2.

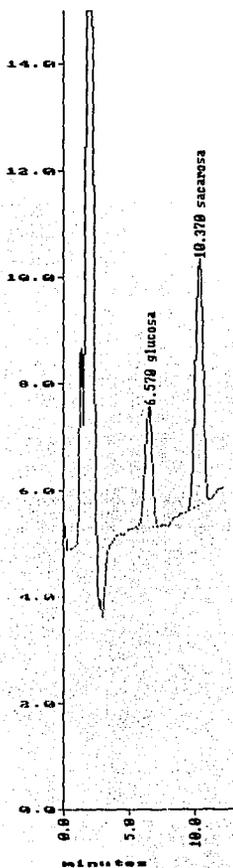


Figura 14. Cromatograma típico de masa de nixtamal con estándares de glucosa y sacarosa en la columna aminada (Spherisorb-Sep), eluyente acetonitrilo/agua a un flujo de 1 ml/min, en equipo No. 2.

Extracción

Para analizar muestras sólidas el disolvente utilizado debe extraer los analitos de interés, por lo que éstos deben ser solubles en él y no extraer compuestos que interfieran en el análisis cromatográfico. El agua o mezclas de ésta con etanol se han utilizado para extraer los azúcares y ácidos orgánicos. Debido a que es de interés cuantificar etanol en las muestras de pozol, se seleccionó al agua a 65°C y no mezclas de agua-etanol como el disolvente de extracción. El agua como el disolvente de extracción puede no ser lo suficientemente selectivo, pero es ampliamente utilizado en combinación con procedimientos de limpieza (Macrae 1985, Martín-Villa y col. (1982). Otros investigadores como Bouzas y col. en 1991 y Canale y col., en 1984 han empleado el ácido sulfúrico muy diluido (eluyente) para la extracción de los azúcares y ácidos en la muestra.

Como se esperan concentraciones bajas de los analitos, el volumen de agua de extracción debería ser suficiente para extraerlos, pero evitando una gran dilución, que dificulte la posterior detección y cuantificación.

Se probaron volúmenes de 10, 20 y 30 ml de agua para extraer 5 g de masa de nixtamal en base húmeda. en la Tabla 3 se muestran los porcentajes de recuperación de glucosa, sacarosa, ácido láctico y ácido acético que se obtuvieron al extraer con los 3 volúmenes de agua mencionados, en 3 repeticiones independientes.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de estándares en 5 g de masa de nixtamal empleando diferentes volúmenes de agua para la extracción.

| Volumen de agua | Repetición | Recuperación en % | | | |
|-----------------|------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | Glucosa ^a | Sacarosa ^a | Acido Láctico ^a | Acido Acético ^a |
| 10 ml | 1* | 61 | 86 | 60 | 77 |
| | 2** | 60 | 80 | 58 | 72 |
| | 3** | 60 | 83 | 56 | 67 |
| 20 ml | 1* | 84 | 90 | 90 | 99 |
| | 2** | 83 | 93 | 86 | 94 |
| | 3** | 100 | 126 | 83 | 99 |
| 30 ml | 1* | 65 | 96 | 63 | 92 |
| | 2** | 67 | 90 | 65 | 89 |
| | 3** | 69 | 93 | 67 | 87 |

* Repetición No. 1 determinada en Equipo No. 1 con columna Aminex

**Repeticiones 2 y 3 determinadas en Equipo No. 3 con columna Aminex para ácidos y columna aminada para azúcares.

a= son promedio de dos determinaciones

En la primera repetición se utilizó sólo la columna Aminex y en la segunda y tercera repetición se emplearon las dos columnas pues ya se había decidido emplear la columna aminada para separar los azúcares, y la Aminex para los ácidos.

En la Tabla anterior se muestran los resultados obtenidos para el volumen de extracción empleado. Con el volumen de 10 ml se dificultó la manipulación de la muestra, pues se obtuvo una suspensión espesa y se obtuvieron porcentajes de recuperación bajos. Aunque se emplearon dos diferentes columnas para la determinación de los azúcares se puede observar que prácticamente no hay diferencia en los resultados con el volumen de agua de extracción empleado, pero se puede concluir que este volumen no es suficiente para extraer los metabolitos de interés presentes en la muestra.

Con el volumen de 20 ml se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a manejo de la muestra, así como a porcentajes de recuperación de los estándares. Comparando la primera y la segunda repetición se puede decir que son muy parecidas aunque existe un ligero aumento en el porcentaje de recuperación de la sacarosa y una ligera disminución en la recuperación de los ácidos. Para la tercera recuperación los porcentajes de

recuperación aumentaron excepto para el ácido láctico, y la sacarosa se sobrestimo probablemente debido a un error en la cuantificación en la muestra.

En cuanto al volumen de 30 ml, se obtuvo un extracto fácil de manejar, pero fue necesario aforar a un volumen mayor y por lo tanto los picos de los compuestos son más pequeños por lo que quizás hubo más error al momento de integrar y por lo tanto cuantificar. Los porcentajes de recuperación para la glucosa y el ácido láctico son ligeramente mayores que para el volumen de 10 ml de extracción, pero menores que para el volumen de 20 ml. Por su parte los porcentajes de recuperación para la sacarosa son comparables con el volumen de 20 ml de extracción, pero para el ácido acético son un poco menores que los obtenidos con el volumen de 20 ml fueron menores comparados con el volumen de 20 ml.

Para los 3 volúmenes probados se mantuvo esta tendencia, es decir los porcentajes de recuperación fueron mejores para la sacarosa y el ácido acético que para la glucosa y el ácido láctico. Esto quizás sea debido a las correspondientes solubilidades de estos compuestos en el agua y a otras características de reactividad (poder reductor de la glucosa y pKa del ácido láctico)de estos compuestos en las condiciones de separación de las columnas.

Se observa además que el mejor volumen de agua de extracción, fue el de 20 ml. Este volumen corresponde a una proporción de 1:4 de masa:disolvente de extracción.

El análisis de variancia indica que existe una diferencia altamente significativa entre los volúmenes de agua de extracción utilizados. Y la prueba de Duncan de rango múltiple indica que el grupo con la media mayor es el volumen de 20 ml (al 0.01% de nivel de confiabilidad), lo que confirma que fue el mejor volumen de extracción.

Los resultados obtenidos en este experimento son comparables con los obtenidos por Bouzas y col. (1991), ellos extrajeron sus muestras de queso Cheddar con H_2SO_4 0.009N, que también emplean como eluyente y obtuvieron una recuperación de 103% de glucosa y de 95 % de lactosa. Estos resultados también son comparables con las recuperaciones mayores al 95% obtenidas por Picha (1985), de glucosa y sacarosa en papas crudas y cocidas empleando etanol al 80%.

Clarificación de la muestra

Los alimentos son sistemas con composición compleja por lo que se ha observado que el mayor problema en el análisis de azúcares y ácidos en alimentos, no es en la determinación cromatográfica, sino el obtener extractos claros con una concentración adecuada de los analitos de interés y que tengan un bajo nivel de compuestos de interferencia. En algunos alimentos esto es fácil de llevar a cabo, pero conforme el alimento es más complejo, el tratamiento de la muestra también se complica. Esto puede consumir más tiempo que el análisis cromatográfico, por lo que es importante establecer los procedimientos de tratamiento de la muestra, entre estos su clarificación.

Métodos alternativos de clarificación

- Filtración.- Es el procedimiento más comúnmente utilizado para clarificar. La muestra recién extraída se filtró con prefiltro y membrana de 0.22 μm , pero no se obtuvo una muestra clara, por lo que fue necesario probar algunos agentes clarificantes y/o algún otro proceso para clarificar la muestra.

Uso de Agentes clarificantes.-

a) Se utilizó el reactivo de Carrez.- Fue posible obtener muestras claras, pero el reactivo arrastra consigo los analitos a cuantificar, disminuyendo los porcentajes de recuperación. Por otra parte, contiene acetato que es uno de los compuestos a analizar.

b) También se probó el uso de una mezcla de $\text{ZnSO}_4/\text{NaOH}$, como agente desproteinizante, pero los porcentajes de recuperación de los estándares en la muestra clara no fueron reproducibles.

c) Etanol. Se mezclaron volúmenes iguales del extracto y etanol al 95%, pero los extractos obtenidos fueron difíciles de filtrar, además como el etanol es uno de los analitos de interés a analizar en las muestras, se descartó esta posibilidad.

d) Se realizaron extracciones con acetonitrilo y cloroformo, para eliminar la grasa, pero las muestras claras obtenidas, no dieron porcentajes reproducibles de recuperación de los estándares.

e) Congelación.- Se observó que se obtenían muestras claras a partir de los extractos congelados por 4 días a -20°C, después de descongelarse, centrifugarse y filtrarse con prefiltro y membrana de 0.22 µm.

Se sabe que la congelación favorece la retrogradación del almidón, proceso en el cual las moléculas de este polisacárido se vuelven insolubles irreversiblemente en agua, debido a la formación de interacciones intermoleculares fuertes, (Banks 1973, Fennema 1985 y Coultate 1990).

El hecho de que se logre la clarificación de los extractos de nixtamal con la congelación, sugiere posiblemente que el almidón, componente importante de la masa, era uno de los causantes de la turbidez.

Con el objeto de determinar si el proceso de congelación interfería con la eficiencia de recuperación de los analitos de interés, se determinó el porcentaje de recuperación de los mismos después de 4 días sucesivos de congelación/descongelación.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de estándares en masas congeladas durante 4 días y descongelando en días sucesivos.

| Día de congelación | No. de Repetición | Recuperación en % | | | |
|--------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | Glucosa ^a | Sacarosa ^a | Acido Láctico ^a | Acido Acético ^a |
| 2º día | 1* | 115 | 125 | 83 | 119 |
| | 2** | 109 | 114 | 81 | 85 |
| | 3** | 103 | 119 | 86 | 112 |
| 3º día | 1* | 100 | 107 | 92 | 129 |
| | 2** | 109 | 112 | 71 | 84 |
| | 3** | 104 | 109 | 91 | 126 |
| 4º día | 1* | 82 | 103 | 87 | 124 |
| | 2** | 104 | 123 | 77 | 93 |
| | 3** | 93 | 113 | 88 | 119 |

*Repetición No. 1 determinada en Equipo No. 1 con columna Aminex

**Repeticiones 2 y 3 determinadas en Equipo No. 3 con columna Aminex para ácidos y columna aminada para azúcares.

a= promedio de dos determinaciones

Después del segundo día de congelación de los extractos de masa de nixtamal, se observa que los porcentajes de recuperación fueron mayores para la sacarosa que para la glucosa y ambos fueron mayores del 100%, y un poco menor para el ácido láctico con respecto al ácido acético, en la columna Aminex. Para el tercero y cuarto días de congelación, realizados con las dos columnas se observa que los porcentajes de recuperación de la sacarosa son mayores que para la glucosa y que al ser mayores del 100 % implican un error sistemático de medición. También se observa esta tendencia, en cuanto a que los porcentajes de recuperación fueron mejores para el ácido acético que para el láctico y que al ser mayores del 100% hay un error en la medición y no necesariamente se están recuperando totalmente los ácidos. Para el ácido láctico se observa la misma tendencia que en el experimento de extracción en cuanto a que los porcentajes son más bajos que los de los demás analitos.

El análisis estadístico de variancia indica que no hay diferencia significativa a un nivel de confiabilidad del 0.01% entre los días de descongelación. Al parecer los 4 días de congelación no afectan a las muestras en cuanto a que haya remoción de los analitos y sí se favorece la sedimentación de partículas finas y su posterior separación con la microcentrifugación y filtración con prefiltro y membrana de 0.22 μm . Un tiempo menor de 4 días es insuficiente para obtener muestras claras.

A pesar de la dificultad que implica comúnmente la clarificación, no se reportan con detalle en la literatura las técnicas de clarificación utilizadas. Pirisino (1983) es el único que reporta explícitamente haber realizado clarificación, como parte del tratamiento de la muestra, en su caso de leche baja en lactosa a través de una filtración con membrana de 0.45 μm . Adams y col. (1984), realizaron extracciones con éter dietílico a muestras de cultivos bacterianos. Canale y col. (1984) y Bouzas y col. en (1991) realizaron extracciones con el H_2SO_4 empleado como fase móvil en ensilaje y en queso Cheddar respectivamente clarificaron sus muestras por filtración a través de membrana de 0.20 μm . La remoción de proteínas y grasas (Zigmunt y col. 1982 y Pirisino 1983), dieron por resultado que las muestras obtenidas de cereales precocidos y leche fueran claras.

Homogeneidad en la composición de la masa de nixtamal

Siendo sólidas las masas de nixtamal, existe la posibilidad de que los estándares no hubieran sido incorporados de manera homogénea en la masa .

Se realizaron experimentos para confirmar esta homogeneidad de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de estándares en 2 muestras (M1 y M2 de la masa 1 y 3 muestras (MA, MB, MC) de la masa 2

| Compuesto | Recuperación en % ^a | | | | |
|-------------|--------------------------------|----|--------|----|----|
| | Masa 1 | | Masa 2 | | |
| | M1 | M2 | MA | MB | MC |
| Glucosa | 82 | 86 | 55 | 52 | 54 |
| Sacarosa | 86 | 94 | 55 | 52 | 54 |
| Ac. Láctico | 88 | 92 | 67 | 66 | 66 |
| Ac. Acético | 81 | 85 | 57 | 55 | 56 |

Determinados en Equipo No. 1 sólo con columna Aminex.

a= promedio de dos determinaciones

De los resultados obtenidos, puede observarse que la variación en los porcentajes de extracción entre las diferentes muestras M1 y M2 son pequeñas por lo que se puede considerar que no existen problemas de homogeneidad en la masa 1 preparada en el laboratorio a partir de harina de maíz. Los valores menores obtenidos para la masa 2 se deben a que en el momento de realizar estas determinaciones las áreas habían disminuido por que la celda del detector se va ensuciando gradualmente conforme se inyectan este tipo de muestras, pero aún con estos porcentajes de recuperación menores tampoco se observan diferencias entre las diferentes regiones de la masa.

Se puede concluir que en el caso de la masa preparada a partir de la harina de maíz no presenta problemas de homogeneidad, pero se prevee que aumente la heterogeneidad en las masas, que se preparan con maíz martajado y no finamente molido. como en el pozol..

Bouzas y col. (1984) molieron muestras de queso Cheddar para homogenizarlas, antes de realizar el proceso de extracción: por su parte Canale y col. (1984), reportan que sus

muestras de ensilaje fresco o congelado fueron molidas para homogenizarlas antes de la extracción. Martín-Villa y col (1982) homogenizaron sus muestras de verduras crudas y cocidas antes de la extracción, a su vez Paynter y col. (1986) mezclaron sus muestras de biomasa para que fueran homogéneas. Picha (1985) homogenizó sus muestras de papas crudas y cocidas en un homogenizador de alta velocidad como parte de la extracción con etanol al 80 %. De estos reportes se puede observar que la homogeneización forma parte importante del proceso de preparación de la muestra, sobre todo en éstas últimas sólidas o semi-sólidas para que la extracción sea más eficiente.

Limpieza de la muestra: Extracción y Clarificación

Los experimentos de extracción y clarificación se realizaron en la Columna Aminex, posteriormente se decidió emplear dos columnas para el análisis de la masa, del nixtamal y/o de las muestras de pozol, pues en el nixtamal se puede encontrar maltosa y esta columna no separa la sacarosa de la maltosa, y la maltotriosa de la rafinosa que pueden encontrarse en el maíz (Boyer y col. 1987).

Tabla 6. Porcentaje de recuperación de estándares en masa de nixtamal
Extracción y Clarificación.

| Compuesto | Recuperación en % ^a | | |
|---------------|--------------------------------|----------------|----------------|
| | 1a. repetición | 2a. repetición | 3a. repetición |
| Glucosa | 84 | 83 | 100 |
| Sacarosa | 90 | 93 | 126 |
| Acido Láctico | 90 | 76 | 99 |
| Acido Acético | 83 | 64 | 99 |

Determinados en Equipo No. 1 con la columna Aminex.

a= promedio de dos determinaciones

Como se observa en la tabla anterior hay variación en los resultados, comparando la primera y la segunda repetición los porcentajes de recuperación para la glucosa y sacarosa son similares pero no así para los ácidos pues en la segunda repetición los porcentajes de estos compuestos disminuyeron esto se debió a que después de la segunda repetición del experimento se notó una disminución en las áreas de los picos de los estándares y de las muestras, por lo que se lavó y regeneró la columna sin desconectarla del detector y esto dió por resultado que la respuesta de éste fuera mejor, lo que se ve reflejado en los mejores porcentajes de recuperación de la tercera repetición, para la glucosa, ácido láctico

y acético, pero la sacarosa parece sobreestimarse o por algún error de medida dio mayor del 100%. Este problema en la disminución de las áreas de estándares y muestras progresiva se resolvió al lavar la celda del detector de acuerdo a la secuencia mencionada en materiales y métodos.

Con respecto a los ácidos Canale y col., (1984) determinaron los ácidos fórmico, láctico, acético, propiónico, isobutírico e isovalérico en ensilaje. Estos fueron extraídos con el H_2SO_4 0.009N, empleado también como fase móvil. Posteriormente las muestras se filtraron por membrana de 0.2 μm . Los porcentos de recuperación encontrados fueron del 98 al 103 %. Bouzas y col., (1991) encontraron una recuperación del 100% para el ácido láctico y del 98 % para el ácido acético en las muestras de queso Cheddar mencionadas anteriormente. Shaw y col. (1981) determinaron los ácidos málico y cítrico en la fruta Loquat (*Eriobotrya japonica Lindl*), extrajeron con agua y encontraron porcentos de recuperación del 97%. Ashoor y col., (1984) determinaron ácido cítrico en bebidas refrescantes, concentrados congelados de naranja, jitomates, y quesos procesados, encontrando una recuperación de este ácido del 98 al 101 %. Para el ácido láctico determinado en productos cárnicos, lácteos y en aceitunas encontraron porcentajes de recuperación del 93 al 97 % y para el ácido acético determinado en vinagre, aceitunas, mayonesa, salsa catsup y mostaza, encontraron porcentajes de recuperación del 93 al 102%. En los alimentos semi-sólidos extrajeron con agua, obteniendo resultados comparables con los de este trabajo.

El proceso de extracción y clarificación establecido, se muestra en la Figura 15 , los tres últimos pasos forman el proceso de clarificación.

Con el procedimiento señalado en la figura 15 fue posible obtener muestras claras; sin embargo ésta contenía sustancias que era necesario eliminar por interferir con la determinación. Esta interferencia consistía en la reducción progresiva de las áreas de los compuestos a analizar y se atribuyó al ensuciamiento de la celda del detector de índice de refracción, probablemente por compuestos grasos presentes en las muestras. Se decidió entonces utilizar los Sep-Pak con una fase inversa de 18 carbonos, adecuada para retener compuestos hidrofóbicos.

Se realizaron experimentos para probar el uso de estos cartuchos para la eliminación de esta interferencia, sin retener los analitos a cuantificar.

Se pasaron 5 ml de la mezcla de estándares de ácido láctico y acético a través de los cartuchos, con el objeto de probar si estos ácidos eran retenidos.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Porcentajes de recuperación de estándares de los ácidos láctico y acético después de ser pasadas soluciones de los mismos por cartuchos Sep-Pak C18

| Compuesto | Recuperación en % ^a | | | | |
|-------------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | Repetición | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Ac. Láctico | 119 | 125 | 111 | 116 | 110 |
| Ac. Acético | 121 | 124 | 113 | 116 | 116 |
| | | | | | |

Determinados en equipo No. 2 con la columna Aminex.

a= promedio de dos determinaciones

En esta tabla se pueden observar los porcentajes de recuperación de estándares de los ácidos, en la elución por el cartucho Sep-Pak C18 en las condiciones establecidas y que fueron: pasar 5 ml de mezcla de estándares por el cartucho, sin ajustar el pH a la mezcla, utilizar el eluyente a base de agua-acetonitrilo 85/15, acabar de eluir con agua destilada y aforar el eluato a 10 ml.

El experimento se realizó 5 veces y sólo con los estándares en solución para tener así la repetibilidad de la elución por el cartucho. Los porcentajes de recuperación de los ácidos láctico y acético eluidos del cartucho Sep-Pak C18 fueron mayores del 100 %, lo que probablemente se debió a que los picos obtenidos fueron muy pequeños a causa de la dilución y por ello hubo error en el proceso de medición. Por otra parte, el cálculo de recuperación se efectuó por comparación con las áreas de los picos del cromatograma obtenido por inyección directa de la mezcla de estándares, más concentrada, lo que también contribuyó a un error en la cuantificación. A pesar de ello, los resultados obtenidos parecen indicar que, con el procedimiento empleado, los ácidos láctico y acético no quedan retenidos en el cartucho.

-Recuperación de estándares de glucosa y sacarosa pasados por el cartucho Sep-Pak C18.

El procedimiento inicialmente planteado fue pasar 5 ml de la mezcla de estándares por el cartucho, eluir con la mezcla de agua-acetonitrilo 85/15, aforar el eluato a 10 ml y utilizar un loop del inyector de 20 μ l.

Los resultados se observan en la siguiente tabla:

Tabla 8. Porcentaje de recuperación de estándares de azúcares en cartuchos Sep-Pak C18

| | | Recuperación en % ^a | | | | |
|-----------|-----------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | Repetición | | | | |
| Compuesto | Proceso 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Glucosa | | 57 | 86 | 88 | 93 | 75 |
| Sacarosa | | 127 | 133 | 134 | 130 | 130 |
| | Proceso 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Glucosa | | 97 | 92 | 81 | | |
| Sacarosa | | 111 | 102 | 99 | | |
| | Proceso 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Glucosa | | 96 | 100 | 99 | | |
| Sacarosa | | 114 | 128 | 128 | | |

Proceso 1: Pasar 5 ml de solución de estándares, aforar a 10 ml e inyectar con loop de 20

Proceso 2: Pasar 5 ml de solución de estándares, aforar a 10 ml e inyectar con loop de 50

Proceso 3: Pasar 2 ml de solución de estándares, aforar a 10 ml e inyectar con loop de 50

Determinados en Equipo No. 2 con la columna Aminada

a= promedio de dos determinaciones

Como se observa en la parte superior de la tabla 8 (Proceso 1) los resultados son dispersos. Existen dos posibles razones, primera el volumen de "lavado" es el mismo que el de la muestra y puede no ser suficiente para eluirla y segunda, al pasar la mezcla por el cartucho, ésta se diluye 2 veces, de manera que los picos son muy pequeños y existe mucha variación entre las áreas obtenidas, esto a su vez provoca error en la medición como en el experimento anterior.

Por esta razón se repitió el experimento, pero se cambió el loop del inyector a 50 μ l, con el objeto de inyectar más muestra y por lo tanto tener áreas mayores. Los resultados se muestran en la parte media de la tabla 8 (Proceso 2). Como se observa, los porcentajes de recuperación son más reproducibles, un poco mejores para la glucosa y la sacarosa se cuantificó mejor.

Con el objeto de observar si la dispersión de resultados se podía atribuir a una elución incompleta de los azúcares, una vez más se repitió el experimento, pero pasando solamente 2 ml de la mezcla de estándares por el cartucho, para eluir o "lavar" con un volumen 4 veces mayor al de la muestra tratada, y utilizando el loop del inyector de 50 μ l.

Los resultados se observan en la parte inferior de la tabla 8 (Proceso 3). Los porcentajes de recuperación de la glucosa son mejores pero aún se siguen teniendo porcentajes mayores del 100 % para la sacarosa. Para verificar si éste problema es debido a que eluye algún compuesto con el mismo tiempo de retención que la sacarosa en la columna aminada, se hizo un blanco pasando agua destilada sola por el cartucho Sep-Pak C18, previamente acondicionado, y eluyendo en las mismas condiciones que los experimentos anteriores. Al inyectar el eluato obtenido no se registró ningún pico, lo que descarta la posibilidad de coelución de algún compuesto interferente a la sacarosa.

El análisis de variancia indica que no existe diferencia significativa a un nivel de confiabilidad del 0.01% entre los tratamientos, por lo que se decidió trabajar con el último tratamiento para asegurar que el cartucho se eluya con un volumen de elución o "lavado" igual a 4 veces el de la muestra (2 ml), así como emplear el loop de 50 μ l para inyectar más muestra y por lo tanto tener áreas mayores y más reproducibles.

-Porcentajes de recuperación de estándares adicionados a masa de nixtamal, incluida la limpieza con el cartucho Sep-Pak C18.

Después de realizar las pruebas anteriormente mencionadas con los estándares de glucosa, sacarosa, ácido láctico y acético, y con las condiciones establecidas en dichos experimentos, se probó pasar el extracto de la muestra de masa a la que se le habían añadido dichos estándares. La muestra se extrajo y clarificó de acuerdo con el procedimiento establecido y se eluyó a través del cartucho Sep-Pak C18.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de estándares de azúcares y ácidos en extractos clarificados de masas con estándares después de ser pasados por cartuchos Sep-Pak C18

| Compuesto | Recuperación en % ^a | | |
|-------------|--------------------------------|-----|-----|
| | Repetición | | |
| | 1 | 2 | 3 |
| Glucosa | 65 | 95 | 93 |
| Sacarosa | 84 | 91 | 92 |
| Ac. Láctico | 99 | 101 | 100 |
| Ac. Acético | 101 | 102 | 99 |

Determinados en Equipo No. 2 con la columna Aminex para ácidos y la columna aminada para azúcares.

a= promedio de dos determinaciones

En los resultados se puede observar que los porcentajes de recuperación en la primera repetición son bajos para la glucosa principalmente, aunque también un poco para la sacarosa; lo que fue debido a que la columna aminada tenía un buen tiempo de uso con muestras y ya estaba perdiendo eficiencia, pues para los porcentajes de recuperación de los ácidos láctico y acético son cercanos al 100 %.

Para la segunda y tercera repeticiones los porcentajes de recuperación para la glucosa y sacarosa mejoran notablemente respecto a la primera repetición y esto se debió a que se realizaron en una columna nueva.

Con este tratamiento de limpieza a las muestras se evitó la disminución de áreas, sin afectar negativamente los porcentajes de recuperación de los estándares en la masa de nixtamal y por lo tanto se considera necesario en el tratamiento de la muestra, antes de ser inyectada en el cromatógrafo de líquidos.

El diagrama del procedimiento establecido para la limpieza de los extractos se muestra en la figura 16.

Es común el uso de cartuchos con este fin, Martín-Villa y col (1984) realizaron un tratamiento de limpieza a sus muestras de verduras crudas y cocidas, que consistió

básicamente en una decoloración del extracto utilizando los cartuchos Sep-Pak C18. Por otra parte, Brons y col. (1983) realizaron un tratamiento de limpieza a muestras de leche utilizando un reactivo con acetato de Zinc y ácido acético y fosfotungstíco o con un buffer de acetatos y acetonitrilo. Zigmunt y col. (1982) realizaron un tratamiento de limpieza a sus muestras de cereales precocidos utilizando cartuchos Sep-Pak C18.

Macrae (1985) y Scott (1992) realizaron una revisión sobre el análisis de carbohidratos, hacen énfasis en la importancia de cada paso del análisis, como son la extracción, clarificación, limpieza, separación, identificación y cuantificación y concluyen que mientras más compleja sea la muestra, mayor tratamiento requerirá antes de su separación por cromatografía de líquidos.

Los resultados de este experimento pueden ser utilizados para concluir si el método es repetible y con que precisión lo es; para ello se necesitan los siguientes datos:

Tabla 10 Datos estadísticos para la repetibilidad del método

| Compuesto | Glucosa | Sacarosa | Ac. Láctico | Ac. acético |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Media del % de recuperación | 84.33 | 89.0 | 100.0 | 100.66 |
| Desviación. estándar | 16.77 | 4.35 | 1.0 | 1.52 |
| % Coef. de variación | 19.88 | 4.89 | 1.0 | 1.51 |
| Error estándar | 9.68 | 2.51 | 0.57 | 0.87 |
| No. de determinaciones | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Varianza (s^2) | 281.23 | 18.92 | 1 | 2.31 |
| X_2 calculada | 5.62 ^a | 1.51 ^b | 0.5 ^c | 1.15 ^c |
| X_2 tablas $\alpha=0.05$ | 5.99 | 5.99 | 5.99 | 5.99 |
| | | | | |

a=al 10 % de desviación estándar relativa

b= al 5% de desviación estándar relativa

c= al 2% de desviación estándar relativa

La prueba de hipótesis establecida es:

$H_0 = s^2 = \sigma^2$, la hipótesis alternativa es $H_1 = s^2 > \sigma^2$
donde $\sigma^2=100$ para una desviación estándar relativa del 10.0%
 $\sigma^2=25$ para una desviación estándar relativa del 5.0%
 $\sigma^2=4$ para una desviación estándar relativa del 2.0%

El método para la glucosa es repetible con una precisión (desviación estándar relativa) del 10.0%, debido a la variación grande entre los porcentajes de recuperación entre la primera repetición con respecto a las otras dos repeticiones, el método no es repetible con una precisión del 5.0%.

Para la sacarosa si es repetible con una precisión del 5.0% y para los ácidos láctico y acético el método es repetible con una precisión del 2.0%, a pesar de el número pequeño de repeticiones.

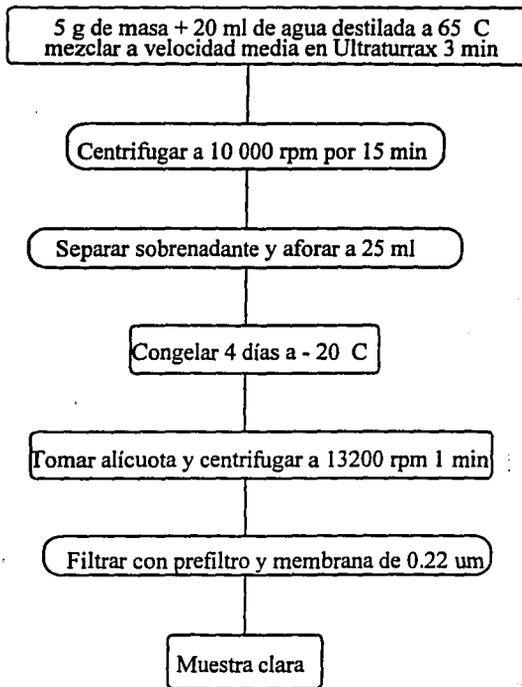


Figura 15 Diagrama del procedimiento de extracción y clarificación establecido

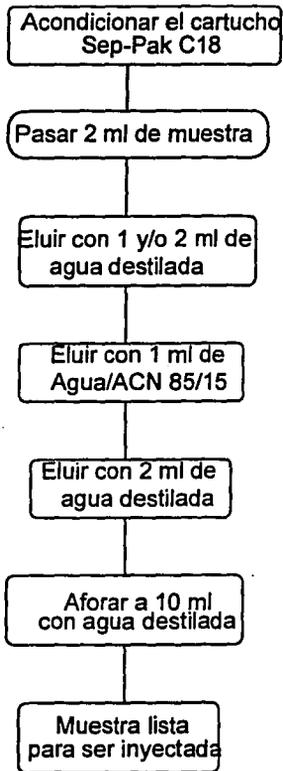


Figura 16 Diagrama del procedimiento de limpieza de la muestra establecido.

-Recuperación de diferentes concentraciones de estándares añadidos a masa de nixtamal

Con el objeto de probar la metodología desarrollada, se prepararon muestras de masa con diferentes concentraciones añadidas de cada estándar en el intervalo de concentración de las curvas de calibración. Con las condiciones establecidas para cada paso del tratamiento de la muestra, es decir , extracción, clarificación y limpieza, y se determinó el porcentaje de recuperación de cada estándar.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 11. Porcentajes de recuperación de estándares en masas a las que se le añadieron diferentes concentraciones de cada estándar.

| Muestra | Recuperación % ^a | | | |
|---------|-----------------------------|----------|-------------|-------------|
| | Glucosa | Sacarosa | Ac. Láctico | Ac. Acético |
| 1C | 93 | 115 | 92 | 91 |
| 2C | 75 | 92 | 94 | 93 |
| 3C | NC | NC | 98 | 94 |
| 4C | 93 | 92 | 100 | 99 |

Determinados en Equipo No. 3 con la columna Aminex para ácidos y la columna aminada para azúcares.

NC= No cuantificado.

a= promedio de dos determinaciones

Como se puede observar, los porcentajes de recuperación para los azúcares fueron mayores del 90% , excepto para la glucosa en la muestra 2C. En la muestra 3C las concentraciones añadidas fueron muy pequeñas y la dilución de la muestra es grande después de todos los tratamientos, (5 veces en la extracción, 5 veces en la limpieza y 5 veces más al agregar el acetonitrilo para tener la misma proporción acetonitrilo/agua que en la fase móvil. Debido a esto no se pudieron cuantificar la glucosa ni la sacarosa. Para estos casos donde la concentración de los azúcares es muy pequeña (muestras de nixtamal con pocas horas de fermentación o muestras de pozol), lo más conveniente será concentrar la muestra y así poder cuantificar los analitos presentes en ella. Para la muestra

4C todos los porcentajes fueron mayores del 90.0% y en general para el caso de los ácidos los porcentajes de recuperación fueron mayores del 90%.

Los resultados de la tabla 11 se utilizaron para determinar si el método fue exacto; para ello se necesitaron los siguientes datos:

Tabla 12. Datos estadísticos para calcular la exactitud del método

| Compuesto | Muestra | Concentración adicional % | Concentración recuperada % | Media del % de recuperación | Desv. Estándar | % Coef. de Variación | Error Estándar | "t" calculada | "t" de tablas |
|-------------|---------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|
| Glucosa | 1 C | 0.0240 | 0.0223 | 87.0 | 10.39 | 11.94 | 6.0 | -2.67 | ±4.30 |
| | 2 C | 0.1000 | 0.0750 | | | | | | |
| | 3 C | 0.0026 | NC | | | | | | |
| | 4 C | 0.0400 | 0.0372 | | | | | | |
| Sacarosa | 1 C | 0.1320 | 0.0758 | 99.66 | 13.27 | 13.32 | 7.66 | -0.04 | ±4.30 |
| | 2 C | 0.1100 | 0.1012 | | | | | | |
| | 3 C | 0.0018 | NC | | | | | | |
| | 4 C | 0.0660 | 0.0600 | | | | | | |
| Ac. Láctico | 1 C | 0.0110 | 0.0100 | 96.0 | 3.65 | 3.80 | 1.82 | -2.19 | ±3.18 |
| | 2 C | 0.0220 | 0.0206 | | | | | | |
| | 3 C | 0.1780 | 0.1744 | | | | | | |
| | 4 C | 0.0400 | 0.0400 | | | | | | |
| Ac. Acético | 1 C | 0.0142 | 0.0128 | 94.2 | 3.40 | 3.61 | 1.70 | -3.38 | ±3.18 |
| | 2 C | 0.0300 | 0.0278 | | | | | | |
| | 3 C | 0.1700 | 0.1598 | | | | | | |
| | 4 C | 0.3800 | 0.0376 | | | | | | |

Se utilizó una prueba bilateral para probar la hipótesis nula con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ y colocando 0.025 en cada extremo de la distribución, se encuentra el valor crítico (de tablas) para "t", y se calcula la "t" de los datos experimentales ($t_{\text{calc}} = x - \mu / (s/\sqrt{n})$). La hipótesis nula $H_0 = \mu$ donde $\mu = 100\%$ de recuperación, se rechaza si:

$$t_{\text{calc}} < -t_{\alpha/2} \text{ o } t_{\text{calc}} > t_{\alpha/2}$$

$$t_{\text{calc}} < -t_{0.025} \text{ o } t_{\text{calc}} > t_{0.025}$$

Para la glucosa $-4.30 < -2.67 < +4.30$
Para la sacarosa $-4.30 < -0.044 < +4.30$
Para el ácido láctico $-3.18 < -2.19 < +3.18$
Para el ácido acético $-3.18 > -3.38 < +3.18$

Para la glucosa, sacarosa, y los ácido láctico y acético la "t" calculada es menor que la "t" de tablas por lo tanto el método es exacto para estos 4 compuestos.

En general durante toda la experimentación los porcentajes de recuperación se mantuvieron en valores mayores al 80 %, para los azúcares y para los ácidos analizados. Esto concuerda con lo reportado por Bouzas y col. (1991), Canale y col. (1984), Picha 1985, Pirisino 1983 y Shaw y col. (1981) respecto a porcentajes de recuperación de azúcares y ácidos cercanos al 100 %

Conservación de las muestras

La filtración de los extractos a través de membranas de 0.22 μm aseguraría su esterilidad; sin embargo se observaron en algunas de ellos contaminaciones importantes que podrían modificar su composición. Esto se debió posiblemente a la gran cantidad de manipulaciones necesarias durante su pretratamiento.

Se probó la adición de agentes conservadores, como azida de sodio al 0.01%, pero interfiere con la determinación cromatográfica, con un tiempo de retención cercano a los azúcares de interés en la columna aminada.

Otros conservadores (benzoato de sodio al 0.01%, sorbato de potasio al 0.01%, metil parabeno al 0.01%, cianuro de sodio al 0.01% y acetonitrilo al 1.5%) no fueron eficientes para inhibir contaminaciones. La única manera de combatir las fue trabajando en las condiciones más asépticas posibles.

Análisis de maíz crudo y pozoles

Para aplicar el método desarrollado, se analizaron muestras de maíz crudo, de masa (nixtamal) y de pozoles indígena y mestizo preparados con el procedimiento señalado en la figura 1. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Concentraciones de azúcares y ácidos en muestras de maíz, masa de nixtamal y pozol.

| Muestra | % Glucosa base seca* | % Sacarosa base seca* | % Maltosa base seca* | % Ac. Láctico base seca* | % Ac. Acético base seca* |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| Maíz crudo ^b | 0.248 | 0.152 | 1.037 | 0.0 | 0.0 |
| Nixtamal ^b | 0.0 | 0.388 | 0.0 | 0.0 | 0.050 |
| Pozol Indígena ^c | 0.0 | 0.0428 | 0.0 | 0.961 | 0.0 |
| Pozol Ladino ^d | 0.048 | 0.0 | 0.0 | 0.792 | 0.0 |

Maíz crudo determinado en equipo No. 3 con la columna aminada.

Nixtamal y pozoles determinados en equipo No. 2 con columna Aminex y columna aminada.

a maíz crudo

b masa de harina de maíz /Quaker Oats

c pozol indígena elaborado en los Altos de Chiapas de 48 de fermentación

d pozol ladino elaborado en los Altos de Chiapas de 48 de fermentación

* Promedio de dos determinaciones

Como se puede observar, en el maíz crudo predomina la maltosa, encontrándose también la glucosa y la sacarosa en concentraciones menores.

En la masa de nixtamal (preparada en el laboratorio con la harina de maíz) sólo se encontró sacarosa. Esto confirma lo reportado por Boyer y col., (1987) respecto a que el disacárido predominante en el maíz es este azúcar, y se detectó una concentración baja de ácido acético, lo que nos indica que probablemente la harina había empezado a deteriorarse.

La preparación del nixtamal involucra etapas de cocción, remojo y lavado de los granos de maíz, durante las cuales pueden eliminarse azúcares solubles. Debido a esto resulta lógico encontrar menor concentración de azúcares en el nixtamal que en el maíz.

La concentración de azúcares en el nixtamal es baja comparada con la de otros alimentos fermentados elaborados a base de maíz.. En el ogi, alimento fermentado africano el maíz, contiene 1.3% de azúcares solubles, producidos probablemente por la adición de amilasas endógenas durante el remojo de los granos (Onyekwere y col. 1989). El mageu (papilla fermentada de maíz) otro alimento fermentado tradicional de Africa, al que se le añade

harina de trigo como fuente de amilasas, el sustrato a base de maíz contiene de 0.3 a 0.6% de azúcares reductores (Holzapfel, 1989).

Se analizaron una muestra de pozol ladino y otra de pozol indígena de los Altos de Chiapas, ambas fueron preparadas por productores de la región y fermentados durante 48 horas. La diferencia entre ambos procesos, como se puede observar en la figura 1, es una cocción adicional en el pozol mestizo o ladino. La concentración de azúcares detectada en ambos es mínima, lo cual era de esperarse considerando que la concentración de azúcares en el nixtamal no fermentado es baja. En ambas masas se detectó el ácido láctico y no el acético, sugiriendo que predomina la fermentación homoláctica.

La concentración de ácido láctico fue mayor en el pozol indígena que en el pozol ladino, lo cual concuerda con la idea de que la concentración de azúcares en el segundo sustrato es menor y por lo tanto se produce menos ácido.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar en nixtaml y en pozol algunos azúcares simples como glucosa, sacarosa, y maltosa, así como ácidos orgánicos productos de fermentación como el ácido acético y láctico.

- El intervalo de concentraciones de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ a 0.01 g/ml es lineal para la glucosa y sacarosa usados como estándares, con un coeficiente de correlación de $r = 0.99$, y un límite inferior cuantificable de detección de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ utilizando el detector de índice de refracción.

- Para el ácido láctico el intervalo lineal de concentración es de 92.7 $\mu\text{g/ml}$ a 9.27 mg/ml con un coeficiente de correlación de 0.99 y un límite inferior cuantificable de 5.74 mg/100 ml, con un loop de 20 μl y de 57.4 $\mu\text{g/ml}$ a 4.63 mg/ml con un límite inferior cuantificable de 57.4 $\mu\text{g/ml}$, utilizando un loop de 50 μl , y un detector de índice de refracción.

- Para el ácido acético el intervalo lineal de concentración es de 73.1 $\mu\text{g/ml}$ a 7.31 mg/ml con un coeficiente de correlación de 0.99 y un límite inferior cuantificable de 0.00731 g/100 ml, con un loop de 20 μl y de 45.7 $\mu\text{g/ml}$ a 3.65 mg/ml con un límite inferior cuantificable de 45.7 $\mu\text{g/ml}$, utilizando un loop de 50 μl , y un detector de índice de refracción.

- El método es repetible, con una precisión o desviación estándar relativa del 10.0% para la glucosa y del 5.0% para la sacarosa, así como del 2.0% para los ácidos láctico y acético.

- El promedio de porcentajes de recuperación es para la glucosa de $88.9\% \pm 7.71$, para la sacarosa de $107.8\% \pm 14.75$, para el ácido láctico de $94.14\% \pm 12.13$ y para el ácido acético de $98.51.0\% \pm 14.37$.

- El método propuesto presenta como ventajas la cuantificación individual de cada azúcar presente en el maíz (o sustrato inicial de la fermentación del pozol) en contraste con otros métodos indirectos como el análisis de los azúcares reductores, y el análisis enzimático donde se necesita una enzima específica para cada azúcar presente en el maíz. En nuestro

caso sólo involucra la utilización de un equipo y una columna para el análisis simultáneo de diferentes azúcares.

- Las muestras extraídas de nixtamal y de pozol son estables en congelación a -20°C durante 4 días.

- Además de la extracción de la muestra se requieren tratamientos de clarificación mediante congelación y filtración así como de limpieza de la misma con cartuchos Sep-Pak C18 antes de ser inyectada.

- El método puede ser empleado para el monitoreo o seguimiento de fermentaciones naturales o controladas del pozol, es decir para analizar el consumo de carbohidratos del maíz o sustrato así como a los metabolitos producidos por los microorganismos participantes en una fermentación sólida.

RECOMENDACIONES

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

El presente trabajo es un inicio en la experimentación cuyo objetivo es el análisis de consumo de sustratos y producción de metabolitos durante una fermentación sólida, por lo que es necesario ampliarla y hacer recomendaciones al respecto.

- Los analitos de interés se cuantificaron en un nivel de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ para el caso de los azúcares como la glucosa y la sacarosa y de 57.4 $\mu\text{g/ml}$ para el caso del ácido láctico y de 45.7 $\mu\text{g/ml}$ para el ácido acético, pero pueden encontrarse otros azúcares presentes en muy bajas concentraciones y que después del tratamiento dado a la muestra, que implica una dilución aproximada del 125%, no se puedan cuantificar por lo que será necesario concentrarlas. Lo más recomendado sería liofilización.
- Será necesario agregar a las muestras un conservador antes de su almacenamiento en congelación, para evitar las actividades enzimática y microbiana que puedan modificarlas.
- Si las muestras provienen de nixtamal o fermentaciones llevadas a cabo en el laboratorio, se podrían colectar en las condiciones lo más asépticas posibles y congelarlas a -70°C para asegurar que no haya ninguna actividad enzimática y al descongelarse, realizar el tratamiento de la muestra también en condiciones asépticas y lo más pronto posible, con el objeto de analizar los cambios durante la fermentación.
- El estudio sobre el consumo de azúcares y producción de metabolitos en masas estériles inoculadas con cepas aisladas del pozol.

BIBLIOGRAFIA

Adams R.F., Jones R.L. y Conway P.L. 1984. High-performance liquid chromatography of metabolites. *Journal of Chromatography* **336**, 125-137.

Aidoo E.K. 1992. Lesser-know fermented plant foods. En: Office of International Affairs National Research Council *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of The Board on Science and Technology for International Development. National Academic Press. Washington D.C. pp. 35-42.

Armstrong W. D. y Heng L. J. 1989. Evaluation of the liquid chromatographic separation of monosaccharides, disaccharides, trisaccharides, tetrasaccharides, deoxisaccharides and sugar alcohols with stable cyclodextrin bonded phase columns. *Journal of Chromatography* **462** 219-232.

Ashoor H. S. y Knox M. J. 1984. Determination of organic acids in foods by high-performance liquid chromatography. Citric acid. *Journal of Chromatography* **299** 288-292.

Ashoor H. S. y Welty J. 1984. Liquid Chromatographic Determination of Acetic Acid in Foods. *Journal of Association Official Analytical Chemist*, **67** (5), 885-887.

Ashoor H. S. y Welty J. 1984. Determination of organic acids in foods by high-performance liquid chromatography. lactic acid. *Journal of Chromatography* **287** 452-456.

Blake J.D, Clarke L. M. and Richards N. G. 1987. Determination of organic acids in sugar cane process juice by High-Performance Liquid Chromatography. Improved resolution using dual Aminex HPX-87H cation-exchange columns equilibrated to different temperatures. *Journal of Chromatography* **398** 265-277.

Banks W., Greenwood C.T. y Muir D.D. 1973. The structure of starch. En: G. G. Birch and Green L.F. (Eds) *Molecular Structure and Function of Food Carbohydrates*. Applied Science Publishers LTD London pp. 176-194.

Brons C. y Olieman C. 1983. Study of the high performance liquid chromatographic separations of reducing sugars, applied to the determination of lactose in milk. *Journal of Chromatography* **259**, 79-86.

Bouzas J., Kant A. C., Bodyfelt F. y Torres J.A. 1991. Simultaneous determination of sugars and organic acids in Cheddar cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Science* **56**(1), 276-278.

Boyer C.D. y Shanon J.C. 1987. Carbohydrates of the kernel. *Corn: Chemistry and Technology*. En: Watson S.A. and Ramstad P.E. (Eds). The American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota E.U., pp 253-272.

Canale A, Valente E. M. y Ciotti A. 1984. Determination of volatile carboxylic acids (Cl-C5) and lactic acid in aqueous acid extracts of silage by high performance liquid chromatography. *Journal of the Science and Food Agriculture* 35, 1178-1182.

Cañas A. 1991. *Variaciones microbiológicas asociadas al método de elaboración de pozol en la zona Altos de Chiapas*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Alimentarias en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Guaymas, pp 95

Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G. Guzmán G.J. 1955. El pozol, forma indígena de consumir maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia Méx.* 15, 27-30.

Coultate T. P. 1990 Carbohidratos. En: *Alimentos Química de sus componentes*. Ed Acribia, España..pp 26-31.

Fook-Min Yong L. 1992. Future Directions. En: Office of International Affairs National Research Council *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of The Board on Science and Technology for International Development. National Academic Press. Washington D.C. pp. 184-189.

Gomis B. 1992. HPLC Analysis of organic acids. En: *Food Analysis by HPLC*. Nollet (Ed). Marcel Dekker Inc. pp 379-385.

Hodge E.J. y Osman E. M. 1985 Hidratos de Carbono. En: *Introducción a la ciencia de los alimentos*. Fennema R.O.(Ed) Ed. Reverte S.A. pp 121-135.

Holzapfel H. W. 1989. Industrialization of Mageu Fermentation in South Africa. En: Steinkraus H. K. (Ed). *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp 285-327.

Honda S. 1984. High performance liquid chromatography of mono and oligosaccharides. *Analytical Biochemistry* 140, 1-45.

Kihara K., Rokushika S. Y. Hatano H. 1987. Elution behaviour of aliphatic carboxylic acids on a strong cation-exchange resin column. *Journal of Chromatography* 410, 103-110.

Leal H., Wachter M.C., Alvarez E., López A. y Saint-Phard C. 1987. Estudio de cambios en el contenido proteico de subproductos agrícolas por fermentación con microfloras mixtas. Memorias del Simposio Latinoamericano Biotecnología para la Producción de Biomasa y Tratamiento de Desperdicios. Antigua Guatemala. 289-304.

Macrae R. 1985. High Performance Liquid Chromatography En: *Analysis of Food Carbohydrates*. Birch G.G. (Ed). National College of Food Technology, University of Reading UK. Elsevier Applied Science Publishers London and New York.pp. 61-89.

Macrae R. 1988.. HPLC in Food Analysis. Macrae R. (Ed). Food Science and Technology 2a. ed. Academic Press London. pp 20-38.

Martin-Villa C., Vidal-Valverde C. y Rojas-Hidalgo E. 1982. High Performance Liquid Chromatographic determination of carbohydrates in raw and cooked vegetables.*Journal of Food Science* 47, 2086-2088.

Miller, I y Freund J. 1967 *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. 1a. Ed. Ed. Reverté, México, D. F pp 167-168.

Miller C.J. Y Miller N.J. 1993 *Estadística para Química Analítica* 2a. Ed. Ed. Addison-Wesley Iberoamérica S.A. Wilmington, Delaware. E.U.A. pp 87-119.

Nuraida L. 1988. *Studies in microorganisms isolated from pozol, a Mexican fermented maize dough*. Tesis de Maestría en Microbiología de Alimentos. Universidad de Reading Gran Bretaña pp 80.

Onyekwere, O. O., Akinrele I. A. y Koleoso O. A. 1989. Industrialization of Ogi Fermentation. En: *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. Steinkraus H. K. (Ed). Marcel Dekker Inc. N.Y. pp 285-327.

Paredes López O. y Gallardo Y. (1981) *Com. Ext. (Méx)* 31, 247.

Paynter A. V., Neubauer D. y Ladenburg K. 1986. Comparision of HPLC and glucose oxidase assay systems for determining glucose content of Biomass samples.*Journal of Chromatographic Science* 24 (April) .pp 170-172.

Paskach J. Th., Lieker P-H., Reilly J. P. y Tielecke K. 1991. High performance anion-exchange chromatography of sugars and alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions.*Carbohydrate Research* 215, 1-14.

Plaga A., Stumpf J. y Fiedler H-P. 1989. Determination of carbohydrates in fermentation process by high performance liquid chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32, 45-49.

- Picha H. D. 1985. HPLC determination of sugars in raw and baked sweet potatoes. *Journal of Food Science* **50**, 1189-1190.
- Pirisino F. J. 1983. High Performance Liquid Chromatographic determination of lactose, glucose and galactose in lactose-reduced milk. *Journal of Food Science* **48**, 742-744.
- Poole F.C.1991. Chromatography Today. 1a. ed.Elsevier Science Publishers B.V. Netherlands pp 422-454.
- Ramírez F. 1987. *Biochemical studies on a mexican fermented corn food-pozol*. Tesis para obtener el grado de Ph. D. Cornell University pp 173.
- Robards K. y Withelaw M. 1986 Chromatography of monosaccharides and disaccharides. *Journal of Chromatography* **337** 81-110.
- Scott W.F. 1992. HPLC Determination of Carbohydrates in foods. En: *Food Analysis by HPLC*. Nollet (Ed). Marcel Dekker Inc. N.Y. pp 259-274.
- Shaw E. P. y Wilson W. Ch. 1981. Determination of organic acids and sugars in Loquat (*Eriobotrya japonica Lindl*) by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Science and Food Agriculture*. **32**, 1242-1246.
- Snyder R. L. and Kirkland J.J. 1982. *Introduction to Modern Chromatography*. 2a. ed. John Wiley and Sons Inc.N. Y. pp
- Steinkraus H. K. (Ed). 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Vol. 9. Microbiology Series. Marcel Dekker Inc. N.Y. pp. 226-233.
- Steinkraus H. K. 1992. Lactic Acid Fermentations. En: Office of International Affairs National Research Council *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Report of an Ad Hoc Panel of The Board on Science and Technology for International Development. National Academic Press. Washington D.C. pp. 43-51.
- Taboada J., Herrera T. y Ulloa M. 1971. Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **2**, 188-191.
- Ulloa M. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. **8**, 17-48.
- Ulloa M. y Herrera T. 1976-1982. Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas indígenas de México: pozol, tesguino, pulque, colonche y tepache. Anales del Instituto de Biología. Universidad. Nacional. Autónoma.de México. 45-53. Series de Botánica., 145-163.

Ulloa M. 1981. Indigenous Fermented Beverages of México. Global Impacts of Applied Microbiology 6th International Conference S.O. Emejuaiwe O. Ogunbi, S.O. Sanni eds Academic Press.

Verhaar Th L A. y Kuster M.B.F. 1982. Contribution to elucidation of the mechanism of sugar retention on amino-modified silica in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **234** 57-64.

Wacher y Col. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**, 269-274.

Watson S. 1987. Structure and composition. *Corn: Chemistry and Technology*. En: Watson S.A. and Ramstad P.E. (Eds). The American Association of Cereal Chemists Inc. St. Paul, Minnesota E.U., pp 54-81.

Yost W.R., Etre S.L. y Conlon D.R. 1980. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Perkin-Elmer Corp.

Zygmunt. Lucian C. 1982. High Pressure Liquid Chromatographic determination of mono and disaccharides in presweetened cereals: Collaborative Study.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**(2), 256-264.