

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**IMPLEMENTACION Y EVALUACION DE UNA TECNICA DE CROMATOGRAFIA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA DETERMINAR EL PATRON
DE AMINOACIDOS DE ALIMENTOS**

INFORME DE TESIS

Presentado por:
Karen Darlene Valenzuela Elias

**PARA OPTAR AL TITULO DE:
QUIMICO BIOLOGO**

Guatemala, enero 2,000

DL
06
T(2057).

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CC.QQ. Y FARMACIA

DECANA	LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO
VOCAL II	DR. RUBEN DARIEL VELASQUEZ MIRANDA
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZALEZ
VOCAL V	BR. ESTUARDO SOLORZANO LEMUS

ACTO QUE DEDICO

A JESUCRISTO:

Para El sea la gloria y la honra.

A MIS PADRES:

Lic. Roberto Aníbal Valenzuela Chinchilla y Blanca Dilia Elías de Valenzuela. *Por su amor incalculable y espíritu de lucha y valentía ante la vida que me han transmitido a lo largo de mi vida.*

A MIS HERMANOS:

Carla, Estuardo y Juan Carlos . *Por el amor que nos une y apoyo que me han brindado.*

A MI SOBRINO:

Carlos Roberto. *Porque su nacimiento ha llenado de alegrías y bendiciones a nuestra familia.*

A MI NOVIO:

Oscar Ernesto Avendaño De León. *Por su inmenso amor y apoyo ilimitado.*

A MIS AMIGAS :

Aura Alejandra Noriega López y Lilian Eunice Quiñonez Carballo . *Por los momentos de alegrías, tristezas, fracasos y éxitos compartidos. Momentos que me acompañarán por siempre.*

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Velásquez, por su asesoría brillante y apoyo incondicional que permitió realizar el presente trabajo.

Al Laboratorio de Investigación del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, por el préstamo de las instalaciones y equipo utilizado en la parte experimental del presente trabajo.

Al Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial al señor José Morales y Licda. Jubitza Contreras por el préstamo de dichas instalaciones y equipo necesario para la realización del presente trabajo.

A la Licda. Julieta de Ariza, por su ayuda incondicional.

A la Licda. Ingrid Benítez, por guiarme en la realización del presente trabajo en forma incondicional.

A los Licenciados María Del Carmen Bran y Raúl Paniagua, por sus observaciones y consejos que ayudaron a mejorar la calidad del presente trabajo.

A la Sociedad Alemana para la cooperación técnica (GTZ PROYECTO POS.-NR. PROJ. 9317) por la donación del equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

INDICE

	PAGS
I. RESUMEN.....	1, 2
II. INTRODUCCION.....	3, 4
III. ANTECEDENTES.....	5
1. Aminoácidos	5
1.A Propiedades Físicas.....	10
1.B Estereoisomerismo de los aminoácidos.....	11
1.C Reacciones de los aminoácidos.....	12
1.C.1 Reacciones del grupo carboxilo.....	12
1.C.2 Reacciones del grupo amino.....	12
1.C.3 Reacciones del grupo R.....	13
2. Proteínas y aminoácidos en los alimentos	14
2.A Satisfacción de requerimientos de proteínas y aminoácidos.....	14
2.B Calidad proteínica de los alimentos.....	15
2.B.1 Composición total de los aminoácidos.....	15
2.B.2 Calidad proteínica y valor nutricional de una proteína.....	16
2.C Aspectos Nutricionales.....	17
2.C.1 Requerimientos de aminoácidos en la dieta.....	18
2.C.2 Concentración proteínica de la dieta.....	21
2.C.3 Factores que influyen en la biodisponibilidad de las proteínas.....	23
2.C.4 Relación proteína energía indicando la calidad de la dieta.....	25
2.D Características de la dieta en Latinoamérica.....	26,27
3. Métodos utilizados para las determinaciones de aminoácidos y proteínas en los alimentos	29
3.A Métodos de determinación de proteínas.....	29
3.A.1 Métodos físicos.....	29
3.A.2 Métodos Químicos.....	32
3.A.3 Métodos Radioquímicos.....	33
3.B Métodos de determinación de aminoácidos.....	33
3.B.1 Cromatografía en papel.....	33
3.B.2 Cromatografía de intercambio iónico.....	35
3.B.3 Cromatografía en capa fina.....	35
3.B.4 Electroforesis.....	36
3.B.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	36
4. Aplicaciones de las determinaciones de aminoácidos	41
IV. JUSTIFICACIONES.....	44
V. OBJETIVOS.....	45
VI. HIPOTESIS.....	46
VII. MATERIALES Y METODOS.....	47-55
VIII. RESULTADOS.....	56-72
IX. DISCUSION DE RESULTADOS.....	73-80
X. CONCLUSIONES.....	81
XI. RECOMENDACIONES.....	82
XII. REFERENCIAS.....	83
XIII. ANEXOS.....	87

I. RESUMEN

La calidad nutritiva de un alimento fuente de proteínas está determinada por la cantidad total de proteínas y por el patrón de aminoácidos; el cual nos indica cuáles y en qué cantidad están cada aminoácido presente. En el país como en la región centroamericana no existe instituciones que realicen análisis para determinación del patrón de aminoácidos en alimentos.

En la actualidad, la técnica más eficiente y utilizada para determinar el patrón de aminoácidos de los alimentos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El objetivo de este trabajo fue implementar y evaluar una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinar el patrón de aminoácidos en alimentos. La técnica incluye la hidrólisis ácida del alimento (HCl 6 N, 110 °C, 24 horas). El hidrolizado se analiza por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa (sílica gel, C-18), con derivatización pre-columna (o-ftaldialdehído/2-mercaptoetanol) y detección de fluorescencia (emite a 330 nm y emite a 450 nm). La elución se realizó con un gradiente que consistía en metanol-acetato de sodio (composición inicial 26/74, composición final 100/0). El análisis duró 60 minutos.

El método era lineal (≥ 0.99) para 13 de los 15 aminoácidos estudiados. Los límites de detección se encuentran de entre 0.01 - 1.11 ug/ml. Porcentajes de recuperación (exactitud) se obtuvieron rangos de entre 28 y 94 por ciento. Máxima

concentración detectable del método fue de 100 ug/ml. La reproducibilidad entre días fue adecuada (porcentaje de error estándar entre 0.6 a 9).

El método fue exitosamente aplicado para la determinación de aminoácidos de la harina de soya, gushnail (*Spathiphyllum phrynifolium*), chomtee (*Lycianthes synanthera*), ambas plantas comestibles nativas de Guatemala y para salchicha de ternera.

II. INTRODUCCION

El patrón de aminoácidos de un alimento es la descripción cuantitativa de los aminoácidos presentes. Es decir, se indica cuáles y en que cantidad están cada uno de ellos.

La calidad nutritiva de un alimento fuente de proteínas está determinada por la cantidad total de proteína, el patrón de aminoácidos, la digestibilidad y la biodisponibilidad. El contenido total de proteína en un alimento es un parámetro de calidad que brinda muy poca información al respecto. Esta información debe ser complementada con datos sobre el patrón de aminoácidos, la digestibilidad y la biodisponibilidad, que son parámetros más difíciles de determinar.

En Guatemala, como en toda región latinoamericana, la desnutrición proteínico calórica es uno de los principales problemas nutricionales de la población, ya que la producción de alimentos no satisface a la población en crecimiento. Una acción de largo plazo para solventar esta deficiencia lo constituye la promoción de la producción y el consumo de alimentos de bajo costo y ricos en proteínas de buena calidad.

Para identificar los alimentos que pueden ser promocionados en cuanto a su producción y consumo, es necesario contar con datos sobre su calidad nutritiva. Estos estudios normalmente se inician con la determinación de su patrón de aminoácidos.

La determinación del patrón de aminoácidos de un alimento implica dificultades analíticas debido principalmente a que este normalmente posee una matriz compleja, a la presencia de otros compuestos y, sobre todo, a que esta implica el análisis de veinte compuestos íntimamente relacionados. El análisis de aminoácidos de un alimento se ha realizado por medio de cromatografía de gases y cromatografía de intercambio iónico con derivatización post-columna. Recientemente se ha desarrollado métodos de cromatografía líquida de alta resolución que permiten el análisis mediante derivatización pre-columna y detección de fluorescencia, que son más rápidos y sensibles que los anteriores.

En este trabajo se implementó y evaluó una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa y detección de fluorescencia, para la identificación y determinación de aminoácidos en hidrolizados ácidos de alimentos, lo que permitirá establecer el patrón de aminoácidos del mismo.

III. ANTECEDENTES

1. AMINOACIDOS.

Los aminoácidos son compuestos que tienen carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N) , y tres de ellos sulfuro (S). En su molécula poseen un grupo carboxílico (ácido) y un grupo amino (básico) ; estos grupos están insertados en el mismo átomo de carbono (alfa α) por lo que son llamados α - aminoácidos. Dado que está presente una función amínica primaria en ocasiones se usa el término aminoácido primario. Son las unidades fundamentales de las proteínas, unidos en una secuencia lineal por enlaces peptídicos. Los aminoácidos tienen un centro quiral (excepto la treonina y la isoleucina que poseen 2 y la glicina que no posee), la única forma estereoisómera que se encuentran en los seres vivos es la forma -L- (1).

El ser humano necesita ingerir en sus alimentos una cantidad regular de ciertos aminoácidos por que su cuerpo no los puede sintetizar a partir de otras sustancias. A estos aminoácidos se les conoce como: ***Aminoácidos esenciales***, mientras que los que el cuerpo es capaz de sintetizar a partir de otras sustancias son los ***Aminoácidos no esenciales*** (2,3).

TABLA No. 1

**Clasificación de los aminoácidos de la dieta desde el punto de vista
nutricional**

Esenciales	Parcialmente esenciales	No esenciales
Histidina *	Cisteína	Alanina
Isoleucina	Tirosina	Arginina
Leucina		Asparagina
Lisina		Acido Aspártico
Metionina		Acido glutámico
Fenilalanina		Glutamina
Treonina		Glicina
Triptófano		Prolina
Valina		Serina

* Esencial para la nutrición de los lactantes.

• Fuente: FAO/OMS/UNU. Ginebra 1985

Los requerimientos de los aminoácidos esenciales para los humanos y animales varían dependiendo de la especie. La arginina es requerida para el crecimiento de las ratas. La glicina es requerida en los pollos y la taurina en los gatos. La mayor parte de los aminoácidos no son esenciales en los rumiantes; el requerimiento es escaso en otros herbívoros que tienen una población substancial de microorganismos intestinales (4).

El carácter único de cada α -aminoácido se debe a la estructura de su grupo R que a menudo se denominan cadenas laterales. El grupo R puede variar desde un simple átomo de hidrógeno en la glicina (el aminoácido más sencillo) hasta una estructura más compleja, como el grupo guanidina de la arginina. En el caso de la prolina, el grupo R forma parte de una estructura amínica secundaria cíclica, por consiguiente, la prolina se considera un aminoácido secundario y en ocasiones se le da el nombre de iminoácido. Se sabe que existen alrededor de 300 aminoácidos diferentes de origen natural. Muchos de ellos sólo se observan en determinadas formas de vida y algunos sólo aparecen en una especie. Sin embargo, todos los organismos utilizan sólo veinte de ellos para la biosíntesis de proteínas los cuales son llamados aminoácidos protéicos (1).

En la tabla No. 2 se presentan las estructuras, los nombres comunes y las abreviaturas de los nombres de los veinte aminoácidos proteicos. Las siete categorías que se presentan en la tabla se basan en la composición química del grupo R: hidrocarburo no aromático (alifático), -OH presente (hidroxilados), S presente (azufrados), hidrocarburo aromático (aromáticos), con un grupo - COOH adicional (ácidos) y los correspondientes derivados amídicos (ácido amídicos), con -NH₂ adicional o un grupo relacionado (básicos o alcalinos) y con una estructura amínica secundaria cíclica =N-H (imínicos) (1,2).

El carácter polar o apolar de los grupos R de los aminoácidos es crucial para comprender algunos aspectos bioquímicos de las proteínas. Un grupo R polar es

hidrofílico (afin al agua) lo que significa que es solvatado con facilidad por las moléculas polares del agua. La polaridad puede deberse a la presencia, a pH 7, 4 (pH fisiológico), de una carga positiva o negativa completa en un grupo R ionizable (polar cargado), o bien a la presencia de cargas parciales en los enlaces tipo dipolo permanente de grupo R no ionizable (polares, no cargados) . Un grupo R apolar es hidrofóbico (repelente al agua), lo que significa que el agua no lo solvata con facilidad. La apolaridad se debe a la ausencia de las características de polaridad antes mencionadas o a una contribución mínima de ellas y a la presencia de muchos enlaces apolares C-C y C-H. La clasificación completa se muestra en la tabla No, 3.

El grupo R puede ionizarse o no. En el segundo caso se dice que es neutro y que no presenta carga. Si puede ionizarse, el grupo R es básico (alcalino) cuando funciona como una base Bronsted para formar un grupo R con carga positiva; o es ácido cuando funciona como un ácido Bronsted para formar un grupo R con carga negativa (1,2).

TABLA No. 2

NOMBRE	CADENA LATERAL	ABREVIATURAS
Glicina	-H	GLY G
Alanina	-CH ₃	ALA A
Valina	-CH-CH ₃ CH ₃	VAL V
Leucina	-CH ₂ -CH-CH ₃ CH ₃	LEU L
Isoleucina	-CH-CH ₂ -CH ₃ CH ₃	ILE I
Serina	-CH ₂ OH	SER S
Treonina	-CH-OH CH ₃	THR T
Acido Aspártico	-CH ₂ COO-	ASP D
Acido Glutámico	-CH ₂ CH ₂ -COO-	GLU E
Asparagina	-CH ₂ CONH ₂	ASN N
Glutamina	-CH ₂ CH ₂ CONH ₂	GLN Q
Lisina	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	LYS K
Arginina	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH NH ₂ +NH ₂ =CH	ARG R
Histidina	CH ₂ NH NH -CH ₂ -C-CH	HIS H
Fenilalanina	-CH ₂	PHE F
Tirosina	-CH ₂	TYR Y
Triptófano	-CH ₂	TRP W
Cisteína	-CH ₂ -SH	CYS C
Metionina	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	MET M
Prolina	H ₂ N ⁺ -CH-COO- CH ₂ CH ₂	PRO P

TABLA No. 3

POLAR CARGADO	POLAR NO CARGADO	APOLAR
Lisina	Asparagina	Glicina*
Arginina	Glutamina	Valina
Acido Glutámico	Serina	Leucina
Acido Aspártico	Treonina	Isoleucina
Histidina	Cisteína	Metionina
	Tirosina	Fenilalanina
		Alanina
		Triptófano
		Prolina

Nota: Las polaridades se basan en la estructura del aminoácido a pH 7

* Clasificado en ocasiones como polar

• Ref. (1)

1.A PROPIEDADES FISICAS

En el estado sólido y en solución los aminoácidos tienen dos propiedades fáciles de observar y que suministran información acerca de su estructura. Con ciertas excepciones, son insolubles en agua y bastante insolubles en los solventes orgánicos no polares del tipo éter, cloroformo y acetona.

Un análisis más a fondo de la estructura de los aminoácidos en solución nos lleva a considerar el comportamiento de los aminoácidos como electrolitos, pueden

reaccionar con los ácidos como con los álcalis -sustancias anfóteras-; debido a ello, tienen una carga eléctrica neta que depende del pH de la solución.

La carga de una molécula influye en el tipo de interacción con otras moléculas; esta propiedad es útil para el aislamiento y purificación de los aminoácidos.

1.B ESTEREOISOMERISMO DE LOS AMINOACIDOS

Con excepción de la glicina, el átomo de carbono alfa de los aminoácidos está fijo en forma tetraédrica a cuatro átomos o grupos de átomos diferentes. Este tipo de carbono se denomina quiral o asimétrico. Debido a esta disposición, los aminoácidos pueden existir en diferentes configuraciones estereoisoméricas, las cuales se distinguen entre sí por la orientación espacial de los grupos fijos al carbono alfa. Los dos estereoisómeros se denominan configuraciones L y D y representan dos estructuras con imágenes especulares que no se pueden superponer; estas estructuras se denominan enantiómeros (de los veinte aminoácidos comunes, sólo la treonina y la isoleucina tienen más de un carbono asimétrico).

La única propiedad física que distingue a los enantiómeros es su capacidad de hacer girar un plano de la luz polarizada (con longitud de onda) con igual magnitud pero con sentidos opuestos.

La importancia biológica de estas configuraciones es que en las proteínas sólo se conoce la existencia de L-aminoácidos. Aunque hasta el momento no se

tiene pruebas de la existencia de D-aminoácidos en las proteínas, estos se encuentran en muchos seres incluso en los humanos tanto libre y como en componentes estructurales distintos a las proteínas.

1.C REACCIONES DE LOS AMINOACIDOS

Si bien su capacidad para actuar como electrólitos es una propiedad química importante de los aminoácidos, tienen igual significado las reacciones en las cuales intervienen las funciones α -carboxilo, α -amino y los diversos grupos R.

1.C.1 Reacciones del grupo carboxilo. Los grupos carboxilos de los aminoácidos pueden esterificarse con los alcoholes, o bien formar una amida en presencia de amoníaco.

Cuando la amina que interviene en la formación de la amida no corresponde al NH_3 sino al grupo α -amino de otro aminoácido, se constituye un dipéptido. El enlace amido que une a los dos aminoácidos se conoce con el nombre del enlace peptídico.

1.C.2 Reacciones del grupo amino. El grupo amino de un aminoácido reacciona con el ácido nitroso (HNO_2), que es un agente oxidante fuerte, para liberar N_2 . Esta reacción al ser estequiométrica, resulta importante en la estimación de los grupos α -amino de los aminoácidos.

El grupo amino de los aminoácidos puede oxidarse con un agente oxidante más suave, la ninhidrina, para formar amoníaco, CO_2 y el aldehído.

El orto-ftaldialdehído (OPA) también llamado fluoroaldehído es un reactivo de revelado al igual que la ninhidrina pero más sensible, con el cual pueden detectarse concentraciones de aminoácidos de orden de picomoles (10^{-12}) a femtomoles (10^{-15}). Esta enorme sensibilidad se debe a la formación de productos intensamente fluorescentes. Después de la reacción, la exposición a una radiación de 360nm provoca una emisión fluorescente a 455 nm, cuya intensidad se relaciona con la concentración del aminoácido. Esta reacción ocurre con rapidez si se trata de aminoácidos primarios, pero no cuando son secundarios.

1.C.3 Reacciones de los grupos R. Dos reacciones que sufren los residuos R frecuentemente son de interés biológico, como en caso de la serina y la cisteína. Con frecuencia el grupo hidroxílico de la serina se fosforila en las proteínas biológicamente activas. La proteína de la leche, la caseína, posee un gran número de residuos de serina fosforilados. El grupo sulfhidrilo de la cisteína sufre las reacciones típicas del grupo -SH. Una de ellas es la oxidación reversible con otra molécula de cisteína para constituir a la cistina, que contiene un enlace disulfuro. La insulina, por ejemplo, contiene tres enlaces disulfuro, dos de los cuales mantienen unidas a dos cadenas polipeptídicas de la molécula fisiológicamente activa (1,2,4).

2. PROTEINAS Y AMINOACIDOS EN LOS ALIMENTOS

Los alimentos consisten principalmente en tejidos de origen animal o vegetal que contienen concentraciones variables de proteínas, péptidos y aminoácidos libres. Estas sustancias son absorbidas y utilizadas por el cuerpo humano en proporciones variables. El grado en que una proteína de la dieta contribuye a formar proteína tisular nueva define su valor nutritivo. Esta expresión se usa frecuentemente como sinónimo de *Calidad protéica*. Sin embargo, esta última está relacionada con el contenido y el patrón de aminoácidos y con su digestibilidad, en tanto que el concepto de *valor nutritivo* implica, además del concepto de calidad protéica, el de contenido total y la biodisponibilidad. Cuando se evalúa una fuente alimentaria de proteínas, se debe tomar en cuenta varios factores: a) El contenido total de proteína y/o de nitrógeno; b) su patrón de aminoácidos; c) su digestibilidad; d) la biodisponibilidad de los aminoácidos que forma parte de ella (5,6).

2.A Satisfacción de requerimientos de Proteínas y aminoácidos con Dietas comunes

El aminoácido esencial presente en concentración más baja en relación a los requerimientos se denomina aminoácido limitante. La limitación en la calidad protéica de una dieta mixta para humanos usualmente se debe sólo a unos cuantos aminoácidos: la lisina, los aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), la treonina y el triptófano.

Las consecuencias de la privación continua, incluso de sólo uno de los aminoácidos esenciales, puede ser terrible y hasta fatal. El aporte alimentario de aminoácidos esenciales es necesario para satisfacer los requerimientos de nutrientes.

En cuanto a su composición química, las proteínas que contienen cantidades suficientes de todos los aminoácidos esenciales son mejores que aquellas que son deficientes en uno o más de ellos, es decir que contienen uno o más aminoácidos limitantes.

Las proteínas de origen animal tienen generalmente concentraciones relativamente altas de aminoácidos esenciales. La calidad de las proteínas de la mayor parte de los vegetales, en cambio, está limitada por uno o más aminoácidos. Tal es el caso del trigo y el maíz, que contienen cantidades bajas de lisina. La soya y las variedades genéticamente mejoradas de maíz, sorgo y cebada, con alto contenido en lisina, constituyen excepciones notorias (7,8).

2. B Calidad Proteínica de Alimentos

2.B.1 Composición total de aminoácidos

La combinación de dos o más proteínas con distintas proporciones de aminoácidos esenciales, puede resultar en una mejoría de la calidad proteínica. Así la combinación de una proteína que está limitada respecto a un aminoácido específico con otra proteína que tenga cantidades relativamente altas de ese aminoácido, resulta en una complementación recíproca al patrón ideal de aminoácidos. Este principio ha sido la base para la formulación de mezclas

vegetales con alto valor proteínico. El concepto de complementación aminoacídica también permite calcular la proporción óptima en que se deben combinar diversos alimentos para preparar dietas de calidad proteínica más alta, así como comprender por qué el agregado de cantidades relativamente pequeñas de proteínas de origen animal, puede mejorar considerablemente la calidad proteínica de dietas predominantemente vegetales.

La calidad también es susceptible de mejorar fortificando los alimentos con el agregado de aminoácidos puros, como sucede con la harina de trigo fortificado con lisina.

Otra forma de mejorar esa calidad es mediante modificaciones genéticas que resulten en proteínas vegetales con mejor contenido en aminoácidos esenciales. El Centro Internacional para el mejoramiento de Maíz y Trigo, con base en México, ha logrado un avance importante en este sentido al desarrollar una variedad de maíz con mayor cantidad de lisina y triptófano (9,10).

2.B.2 Calidad protéica y valor nutricional de una proteína

La digestibilidad y composición química de una proteína permite predecir su valor nutricional en relación a una proteína de referencia. Esta última usualmente es la proteína de la leche, huevo o carne. Por ejemplo, si una proteína tiene digestibilidad de 90 por ciento comparada con la leche, y su composición de aminoácidos indica que sólo tiene 80 por ciento de lisina en relación al patrón de aminoácidos, la calidad de dicha proteína es $(0.90 \times 0.80) \times 100 = 72$ por ciento, comparada con la proteína de leche. Pero la *calidad nutricional de una proteína*,

aún cuando es el factor principal, no refleja necesariamente la *calidad proteínica de la dieta*. Esta última puede ser influenciada por otros componentes de la dieta, la combinación de las proteínas que contiene, la forma de almacenar los alimentos, su procesamiento y la preparación de las comidas.

La incorporación de una proteína de calidad nutricional excede a una dieta en que los demás ingredientes tienen muy pocas proteínas, puede resultar en una dieta con concentración proteínica tan baja que requiera la ingestión de volúmenes muy grandes para satisfacer los requerimientos del organismo. A pesar de la composición química y digestibilidad de su proteína, esta dieta tendría una calidad proteínica pobre.

La concentración pobre de una dieta puede mejorar cuando se le agregan alimentos con un alto contenido de proteínas, como huevos y carne, o concentrados proteínicos y productos deshidratados, como leche en polvo, harinas integrales de leguminosas y proteínas aislada de soya. Los procesos culinarios que producen evaporación de agua también resultan en alimentos más concentrados (11).

2.C ASPECTOS NUTRICIONALES

2.C.1 Requerimientos de aminoácidos en la dieta

Un comité de expertos convocados por los organismos de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la salud (OMS), y la Universidad de las Naciones Unidas (UNU), propuso los requerimientos que se muestran en las primeras cuatro columnas de la tabla No. 4, basados en información experimental recabada entre el 1955 y 1981 por un número reducido de investigadores, que incluía a científicos del INCAP.(14)

TABLA No. 4

REQUERIMIENTOS DE AMINOACIDOS ESENCIALES ESTIMADOS PARA
DIVERSOS GRUPOS ETARIOS (MG/KG/DIA)

	Lactantes (3-4 meses)	Preescolares (2-5 años)	Escolares (10-12 años)	Adultos	Adultos
Fenilalanina+					
tirosina	125	69	22	14	39
Histidina	28	?	?	(8-12)?	--
Isoleucina	70	31	28	10	23
Leucina	161	73	44	14	40
Lisina	103	64	44	12	30-42
Metionina+cistina					
Treonina	58	27	22	13	13-16
Triptófano	87	37	28	7	15-21
Valina	17	12.5	3.3	3.5	6
	93	38	25	10	20-24
Total (sin histidina)	714	352	216	84	186-211

Primeras cuatro columnas: Valores sugeridos por FAO/OMS/UNU

Ultima columna: Valores sugeridos por Young et. al.1986

De esos valores y de los "niveles seguros" de ingestión proteínica para los diversos grupos etarios, se propuso los patrones (o composiciones proporcionales) adecuados de aminoácidos esenciales que, como mínimo, deberían tener las proteínas de una dieta. La expresión de esos patrones como mg de cada aminoácido esencial por gramo de proteína, implica que al ingerir proteínas en cantidad suficiente para satisfacer las necesidades del nitrógeno alimentario, también se llenarían las necesidades de aminoácidos esenciales.

Los patrones propuestos por FAO/OMS/UNU sugieren que a medida que la edad progresa, las necesidades de aminoácidos esenciales disminuyen en relación a las necesidades totales de proteínas : 43, 32, 22 y 11 por ciento de las proteínas para lactantes, preescolares, escolares y adultos, respectivamente. Además, como

los requerimientos de aminoácidos esenciales aparentemente son tan bajos en los adultos, se sugirió que la composición química de las proteínas en casi todas las dietas no tenía mayor importancia para evaluar la calidad proteínica para adultos. Sin embargo, no hay una explicación metabólica satisfactoria para esa aparente reducción en las necesidades de aminoácidos esenciales con la edad. Además un análisis crítico de las investigaciones hechas entre 1955 y 1981 e investigaciones más recientes usando aminoácidos marcados con isótopos estables han puesto en duda las recomendaciones y patrones sugeridos por FAO/OMS/UNU, particularmente para escolares y adultos (12,13).

Young, Bier y Pellett (1995), re-evaluaron los requerimientos de aminoácidos esenciales para adultos con base en un análisis factorial de pérdidas obligatorias de Nitrógeno, investigaciones sobre recambio de proteínas y estudios cinéticos con aminoácidos marcados isotópicamente. Sus estimaciones expresadas por Kg de peso corporal, son mayores que las sugeridas por FAO/ OMS/UNU. Ellos calcularon esos requerimientos en relación a las necesidades promedio de proteínas y propusieron un patrón de aminoácidos para adultos (ver tabla 5) muy similar al de los preescolares. Debe considerarse, sin embargo, que FAO/OMS/UNU usaron el nivel "seguro" de ingestión de proteínas para calcular los patrones de aminoácidos, mientras que Young y colaboradores usaron el promedio de los requerimientos. En todo caso, esos estudios apoyan y refuerzan el argumento de que, excepto para niños menores de un año de edad, la evaluación de la calidad de las proteínas se debe hacer en función de su digestibilidad y del

patrón de aminoácidos esenciales para niños preescolares, el cual está basado en las investigaciones del INCAP (Ver tabla 5) (7,14).

TABLA No. 5

INGESTA DIARIA DE PROTEINAS RECOMENDADA, CON UN MARGEN DE SEGURIDAD PARA CUBRIR LAS NECESIDADES DE CASI TODA LA POBLACION

Edad	Ingesta Recomendada (g/kg/día)	
3-6 meses	1.85 (2.55)	
6-9 meses	1.65 (2.30)	
9-12 meses	1.50 (2.10)	
1-2 meses	1.20 (1.65)	
2-3 meses	1.15 (1.60)	
3-5 meses	1.10 (1.55)	
5-12 meses	1.0 (1.40)	
	Hombres	Mujeres
12-14 años	1.0 (1.40)	0.95 (1.30)
14-16 años	0.95 (1.30)	0.90 (1.25)
16-18 años	0.90 (1.25)	0.80 (1.10)
18 y más	0.75 (1.05)	0.75 (1.05)
Necesidades diarias adicionales para mujeres durante:		
• embarazo	6 (8) g/día	
• lactancia (primeros 6 meses)	17 (24) g/día	
• Lactancia (después de 6 meses)	12 (17) g/día	

Fuente: FAO/OMS/UNU: Ginebra 1985

2.C.2 Concentración proteínica de la dieta

A continuación se muestran tablas de los contenidos de aminoácidos de diferentes alimentos consumidos diariamente por la población guatemalteca, así como las diferencias de los mismos durante su cocción.

Tabla No. 6

VARIACIONES DE LOS AMINOACIDOS DURANTE LA COCCION DEL MAIZ

(g/16gN)

alimentos	MAIZ	TORTILLA	MASA
aminoácidos			
Acido aspártico	6.2	6.2	6.9
Acido glutámico	20.3	19.0	19.5
Alanina	8.8	8.8	8.1
Arginina	5.1	4.2	4.6
Cisteína	-	-	1.7
Cistina	1.0	0.9	-
Fenilalanina	3.7	3.8	5.2
Glicina	4.8	4.8	4.3
Histidina	2.7	2.4	2.8
Isoleucina	4.2	4.5	3.8
Leucina	12.2	9.6	13.4
Lisina	3.0	2.9	2.7
Metionina	1.9	1.9	2.9
Prolina	11.0	10.1	10.7
Serina	4.5	4.2	5.0
Treonina	3.8	3.8	4.6
Tirosina	3.0	3.0	3.8
Triptófano	0.5	0.5	-
Valina	4.5	4.8	5.3

Fuente: Bressani y Scrimshaw, 1958; Sanderson et. Al. 19

Tabla No. 7

CONTENIDO DE AMINOACIDOS EN LOS CEREALES DE GRANO ENTERO Y TUBERCULOS (g/16gN)

alimento aminoácido	Arroz	Trigo	Sorgo	Centeno	Avena	Papa	Yuca
Lisina	3.8	2.3	2.7	3.7	4.0	6.3	6.3
Treonina	3.9	3.9	2.8	3.7	4.8	4.1	3.4
Metionina	3.6	2.8	3.3	3.3	3.6	3.6	2.6
Triptófano	1.1	1.1	1.0	1.0	0.9	1.7	1.0

Fuente: Eggnum, 1969, 1977, 1979; FNRI, 1980 (OMS) 1985

Tabla No. 8

CONTENIDO DE AMINOACIDOS ESENCIALES EN SOYA, CALABAZA Y MORRO EXPRESADOS EN MILIGRAMOS POR 100 GRAMOS DE ALIMENTO

alimento aminoácido	grano de soya	torta de semilla de calabaza	harina de semilla de morro
Fenilalanina	2055	649	-
Histidina	1051	379	1091
Isoleucina	1889	411	2017
Leucina	3232	859	2540
Lisina	2653	565	1000
Metionina	552	211	5976
Prolina	-	-	-
Serina	-	-	-
Tirosina	1303	-	-
Treonina	1603	326	1120
Triptófano	532	166	1098
Valina	1995	652	2487
Cisteína		40	

Fuente: Kolar. Et al. 1985.

2.C.3 Factores que influyen en la biodisponibilidad de las proteínas

La digestibilidad de las proteínas de una dieta puede determinarse experimentalmente usando técnicas de balance metabólico, o bien, se puede calcular en base a la digestibilidad ponderada de sus componentes. La digestibilidad aproximada de una dieta en que el 40 por ciento de proteína proviene de arroz, 35 por ciento de frijol negro, 15 por ciento de trigo integral y 10 por ciento de leche y huevos sería igual a 82 por ciento.

En términos generales, las dietas latinoamericanas basadas en cereales integrales y vegetales tiene una digestibilidad "real" de 75 a 80 por ciento; las basadas en cereales refinados y proteínas animal, 85 a 95 por ciento; y las que incluyen todos esos alimentos, 85 a 90 por ciento.

Algunos ingredientes de la dieta pueden afectar la digestibilidad de las proteínas. Entre ellos, un contenido abundante de fibra, particularmente hemicelulosa y salvados de cereal, así como taninos y otros polifenoles aumentan la excreción fecal de nitrógeno alimentario.

La biodisponibilidad de algunos aminoácidos esenciales puede disminuir como consecuencia del almacenamiento de los alimentos en condiciones inadecuadas, debido a su procesamiento industrial o cuando las proteínas se someten a calentamiento intenso en presencia de azúcares o lípidos oxidados.

El organismo humano usa preferentemente grasas y carbohidratos como sustratos alimentarios para producir energía. Cuando éstos no son suficientes, las proteínas se utilizan en mayor proporción como fuente energética, y la dieta debe

aportar más proteínas para satisfacer las necesidades del organismo. En contraste, cuando la dieta aporta fuentes de energía en cantidades suficientes, las proteínas se utilizan de manera más eficiente.

El efecto de "protección" que tiene la energía alimentaria sobre las proteínas no es igual con todo tipo de sustrato energético. Así, el metabolismo proteínico es más eficiente y hay un mayor "ahorro" de proteínas cuando se ingieren más carbohidratos que cuando se ingieren más grasas. En todo caso, una deficiencia energética alimentaria exige una mayor ingestión de proteínas (15,16).

2.C.4 Relación proteínas-energía como indicador de la calidad de la dieta

La relación entre el aporte de nutrientes y el aporte de energía en una dieta ha sido usada como indicador de la calidad de esa dieta en relación al nutriente en cuestión. Esto se basa en el principio de que cuando una buena dieta se consume en cantidades que permitan satisfacer las necesidades de energía, también debería satisfacer las necesidades de nutrientes específicos. Por lo tanto, se ha sugerido usar el indicador de este aspecto de la calidad de la dieta para humanos. La relación generalmente se expresa como porcentaje y no como fracción, y tradicionalmente se identifica como PE por ciento.

El PE por ciento simplemente indica un aspecto de la calidad proteínica de una dieta. Por otra parte, el PE por ciento no dice nada de la calidad nutricional de las proteínas en la dieta para humanos

Se debe recordar que los requerimientos de proteínas y energía cambian en forma desproporcionada con el estilo de vida o circunstancias biológicas y nutricionales de las personas. Por lo tanto, el PE por ciento recomendable varía de acuerdo a esas circunstancias, y debe aplicarse en función de las características específicas del grupo de población (17,18).

2.D Características de las dietas en Latinoamérica

Las dietas latinoamericanas en los estratos socioeconómicos alto y medio tiene una composición proteínica similar a la de las poblaciones de Estados Unidos o Europa Occidental, con más de 50 por ciento de las proteínas alimentarias de origen animal. Las personas de clases socioeconómicas más bajas subsisten a base de dietas con un fuerte predominio de proteínas vegetales, especialmente en las áreas rurales. En algunos países existen programas de ayuda alimentaria que incluyen distribución de leche de vaca, pero ésta generalmente es para uso de niños y mujeres embarazadas. En las regiones donde hay una producción abundante y barata de productos cárnicos y lácteos, las poblaciones tienen más acceso a ellos. En general, la mayoría de personas en las clases pobre y medio-baja de América Latina dependen de alimentos vegetales como la fuente de 70-80 por ciento de su proteína alimentaria, y hay muchos que ingieren menos de 15 por ciento de proteínas de origen animal (Ver tabla No. 9) (19).

TABLA No.9

PROPORCION DE PROTEINAS DE ORIGEN ANIMAL COMO PORCENTAJE DE
LAS PROTEINAS TOTALES EN DIETAS DE PAISES LATINOAMERICANOS

Pais	Proteína animal %	Comentarios
Uruguay	65	*
Argentina	64	*
Guayana Francesa	62	*
Panamá	54	Población urbana
Panamá	52	*
Panamá	44	Población rural
Venezuela	50	*
Honduras	50	Población urbana
Honduras	33	Población rural
Honduras	28	*
Cuba	49	*
Ecuador	49	*
Nicaragua	49	Población urbana
Nicaragua	37	Población rural
Belice	48	*
Surinam	45	*
Costa Rica	44	Población urbana
Costa Rica	36	Población general
Costa Rica	32	Población rural
Colombia	42	*
El Salvador	41	Población urbana
El Salvador	22	Población rural
Guyana	39	*
Paraguay	39	*
Santo Domingo	38	*
Chile	25	*
Chile	38	Adultos urbanos pobres
Guatemala	23	Población urbana
Guatemala	15-25	*
Guatemala	18	Adultos rurales
Guatemala	37	Preescolares rurales
Perú	37	*
Brasil	30	*
Brasil	32	Hombres rurales
México	32	*
Bolivia	15	*
Haiti		*

* Todos los grupos socioeconómicos y áreas geográficas dentro de un país 1981-1983
Fuente: FAO/OMS/UNU: Roma 1986

Algunos alimentos de las dietas tradicionales en América Latina contienen proteínas de alto valor biológico, pero la calidad de la mayoría de proteínas de cereales está limitada por su contenido de lisina y triptófano o treonina, y la de las leguminosas, por su contenido de aminoácidos azufrados y triptófano. La proporción en que esos alimentos figuran en la mayoría de dietas no es la que resultaría en una complementación óptima de aminoácidos. Además, la baja disponibilidad y concentración proteínica y lo voluminoso de la mayoría de los alimentos vegetales, obligan a ingerir cantidades relativamente grandes de la dieta para satisfacer los requerimientos de nitrógeno total y aminoácidos esenciales. Aunque los adultos y niños mayores si pueden hacerlo, la capacidad gástrica de los infantes y preescolares, y el bajo apetito de los ancianos, impiden o dificultan la satisfacción de esos requerimientos con tales dietas.

En resumen, en la mayoría de las áreas rurales y en los estratos socioeconómicos pobres de las ciudades latinoamericanas, las dietas de consumo habitual no tienen una calidad proteínica muy buena. No obstante, esa calidad puede mejorar con modificaciones en las proporciones de alimentos vegetales y con el agregado de alimentos de origen animal (20).

3 METODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS EN ALIMENTOS

En bioquímica se emplean métodos de laboratorio diferentes para la identificación y cuantificación de proteínas. Entre las metodologías que más se han utilizado para este propósito están: La determinación de nitrógeno, cuantificandose la presencia de proteínas relacionando el % de nitrógeno proteico presentes en las mismas. Se cuentan con métodos físicos, los cuales se basan fundamentalmente en espectroscopía y turbidimetría y por último existen métodos para la separar e identificar las proteínas como son: cromatografía en papel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de capa fina y electroforesis (21).

3.A Proteínas

- **Método de Kjeldahl**

Se caracteriza por el uso de ebullición con ácido sulfúrico concentrado que causa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco. El amonio es retenido como bisulfato y puede ser determinado *in situ* o por destilación alcalina y titulación. Se utilizan los siguientes catalizadores: Oxido de mercurio, selenio o mezcla de sulfato de cobre y selenio, mezcla de sulfato de cobre y dióxido de titanio.

- **Método de Dumas**

Se caracteriza por pirólisis completa de la muestra y medición del contenido de nitrógeno de los gases de combustión. El nitrógeno puede ser medido con un

manómetro después de la absorción del dióxido de carbono en una solución alcalina o por conductividad térmica en métodos automatizados.

3.A.1 Métodos Físicos

Son más simples, rápidos y el costo por análisis es menor, aunque el costo de los equipo es elevado. La exactitud de estos métodos se relaciona con las características del material a analizar. La concordancia con nitrógeno total depende de que el material no varíe de muestra en muestra.

Entre éstos se encuentran:

- a) Espectroscopía infrarroja: Se aprovecha la absorción del grupo amida del enlace peptídico a 6,46 Tm.
- b) Espectroscopía infrarroja reflectante: La muestra se ilumina con seis longitudes de onda cercanas a la radiación infrarroja (0,75-2,5 Tm) y se detecta la luz reflejada.
- c) Espectrofotometría ultravioleta: Mide proteínas en solución con absorción máxima a 280 nm atribuible a los anillo aromáticos de tirosina , triptófano y fenilalanina en el rango 180-220 nm.
- d) Métodos refractométricos: Mide la refracción directa de la proteína en solución o el cambio de índice de refracción causado por la remoción de la proteína de la solución.
- e) Método turbidimétrico: Mide la reducción de la intensidad de la luz al pasar por una suspensión de partículas de proteínas. Este cambio se relaciona con el contenido de proteína.

- f) Espectroscopía electrónica: Se irradia el material con rayos X y se cuantifica los fotoelectrones liberados, característicos del átomo de N en el grupo amida de la proteína.
- g) Polarografía: Determina trazas de proteína.

3.A.2 Métodos Químicos

Las proteínas presentan un amplio rango de comportamiento químico a los distintos grupos funcionales de los aminoácidos y a los enlaces peptídicos. Entre ellos están:

- a) Método de Biuret: La reacción se caracteriza por una coloración púrpura cuando los iones cúpricos son complejados por los enlaces peptídicos a pH alcalino. El matiz del color depende del tipo de proteína y su intensidad depende del contenido de proteína presente.
- b) Método "dye-binding": se caracteriza por la formación de un coágulo de proteína coloreado e insoluble producto de la reacción de la proteína con una solución coloreada de ácido sulfónico a pH 2. El anión coloreado se une por asociaciones electrostáticas a los sitios básicos de la proteína, por ejemplo a los grupos amino de lisina, guanidina de arginina, imidazol de histidina y aminos terminales. Además se producen atracciones intermoleculares por interacciones hidrofóbicas entre la proteína y la mitad no iónica del anión y entre el anión unido a proteína y la mitad no iónica del anión en solución. El coágulo se separa por filtración y el exceso de colorante en el sobrenadante se mide colorimétricamente.

- c) Métodos de destilación alcalina: La hidrólisis de las amidas en medio alcalino fuerte da origen a amoníaco el cual es destilado y su valor es relacionado con el contenido de proteína. Se ha encontrado que el rendimiento de amonio es altamente reproducible para una proteína dada.
- d) Método de Lowry: Cuando se agrega reactivo de Folin (Acido fosfomolibdico-fosfotúngstico) a una proteína, ésta se reduce a un complejo azul de molibdeno por la oxidación de los aminoácidos tirosina, triptófano, cistina, cisteína e histidina.
- e) Métodos de titulación con formol: A la muestra neutraliza con álcali se le agrega formaldehído en exceso el cual reacciona con cada grupo básico de lisina y arginina. El exceso de formaldehído se neutraliza a su vez con un exceso de álcali estándar el cual se titula, el valor se relaciona con el contenido de proteína.

3.A.3 Métodos radioquímicos

- a) Activación neutrónica: Se irradia una cantidad pesada de muestra con neutrones lo que produce el paso de ^{14}N a ^{13}N . Este positrón tiene una vida media de 10 minutos y emite radiaciones gamma la que se registran en un contador de centello. Las cuentas se relacionan con el contenido de nitrógeno de la muestra.
- b) Activación protónica: Similar al anterior con la variante de que la muestra se irradia con protones y se efectúa la conversión de ^{14}N a ^{14}O , un isótopo que decae

con la emisión de un protón y de radiaciones gamma, las que son registradas con el contenido de nitrógeno de la muestra (22,23,24).

3.B METODOS DE DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Los aminoácidos constituyen la estructura primaria de la proteína y le confiere el valor nutricional a los alimentos. Para el análisis de los aminoácidos es necesario romper los enlaces peptídicos de las proteínas por medio de hidrólisis que puede ser ácida, alcalina o enzimática. La hidrólisis ácida se realiza con ácido clorhídrico de concentración 6N. El reactivo debe ser puro y no debe dejar residuos por lo que se recomienda una hidrólisis en fase gaseosa. Para que la hidrólisis de las proteínas se a completa es necesario tener en cuenta factores como la razón ácido/proteínas, la temperatura y el tiempo de hidrólisis y evitar la presencia de oxígeno en el medio aplicando vacío y nitrógeno para minimizar la oxidación de los aminoácidos.

Para el análisis de los aminoácidos es necesario romper los enlaces peptídicos de las proteínas por medio de hidrólisis que puede ser ácida con HCl, H₂SO₄ y HClO o básica con NaOH. La más común es la hidrólisis ácida utilizando HCl con concentración de 6 N a 110 °C durante 24 horas, debido a que se realizaron diferentes estudios y se logró determinar que a esa concentración, tiempo y temperatura, se realizaba una hidrólisis adecuada y no había pérdida de aminoácidos en las muestras a analizar (22).

3.B.1 Cromatografía en Papel:

Uno de los primeros recursos durante el desarrollo de técnicas cromatográficas fue el uso de una hoja de papel filtro (celulosa) como base estacionaria inerte para sostener un líquido, esta técnica se denomina *cromatografía en papel*. El papel se humedece por absorción de vapor de agua; así, la fase estacionaria es un líquido polar sostenido en papel. Luego se permite que otro disolvente (sustancia más apolar) migre hacia arriba o hacia abajo en el papel por acción capilar. Cuando este disolvente llega al punto del papel en el cual se puso una porción de la muestra (origen), cada sustancia de ésta se disuelve en distinta medida entre la fase apolar migratoria y la fase polar estacionaria. Este fraccionamiento basado en la solubilidad prosigue mientras el disolvente siga moviéndose a lo largo del papel. Las sustancias más solubles en agua se mueven con mayor lentitud que las más solubles en la fase orgánica móvil. Entre los solventes utilizados están: Isobutanol, isopropanol, y los reveladores: alanina, difenilalanina.

3.B.2 Cromatografía de Intercambio iónico.

Después de hidrolizar las proteínas a aminoácidos (usualmente en HCl concentrado), éstos pueden separarse por medio de cromatografía de intercambio iónico. Para eluir a los aminoácidos de la columna de cromatografía se utilizan tres reguladores de pH sucesivamente más alto. El orden de elución depende de la carga del aminoácido. Los básicos (lisina, histidina y arginina) se unen con más fuerza a la resina de intercambio iónico cargada negativamente. Por medio de esta

técnica es posible determinar qué aminoácidos se encuentran en el hidrolizado de una proteína. También puede determinarse la abundancia relativa, midiendo la concentración de cada aminoácido. La ninhidrina reacciona con los aminoácidos formando un derivado de color púrpura. Midiendo la absorbancia de la solución púrpura a 570 nm, se puede determinar la concentración relativa de cada aminoácido.

3.B.3 Cromatografía en Capa Fina

El uso de una fase estacionaria sólida dispuesta en forma de una capa delgada sobre la superficie de una base firme (vidrio o plástico) constituye el método llamado cromatografía en capa fina. La fase sólida puede funcionar como adsorbente (por lo común gel de sílice), como intercambio iónico. El procedimiento es similar al de la cromatografía en papel. Esta técnica tiene gran aceptación porque combina las características siguientes: la resolución del soluto y la posibilidad de reproducir los resultados se consideran de buenas a excelentes; según el caso todas las separaciones se efectúan con rapidez (0.5 a 3 horas); puede usarse para el análisis de casi todo tipo de sustancias; permite detectar cantidades muy pequeñas de solutos (del orden de microgramos) y se trata de un procedimiento económico y de fácil ejecución. Se utilizan solventes como: acetato de etilo, isopropanol, piridina y reveladores : ninhidrina.

3.B.4 Electroforesis.

Consiste en mover partículas cargadas (iones) dentro de un campo eléctrico. El desplazamiento ocurre en un medio líquido sostenido por una sustancia sólida inerte, por ejemplo un papel o un gel. El líquido -una solución salina amortiguadora

con pH y fuerza iónica conocidos- sirve como medio conductor de electricidad en el momento que se aplica un voltaje externo. El grado de movimiento de cada sustancia cargada (molécula) dentro del campo eléctrico se denomina *movilidad electroforética* . Esta puede ser en dos tipos: en papel y en gel.

En la *electroforesis en papel*, una tira u hoja de papel filtro humedecido de manera uniforme con una solución amortiguadora se suspende entre dos compartimientos electródicos que también contienen amortiguador. Las muestras se aplican sobre el papel en un punto de origen determinado, el cual puede estar cerca de uno de los extremos o justo en medio.

En la electroforesis en gel, se emplea como base un gel semisólido, ofrece resultados muy superior cuando tienen sustancias de alto peso molecular (proteínas, ADN, ARN) . Los geles de agarosa y de poliacrilamida son los más ampliamente utilizados. La porosidad de la matriz de gel implica que la migración electroforética reflejara de una manera muy exacta las diferencias dimensionales de los iones en movimiento. Otro factor que influye sobre la migración es la forma molecular. Una ventaja del método es que los geles pueden solidificarse en forma de barras o como placas delgadas, son lo bastante firmes para manipularlos; son transparentes y eso facilita la observación de los materiales coloreados (25).

3.B.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

El concepto fundamental de la cromatografía es muy simple. Los materiales son separados por una columna empacada con un soporte cromatográfico llamado fase estacionaria. La fase móvil (eluyente) pasa a través de la columna y los materiales disueltos en ella pueden interactuar con la fase estacionaria.

Esta interacción o la falta de ésta provee las bases para la separación. Si no hay interacción los compuestos se moverán a la misma velocidad de la fase móvil y emergerán de la columna después que una cantidad considerable de disolvente ha pasado a través de ella.

Algunos materiales serán atrapados totalmente por la fase estacionaria por las condiciones iniciales para eluirlos requiere un cambio en la composición de la fase móvil. Esto puede hacerse con incrementos bruscos, (elución por pasos) o más gradualmente (gradiente de elución).

Esta técnica da magníficos resultados (excelente resolución) en poco tiempo. El método es aplicable a la separación y el análisis de casi todo tipo de sustancias.

Las razones de popularidad de ésta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos

materiales incluyen los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, antibióticos y una cierta variedad de sustancias inorgánicas.

Para poder determinar los aminoácidos en la cromatografía líquida de alta resolución, es necesario recurrir a técnicas que incrementen la absorción de luz ultravioleta o fluorescencia para poder ser detectados por los diferentes tipos de detectores utilizados. Estos procedimientos son conocidos como derivatizaciones y se pueden realizar antes de la separación cromatográfica (pre-columna), o bien después de la misma (post-columna) (26).

Derivatización pre-columna

Los derivados formados deben poderse separar con facilidad y ser altamente fluorescentes

Cuatro reactivos son usados con tal fin pero algunos de ellos ocasionan algunos problemas.

Los reactivos empleados son:

1. Fenilisotiocianato (PTH)

El fenilisotiocianato forma derivados feniltiocianatos (PTH) de los aminoácidos libres en una forma similar a los derivados de cadenas polipeptídicas en la llamada degradación de Edman (ver anexo No.1).

La separación de los derivados PTH es muy eficiente y ha sido bien desarrollada. También la sensibilidad es bastante aceptable. El problema con el uso del fenilisotiocianato para la separación de aminoácidos por derivatización pre-columna, es que las condiciones para convertir los aminoácidos protéicos en sus derivados PTH no son simples y la conversión no es del 100 por ciento. Esta dificultad radica en que los derivados PTH una vez formados son muy inestables. La separación debe hacerse tan pronto como sea posible después de la formación del derivado PTH. Esto introduce un elemento adicional de complejidad en el equipo necesario, si se pretende automatizar el análisis.

2. Cloruro de sulfonil dimetil-amino naftaleno (cloruro de Dansilo).

La reacción de Cloruro de Dansilo con el grupo amino de los aminoácidos protéicos produce dansil-aminoácidos. La separación de los derivados dansilados de los 20 aminoácidos protéicos se realiza en una sola corrida o en columna de fase reversa, pero algunas de las separaciones no son completas. Se necesitan por lo general tres diferentes tipos de gradientes para su perfecta elución. La sensibilidad de detección, en este caso por fluorescencia, es excelente. En éste método también existe un ligero problema con la reacción de derivatización, las condiciones son simples pero para obtener una conversión cuantitativa debe utilizarse excesos grandes de cloruro de dansilo. El exceso de reactivo es hidrolizado para dar ácido dansilsulfónico que se encuentra en exceso en comparación con los derivados dansilo-amino. Esto a menudo causa problema en la detección ya que el ácido dansilsulfónico es fluorescente.

3. O-ftaldialdehído (OPA)

El O-ftaldialdehído (OPA) también reacciona con el grupo amino de los aminoácidos protéicos, que en presencia de determinados tioles forma un aducto isoindólico.

La reacción resulta efectiva en la presencia del 2-mercaptoetanol. Se consigue una separación adecuada y la detección es por fluorescencia. La sensibilidad es buena. En algunos casos el reactivo da problemas con la formación de los derivados de la cisteína lo que determina poca sensibilidad hacia este aminoácido y con la prolina, que no reacciona bajo condiciones normales. Si estos aminoácidos no están presentes, el método OPA es la mejor técnica de derivatización pre-columna.

4. 9-Fluoronilmetil oxicarbonilo (FMOC)

El FMOC ha sido usado como reactivo bloqueador en la síntesis de péptidos durante años, recientemente ha demostrado muchas desventajas como los otros reactivos derivatizantes. El FMOC reacciona con el grupo amino de aminoácidos en solución alcalina pero es diferente al OPA, éste reacciona bien con las aminas secundarias, lo que significa que la prolina puede ser cuantificada. Los 20 derivados de los aminoácidos puede ser analizados con una simple corrida en una columna de fase reversa en menos de 30 minutos. La resolución es alta como con los derivados PTH y significativamente mejor que con los de aminodansilo, pero el exceso de reactivo debe ser eliminado con un paso adicional posterior a la

derivatización. Por lo tanto, la reproducibilidad no es tan buena como con el OPA. La presencia de un pico de reactivo es inevitable en el rango cromatográfico útil. Además la arginina presenta una deriva en su tiempo de retención con el envejecimiento de la columna, y la detección fluorescente de la cisteína y el triptófano es poco sensible.

Derivatización post-columna

Este procedimiento combina la separación de aminoácidos por medio de una columna cromatográfica y la introducción continua posterior del reactivo derivatizante en el flujo de eluyente. Los compuestos son mezclados, y sometidos a condiciones óptimas de reacción (temperatura, tiempo, pH), para finalmente detectar los derivados formados.

La separación puede realizarse por columna de intercambio iónico usado en HPLC. Los tiempos de separación pueden reducirse utilizando gradientes de elución que pueden ser fácilmente controlados con los equipos programables disponibles en la actualidad. La temperatura de análisis es de 40 °C y puede ser analizado con relaciones de flujos más altas si está presente el isopropano.

1. Los reactivos empleados para la derivatización post columna: ninhidrina, OPA y fluoresceína (26).

3.B.5.1 APLICACIONES DE LAS DETERMINACIONES DE AMINOACIDOS.

En Italia 1989, Stocchi V. realizó un estudio por medio de HPLC, sobre la determinación de aminoácidos primarios y secundarios utilizando la derivatización pre-columna con (DABS-Cl), la cual es sumamente sencilla y rápida (10 minutos a 70 °C). La separación de los aminoácidos se realizó en 25 minutos utilizando una columna LC-18. El propósito del estudio fue la determinación de los aminoácidos utilizando diferentes técnicas de hidrólisis de proteínas (HCl, ácido metanosulfónica e Hidróxido de sodio). Este método se puede realizar con pequeñas cantidades de proteínas (1 a 5 microgramos). Llegándose a la conclusión que el corto tiempo del análisis, juntamente con su reproducibilidad y los niveles tan bajos de detección (sensibilidad) , hacen de este método un excelente para la identificación de aminoácidos (27).

En 1992 Nagata et al, . Determinaron D y L aminoácidos en riñón de ratón por medio de HPLC, derivatizando los aminoácidos con 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina amida. Cada uno de los aminoácidos fue separado por HPLC de fase reversa. Se obtuvo buena resolución de los picos utilizando una columna empacada con octadecilo. Este experimento se realizó para demostrar la presencia de D-enantiómeros de alanina, prolina y serina en el riñón de ratón (28,29).

Por otro lado, se realizaron diferentes estudios sobre las proteínas presentes en los cereales. La purificación estas proteínas es sumamente difícil debido a su heterogenicidad, baja solubilidad y tendencia a polimerizarse. En 1983 Bietz JA.

Realizó un estudio sobre éstas proteínas por medio de HPLC. En el cual utilizó una columna RP-18 usando acetonitrilo como modificador orgánico en presencia de ácido trifluoroacético, que dio como resultado la obtención de una excelente separación de dichas proteínas (30,31).

Por medio de la cromatografía líquida de alta resolución se han determinado aminoácidos como cisteína y metionina en fórmulas de infantes o pediátricas, las cuales son importantes en particular en el sistema redox. Las fórmulas pediátricas se dividieron en tres grupos: alimentos basados en proteínas de maíz, basados en caseína, y basados con soya (32).

Antes de las determinaciones de los aminoácidos, por medio de HPLC, las proteínas fueron oxidadas con ácido perbórmico, este tratamiento convierte a la metionina en metionina sulfónica y a la cisteína en ácido cistéico. Luego fueron hidrolizadas con HCl 6N y por último derivatizadas con (etanol:TEA:PITC).

Por otro lado se han realizado diferentes estudios sobre el aminoácido esencial triptófano.

Muchos métodos han sido desarrollados para la determinación de triptófano de proteínas puras. Uno de los métodos más utilizados es la técnica de HPLC con detector UV. Antes de la determinación de triptófano se hidrolizan las proteínas por medio de una hidrólisis básica. Los álcalis más utilizados son: LiOH, NaOH y Ba(OH)₂. Este trabajo se aplicó para fórmulas pediátricas para la determinación de triptófano por HPLC después de la derivatización con fenil tiocianato PITC (33,34).

IV. JUSTIFICACION

La determinación del patrón de aminoácidos de un alimento, es uno de los primeros pasos para estudios tendientes a conocer el valor nutritivo del mismo.

La desnutrición proteínico - calórica, la cual es causada por deficiencias alimenticias de proteínas y calorías, es un problema nutricional grave de la población guatemalteca. La promoción de la producción de alimentos ricos en proteínas de buena calidad puede contribuir a resolver este problema.

En el país como en la región centroamericana no existen instituciones que realicen análisis para determinación de aminoácidos en alimentos.

El presente trabajo servirá como base para establecer un método para la determinación de los patrones de aminoácidos en alimentos en forma rutinaria en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Con esto además de favorecer trabajos de investigación y la presentación de este servicio, se estará formando recurso humano capacitado para realizarlo así como se estará elevando el nivel académico de cursos en los cuales incluye esta metodología en sus contenidos programáticos.

V. OBJETIVOS

General

Implementar un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa con derivatización pre-columna y detección de fluorescencia para la determinación de patrones de aminoácidos en los alimentos.

Específicos

- Optimizar y evaluar la hidrólisis de alimentos como paso previo a su análisis cromatográfico.
- Optimizar la derivatización de los aminoácidos de un hidrolizado utilizando Orto - ftaldialdehído, 2-mercaptoetanol (OPA/ mercaptoetanol) como agente derivatizante.
- Optimizar y validar las condiciones cromatográficas para el análisis simultáneo de derivados fluorescentes de OPA de los aminoácidos presentes en un hidrolizado.
- Aplicar la técnica implementada y validada para el análisis de dos plantas alimenticias autóctonas de Guatemala y un alimento preparado a base de una de estas plantas.

VI. HIPOTESIS

Por ser un estudio descriptivo no es necesario aceptar o rechazar una hipótesis.

VII. MATERIALES Y METODOS

Universo de trabajo

Contenido de aminoácidos presentes en muestras de alimento.

Recursos

- *Humanos*

Br. Karen Darlene Valenzuela (Estudiante de la carrera de Química Biológica)

Dr. Rubén Velásquez (Asesor)

Personal de Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia USAC.

- *Institucionales*

LABORATORIOS

Laboratorio de Investigación del Departamento de Bioquímica . Facultad de Ciencias Química y Farmacia .

Laboratorio de Bromatología. Facultad de Veterinaria y Zootecnia USAC.

BIBLIOTECAS

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)

- *Económicos*

El equipo de laboratorio (cromatógrafo, integrador y demás equipo), parte de reactivos, cristalería y muestras a analizar fueron proporcionados por el

Departamento de Bioquímica. Otra parte de reactivos fue donado por el Laboratorio de Bromatología del la Facultad de Veterinaria.

• **Materiales**

Reactivos

- Borato de sodio 0.5 M pH 9.5 (tetraborato de sodio, HCl 1N)
- Reactivo OPA/mercaptoetanol (orto-ftaldialdehido, metanol, 2-mercaptoetanol)
- HCl 0.75 N
- Acetato de sodio 50mM
- Metanol HPLC
- Solución HCl 0.1N
- Solución NaOH 0.1N
- Solución NaAc - MeOH (74:26%)
- Agua HPLC

Equipo de Laboratorio

Sistema de HPLC Merck-Hitachi, consiste en:

- Bomba HPLC Modelo L-6200A
- Detector Merck Hitachi Modelo F-1050 Fluorescente con una lámpara HG-XE
- Integrador Merck Hitachi Modelo D-2500
- Columna: Merck Lichrocart 100 R-18 5um ID 250 x 4 mm
- Inyector Reodyne, modelo 7125 LC Organizer, con loops de 20 y 200 ul.

- Balanza analítica y semianalítica, marca MD Toledo modelo 10036 y 10146.
- Potenciómetro
- Estufa
- Agitador Vortex Lab-line Instruments Inc. Modelo 1190 serie 095-0075
- Equipo especial para filtración y desgasificación de solventes .
- Membrana de filtración Whatman (0.45 μ m) Nylon 47mm de diámetro
- Centrifugadora Clínica Modelo CI Serie 18965p-4

Cristalería

- Balones aforados de 25 y 10 ml
- Vasos de precipitación 25, 50, 100, 250 y 1000 ml de capacidad
- Probetas 10, 25, 100, 500 y 1000 ml
- Agitadores magnéticos
- Pipetas volumétricas 1, 5 y 10 ml
- Agitares magnéticos
- Micropipetas ajustables con capacidad de 500 μ l , 250 μ l, 100 μ l y 50 μ l.
- Viales de polietileno tipo Eppendorf
- Kitasato de 1 litro
- Equipo especial para Filtración y desgasificación HPLC

PROCEDIMIENTO

Para la implementación de la técnica de HPLC para la cuantificación de aminoácidos de alimentos se procedió de la siguiente manera:

1. Se estableció un método para la hidrólisis ácida de las proteínas de muestras alimenticias. Para tal fin se utilizó un protocolo utilizado en el Departamento de Alimentos de la Universidad de Valencia (35). La hidrólisis se probó con muestras que presentaron distintas matrices (harina de pescado, harina de soya, salchicha). Se evaluó la temperatura y tiempo de hidrólisis, así como la repetibilidad.
2. Con los hidrolizados obtenidos, se probó un procedimiento de derivatización, el cual ha dado resultados óptimos con patrones conteniendo mezclas de diecinueve aminoácidos proteicos (46). Se evaluó la concentración del compuesto derivatizante (OPA). Además se evaluó la repetibilidad de la derivatización.
3. Con los derivados generados con los hidrolizados, se evaluó el análisis cromatográfico. Se evaluó la presencia de picos inespecíficos, que puedan interferir con la separación o detección de los aminoácidos.
4. Para la validación del método, se analizó repetidamente muestras patrón de aminoácidos. Los resultados de estos análisis se analizarán estadísticamente para establecer los valores de los siguientes parámetros:

Linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, sensibilidad, límites de cuantificación y exactitud o porcentaje de recuperación.

Optimización de la Hidrólisis:

- Se pesa 0.0432g de la muestra , se le agrega 2.5 ml de HCl 6N, se dejan las muestras durante 24 horas a 110° C. Al finalizar este periodo se enfrían las muestras a temperatura ambiente y se filtran con papel Whatman . Se llevan a un volumen de 10 ml con agua destilada.
- Las muestras se guardan en congelación a -10 °C o en refrigeración si el hidrolizado se analiza como máximo en los dos días siguientes.

Optimización de la derivatización:

- Se pipetea 200 ul de la muestra hidrolizada y filtrada , se le agrega 200 ul de buffer de boratos. Se agita durante 10 segundos
- Luego se le agrega 50 ul de OPA/mercaptoetanol (25 mg de ortofenildialdehído, 2.2 ml de metanol , 200 ul de buffer de boratos y 25 uL de mercaptoetanol), se agita de nuevo 10 segundos y se deja reposar durante 210 segundos (3' 30" minutos).
- Se agrega 100 ul de HCl 0.75N y se agita durante 10 segundos.

- Se toma una alícuota de 50 μ l y ésta se diluye en 500 μ l de NaAc/MeOH .
- Se inyecta 20 μ L de esta mezcla (35).

Condiciones Cromatográficas.

Una vez optimizadas las condiciones con las cuales se obtuvo el derivado, se procedió a establecer las condiciones cromatográficas para la separación e identificación de los aminoácidos presentes de los alimentos.

- Parámetros del Integrador

<i>Velocidad del papel:</i>	2.5 ml/min
<i>Atenuación</i>	7
<i>Identificación del pico:</i>	Tiempo de retención
<i>Picos Traslapados:</i>	Todos
<i>Escala de tiempo:</i>	si
<i>Formato de Impresión:</i>	Número del pico, Tiempo de retención (t_R), Area y Altura
<i>Impresión del pico:</i>	Identificado
<i>Tiempo del análisis:</i>	60.00 minutos

Tabla No. 10

Gradiente de elución para realizar la separación de aminoácidos

Detección: EX 330 / EM 450

T(min)	% A	%B	%C	FLUJO (ml/min)
0	26	0	74	1.0
10	26	0	74	1.0
25	38	0	62	1.0
30	45	0	55	1.0
40	45	0	55	1.0
50	75	0	25	1.0
55	75	0	25	1.0
59	100	0	0	1.0
60	26	0	74	1.0
65	26	0	74	1.0

A: metanol; B: agua; C: acetato de sodio

Validación del Método

Inyectar muestras de los siguientes aminoácidos estándares: tirosina, triptófano, alanina, metionina, fenilalanina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, serina, asparagina, treonina, isoleucina, leucina, histidina y valina

- * Linealidad: Inyectar la mezcla de aminoácidos, nueve distintas concentraciones en un rango de 2.56×10^{-7} - 0.1 mg/ml.

- Repetibilidad: Inyectar siete veces seguidas la misma muestra en el mismo día (dicha muestra debe ser de una concentración conocida y ubicarse en medio de rango de concentraciones anteriormente dicho).
- Reproducibilidad: Inyectar la misma muestra siete veces en días diferentes.
- Sensibilidad: Determinar la concentración máxima detectable y mínima detectable realizando inyecciones de concentraciones conocidas.
- Límites de cuantificación:
 - Límite inferior: Extrapolación de datos obtenidos a partir de linealidad.
 - Límite superior: El aparato indicó la concentración over, o sea cuando sobrepase los límites de la concentración máxima detectable (36).
- Exactitud o porcentaje de recuperación:

Para esto se hidrolizaron y analizaron muestras de harina de soya enriquecidas con 0.04 g de isoleucina, 0.01g de serina, 0.01g de triptófano y 0.01g de fenilalanina. Estos resultados fueron comparados con las muestras

de harina de soya no enriquecidas. El porcentaje de recuperación se calculó de la siguiente forma:

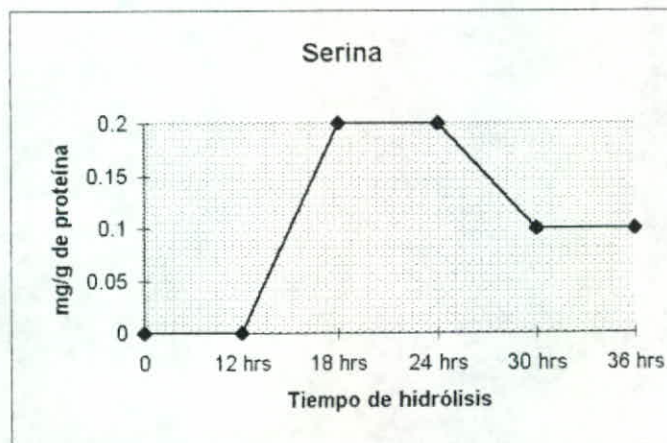
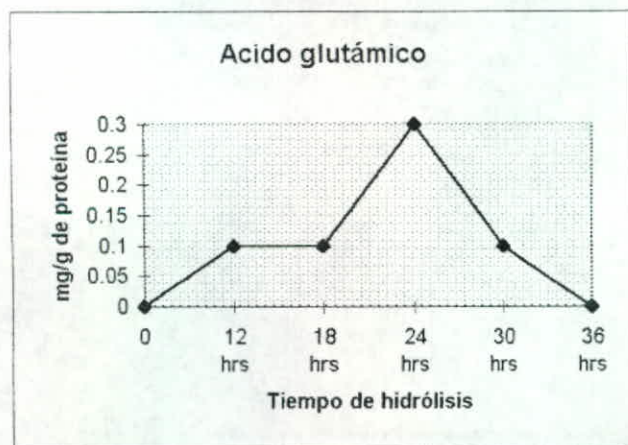
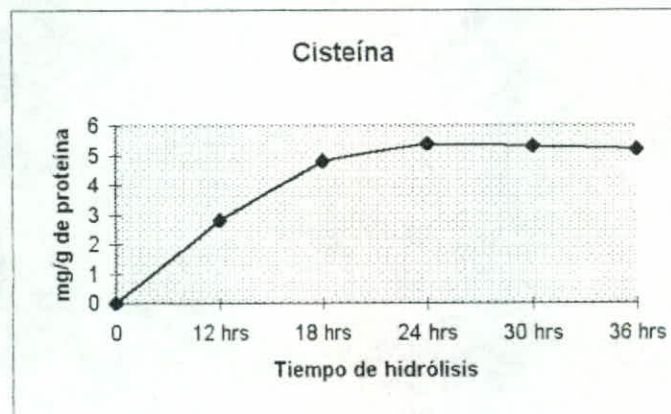
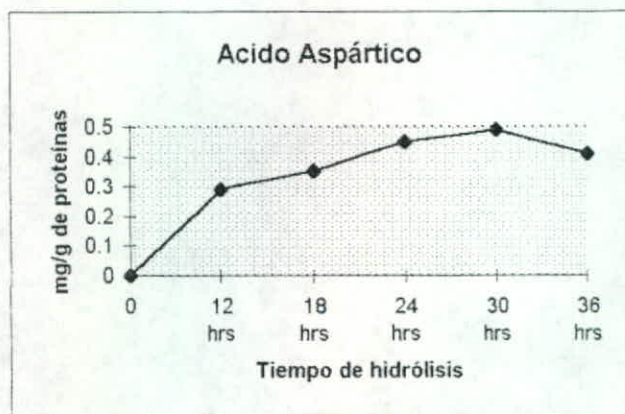
$$\% \text{ de recuperación} = \frac{m \text{ Enriquecida} - m \text{ no Enriquecida}}{\text{gramos de enriquecimiento}} \times 100$$

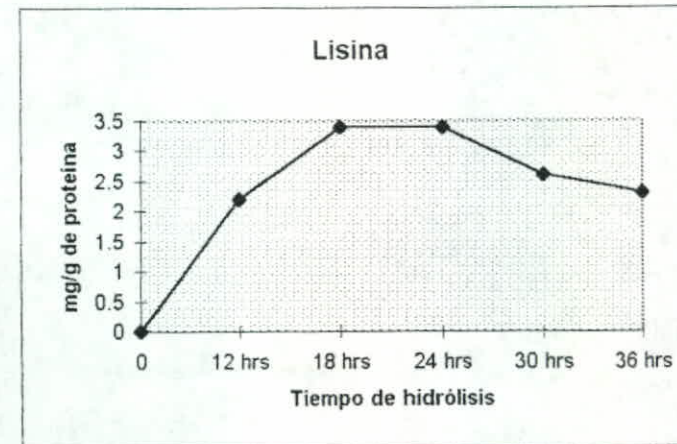
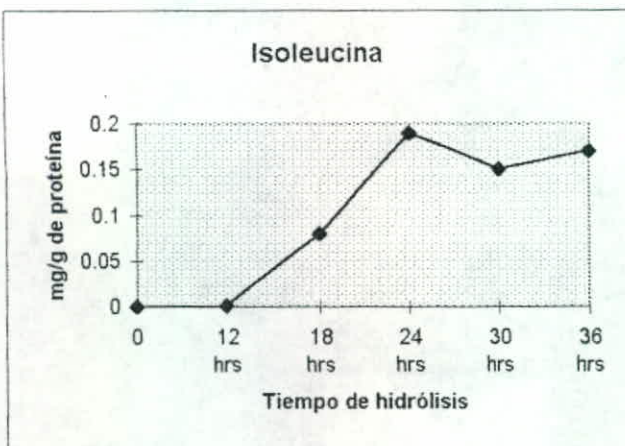
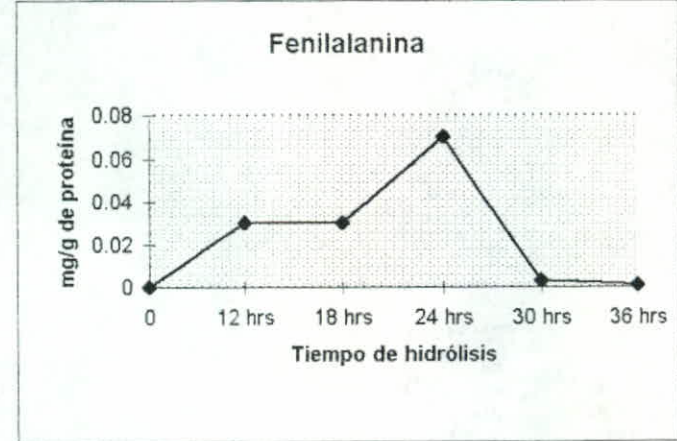
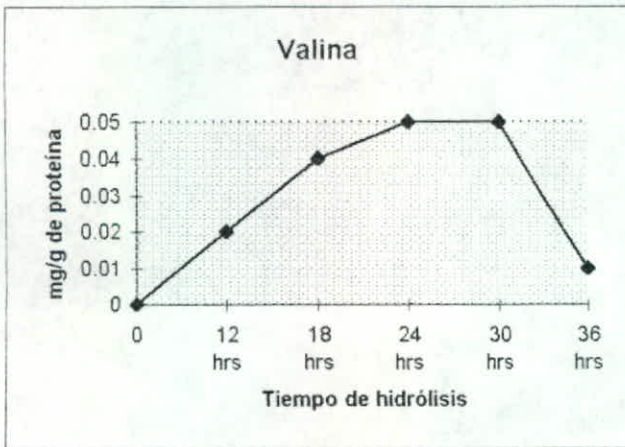
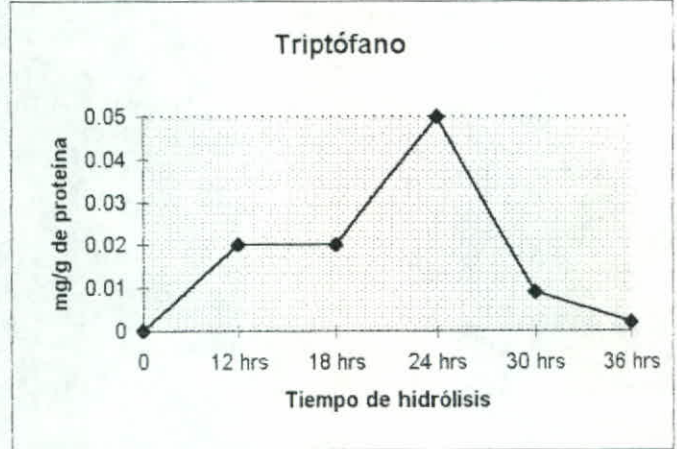
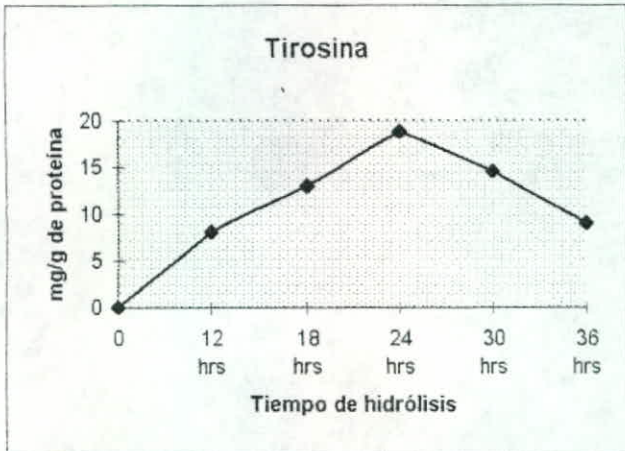
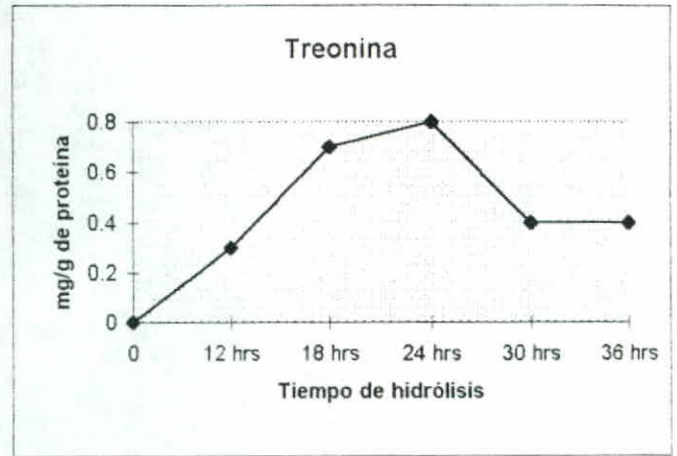
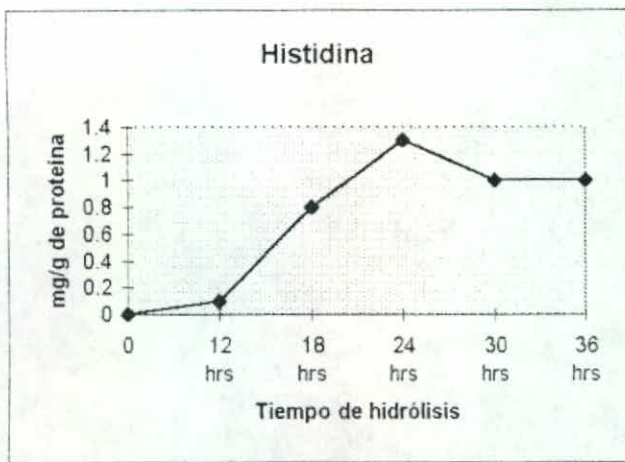
Los porcentajes de recuperación de aminoácidos enriquecidos se muestran en la tabla No. 6 de resultados.

1 HIDROLISIS

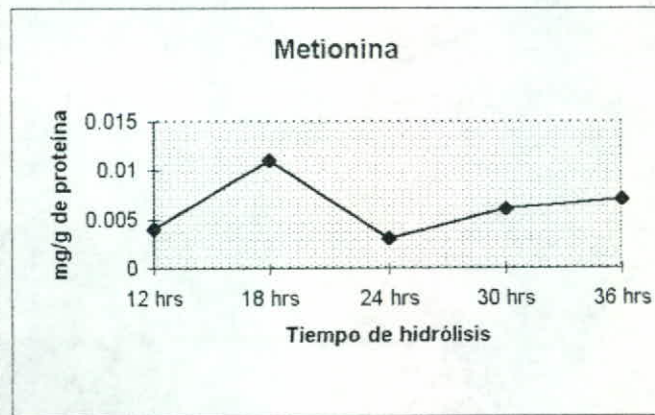
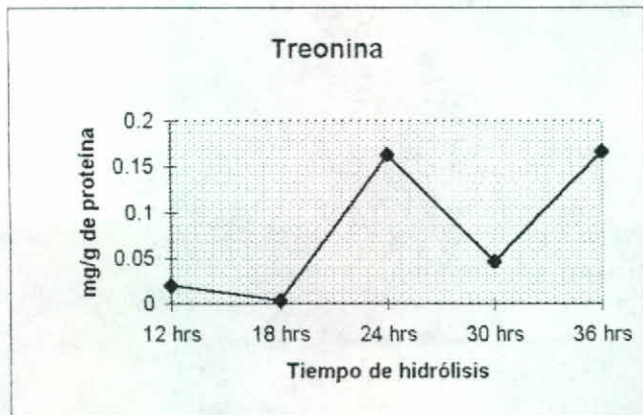
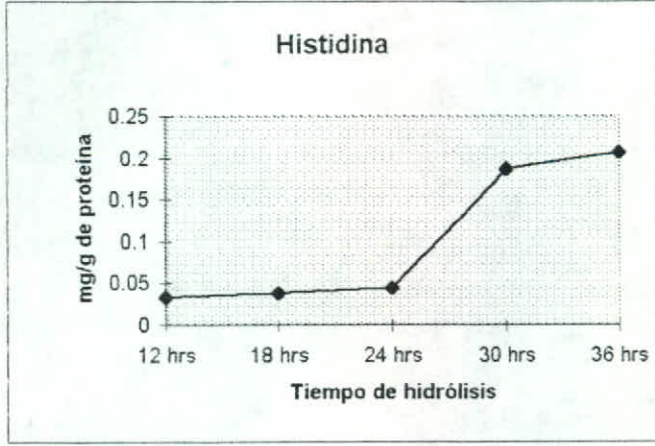
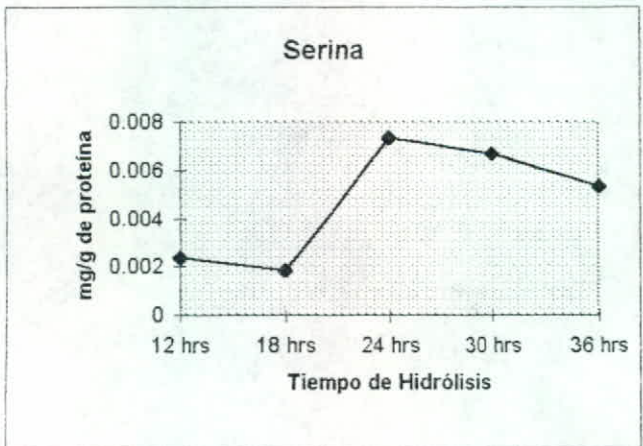
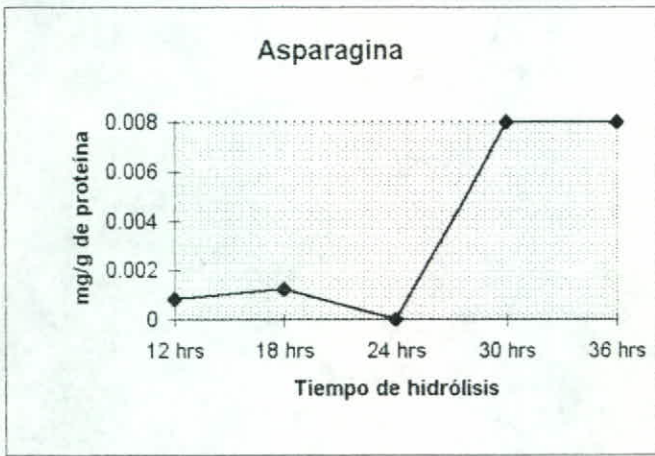
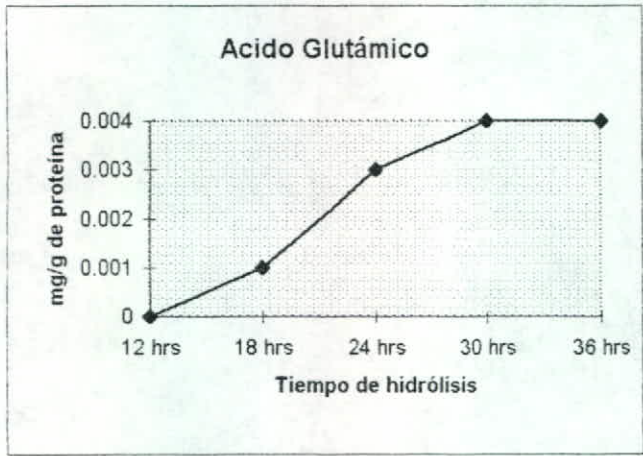
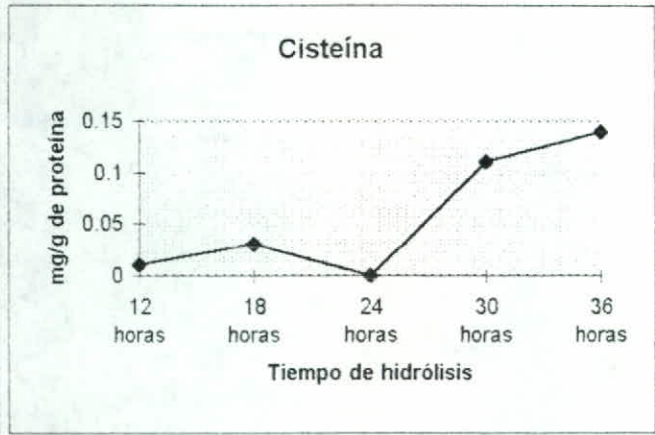
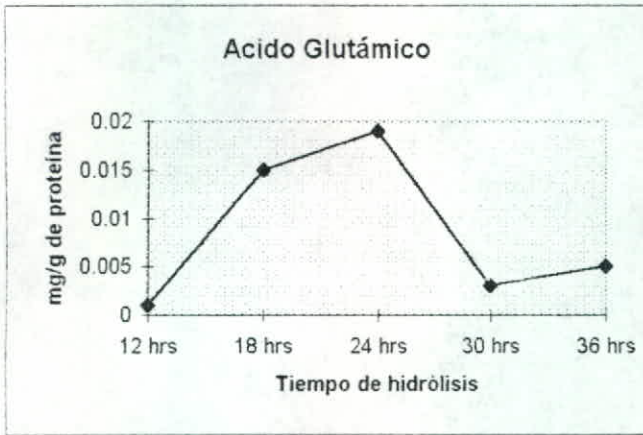
Para optimizar y evaluar la hidrólisis de los alimentos, como paso previo a su análisis cromatográfico, se estudió el efecto del tiempo sobre la hidrólisis de la harina de soya y de pescado. En las gráficas 1 y 2 se muestra la concentración de doce distintos aminoácidos, luego de hidrólisis ácida (HCl 6N a, 110°C) a distintos tiempos (12 - 36 hrs.). Para la harina de soya, el tiempo óptimo de hidrólisis fue de 24 hrs; mientras que para la harina de pescado no se tiene un patrón similar para todos los aminoácidos.

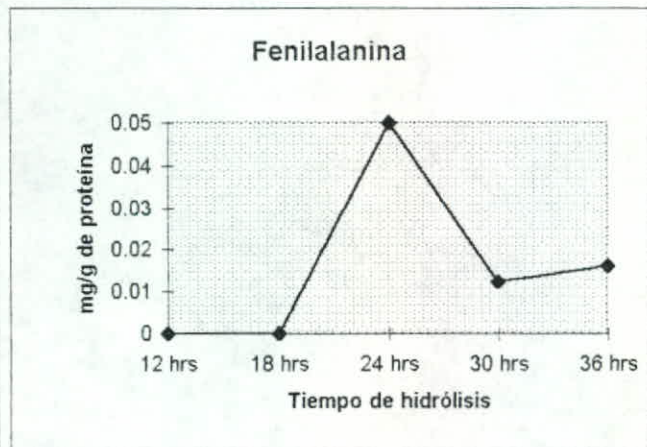
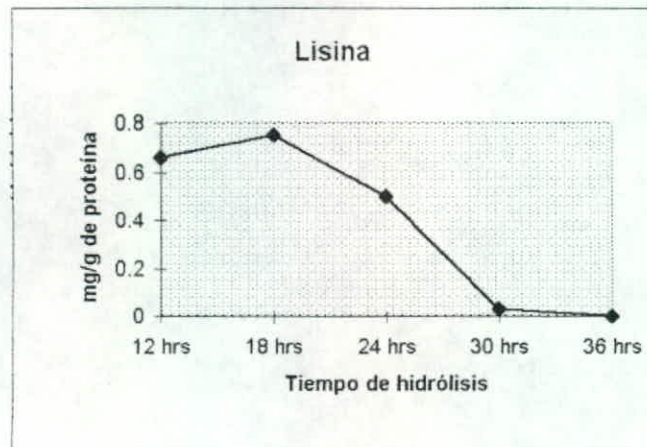
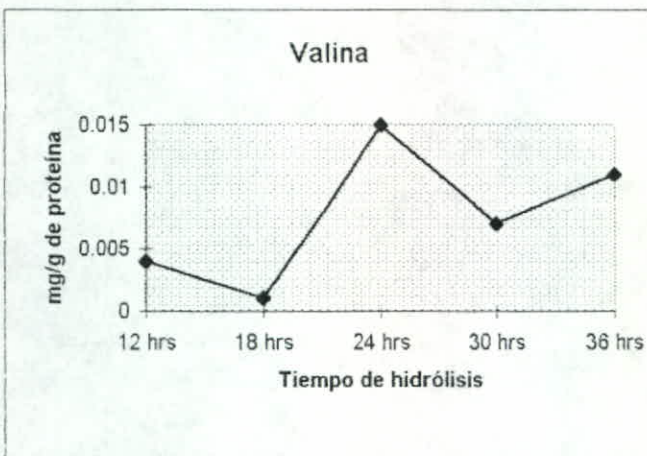
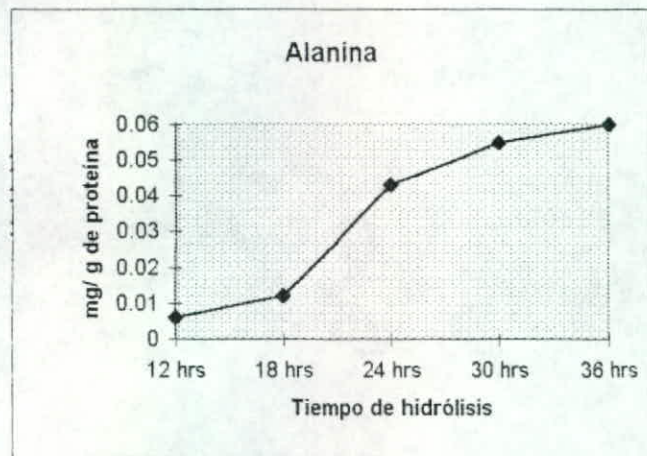
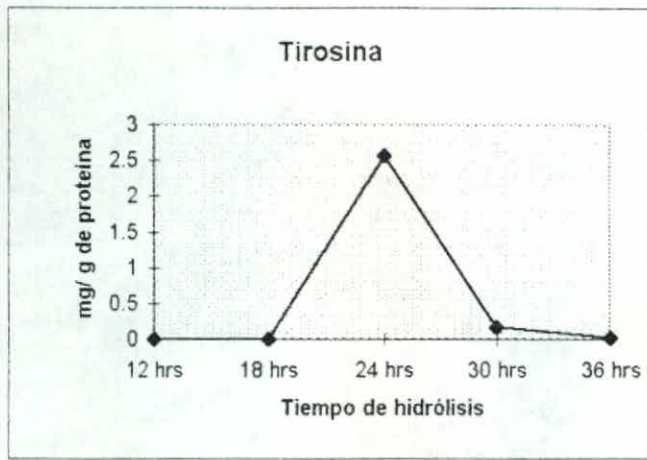
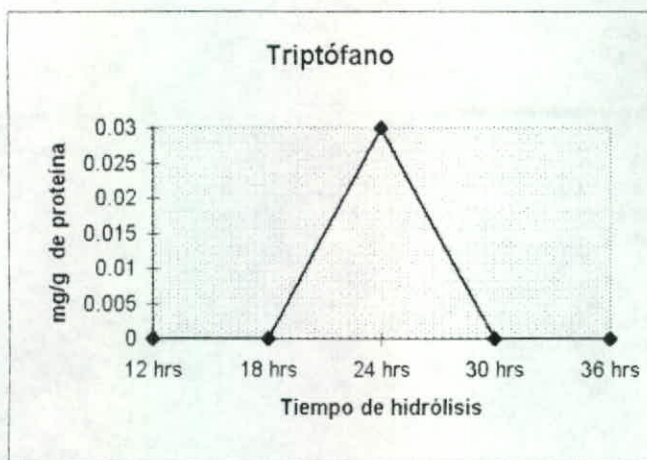
GRAFICA No. 1
EFECTO DEL TIEMPO EN LA HIDROLISIS ACIDA (HCl 6N, 110°C)
DE LA PROTEINA DE HARINA DE SOYA





GRAFICA No. 2
 EFECTO DEL TIEMPO EN LA HIDROLISIS ACIDA (HCl 6N, 110°C)
 DE LA PROTEINA DE HARINA DE PESCADO



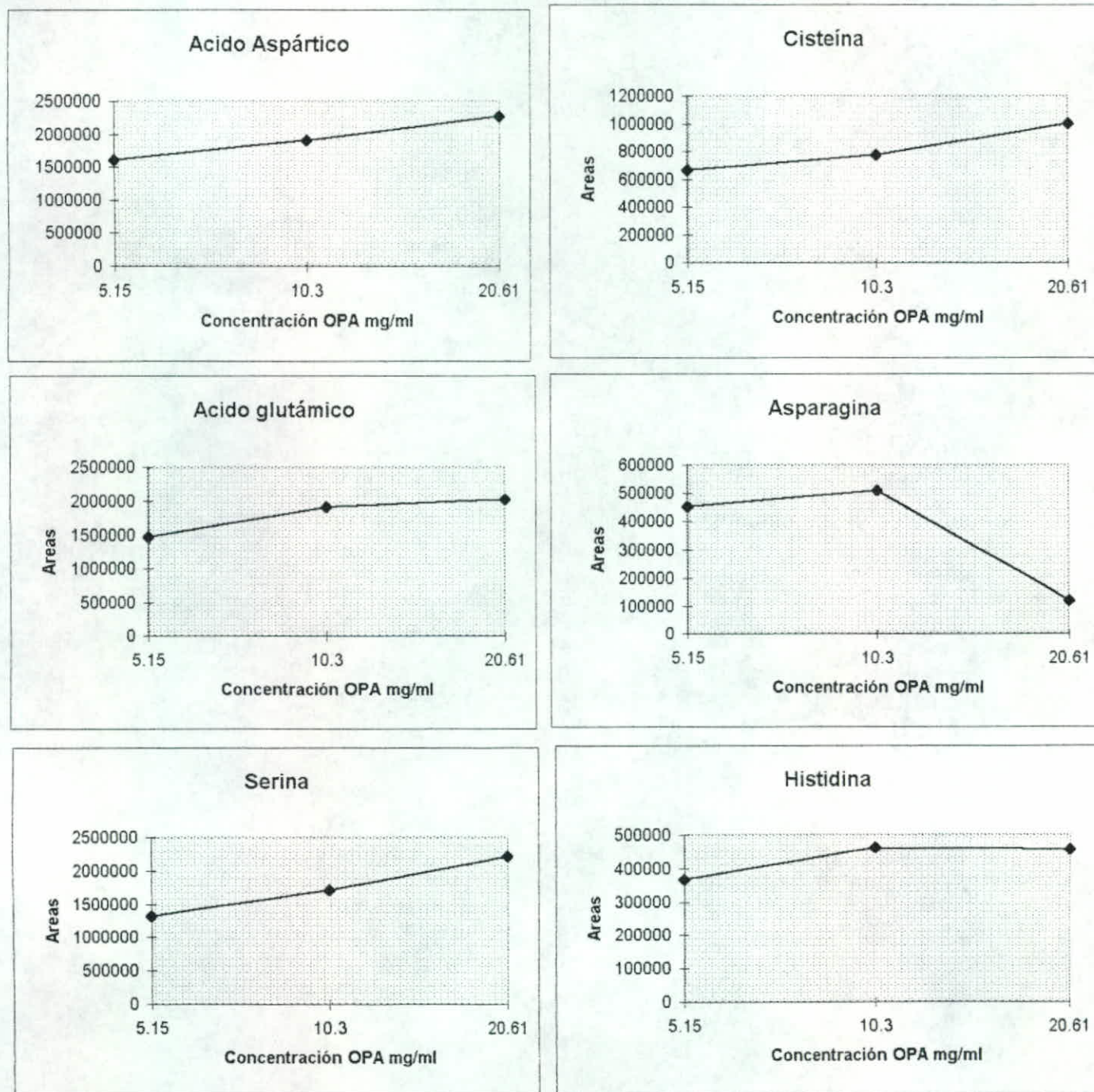


2 DERIVATIZACION:

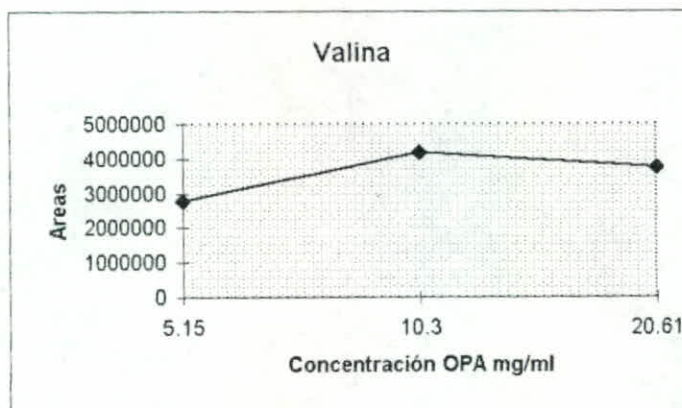
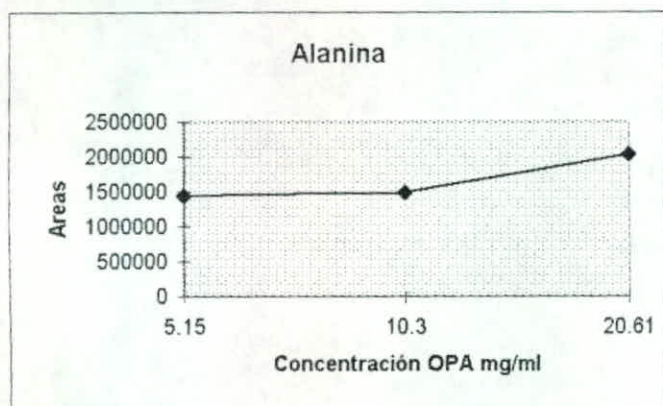
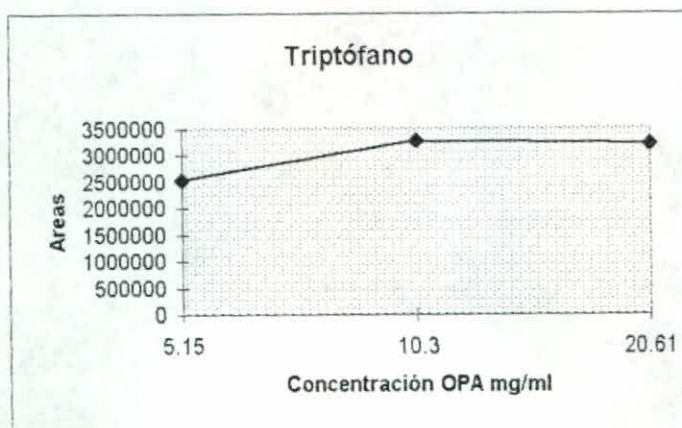
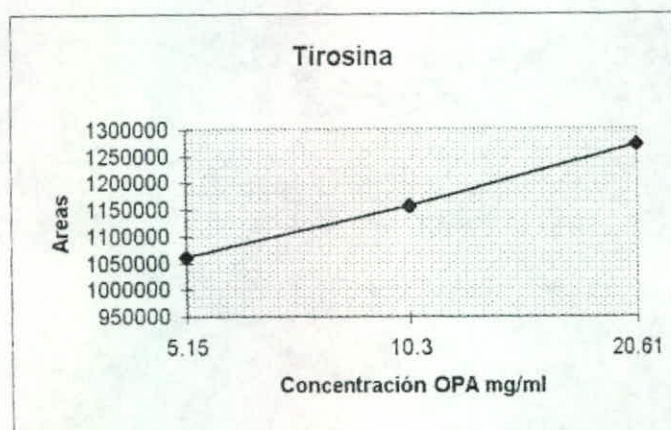
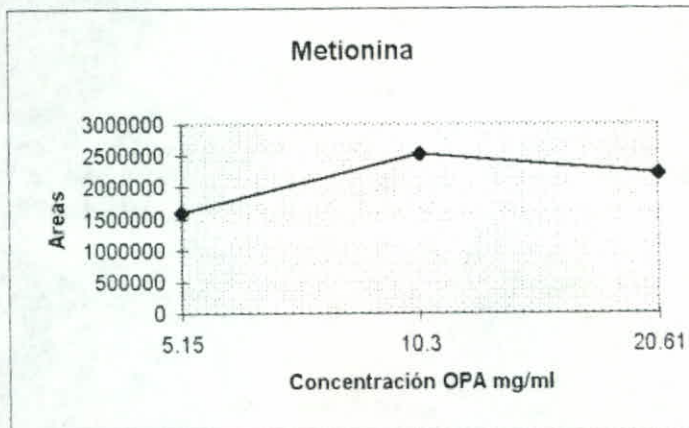
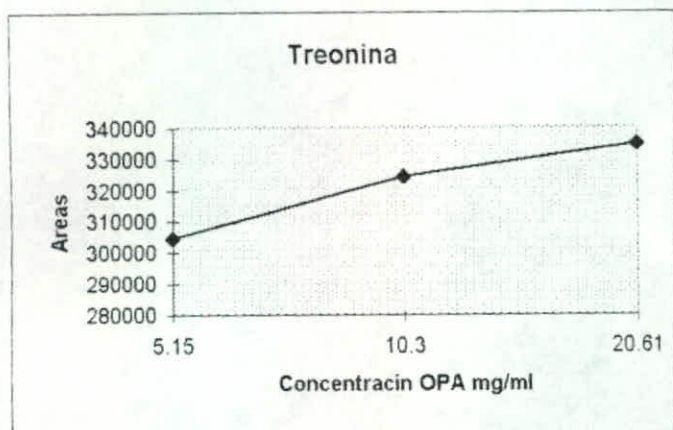
Para optimizar las condiciones de derivatización, se estudió el efecto de la concentración de OPA y la relación moles de aminoácido a moles de reactivo (OPA) sobre el rendimiento de la formación de derivados fluorescentes (fluorescencia). Para esto se analizó una solución patrón con 15 aminoácidos, utilizando distintas concentraciones de OPA en la mezcla de reacción.

GRAFICA No. 3

Comportamiento de una solución patrón con 15 aminoácidos (0.4 ug/ml) expuesta a diferentes concentraciones del agente derivatizante OPA/2-mercaptoetanol



Continuación Gráfica No.3 (Comportamiento de una solución patrón expuestas a diferentes concentraciones de OPA)



Continuación Gráfica No.3 (Comportamiento de una solución patrón expuestas a diferentes concentraciones de OPA)

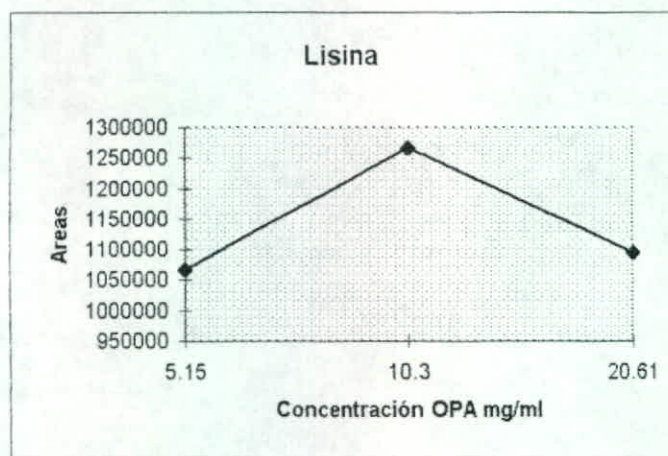
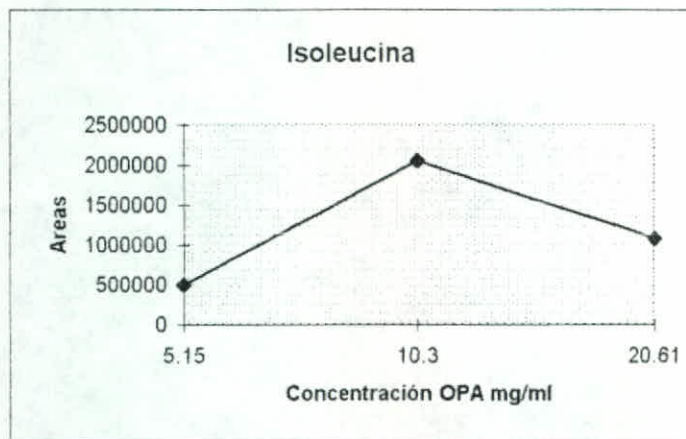
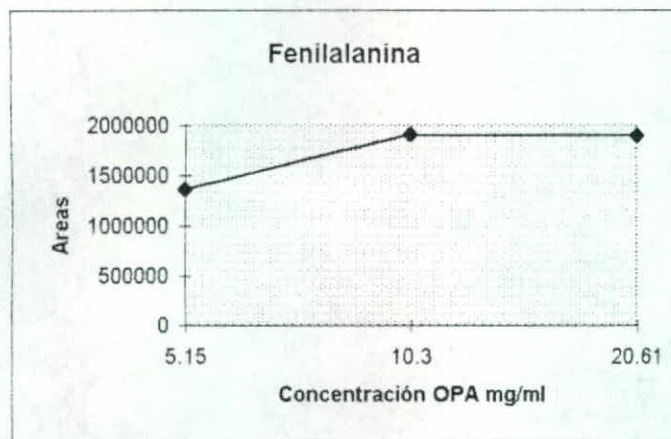


TABLA No. 1
 Total de umoles de 15 aminoácidos presentes en una solución patrón
 a una concentración de 0.4ug/ml

AMINOACIDO	umoles
Acido Aspártico	6.10E-04
Cisteina	6.60E-04
Acido Glutámico	5.44E-04
Asparagina	6.05E-04
Serina	7.54E-04
Histidina	5.16E-04
Treonina	5.14E-04
Metionina	5.36E-04
Tirosina	4.42E-04
Triptófano	3.92E-04
Alanina	9.00E-04
Valina	6.82E-04
Fenilalanina	4.84E-04
Isoleucina	6.10E-04
Lisina	5.14E-04
TOTAL	8.76E-03

TABLA No. 2
 Cantidad de umoles del reactivo OPA que reacciona
 con umoles de aminoácidos presentes en una solución
 patrón (0.4 ug/ml)

Concentración OPA mg/ml	umoles de OPA
5.15	1.92
10.3	3.84
20.61	7.68

3 CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

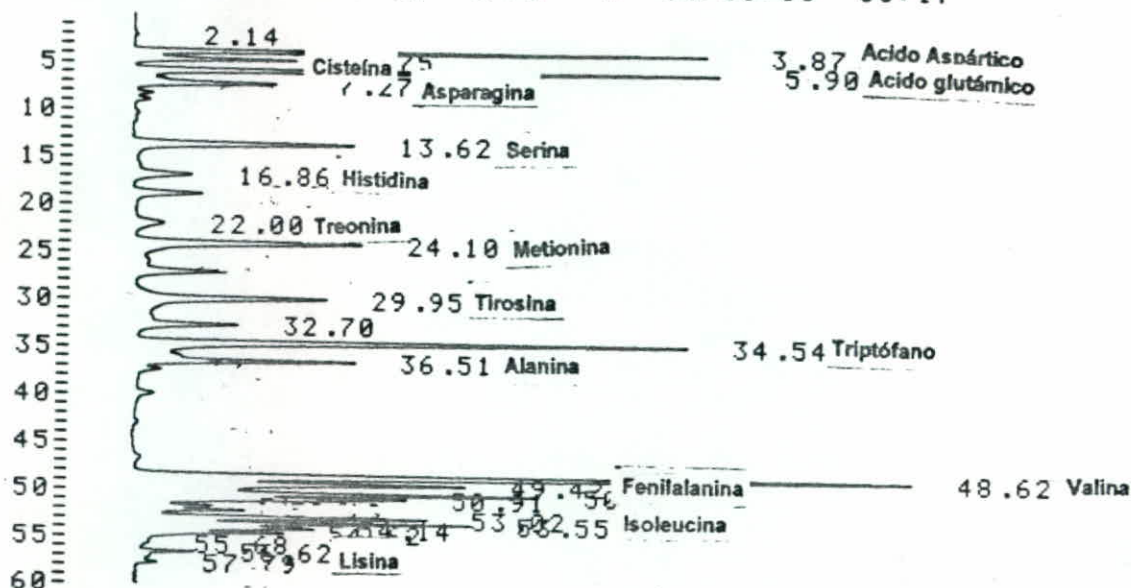
3.1 Separación de picos

El análisis de un hidrolizado de harina de Soya utilizando las condiciones cromatográficas descritas en la metodología generó cromatogramas como se observa en la grafica No. 4 B. Estos son muy similares a los que se obtienen al analizar una mezcla patrón de 15 aminoácidos grafica No. 4 A.

GRAFICA No. 4

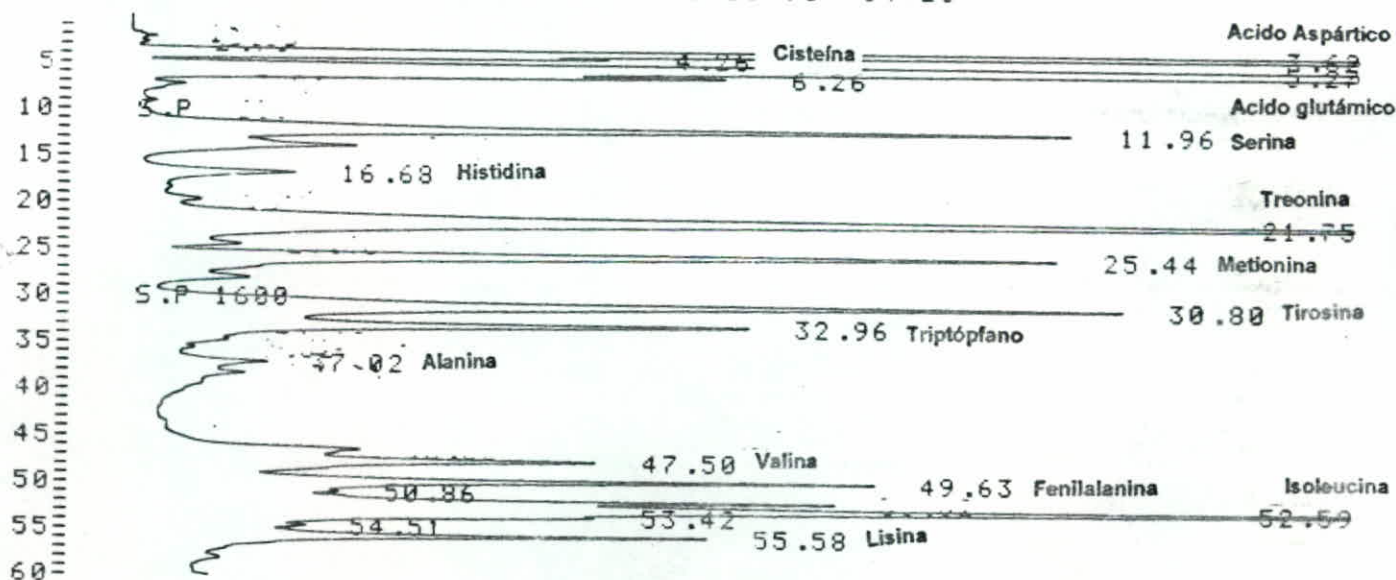
A

CH. 1 C.S 1.25 ATT 10 OFFS 0 00/00/00 00:17



B

CH. 1 C.S 1.25 ATT 7 OFFS 0 10/28/98 14:23



continuación *Separación de picos*

Se observan picos separados para cada uno de los aminoácidos con separación óptima entre ellos con excepción de Acido aspártico y Cisteína que difieren únicamente en 0.84 minutos en tiempo de retención. Los tiempos de retención de los derivados fluorescentes de los aminoácidos se presentan en la tabla No. 3.

TABLA No. 3
Identificación de aminoácidos estándares

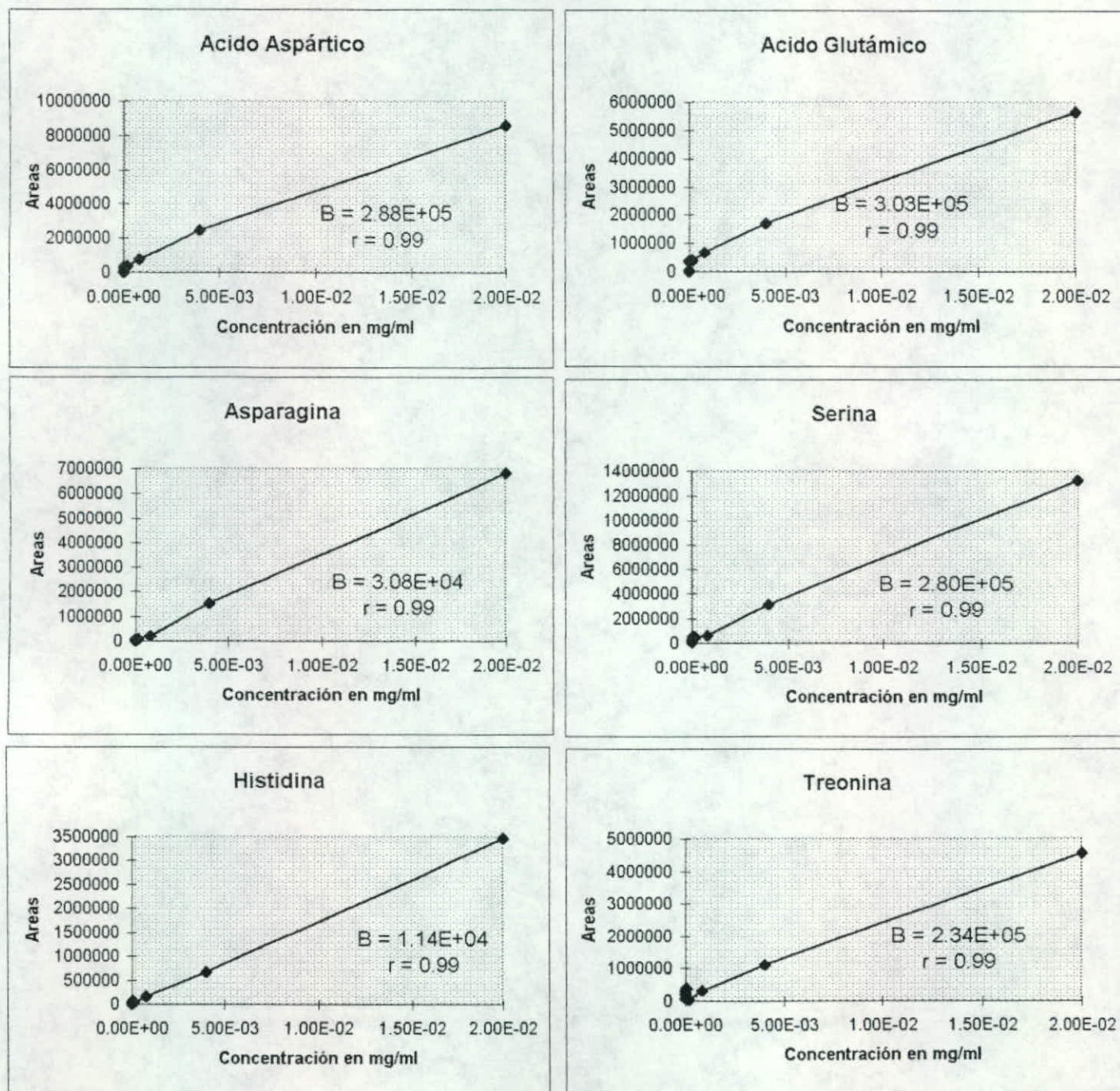
Aminoácido	Tiempo de Retención minutos ± 2
Acido Aspártico	3.83
Cisteína	4.67
Acido Glutámico	5.79
Asparagina	7.06
Serina	13.23
Histidina	16.38
Treonina	21.46
Metionina	24.15
Tirosina	29.95
Triptófano	34.54
Alanina	36.51
Valina	48.62
Fenilalanina	49.43
Isoleucina	52.03
Lisina	55.13

3.2 VALIDACION:

Linealidad:

Los resultados del análisis de soluciones patrón de 15 aminoácidos, cada uno con concentraciones entre 2.56 ng/ml a 20 ug/ml muestran líneas rectas ($r > 0.99$) al graficar las concentraciones en el eje de las abscisas versus la fluorescencia (áreas del pico) en el eje de las ordenadas. Los aminoácidos Tirosina ($r = 0.75$) y Lisina ($r = 0.45$), no muestran un comportamiento lineal.

Gráfica No. 5
LINEALIDAD DEL METODO



Continuación Gráfica No. 5 (Linealidad del Método)

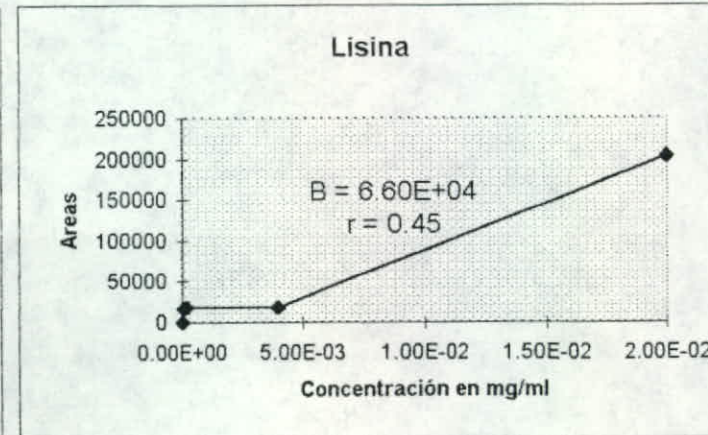
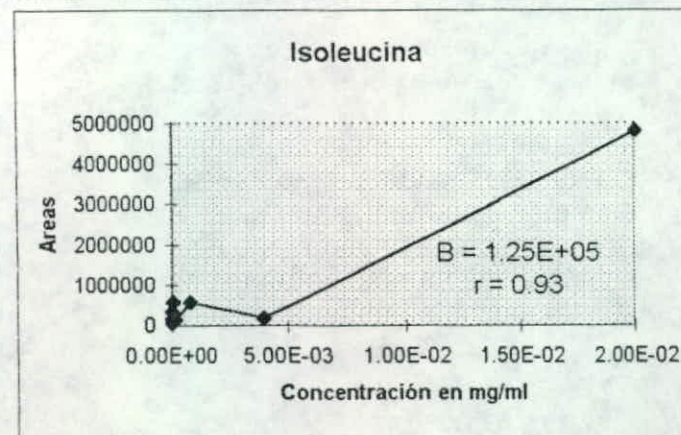
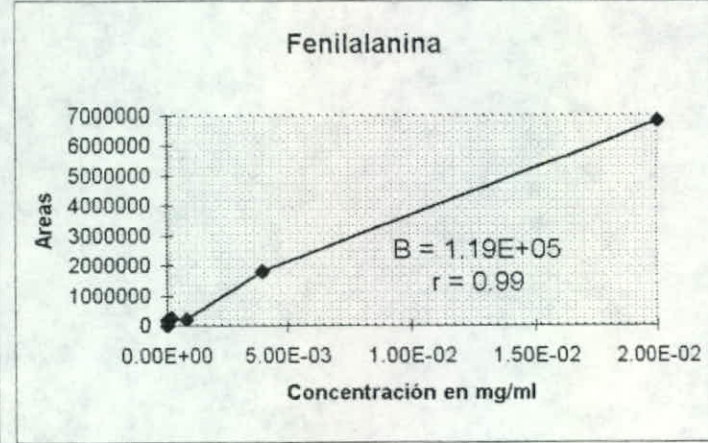
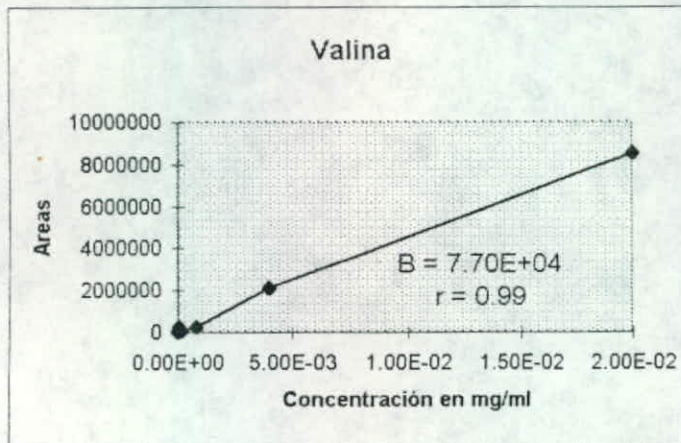
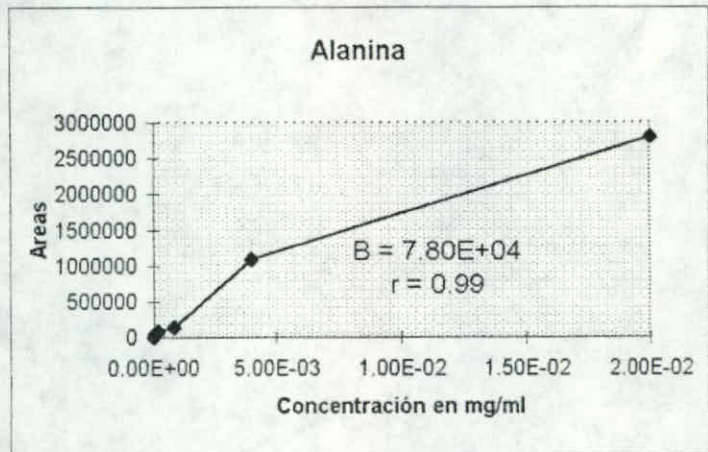
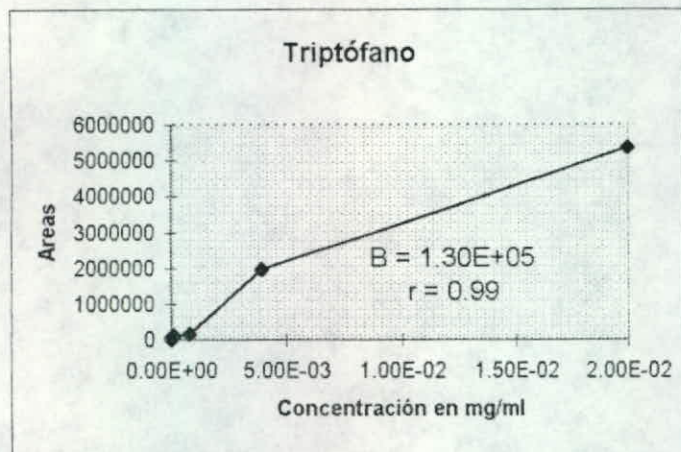
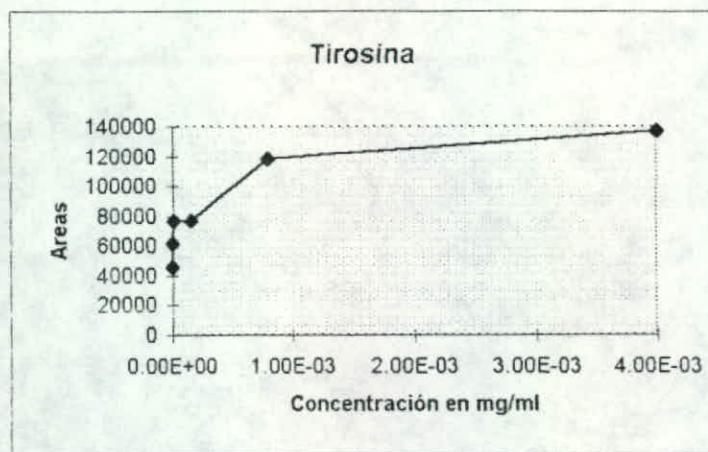
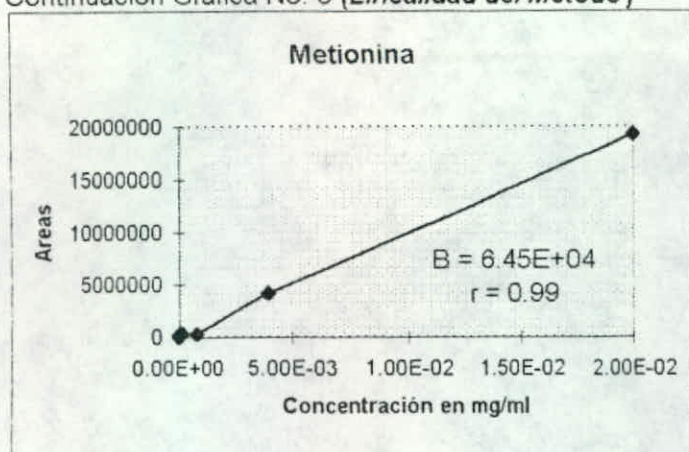


TABLA No. 4
RANGO DE LINEALIDAD DE 14 AMINOACIDOS PATRONES

AMINOACIDOS	RANGO DE LINEALIDAD mg/ml concentración máxima 0.02	COEFICIENTE DE CORRELACION
Acido Aspártico	> 0.000032	0.99
Acido glutámico	> 0.000032	0.99
Asparagina	> 0.0000064	0.99
Serina	> 0.0000064	0.99
Histidina	> 0.0008	0.99
Treonina	> 0.00016	0.99
Metionina	> 0.00016	0.99
Tirosina	> 0.00016	0.75
Triptófano	> 0.00016	0.99
Alanina	> 0.000032	0.99
Valina	> 0.00016	0.99
Fenilalanina	> 0.0000064	0.99
Isoleucina	> 0.0000064	0.99
Lisina	> 0.000032	0.45

Reproducibilidad:

Los resultados del análisis repetido, de una mezcla de 15 aminoácidos a una concentración de 160 ng/ml, produjeron porcentajes de error estándar entre 7 y 34, lo cual puede observarse en la tabla No 5. En el mismo estudio para los análisis realizados en días diferentes mostraron porcentajes de error estándar de entre 0.6-9 por ciento.

TABLA No. 5
Resultados de la reproducibilidad en un mismo día, al analizar una solución patrón de 13 aminoácidos, cada uno en una concentración de 160 ng/ml realizado en un día, durante tres días consecutivos

Aminoácido	% de error estándar*	
	en el mismo día n = 7	en días distintos n = 3
Acido Aspártico	12	5
Acido glutámico	13	5
Asparagina	25	3
Serina	34	3
Histidina	29	9
Treonina	15	2
Metionina	23	2
Tirosina	7	1
Triptófano	7	0.6
Alanina	28	3
Valina	20	1
Fenilalanina	21	2
Isoleucina	22	5

* $(DS/X) \times 100$

Exactitud o porcentaje de recuperación

El porcentaje de recuperación obtenido de cuatro aminoácidos estudiados, varió de entre 28 y 94%. Los aminoácidos Isoleucina y Serina presentaron porcentajes de recuperación altos mientras que los aminoácidos Triptófano y Fenilalanina porcentajes bajos como se muestra en la tabla no. 6.

Tabla No. 6
Porcentaje de recuperación de 4 aminoácidos en muestras enriquecidas de Harina de Soya después de su hidrólisis

Aminoácido	Area sin enriquecimiento	Area enriquecida	Gramos de enriquecimiento	% de Recuperación
Isoleucina	239992	13756882	0.04	94
Serina	395359	23447409	0.01	88
Triptófano	356652	1469181	0.01	27
Fenilalanina	5620277	8032350	0.01	28

Límites de Detección y Límites de cuantificación

La concentración mínima detectable fue de 2.56 E-05 ng/ml. A esta concentración fueron detectables los 15 aminoácidos pero cuantificables solo 6 debido a que por el tamaño y forma del pico, no permitió conocer con exactitud los picos generados por esas cantidades.

Los límites de detección, calculados para una razón señal:ruido de 3:1 están expuestos en la tabla No. 6 para cada uno de los aminoácidos.

TABLA No. 7
LÍMITES DE DETECCIÓN PARA 15 AMINOACIDOS PROTEICOS
(razón señal:ruido de 3:1)

AMINOACIDOS	Límite de Detección (ug/ml)
Acido Aspártico	0.68
Cisteína	0.15
Acido Glutámico	1.11
Asparagina	0.09
Serina	0.42
Histidina	0.06
Treonina	1.03
Metionina	0.07
Tirosina	0.01
Triptófano	0.48
Alanina	0.68
Valina	0.17
Fenilalanina	0.35
Isoleucina	0.56
Lisina	8.15

4. APLICACIÓN:

El método implementado se aplicó en dos plantas autóctonas y dos alimentos comunes de la población guatemalteca, determinándose el patrón de aminoácidos para cada uno de éstos. En las tablas 8 y 9 se presentan los patrones de aminoácidos de los alimentos, expresados como mg de aminoácido/g de proteína y de mg de aminoácido/g de alimento, respectivamente.

Tabla No. 8

Patrón de Aminoácidos de algunos alimentos (mg de aminoácido/ g de proteína) determinados con la técnica establecida

Alimentos	CHOMTEE	GUSHNAI	HARINA DE SOYA	SALCHICHA DE TERNERA
Aminoácidos				
Acido aspártico	0.45	0.0037	0.126	0.05
Cisteína	2.96	0.0667	0.022*	n.d
Acido glutámico	0.54	n.d	0.3013	1.22
Asparagina	0.2933	0.0047	n.d	n.d
Serina	0.0002	n.d	0.0642	0.04
Histidina	1.6	0.0134	0.0363	0.05
Treonina	0.33	0.068	0.182	0.35
Metionina	0.1667	0.0043	2.07	0.04
Tirosina	17.25	0.499	4.517	5.2
Triptófano	0.0017	n.d	0.14	0.001
Alanina	0.427	0.014	0.056	n.d
Valina	0.15	0.002	0.025	0.03
Isoleucina	0.657	0.038	0.041	0.09
Lisina	0.49	n.d	1.22	0.42
Fenilalanina	n.d	0.006	0.0327	0.03

n.d = no detectado

** = dato no confiable por los valores obtenidos de la curva de calibración*

Tabla No. 9

Patrón de aminoácidos de algunos alimentos (mg de aminoácido/ g de alimento)

Alimento	CHOMTEE	GUSHNAI	HARINA DE SOYA	SALCHICHA DE TERNERA
Aminoácido				
Acido aspártico	13.88	0.10	5.84	0.587
cisteína	91.28	1.80	1.00*	n.d
Acido glutámico	16.65	n.d	13.72	15.33
Asparagina	9.04	0.13	n.d	n.d
Serina	6×10^{-3}	n.d	2.9	0.47
Histidina	49.34	0.36	1.65	0.679
Treonina	10.17	1.83	8.28	4.41
Metionina	5.14	0.12	12.36	0.553
Tirosina	53.69	13.46	36.21	21.3
Triptófano	0.052	n.d	7.37	0.1
Alanina	13.17	0.38	2.55	n.d
Valina	4.63	0.05	1.14	0.446
Isoleucina	20.26	1.03	1.87	1.21
Lisina	15.11	n.d	55.5	5.31
Fenilalanina	n.d	0.16	1.49	0.39

n.d = no detectado

* = dato no confiable por los valores obtenidos de la curva de calibración

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Como primer paso para la implementación de la técnica de determinación del patrón de aminoácidos en un alimento, es necesario conocer el tiempo óptimo al cual se debe someter el alimento a hidrólisis ácida. Los factores que más influyen en la hidrólisis de las proteínas son: concentración del ácido, tiempo y temperatura de hidrólisis. Estudios previos (35) han demostrado que el ácido clorhídrico 6 N y la temperatura de 110 °C son óptimas para lograr la hidrólisis total de proteínas contenidas en un alimento. El tiempo de hidrólisis con las anteriores condiciones es un factor que debe ser controlado, ya que tiempos menores al óptimo puede determinar que no todos los enlaces peptídicos sean hidrolizados, con la consecuente subcuantificación de aminoácidos. Por el contrario, si el tiempo excede al óptimo, se puede causar la degradación de aminoácidos, con lo cual, de igual manera, se subestima la cantidad de aminoácidos presentes en el alimento.

Para conocer el tiempo óptimo de hidrólisis, se utilizó harina de soya y de pescado. Estos productos alimenticios, por separado, fueron hidrolizados (HCl 6 N, 110 °C) durante lapsos que variaban entre las 12 y 36 horas. En el hidrolizado de harina de soya obtenido después de 24 horas de hidrólisis, se encontraron las mayores concentraciones de cada uno de los aminoácidos (Ver gráfica No. 1). Las gráficas para cada uno de los 14 aminoácidos analizados, muestran un incremento de la concentración en función del tiempo, cuando la hidrólisis transcurrió en tiempos menores a 24 horas. Después de ese tiempo, las concentraciones

declinaron, sobre todo en aquellos aminoácidos reportados como poco estables bajo las condiciones de hidrólisis (ej. fenilalanina y triptófano). Por otro lado, para la harina de pescado se observaron distintos tiempos óptimos de hidrólisis para cada aminoácido. Estos fueron de 24 horas para 7 de los aminoácidos (ácido aspártico, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y fenilalanina), mientras que para otros fue mayor (ácido glutámico, e histidina) o menor (lisina y metionina). En la harina de pescado se han reportado cantidades considerables de aminas biogénicas, estas poseen reactividad y comportamiento cromatográfico similar a los aminoácidos, con lo cual pueden interferir en la formación de derivados fluorescentes con el reactivo de OPA y/o con la separación cromatográfica de los mismos. Otro factor que puede influir es el mayor número relativo de tipos de proteínas en la harina de pescado. Si proteínas distintas se comportaran de forma diferentes a la hidrólisis ácida, esto podría explicar los resultados obtenidos.

Posterior a la hidrólisis de los alimentos se optimizó la derivatización. Esta se basa en la reacción entre el grupo amino primario de un aminoácido y el o-ftaldialdehído, en presencia de un reductor (beta-mercaptoetanol). El producto de esta reacción es un isoindol sustituido que posee fluorescencia (Ver anexo No. 3). Para que todos los aminoácidos presentes en un hidrolizado reaccionen, se debe contar con la concentración adecuada de OPA. Para determinar esta se realizó un estudio en el cual se probaron distintas concentraciones de OPA en la mezcla de reacción (5.15, 10.3 y 20.61 mg/ml). Con cada una de las concentraciones mencionadas se hizo reaccionar una mezcla patrón de 15 aminoácidos, cada uno en una concentración de 0.4 ug/ml. A medida que se incrementó la concentración

de OPA, aumentaba en forma no considerable la fluorescencia, excepto para los aminoácidos asparagina, metionina y valina, para los cuales se obtuvo fluorescencias menores con la mayor concentración de OPA (Ver gráfica No.3). Estos resultados nos permiten apreciar que la concentración de OPA más adecuada para realizar la derivatización es de 10.3 mg/ml. El cálculo de la relación moléculas de aminoácido : moléculas de OPA permite conocer que en cada una de las concentraciones utilizadas, el reactivo OPA estaba en exceso, condición necesaria para permitir la derivatización de todos los aminoácidos presentes. Para que se alcance una formación óptima de los derivados fluorescentes, por cada molécula de aminoácido debe haber alrededor de 500 moléculas de OPA.

Una vez obtenidos los derivados fluorescentes de los aminoácidos, estos son analizados por cromatografía líquida de alta resolución. Se inyectan los mismos en un cromatógrafo líquido, la mezcla se fracciona por medio de una columna, de donde eluyen en forma separada. El eluido se hace pasar por un detector de fluorescencia, el cual envía señales al detector. El paso de un compuesto fluorescente, genera un pico, cuya altura y área es proporcional a la intensidad de la fluorescencia y consecuentemente a la cantidad o concentración del derivado. El orden de elución de los derivados correspondió con su polaridad, eluyendo primero los polares: ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, asparagina, serina, histidina y treonina. Seguido por los apolares : metionina, tirosina, triptófano, alanina, valina, fenilalanina, isoleucina y por último lisina el cual

teniendo características polares, eluyó de último por tener dos grupos amino, lo que disminuye su polaridad (Ver Gráfica No. 4 A).

Cada aminoácido eluye a un tiempo específico (tiempo de retención, t_R). El tiempo de retención permite la identificación de los aminoácidos presentes en una muestra. Para conocer el tiempo de retención de cada aminoácido, se analizaron mezclas por separado de derivados fluorescentes de aminoácidos protéicos. Posteriormente, se analizaron mezclas conteniendo hasta 15 derivados de aminoácidos. Con las condiciones cromatográficas utilizadas, se obtuvo una buena separación de los derivados, los cuales presentaban distintos tiempos de retención. En el caso del ácido aspártico y cisteína, los tiempos de retención difieren únicamente 0.84 minutos, lo cual dificulta la identificación y cuantificación de la cisteína (por ser un pico con área y altura más pequeñas que el aminoácido ácido aspártico).

En la Gráfica No. 4 B se observa un cromatograma de harina de soya picos del hidrolizado que permiten identificar aminoácidos presentes. No se observan picos inespecíficos que pudieren interferir con la identificación de los aminoácidos presentes. No se pudo establecer los t_R de los aminoácidos: *glutamina*, *arginina*, *leucina* y *glicina* por carecer de patrones de los mismos; esto no permitió identificar a los picos correspondientes en el cromatograma del hidrolizado de harina de soya. Sin embargo, tomando en consideración su estructura y polaridad, se puede suponer que el pico cuyo t_R es de 13.71 que se observa en la gráfica 4 B es muy probable que sea el aminoácido glutamina. En el rango de tiempo de retención de 6.28 - 7.24 se observan algunos picos, uno de los cuales puede corresponder a la

arginina. Lo mismo puede inferirse con los picos cuyo t_R es de 19.5 y 38 que corresponderían a glicina y leucina, respectivamente. La *Prolina* no reacciona con OPA/2-mercaptoetanol por ser un iminoácido. Esto quiere decir que no tiene el grupo amino libre para poder formar derivado fluorescente.

Una vez optimizadas las condiciones de hidrólisis, concentración del reactivo y cromatográficas, se continuo con la validación del método empezando con el parámetro de linealidad. Para esto se preparó una serie de soluciones patrón de aminoácidos en una concentración de entre 2.56 ng/ml a 20 ug/ml. A estas soluciones se les realizó el análisis cromatográfico. A partir de las áreas de los picos que produjeron cada uno de los aminoácidos en cada una de las concentraciones, se graficaron curvas de calibración y se calcularon los coeficientes de correlación. De catorce aminoácidos determinados, se obtuvieron coeficientes de correlación (r) de 0.99 para doce de éstos. Mientras que para los aminoácidos (tirosina y lisina) se obtuvieron valores de coeficiente de correlación de 0.75 y 0.45 respectivamente (Ver gráfica No. 5).

Los rangos de concentraciones utilizados para la determinación de la linealidad del método, están muy cercanos a la concentración de los aminoácidos presentes en los alimentos estudiados, incluso en aquellos con altos contenidos de proteínas como es el caso de la harina de soya. Esto significa que a partir de las curvas de calibración mencionadas , se puede determinar la concentración real de cada uno de los aminoácidos presentes en el hidrolizado, y así calcular el contenido de aminoácidos en el alimento.

A partir del estudio realizado de linealidad se calculó la concentración *máxima detectable de* 100 ug/ml. A esta concentración los picos sobrepasan el límite de la señal del detector.

Usando una razón de 3 :1 como señal : ruido, se encontró que los límites de cuantificación para las muestras patrón de 14 aminoácidos se encuentra en el rango de entre 0.01 -1.11 ug/ml. Ver tabla No. 7

Para evaluar la exactitud o porcentaje de recuperación de la técnica, se prepararon soluciones patrón de cuatro aminoácidos (triptófano, fenilalanina, serina e isoleucina). Estas soluciones fueron agregadas a muestras de harina de soya (enriquecimiento). A este alimento enriquecido, se hidrolizó, derivatizó y se le realizó el análisis cromatográfico. Para los aminoácidos mencionados, se comparó el pico en muestras enriquecidas y no enriquecidas y se calculó el porcentaje de recuperación, obteniendo un amplio margen de 28 a 94 por ciento (ver tabla no.6). Los aminoácidos triptófano y fenilalanina, reportaron porcentajes de recuperación de 27 y 28 respectivamente. Esto significa que hubo una pérdida de aproximadamente tres cuartos de la cantidad inicial agregada de cada uno de éstos. Lo cual puede deberse a que ambos aminoácidos una vez liberados por la hidrólisis ácida a la que son sometidos, son destruidos fácilmente en el lapso de 24 a 30 horas (Ver gráfica No. 1). Por el contrario los porcentajes de recuperación de los aminoácidos serina e isoleucina, fueron de 88 y 94 respectivamente (Ver tabla No. 6). Se puede observar en la gráfica No. 1 que el comportamiento de estos aminoácidos, después de haber experimentado una hidrólisis de 24 horas, permanecen más estables. Si se hubiese realizado dicho estudio con otros

aminoácidos como ácido aspártico, el porcentaje de recuperación deberá ser mucho más alto (cercano al 100 por ciento) por la estabilidad que presenta dicho aminoácidos. Con estos resultados se recomienda que se debe tener cuidado en el tiempo de hidrólisis de un alimento, el cual estrictamente debe de ser de 24 horas.

Para evaluar la reproducibilidad del método, se analizó repetidamente ($n=7$) una mezcla patrón conteniendo 15 aminoácidos en una concentración de 160 ng/ml. Este ensayo se repitió durante tres días diferentes para evaluar la reproducibilidad entre días. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de error estándar, este varió de entre 7 y 34, para tirosina y serina respectivamente. Mientras que la reproducibilidad entre días fue de 0.6 a 9 por ciento de error estándar para triptófano e histidina. Ver tabla No. 5. Esta aparente contradicción se explica al observar los resultados de los siete análisis sucesivos. Se puede observar que existe muy poca variación entre los análisis y de la cuarta inyección en adelante el valor detectado de cada aminoácido tiende a disminuir. Esta disminución observada puede deberse después del tercer análisis con la consecuente pérdida de poder de resolución, la deformación de los picos y dificultados de integración o cálculo de las áreas bajo los picos. Otras posibilidades consistirían en la leve degradación del reactivo OPA/mercaptoetanol y/o de los aminoácidos a ser analizados. Estos cambios indeseables podrían ser solucionados incrementando el tiempo entre inyección e inyección, lo que permitiría regenerar y estabilizar la columna. Además sería recomendable mantener el reactivo de OPA y aminoácidos a ser analizados en baño de hielo y cubierto de la luz.

El método descrito fue aplicado para la determinación del patrón de aminoácidos en los alimentos: harina de soya, gushnaih, chomtee, ambas plantas comestibles nativas de Guatemala y para salchicha de ternera (Ver tablas 8 , 9 anexos 4, 5 y 6).

Los resultados fueron reproducibles, con la excepción de los análisis realizados en la harina de pescado (Ver gráfica No. 2). En esta se observó una gran variación en los resultados obtenidos, lo cual es consiguiente con el comportamiento observado al estudiar el efecto del tiempo sobre la hidrólisis ácida.

Los resultados obtenidos no se pudieron comparar con estudios anteriores que reportan el patrón de aminoácidos en alimentos, debido a que no explican la forma de hidrólisis a la que expusieron los alimentos y cuál fue la técnica que utilizaron posteriormente para determinar el patrón de aminoácidos presentes (Ver anexo No. 7).

X. CONCLUSIONES

1. Para determinar cuáles y en qué cantidad están presentes los aminoácidos en los alimentos, el tiempo óptimo de hidrólisis de los alimentos es de 24 horas en medio (HCl 6 N) y a una temperatura de 110 °C
2. Para la derivatización con el reactivo orto-ftaldialdehído / 2-mecaptoetanol (OPA), es necesario ajustar las condiciones para que por cada molécula de aminoácido existan alrededor de 500 moléculas de OPA.
3. Con las condiciones cromatográficas descritas se obtuvo una separación de quince aminoácidos cuando se analiza una mezcla patrón o un hidrolizado de un alimento.
4. La técnica validada de HPLC, para la determinación del patrón de aminoácidos presentes en los alimentos, posee valores aceptables de reproducibilidad, linealidad, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.
5. La técnica puede ser exitosamente aplicada para la determinación del patrón de aminoácidos en los alimentos como: harina de soya, chomtee, gushnail y salchicha de ternera.

XI. RECOMENDACIONES

1. La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia debe de establecer y brindar a centros interesados, el servicio de determinación del patrón de aminoácidos en los alimentos, el cual sirve para velar el bienestar y la salud nutricional de la población guatemalteca.
2. Continuar con estudios que verifiquen la calidad nutricional de los alimentos, para que los guatemaltecos ingieran en su dieta, alimentos con altos contenidos de nutrientes y así mejorar su calidad de vida.

XII. REFERENCIAS

- (1) Bohinski, Bioquímica. 5ta. ed. Editorial Iberoamericana. EUA: 1991. III:64pp.
- (2) Stocchi V. Piccoli G. et. al. Biochemistry 1989 Apr. 178:1,107-17.
- (3) Mejía, Luis A. Is histidine essential for the adult man. A review. Arch. Latinoamericana Nutrition: 28(2):143-151, 1958
- (4) Murray, Robert. Et. Al. Bioquímica de Harper. 13 edición .México: Editorial Manual moderno 1993. 717 pp.
- (5) Bressani & Elías. The world Protein and Nutritional Situation . vol 1 Vienna Austria, International Atomic Energy 1979 pp 3-23
- (6) Torún, Benjamín MD, PhD. Clinical Nutritiom of the Young Child INCAP 1985 pp 99-119
- (7) Organización Mundial de la Salud. Necesidades de Energía y Proteínas. Informe de una reunión conjunta FAO/OMS/UNU de expertos. Ginebra OMS. 1985 .
- (8) Echard E. Ziegler y L.J. Fieler JR. Conocimientos Actuales sobre Nutrición 7 ed . Editorial ILSI, 1997.

- (9) Torún, Benjamín. Analysis of international recommendations for energy and protein requirements: A work shop report 1960
- (10) Lanchance Paul A. et. al. Shorter Protein Bioassay. Food Technology June 1977 82-84
- (11) Torrún Benjamín. Role of energy metabolism in regular of protein requirements. INCAP 1986.
- (12) INCAP Alimentación y Nutrición en Centro América y Panamá: Análisis y Estratégias para su desarrollo. MEMORIAS. Reunión Científica Celebrada en Guate 11 y 12 Sep 1989.
- (13) Melanie C.J. et. al. The influence of amino acid source on the stability of Ascorbic Acid in total parenteral nutrition (TPN) mixtures . Nutrition 1998;14:620-626

- (14) Bressani Ricardo, Elías Luiz. Suplementación de la avena con aminoácidos . Separata de Archivos Latinoamericanos de Nutrition INCAP vol XVII No. 2 junio 1967.
- (15) Donald S. McLaren. La Nutrición y sus Transtornos. 3era. ed. Mexico: Editorial Manual Moderno ;1988 . 41,62,83,103,120 pp.
- (16) Méndez MH, et. Al. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. Arch. Latinoam. Nutri. 1993 Mar; 43(1):66-72.
- (17) Delgado, Hernán L. Aportes del INCAP a la vigilancia alimentaria y nutricional en C.A, y Panamá . Publicación 1984
- (18) E. Meuccini and M.C. Mele Amino Acids and plasma antioxidant capacity. Amino Acids, 12/3-4,1997
- (19) Memorias del Taller Internacional Sobre Vigilancia Alimentaria y Nutricional La Habana Cuba mayo 1986. Ministerio de Salud Pública de Cuba 1986.
- (20) Arroyave, Guillermo. et. al. Assessment of protein nutritional status. J.Clin. Nutr. Vol 23, No. 6 June 1970 807-819 pp.
- (21) Benitez, Ingrid Lorena. Estandarización de un método de HPLC para determinar aminoácidos protéicos. Informe Final Examen de Integración Julio 1995
- (22) Nalda Romero. Métodos de análisis para la determinación de Nitrógeno y Constituyentes nitrogenados en alimentos. 1984 56-90 pp
- (23) Creighton Thomas E. Proteins structure and molecular properties. 2da. ed. N.Y. Editorial Freeman and Co. 1993 28-31 pp.
- (24) Coppola G. et. al. High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. Comparisons of methods for the purification of mouse monoclonal immunoglobulin M antibodies. J chromatogr. 1989 476:26290pp.
- (25) Skoog & Leary. Análisis Instrumental. 4ta. ed. Editorial Mc.Graw Hill;1993. XXVI: 730-734 pp.
- (26) Quattrocchi Oscar, et. Al. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Argentina 1992. 407 pp.
- (27) Stocchi V. et. al. Reverse Phase high-performance liquid chromatography of dimethylaminobenzene sulfonyl-and dimethylaminobenzene thiohydantoin-

- aminoacid and derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. *Anal Biochem* 1989 Italy,178:1 107-117pp.
- (28) Nagata Y, et. al. Determination of D- and L-amino acids in mouse kidney by high-performance liquid chromatography. *J chromatogr.*1992 Japan, 575:1 147-152pp
- (29) Beitz JA. Separation of cereal proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J chromatogr* 1983 255:219-238pp.
- (30) Alegría A. et. al. HPLC Method for cysteine and methinine in infant formulas. *J.Food Sci . Vol. 61 No. 6* 1132-1135 pp.
- (31) Alegría A. et. al. Isocratic HPLC, determination of Tryptophan in infant formula. *Journal of Chromatography* 721 (1996) 83-88 pp.
- (32) T. Okayasau, et al. The amino acid composition of mammalian and bacterial cells. *New York: Aminoacids. 13/3-4, 1997.*
- (33) Meucci E. and Mele M.C. M Amino Acid and plasma antioxidant capacity. *Amino acid, 12/3-4 , 1997.*
- (34) Dudasova s. Grancicova E. Influence of casein and soy flour proteins on aminoacid content in the liver of experimental animals. *Physiol Res* 1992 41(6):411-6.
- (35) Kirschbaum,J. et al. HPLC analysis of biogenic amines and amino acids in food. *American Laboratory:28C. 1994.*
- (36) Perkin Elmer. *Guía de Validación en HPLC. ANAQUI. s.f.*
- (37) Richard L. Davies. et. al. Accuracy and Precision in Amino Acid Analysis. *Journal Science Food* 1992 ;59:423-436.
- (38) Benjamin T. Burton *Nutrición Humana. 2da ed OPS , EUA: Editorial Mc Graw Hill . 1966 VII (45 - 59) pp.*
- (39) Smith, et. al. Six month outcome of critically patients given glutamine - supplemented Parenteral Nutrition. *Nutrition, Journal Vol 13 Apr 97 No. 4 . 56-59 pp.*
- (40) Claude, et al. Protein Quality. Aminoacid balance utilization and evaluation of diets containing aminoacid as therapeutic agents . *Nutrition* 1998;9:460-469.

- (41) Lee, et. al. Influence of Ingesting a solution of branched-chains amino acid in plasma and muscle concentration of during prolonged submaximal exercise. *Nutrition* 1996; 12:485-490.
- (42) Allwood, et al. Leucine and manifestation of antitumor activity by valine-depleted amino acid balance. *Nutrition* , 1993; 9:136-140.
- (43) T. Okayasau, et al. The amino acid composition of mammalian and bacterial cells. *New York: Aminoacids.* 13/3-4, 1997.
- (44) Dudasova S, Grancicova E. Influence of casein and soy flour proteins on aminoacids content in the liver of experimental animals. *Physiol Res.* 1992;41(6):411-416.
- (45) H. Sidransky. Effect of amino acid imbalances on the stimulatory effect of L-tryptophan on hepatic protein synthesis *Amino Acids*, 12/3-4,1997.
- (46) K.A. Massey. A review of physiological and metabolic effects of essential amino acids. *Amino acids*, 14/4,1998.

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1

ALGUNOS ASPECTOS DE LA CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

1. INSTRUMENTACION

Las partes fundamentales de un cromatógrafo líquido de alta precisión son:

1. Recipientes con solvente
2. Sistema de bomba de alta presión
3. Inyector de alta presión
4. Columna
5. Detector
6. Reproductor de señal

BOMBAS:

Una variedad de bombas son obtenibles para cromatógrafos líquidos. Estas bombas son diseñadas para forzar una variedad de solventes sobre la columna densamente empaquetada. A causa de la alta resistencia a flujo sobre la columna, las bombas pueden circular a altas presiones, obteniendo un exceso de 1,000 psi. Algunas bombas son capaces de operar a presiones arriba de 8,000 psi, pero aplicaciones en las que se requiere presiones altas SON poco comunes. Sin embargo, estas son dos desventajas para tener un sistema de bombeo con capacidad de alta presión. Primero, bombas con alta presión tienen menos problemas de trabajo a bajas presiones: pueden tener más duración y no induce a

variaciones en flujo. También, otra ventaja es que es posible utilizarlas a altas velocidades de flujo para disminuir el tiempo de análisis en una separación.

Existen dos formas de clasificar los sistemas de bombeo : de presión constante y de desplazamiento constante.

- a. Bombas a presión constante: Estos son tipos de bombas de presión constante. Este tipo de bombas son usados en algunos cromatógrafos, sin embargo estas causan algunos problemas ya que hacen que el líquido se sature con gas y este produzca ruido, y además forman gradientes de elución de solventes flexibles pero con dificultad . Son utilizadas en sistemas en el que se requiere altas presiones de flujo en aplicaciones preparativas.
- b. Bombas de desplazamiento constante: Bombas de desplazamiento constante son usadas para disminuir los efectos adversos de cambios en velocidad de flujo sobre las separaciones o análisis. Este tipo de bombas pueden ser divididos en dos grandes clases, recíprocas y bombas de desplazamientos sencillo a de jeringa. Una ventaja primaria en bombas recíprocas es su bajo costo . Pero estas bombas recíprocas tienen limitaciones: puede tener pérdida con solventes que son de alta volatilidad. Esto limita su utilidad con solventes como son cloruro de metileno, pentano o éter etílico.

Las bombas de jeringa poseen un flujo uniforme del solvente sobre la columna y un detector, disminuyendo el ruido con detectores sensibles al flujo de las bombas de jeringa son más costosas que las demás bombas.

Solventes y su tratamiento:

La pureza de los solventes es una consideración muy importante en la operación sucesiva de un cromatógrafo líquido. Los solventes necesitan estar puros para que no den problemas. Debido al uso de detectores de absorción óptica que son los más comunes. Recientemente, solventes específicamente purificados para HPLC han aparecido en el mercado.

Si el solvente posee impurezas, estas pueden pasar en la columna y ser detectadas por el detector produciendo picos no deseados.

Solventes no polares pueden ser purificados tratándolos con ácido sulfúrico concentrado para remover impurezas básicas. El solvente puede pasarse sobre una columna de vidrio o teniendo sílica gel y alumina. Los solventes polares pueden ser purificados de la misma manera o también haciéndolos pasar sobre un filtro de membrana. Algunos otros contaminantes pueden ser removidos combinando destilación y purificación cromatográfica.

Otro factor muy importante es mantener los solventes en recipientes bien cerrados y desecarlos después de purificarlos para evitar que contenga agua.

Los solventes más utilizados son: hexano, heptano, acetonitrilo, metanol, isopropanol, benceno y acetato de etilo.

Sistemas de Inyección

La muestra debe ser introducida al interior de la columna con perturbación mínima sobre el empaque de la columna. Existen dos modos generales:

- a. Flujo detenido
- b. Solvente fluido

La inyección de la muestra por la introducción de la jeringa y forzando la jeringa en una septa elástica es una técnica simple de inyección. Los inyectores con septas para cromatografía líquida son pocos utilizados. La septa entra en contacto con el solvente a alta presión, se debe tomar en cuenta en la búsqueda de una septa, que no sea deteriorada por el solvente.

Columnas y Empaques:

Las columnas para HPLC se fabrican con tubos de vidrio de pared gruesa o acero inoxidable de calibre muy preciso, las primeras se utilizan para presiones por debajo de 40kg/cm². Una columna típica tiene una longitud de 15 a 150 cm con un diámetro interno de 2 a 3 mm. Las columnas más largas (de hasta un metro o más) se preparan conectando secciones de columna más cortas. También se utilizan columnas en espiral a pesar de que ésta configuración da lugar a cierta pérdida de eficiencia.

Las columnas pueden ser divididas por dos grandes grupos:

- a. Analíticas. Tiene un diámetro interno de 2 a 6 mm. La longitud depende del tipo de empaquetado.
- b. Preparativas: Generalmente tiene el diámetro de 6 mm y longitudes de 25 a 100 cm. Las columnas son generalmente operadas a temperatura ambiente.

Los empaques son dependientes sobre el modo de HPLC utilizado (LSC, LLC, intercambio iónico). El tipo más común de empaque es el gel de sílice finamente dividido. En algunas ocasiones se utiliza alumina y céelite.

Detectores Utilizados:

Probablemente los detectores más comunes para la cromatografía líquida de alta resolución son los que se basan en la absorción de la radiación ultravioleta, fluorescencia y visible. También existe el detector de infrarrojo, separan las soluciones del disolvente y de la placa de vidrio montada en un ángulo tal que se produce la reflexión del rayo incidente cuando ambas soluciones difieren en su índice de refracción.

Amplificador y Procesamiento de Señales:

La conversión de la señal del detector al integrador se da una manera similar a la cromatografía de gases. Este paso es acompañado por el despliegue de la señal del detector sobre un reproductor de señal. La composición puede ser determinada después manualmente obteniendo las áreas de los picos. Sin embargo, en años recientes técnicas electrónicas convierten directamente la señal a composición. Esto toma lugar a la invención de minicomputadoras o grandes procesadores de datos (21,26).

ANEXO No. 2

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

La validación de un método analítico es el proceso por medio del cual se establece, a través de estudios de laboratorio, que características del método cumplen con los requerimientos necesarios para la aplicación analítica propuesta. La validación es requerida para cualquier método nuevo o cuando se modifica alguna condición de un método pre-establecido, para asegurar que es capaz de proporcionar resultados confiables y reproducibles, cuando es utilizado por diferentes operadores que usan equipos análogos, ya sea en el mismo o diferente laboratorio.

El tipo de programa de validación requerido depende totalmente del método en particular y su aplicación propuesta.

Para la validación de métodos deben tenerse en cuenta los siguientes parámetros:

Precisión: Es una medida de la reproducibilidad de los resultados del procedimiento bajo circunstancias normales de operación. El parámetro característico de la precisión es la desviación estándar relativa. Describe el error eventual.

Exactitud: Esta indica la desviación entre el valor encontrado y el valor real. Esta desviación puede ser causada por errores sistemáticos constantes y/o

proporcionales. Como medida para la exactitud se utiliza se utiliza el error sistemático. Puede ser determinado por medio de aplicar el método a muestras con concentraciones conocidas. La exactitud es luego calculada de los resultados de prueba como un porcentaje del analito-recuperado del ensayo

Sensibilidad: Por esto se entiende la acción que los factores ambientales, tales como la luz, el oxígeno o la temperatura, ejercen sobre las pruebas de análisis, pudiendo alterar dichas pruebas y modificar los resultados.

Linealidad: Esta es la habilidad del método para obtener resultados ya sea en forma directa o después de una transformación matemática que sea proporcional a la concentración de analito dentro de un rango determinado. En otras palabras es la relación funcional entre la señal y la concentración de la sustancia a medir. Se puede expresar con la ecuación $Y = a x + b$, o por medio de un cálculo de regresión lineal entre los resultados y la concentración.

Rango: Es el intervalo entre el límite inferior y superior en el que el analito ha sido determinado con una precisión, exactitud y linealidad aceptable. Este es determinado por una curva ya sea lineal o no.

Robustez: Es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo una variedad de condiciones un poco diferentes.

Límite de detección: Se refiere a la mínima concentración que puede ser detectada en la muestra, bajo un estado de condiciones experimentales. Es de gran importancia debido que a veces es necesario realizar pruebas de pureza o

ensayos de dosificación. Generalmente se cuantifica como la concentración sensible a una razón de señal:ruido de 2:1.

Límite de Cuantificación Se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser determinada por el sistema con una precisión y exactitud aceptable. Se define como concentración mínima cuantificable a la que tenga una relación señal ruido de 10:1 y se puede confirmar analizando muestras cercanas a este valor.

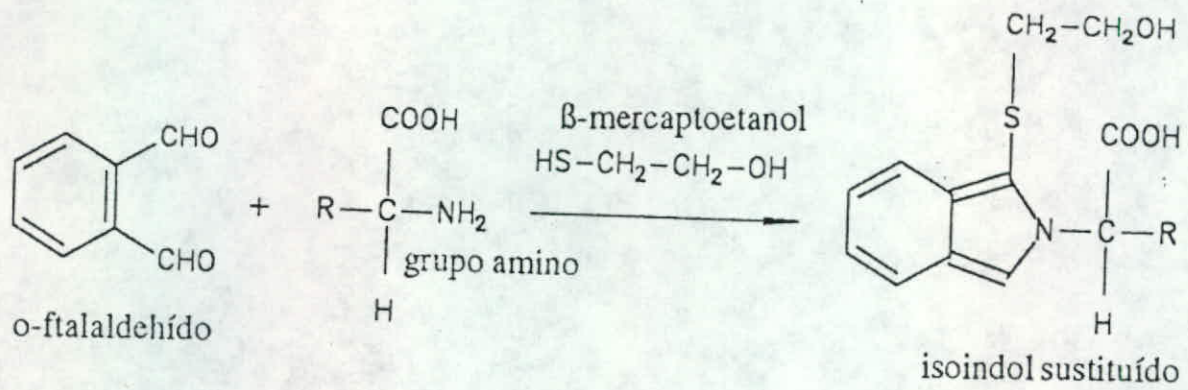
Selectividad y Especificidad La selectividad es la capacidad para medir exacta y específicamente el analito en la presencia de otros componentes en la matriz de la muestra.

La especificidad se refiere a asegurar que la señal de la medición proviene de la sustancia de interés y no de una interferencia del excipiente o de una impureza.

Confiabilidad: La confiabilidad de un método expresa la variación de series de mediciones de la misma muestra. Las condiciones en las cuales estas series son medidas definen la repetibilidad (condiciones idénticas) y la reproducibilidad (36).

ANEXO No. 3

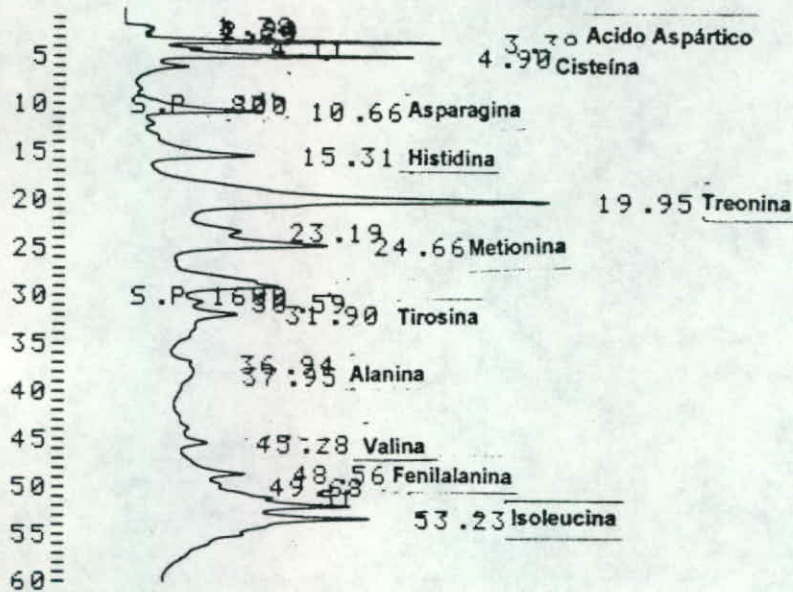
Reacción que se lleva a cabo durante la derivatización de los aminoácidos presentes en hidrolizados de alimentos.



ANEXO No. 4

Cromatograma de un hidrolizado de la planta comestible gushnaili, en el que muestra todos los aminoácidos presentes.

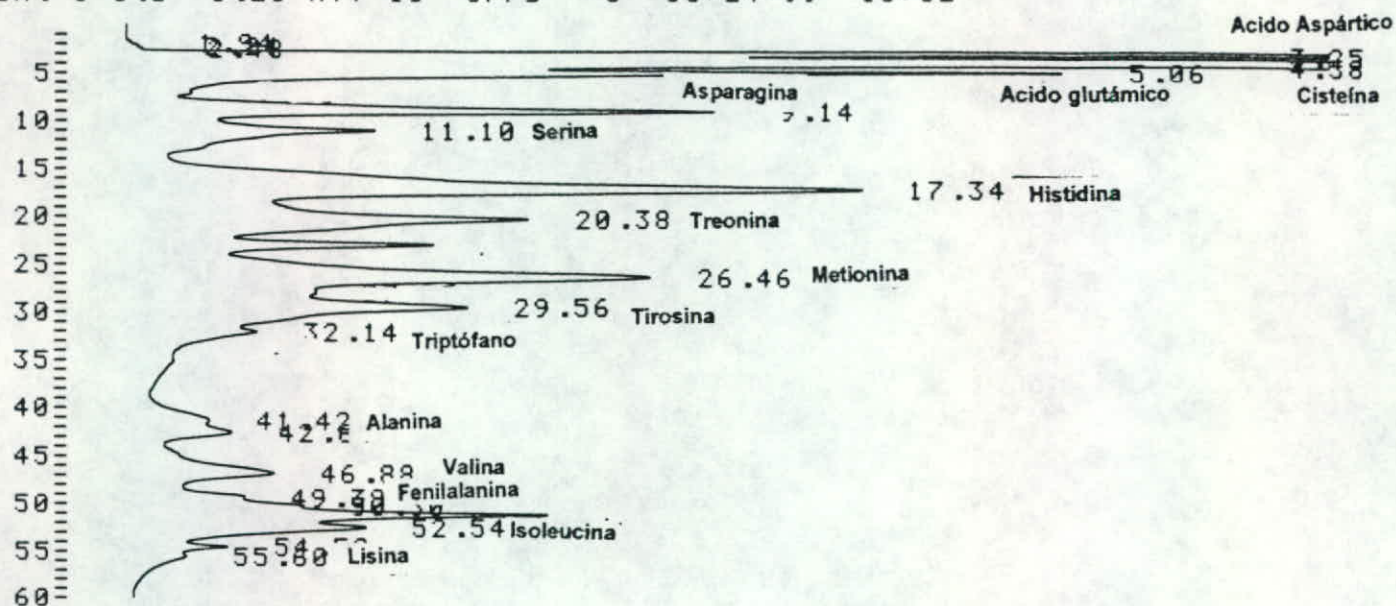
CH. 1 C.S 1.25 ATT 7 OFFS 0 03/25/99 08:40



ANEXO No. 5

Cromatograma de un hidrolizado de la planta comestible chomtee, en el que muestra todos los aminoácidos presentes.

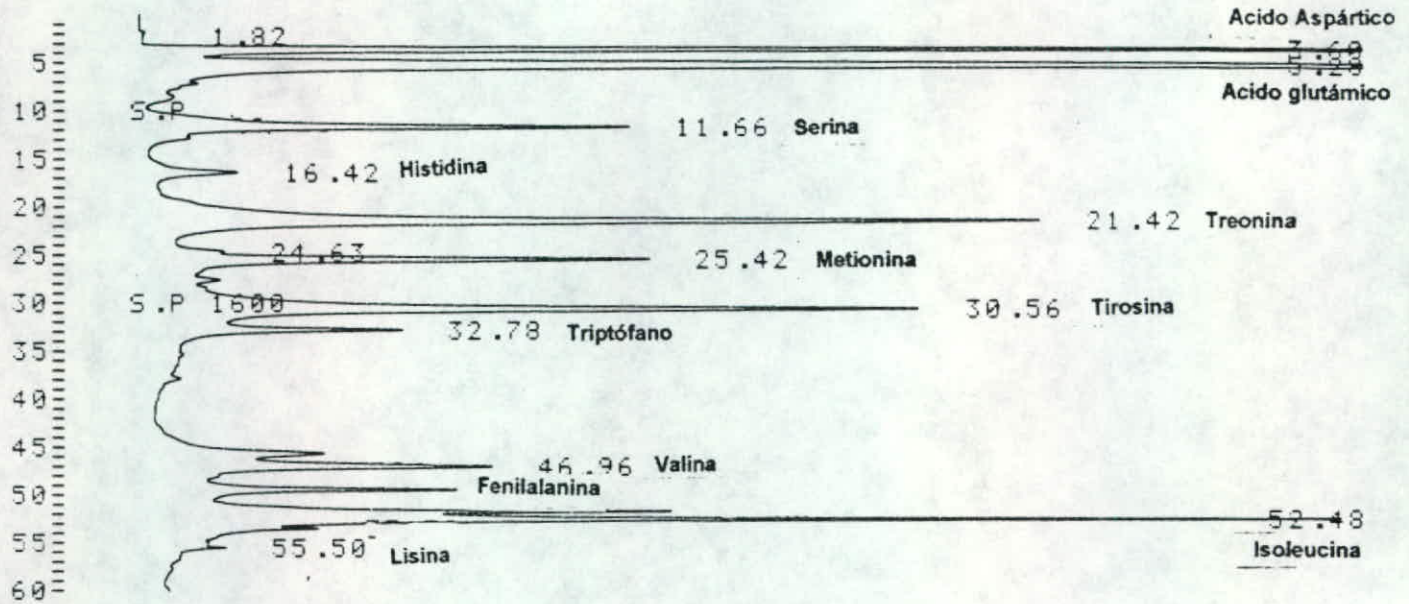
CH. 1 C.5 1.25 ATT 10 OFFS 0 03/24/99 13:52



ANEXO No. 6

Cromatograma de un hidrolizado de salchicha de ternera, en el que muestra todos los aminoácidos determinados.

CH. 1 C.S 1.25 ATT 7 OFFS 0 11/17/98 10:59



ANEXO No. 7

Patrón de aminoácidos reportado del grano de soya obtenido de la USDA Nutrient Database for Standar Reference, Release 12 (March 1998). En este reporte no mencionan el tratamiento del alimento , ni el método de cuantificación.

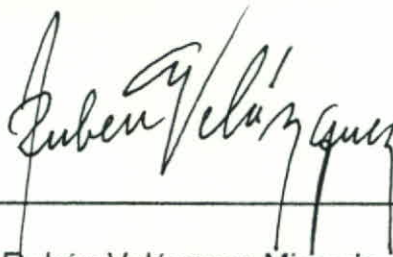
Soy flour, full-fat, raw, crude protein basis (N x 6.25)

NDB No: 16415

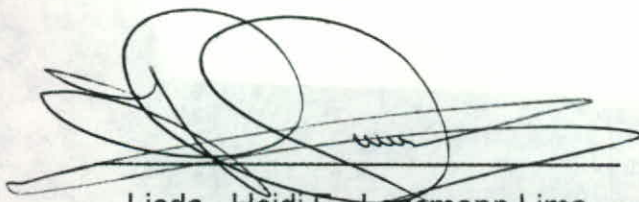
Nutrient	Units	Value per 100 grams of edible portion	Sample Count	Std. Error
Amino acids				
Tryptophan	g	0.502	0	0.000
Threonine	g	1.500	0	0.000
Isoleucine	g	1.675	0	0.000
Leucine	g	2.812	0	0.000
Lysine	g	2.298	0	0.000
Methionine	g	0.466	0	0.000
Cystine	g	0.556	0	0.000
Phenylalanine	g	1.802	0	0.000
Tyrosine	g	1.306	0	0.000
Valine	g	1.724	0	0.000
Arginine	g	2.679	0	0.000
Histidine	g	0.931	0	0.000
Alanine	g	1.627	0	0.000
Aspartic acid	g	4.342	0	0.000
Glutamic acid	g	6.689	0	0.000
Glycine	g	1.597	0	0.000
Proline	g	2.020	0	0.000
Serine	g	2.002	0	0.000



Br. Karen Darlene Valenzuela Elías
TESISTA



Dr. Rubén Velásquez Miranda
ASESOR



Licda. Heidi E. Logemann Lima
DIRECTORA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta
DECANA