



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

*PRUEBA A PUNTO DE METODOLOGÍA
PARA DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO
Y LISINA Y SU APLICACIÓN EN CHUFA (C.
esculentus)*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE LA
CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: MIRIAM VILCHES CORTÉS

TUTOR/A ACADEMICO: MARÍA DOLORES RAIGÓN JIMÉNEZ

Curso *Académico:*

2018/2019

VALENCIA, 05 DE JULIO, 2019

PRUEBA A PUNTO DE METODOLOGÍA PARA DETERMINACIÓN DE TRIPTÓFANO Y LISINA Y SU APLICACIÓN EN CHUFA (*C. esculentus*)

Miriam Vilches Cortés; M.D. Raigón

RESUMEN

La elevada demanda de información relacionada con el valor nutritivo ha dado lugar al desarrollo de métodos analíticos precisos para aminoácidos. La calidad de la proteína depende en gran parte de la composición de sus aminoácidos y su digestibilidad. Por tanto, es importante la identificación del contenido en aminoácidos mediante técnicas analíticas validadas y simples con equipos versátiles que permitan medir la composición en aminoácidos para poder determinar la calidad proteica real, en este caso aplicado en el análisis de chufa (*Cyperus esculentus* L.). Para ello se ha puesto a punto y adaptado el método espectrofotométrico UV/Vis descrito para muestras de cereales, a la determinación de lisina y triptófano en chufa, validando los métodos mediante diferentes criterios analíticos y se han aplicado en la determinación de la calidad de la proteína de chufa, a través del contenido de lisina y triptófano, en chufas procedentes de la zona productora de L'Horta Nord (Valencia) de tres procedencias con dos sistemas de producción: convencional, ecológica de larga trayectoria (ECO 1) y ecológica de reciente implantación (ECO 2). El método ha sido validado siguiendo los criterios de aceptación requeridos en las pautas de validación. Los métodos han presentado una buena repetitividad y un error absoluto, en la mayoría de los casos, inferior a 0.05. En cuanto a la linealidad, las curvas de calibración fueron mayores de 0.99, en los dos métodos. Las diferencias encontradas en la aplicación de los métodos en la cuantificación de los aminoácidos lisina y triptófano en muestras de chufa ecológica y convencional, indican que la fertilización nitrogenada, tanto a nivel de dosis, como de fuente de nitrógeno, como de las diferencias que se pueden generar con el metabolismo de la planta, son los factores que pueden influir no sólo en la cantidad de la proteína, sino en la composición de los aminoácidos y con ello en la calidad proteica.

PALABRAS CLAVE: aminoácidos esenciales, composición nutricional, ecológico, análisis espectrofotométrico.

ABSTRACT

The high demand for information related to nutritional value has related to the development of precise analytical methods for amino acids. The quality of protein depends on the composition of its amino acids and their digestibility. Therefore, it is important to identify the content of amino acids through validated and simple analytical techniques with diverse equipment that can measure the composition in amino acids to determine the real protein quality, in this case

applied in the analysis of tigernut. (*Cyperus esculentus* L.). The UV/Vis spectrophotometric method described for cereal samples has been developed and adapted to the determination of lysine and tryptophan in tigernut, validating the methods by means of different analytical criteria and have been applied in the determination of the quality of tigernut protein, through the content of lysine and tryptophan, in tigernuts from the production area of L'Horta Nord (Valencia) of three systems of origin: conventional, ecological long-path (ECO 1) and ecological of recent implantation (ECO 2). The method has been validated following the acceptance criteria required in the validation guidelines. The methods had good repeatability and an absolute error, in most cases, of less than 0.05. As for linearity, the calibration curves were greater than 0.99, for both cases. The differences found in the application of the methods in the quantification of the amino acids lysine and tryptophan in samples of organic and conventional tiger nut, indicate that the nitrogen fertilization, both at the dose level, the nitrogen source, as well as the differences can generate with the metabolism of the plant, are the factors that can influence not only the amount of the protein, but in the composition of the amino acids and thus in the protein quality.

KEYWORDS: amino acids, essential, nutritional value, ecological, spectrophotometric analysis.

RESUM

L'elevada demanda d'informació relacionada amb el valor nutritiu ha donat lloc al desenrotllament de mètodes analítics precisos per a aminoàcids. La qualitat de la proteïna depèn en gran part de la composició dels seus aminoàcids i la seua digestibilitat. Per tant, és important la identificació del contingut en aminoàcids per mitjà de tècniques analítiques validades i simples amb equips versàtils que permeten mesurar la composició en aminoàcids per a poder determinar la qualitat proteica real, en este cas aplicat en l'anàlisi de xufa (*Cyperus esculentus* L.). Per a això s'ha posat a punt i adaptat el mètode espectrofotomètric UV/Vis descrit per a mostres de cereals, a la determinació de lisina i triptòfan en xufa, validant els mètodes per mitjà de diferents criteris analítics i s'han aplicat en la determinació de la qualitat proteïna de xufa, a través del contingut de lisina i triptòfan, en xufes procedents de la zona productora de L'Horta Nord (València) de tres sistemes de procedència: convencional, ecològica de llarga trajectòria (ECO 1) i ecològica de recent implantació (ECO 2). El mètode ha sigut validat seguint els criteris d'acceptació requerits en les pautes de validació. "Els mètodes han presentat una bona repetitividad i un error absolut, en la majoria dels casos, inferior a 0.05. Quant a la linealitat, les corbes de calibratge van ser majors de 0.99, per als dos mètodes. Les diferències trobades en l'aplicació dels mètodes en la quantificació dels aminoàcids lisina i triptòfan en mostres de xufa ecològica i convencional, indiquen que la fertilització nitrogenada, tant a nivell de dosi, com de font de nitrogen, com de les diferències que es poden generar amb el metabolisme de la planta, són els factors que poden influir no sols en la quantitat de la

proteïna, sinó en la composició dels aminoàcids i amb això en la qualitat proteica.

PARAULES CLAU: aminoàcids, essencials, composició nutricional, ecològic, anàlisi espectre-fotomètric.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son junto con los hidratos de carbono y los lípidos los macronutrientes presentes en los alimentos. Las recomendaciones nutricionales indican que entre el 55 y 60% de la energía debe proceder de los hidratos de carbono, entre el 20 y 25% de los lípidos y entre el 10 y el 15% restante de las proteínas. Si el consumo de glúcidos y/o lípidos no alcanza para compensar las necesidades energéticas, las proteínas se catalizan en el organismo para la obtención de energía (Rolfes, 2011).

Las proteínas están conformadas por 20 aminoácidos conocidos, 9 de los cuales [histidina (His), isoleucina (Ileu), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptófano (Trp) y valina (Val)] son esenciales, es decir, no se sintetizan en los mamíferos, y la única manera de suplirlos es a través de la dieta. La degradación de proteínas es constante y superior a la ingesta diaria, existiendo un sistema de reutilización de aminoácidos para mantener el metabolismo, por lo que es necesario un balance adecuado entre ingesta y excreta de proteínas en la dieta para poder mantener los requerimientos de aminoácidos que el cuerpo necesita (National Research Council, 1989).

La calidad de las proteínas reside en su contenido en aminoácidos esenciales. Las proteínas de origen animal son ricas en la mayoría de los aminoácidos esenciales, por lo que son de alto valor biológico. Las proteínas vegetales son deficitarias en aminoácidos esenciales ricos en azufre como metionina, cistina y cisteína. Por ello, la mezcla de cereales y legumbres proporciona proteínas con cantidades adecuadas de aminoácidos esenciales (Iqbal *et al.*, 2006), dando lugar a proteína de alto valor biológico y de origen vegetal, menos calórica, rica en fibra, sin grasas ni colesterol y con un índice glucémico bajo.

La identificación del contenido en aminoácidos, cada vez es más importante para evaluar la calidad de la proteína de un alimento. Durante los últimos años, la evolución del análisis instrumental ha permitido el análisis y cuantificación de un gran número de aminoácidos, con alta precisión y sensibilidad. Principalmente, tres son las técnicas que se usan con mayor frecuencia, 1) la cromatografía de intercambio iónico y detección por ultravioleta (UV); 2) la separación de derivados volátiles de aminoácidos por cromatografía gaseosa (CG) y detección por espectrometría de masas (EM) y 3) la separación de aminoácidos por cromatografía líquida (CL) y su detección por fluorescencia. Además, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la electroforesis capilar (EC) son otras de las técnicas usadas en la determinación de aminoácidos (Sun *et al.*, 2006). Estas metodologías han sido empleadas con éxito en diferentes matrices alimentarias, pero cuentan con algunos inconvenientes entre los que destacan los altos costes iniciales y de mantenimiento de los equipos, la especificidad del método, la formación del personal técnico, las interferencias con algunas matrices, la lentitud en el

proceso global, la inestabilidad de los analitos en el proceso de análisis, la menor sensibilidad a la determinación de Lys y Trp, etc. Por todo ello, es importante poner a punto metodologías empleando equipos versátiles que permitan la cuantificación precisa de aminoácidos.

La elevada demanda de información relacionada con el valor nutritivo ha dado lugar al desarrollo de métodos analíticos precisos para aminoácidos. El análisis de aminoácidos tiene aplicación directa en diferentes campos de investigación, siendo uno de los más importantes, la estimación del valor nutritivo de alimentos para humanos, incluso para animales. Además, es creciente el número de aplicaciones como la detección de posibles adulteraciones en alimentos y bebidas o la determinación de aminoácidos, péptidos o derivados potencialmente tóxicos producidos por las técnicas de producción, procesado y almacenamiento alimentos (Tezcan *et al.*, 2013).

La composición de los alimentos frescos es altamente variable y está fuertemente relacionada con el sistema productivo (diversidad genética, tipo de suelo, manejo del agricultor, sistemas de fertilización, dosis y calidad el agua de riego, prácticas fitosanitarias, etc.), así como de otras cuestiones, como las condiciones medioambientales. Así el contenido en nitrógeno del suelo y el abonado nitrogenado en los cultivos es un desencadenante del aumento del contenido proteico total en el alimento, aunque estas relaciones se correspondan poco con la distribución de aminoácidos y por tanto de la calidad de la proteína (Johansson *et al.*, 2003). Por otro lado, las condiciones de cultivo y fertilización nitrogenada pueden influir en la concentración de principios activos (Tavarini *et al.*, 2015), así como en la conservación del alimento y tener influencia durante el almacenamiento y posterior procesado, como por ejemplo en el caso de la chufa.

La chufa (*Cyperus esculentus* L.) es un tubérculo del rizoma de la planta herbácea de la familia de las Ciperáceas que lleva el mismo nombre, y la variedad población cultivada en la zona valenciana pertenece a la variedad botánica *sativus* (Boeck.). En algunos países los tubérculos de chufa se utilizan como pienso. En lo referente al consumo humano con la chufa se fabrica la horchata (bebida refrescante obtenida mediante la mezcla de extracto de chufas trituradas con agua y según el gusto azucarada), que goza de una enorme tradición en la Comunidad Valenciana, desde donde se ha extendido al resto de la geografía española (Melián, 2002). En los últimos años, la harina de chufa también se está utilizando para otras elaboraciones y procesados alimenticios debido a su potencial nutricional (Albors *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la harina de chufa es una fuente rica de proteínas, minerales como el hierro y el calcio (Oladele y Aina, 2007). El componente mayoritario de la chufa son los hidratos de carbono, seguido de los lípidos y las proteínas. Según la base de datos Española de Composición de Alimentos, el contenido de proteína total es de 6.13 g/100 g de porción comestible (BEDCA, 2006). Además, contiene una alta fracción de aminoácidos esenciales (Bosch *et al.*, 2005), siendo el predominante la arginina, seguido del ácido aspártico, el ácido glutámico, leucina, alanina y lisina. Metionina, isoleucina, triptófano y valina son los que se encuentran en menor proporción (Bixquert Jiménez, 2016).

Los objetivos del presente estudio son: 1) La puesta a punto y adaptación del método espectrofotométrico UV/Vis descrito por Villegas *et al.* (1984), para el caso de cereales, a la determinación de lisina y triptófano en chufa, validando el método mediante diferentes criterios analíticos. 2) Aplicar el método en la determinación de la calidad proteica de chufa, a través del contenido en lisina y triptófano, en chufa de tres orígenes (de agricultura ecológica de larga trayectoria, ecológica de reciente implantación y de agricultura convencional), procedente de la zona productora de L'Horta Nord (Valencia), de tres sistemas productivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Puesta a punto del método para la determinación de los aminoácidos lisina y triptófano. Para la puesta a punto y optimización del método analítico de lisina se parte del trabajo de Tsai *et al.* (1975) modificado por Villegas *et al.* (1984) para muestras de maíz. Este método utiliza el compuesto 2-cloro-3,5-dinitropiridina, que reacciona con el grupo ϵ -amino de lisina, después de haber bloqueado con cobre los grupos α -amino de los aminoácidos y de los péptidos de bajo peso molecular presentes en el hidrolizado proteico. El ϵ -dinitropiridil lisina formado es soluble en agua, pero insoluble en acetato de etilo, lo que permite que los demás compuestos formados durante la reacción sean eliminados con el acetato de etilo, suprimiendo también el exceso del reactivo 2-cloro-3,5-dinitropiridina. La absorbancia de la disolución acuosa de ϵ -dinitropiridil lisina se lee en un espectrofotómetro de UV-visible a 390 nm. El contenido de lisina se calcula en base a una curva estándar y se expresa para el porcentaje de muestra seca.

En la determinación del contenido en triptófano se parte del método de Opienska-Blauth *et al.* (1963), modificado por Hernández y Bates (1969), y aplicado por Villegas *et al.* (1984) en muestras de maíz. En este método, el grupo indol del triptófano reacciona con el ácido glioxílico en presencia de ácido sulfúrico concentrado para formar un complejo coloreado que presenta un máximo de absorción a 560 nm.

En la optimización analítica se comenzó aplicando los métodos bibliográficos sin modificaciones y comprobando la linealidad de las rectas de calibración y la repetitividad. Para ello, se emplearon muestras de chufa y se incluyó un blanco y dos testigos de concentraciones conocidas de lisina y triptófano. En función de los resultados se realizaron ajustes en las disoluciones y tiempos hasta encontrar los parámetros analíticos idóneos.

Validación de los métodos de determinación de lisina y triptófano. El protocolo de validación del método se basó en las pautas de validación descritas por Eurachem Guide (2014). Los parámetros que empleados para validar el método han sido exactitud, precisión (repetitividad y reproducibilidad), linealidad y veracidad (error absoluto y error relativo). Para el procedimiento de validación, se llevaron a cabo quince repeticiones para cada tipo de muestra de chufa.

La exactitud es la propiedad por la que una medida o el representante de una serie de medidas se acerca al valor real o de referencia aceptado (Sánchez y Villalobos, 2010). El término exactitud se refiere a una combinación de precisión y veracidad.

La precisión es el grado de dispersión o concordancia que presentan los resultados que se obtienen cuando se mide repetidamente un determinado valor de una variable, bajo unas condiciones fijas. Se expresa normalmente como porcentaje de desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV). El coeficiente de variación se determina a través de la expresión:

$$CV(\%) = \frac{s}{x} 100$$

Donde s = desviación estándar ; x = valor promedio de las medidas.

La veracidad es el grado de concordancia entre el resultado obtenido de forma experimental y el valor verdadero. El error se ha cuantificado como error absoluto: Error absoluto (Ea) = $|\bar{x} - \mu|$

Donde \bar{x} = valor experimental en la medida; μ = valor aceptado como valor verdadero de la misma.

Y error relativo (Er) que se calcula como el cociente entre el error absoluto y el valor aceptado verdadero, multiplicado por 100.

Al igual que el error absoluto puede ser positivo o negativo (según lo sea el error absoluto) porque puede ser por exceso o por defecto, aunque se expresarán en valor absoluto.

En todos los casos se tomará el valor aceptado como verdadero, el valor promedio de cada una de las quince repeticiones, para cada tipo de chufa.

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta que sea proporcional a la cantidad de analito que se habrá de determinar en la muestra (Sandoval *et al.*, 2010). La linealidad se calcula mediante la obtención de la recta de regresión a partir de los valores de absorbancia de los patrones, utilizando el método de mínimos cuadrados. El criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el valor del coeficiente de correlación (r^2). Como criterio, se estable un r^2 mínimo de 0.995.

Procedencia y tratamiento previo de las muestras de chufa. Los tubérculos de chufa empleados en el presente trabajo proceden de campos de cultivo situados en la comarca de L'Horta Nord de Valencia. Las chufas proceden de dos sistemas productivos (ecológico y convencional) y para el caso del ecológico, las chufas pertenecían a dos explotaciones agrícolas diferentes; una de ellas (ECO 1) procede de un agricultor con una alta trayectoria en agricultura ecológica, estando las parcelas certificadas bajo la normativa europea (CE) 834/2007, desde hace más de 20 años. La segunda muestra ecológica (ECO 2) procede de una explotación con dos años de vigencia en la certificación ecológica. Las diferencias en la composición del suelo de las diferentes procedencias de chufa se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Resumen de la composición del suelo de las tres procedencias de chufa

	Convencional	ECO 2	ECO 1
pH en agua (Extracto 1:2.5)	8.18	7.90	8.14

pH en KCl (Extracto 1:2.5)	7.71	7.65	7.84
Conductividad (dS/m, extracto 1:5)	0.428	0.502	0.507
Carbonatos totales (%)	30.5	30.2	30.0
Materia orgánica (%)	2.1	2.3	4.6
Nitrógeno total (%)	0.22	0.16	0.21
Fósforo asimilable (ppm)	527	402	682
Potasio asimilable (ppm)	291	423	510

La tabla 2 muestra la composición nutricional obtenida de los diferentes tipos de chufa.

Tabla 2. Composición nutricional de la chufa de las tres procedencias de chufa

	Convencional	ECO 2	ECO 1
Proteína (%)	4.05	3.93	4.48
Grasa (%)	12.5	14.5	15.5
Hidratos de carbono (%)	30.8	30.0	34.8
Azúcares totales (%)	3.20	3.42	3.09
Fibra (%)	16.61	16.09	10.26
Ácidos grasos saturados (%)	18.149	17.262	17.188
Ácidos grasos monoinsaturados (%)	72.719	73.324	73.326
Ácidos grasos poliinsaturados (%)	9.125	9.435	9.482

Previo al análisis de aminoácidos, la chufa fue desecada, triturada, homogeneizada y tamizada. El desecado se realizó en estufa a 105 °C, hasta peso constante de las muestras. Una vez secas las muestras se Trituran y se pasan por un tamiz de 1 mm de diámetro. La harina de chufa seca y tamizada se sometió a un proceso de desgrasado en un extractor (modelo ST 243, Soxtec, Suecia) siguiendo el protocolo de extracción de grasa en alimentos en general. Las muestras para desgrasar se introdujeron en los dedales de extracción. En los vasos de recogida de grasa se añadió 40 ml del disolvente (éter de petróleo a 40-60 °C) y se realizó un ciclo de arrastre de vapor durante 135 minutos (FOSS, 2007).

Determinación de lisina en muestras de chufa. Los reactivos empleados han sido: disolución reguladora de fosfato 0.03 M a pH 7.4; disolución de papaína de latex de papaya (Sigma, USA) (4 mg de papaína por ml de disolución reguladora a pH 7.4 de fosfato 0.03 M); disolución reguladora a pH 9.0 de carbonato 0.05 M; disolución reguladora a pH 9.0 de borato 0.05 M; suspensión de fosfato de cobre (mezcla de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$); disolución 1.2 N de HCl; disolución al 3% en metanol de 2-cloro-3,5-dinitropiridina; acetato de etilo; lisina (L-Lysine extra pure, Scharlau).

Para la determinación, se realiza una hidrólisis previa de la muestra, para ello se pesan en balanza analítica (modelo AB204-S, Mettler Toledo, España), con exactitud 100 mg de muestra pulverizada y desengrasada y se introducen en un tubo de ensayo, al que se le adiciona 5 ml de la disolución de papaína. Se homogeniza la mezcla en el vortex y se lleva a incubar a 63 ± 2 °C durante 16 h, en estufa modelo 3P-092, J.P Selecta, SA (España). Durante las dos

primeras horas de incubación, los tubos se van agitando para facilitar la exposición de la muestra a la enzima. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos.

Para el análisis, se toma 1 ml del sobrenadante y se introducen en un tubo de centrifuga, donde se añaden 0.5 ml de la disolución reguladora de carbonato 0.05 M y 0.5 ml de la suspensión de fosfato de cobre. Las muestras se agitan en un agitador orbital (modelo orbital shaker S01, Stuart Scientific, UK) durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de agitación se centrifuga durante 5 minutos a 2500 rpm. Del sobrenadante se toma una alícuota de 1 ml y se transfiere a un tubo de ensayo, al que se le añade 0.1 ml de la disolución 2-cloro-3,5-dinitropiridina, agitando con el vortex y se deja reposar durante 2 h, en la oscuridad, agitando cada 30 minutos. Pasado este tiempo, se añaden 5 ml de HCl 1.2 N a cada muestra y se agita vigorosamente. Se añaden otros 5 ml de acetato de etilo y se mezclan bien, invirtiendo los tubos al menos 10 veces para extraer así la fase acuosa (figura 1). Este paso se repite 3 veces, para intentar arrastrar todo el acetato de etilo.



Figura 1. Fase orgánica, en color amarillo (parte superior) fase acuosa, incolora (parte inferior)

La determinación de la lisina se realiza directamente sobre la fase acuosa en el espectrofotómetro de UV-Vis (UViline 9400, Schott Instruments) a la longitud de onda de 390 nm. En cada tanda de muestras se prepara una recta de calibrado con un rango de 0 a 250 μg de lisina por ml, a partir de patrón de lisina de concentración 2500 μg por ml (preparar diariamente). El proceso se realiza de forma idéntica para el blanco y los puntos de la recta de calibrado.

El contenido de lisina de las muestras se obtiene directamente a partir de la absorbancia, extrapolando el resultado en la curva de calibrado. El resultado se expresa en g/100 g de muestra seca.

Determinación de triptófano en muestras de chufa. Los reactivos empleados han sido: anhídrido acético; reactivo A formado por $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en ácido acético glacial más 3% anhídrido acético; reactivo B que es una disolución de ácido sulfúrico 30 N; reactivo C (1:1, volumen/volumen de reactivo A y reactivo B), este reactivo se prepara una hora antes de uso; disolución reguladora a pH 7.0 de acetato de sodio 0.1 M; disolución de

papaína de latex de papaya (Sigma, USA) (4 mg de papaína por ml de disolución de acetato de sodio 0.1 M a pH 7.0); triptófano (L-tryptophan extrapure Farnur, Scharlau).

Para la determinación, se realiza una hidrólisis previa de la muestra, para ello se pesan en balanza analítica (modelo AB204-S, Mettler Toledo, España), con exactitud 80 mg de muestra pulverizada y desengrasada y se introducen en un tubo de ensayo, al que se le adiciona 3 ml de la disolución de papaína. Se homogeniza la mezcla en el vortex y se lleva a incubar a 63 ± 2 °C durante 16 h, en estufa modelo 3P-092, J.P Selecta, S.A. (España). Durante las dos primeras horas de incubación, los tubos se van agitando para facilitar la exposición de la muestra a la enzima. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugan a 2500 rpm durante 5 minutos.

Del sobrenadante se toma 1 ml que se introducen en un tubo de centrifuga y se añaden 4 ml de reactivo C. Esta disolución contiene ácido glioxílico, compuesto que es capaz, en presencia de triptófano, de producir un compuesto coloreado. Se agita vigorosamente la muestra y se incuba a 63 ± 2 °C durante media hora para máximo desarrollo de color. Se enfría rápidamente la muestra sumergiendo el tubo en agua y hielo, para paralizar la reacción exotérmica, y se mide la absorbancia a 560 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro UV/Vis (UViline 9400, Schott Instruments).

En cada tanda de muestras se prepara una recta de calibrado con un rango de 0 a 175 µg de triptófano por ml, a partir del patrón de triptófano de concentración 200 µg por ml (preparar diariamente). El proceso se realiza de forma idéntica para el blanco y los puntos de la recta de calibrado.

El contenido en triptófano de las muestras se obtiene directamente a partir de la absorbancia, extrapolando el resultado en la curva de calibrado. El resultado se expresa en g/100 g de muestra seca.

Análisis estadístico. Para el cálculo y tratamiento de datos se empleó el programa Microsoft Excel 2010. Para el tratamiento comparativo de los resultados del contenido en lisina y triptófano de la chufa, se realizó un análisis de la varianza mediante el programa Statgraphics Centurion versión XVII.II. Los datos experimentales fueron evaluados mediante ANOVA de un solo factor, error estándar de estimación y la menor diferencia significativa del test de Fisher (F-test) y el p-valor derivado como se describe por Ott (1977). Los resultados se consideran significativos cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del método para la determinación de los aminoácidos lisina y triptófano. La puesta a punto de la metodología en la determinación del contenido de triptófano en la chufa requirió de cinco pruebas (tabla 3), hasta obtener una buena linealidad.

En la prueba 1, las modificaciones con respecto al método de referencia fueron el empleo del reactivo B a una concentración 38 N, la utilización de cubeta de plástico, la realización del cero con agua destilada y la incubación de la recta de calibrado sin papaína. Estas modificaciones fueron realizadas por acomodación a las condiciones de trabajo del laboratorio y porque en el

método de referencia faltaba explicación con respecto a la operatividad analítica. El resultado de esta prueba fue una linealidad baja de la curva de calibrado ($r^2=0.9756$) y la desestimación de algunos parámetros, como por ejemplo el material de la cubeta y el cero de agua destilada. Además de la baja linealidad del método se obtuvieron valores muy variables de la absorbancia, es decir con poca repetitividad, posiblemente debido a factores de interferencias en la lectura espectrofotométrica. Esta primera prueba permitió agilizar la operatividad analítica, en el empleo de micropipetas, toma de volúmenes, etc.

En la prueba 2, las modificaciones con respecto al método de referencia y a la prueba 1 son el empleo del reactivo B a una concentración 38 N, la utilización de cubeta de cuarzo, la realización del cero con acetato de sodio, ya que es el reactivo con el que se realiza la disolución de papaína y la incubación de la recta de calibrado sin papaína. Además, se realizaron algunas modificaciones para evitar posibles interferencias. Para ello, se emplearon tubos de reacción más pequeños, para facilitar la exposición de la muestra a la reacción enzimática.

La metodología inicial indica un tiempo de reacción de 15 minutos, este tiempo se vio que era insuficiente, para observar el máximo desarrollo del color, por lo que se amplió a 30 minutos.

Por otro lado, la reacción que se produce es muy exotérmica, por lo que en la medición espectrofotométrica, el mínimo movimiento de los tubos va a iniciar la reacción, por lo que una vez sacados de la estufa, se enfrían rápidamente en agua con hielo paralizando así la reacción. En el proceso de enfriamiento, se producen gotas de condensación del ácido acético glacial, para eliminar estas interferencias, se sumergen los tubos en un baño de ultrasonidos. Para comprobar la eliminación de las interferencias se realizan las medidas a las longitudes de onda de 560 y 750 nm, valorando la diferencia en la lectura procedente de ambas longitudes de onda. Con estas modificaciones se obtuvo resultados repetitivos en la medida, aunque la linealidad de la recta de calibrado no fue la idónea ($r^2=0.9531$).

En la prueba 3, las modificaciones con respecto al método de referencia y a la prueba 1 y 2 son el empleo del reactivo B a una concentración 38 N, la utilización de cubeta de cuarzo, el empleo de baño de ultrasonidos, la realización del cero con acetato de sodio, ya que es el reactivo con el que se realiza la disolución de papaína, el empleo del reactivo C en caliente, antes de transcurrida la hora de reposo, y la incubación de la recta de calibrado sin papaína. El resultado de esta prueba fue una baja linealidad en la curva de calibrado ($r^2=0.9653$) y la desestimación de algunos parámetros, como por ejemplo, la importancia de esperar como mínimo una hora en el tiempo de reposo del reactivo C, hasta alcanzar la temperatura ambiente, para evitar influir en la cinética de la reacción.

En la prueba 4, las modificaciones con respecto al método de referencia y a las pruebas anteriores son el empleo del reactivo B a una concentración 30 N, la utilización de cubeta de cuarzo, el empleo de baño de ultrasonidos, el transcurso de 30 minutos de incubación, la realización del cero con acetato de sodio, el empleo del reactivo C transcurrido al menos una hora de reposo, la

adición del 3% de anhídrido acético al reactivo A y la incubación de la recta de calibrado sin papaína. La adición del 3% de anhídrido acético se justifica porque algunas partidas del ácido acético glaciar pueden estar libres de aldehídos y no producir suficiente ácido glioxílico para reaccionar con el triptófano y dar el producto coloreado deseado, que pueda ser medible en el espectrofotómetro. El resultado de esta prueba fue una baja linealidad en la curva de calibrado ($r^2=0.9324$). En esta prueba se evaluó la importancia de la realización de la curva de calibrado en el momento, así como la importancia de realizar la hidrólisis en el momento del análisis. Para ello, se evaluaron rectas de fechas anteriores y se compararon las lecturas con la realizada en el momento. También se emplearon muestras hidrolizadas en días anteriores. La conclusión fue que la curva hay que realizarla diariamente junto con las disoluciones patrones de triptófano y las muestras, para evitar la degradación del hidrolizado, frente a lo que indica la bibliografía de referencia que dice que el extracto hidrolizado de las muestras, se pueden conservar.

En la prueba 5, las modificaciones con respecto al método de referencia y a las pruebas anteriores son el empleo del reactivo B a una concentración 30 N, la utilización de cubeta de cuarzo, el empleo de baño de ultrasonidos, el transcurso de 30 minutos de incubación, la realización del cero con acetato de sodio, el empleo del reactivo C transcurrido al menos una hora de reposo, la adición del 3% de anhídrido acético al reactivo A y la realización diaria de las curvas y los hidrolizados de muestra con la incorporación de papaína en los puntos de la curva de calibrado, alcanzando condiciones idénticas en la curva patrón y en las muestras (figura 2). El resultado de esta prueba fue una buena linealidad en la curva de calibrado ($r^2=0.9952$) y en la repetitividad de los resultados, llegando a la idoneidad del método.

Tabla 3. Resumen de las modificaciones en las condiciones de reacción de la optimización de triptófano en chufa

	Modificaciones	Linealidad	Toma de decisión
Prueba 1	Reactivo B concentrado 38 N; cubeta de plástico; cero con agua destilada; curva sin papaína	$r^2=0.9756$	No idóneo. Cambio de material de cubeta, cambio de reactivo para el cero
Prueba 2	Reactivo B concentrado 38 N; cubeta de cuarzo; cero con acetato de sodio; curva sin papaína; tubos más pequeños; incubación de 30 minutos; eliminación de interferencias por ultrasonidos	$r^2=0.9531$	No idóneo. Se incluye el baño de ultrasonidos para eliminar las interferencias
Prueba 3	Reactivo B concentrado 38 N; cubeta de cuarzo; cero con acetato de sodio; curva sin papaína; baño de ultrasonidos; reactivo C caliente	$r^2=0.9653$	No idóneo. Mantener el tiempo de reposo en la elaboración del reactivo C
Prueba 4	Adición del 3% de anhídrido acético al reactivo A; reactivo B 30 N; cubeta de cuarzo; comprobación de la curva de calibración	$r^2=0.9324$	No idóneo. Mantener la concentración 30 N del reactivo B, la adición del anhídrido acético y la realización diaria de

Prueba 5	Adición del 3% de anhídrido acético al reactivo A; reactivo B 30 N; cubeta de cuarzo; realización curva patrón diariamente; incorporación de papaína a los puntos de la recta de calibrado	$r^2=0.9952$	Idóneo
----------	--	--------------	--------

En conclusión, para la determinación de triptófano en muestras de chufa, la hidrólisis de las muestras hay que realizarla en tubos roscados pequeños, procurando en todo momento que la muestra no se adhiera a las paredes internas del tubo y que esté en contacto con la papaína en la reacción enzimática. La temperatura y tiempo de digestión de la muestra se mantienen tal y como se indica en el procedimiento de partida, aunque los hidrolizados junto con el reactivo C se incubaron durante media hora para favorecer el



máximo desarrollo de color. Las interferencias en la reacción se evitan enfriando rápidamente la reacción y aplicando un baño de ultrasonidos, y para garantizar la producción de suficiente ácido glioxílico se adiciona al reactivo A un 3% de anhídrido acético. Además, la curva de calibrado y las muestras deben estar en idénticas condiciones, realizando la hidrólisis diariamente y adicionando a cada punto de la recta de calibrado la papaína necesaria para la reacción enzimática.

Figura 2. Hidrólisis de muestras y blanco tras la incubación (izquierda) y disoluciones coloreadas para la medición espectrofotométrica de triptófano (derecha)

La optimización en la determinación de lisina siguió los mismos pasos que se describen en el método de referencia, excepto en el tipo de lisina usada para la preparación de la disolución patrón. En este caso se ha usado L-lisina extra pura, por lo que los cálculos fueron modificados conforme a su molaridad. La eliminación de interferentes se ha llevado a cabo químicamente, donde los grupos α -amino de los aminoácidos y de los péptidos de bajo peso molecular presentes en el hidrolizado proteico han sido bloqueados por el compuesto 2-

cloro-3, 5-dinitropiridina. Para la lisina se hizo sólo una prueba ensayo, obteniendo idóneos resultados de repetitividad y linealidad ($r^2=0.9960$).

Con la optimización de los dos métodos, se pueden realizar 60 muestras diarias de cada aminoácido, teniendo en cuenta que se requieren las 16 h previas de incubación.

Validación de los métodos espectrofotométricos de determinación de lisina y triptófano. Los parámetros empleados en la validación de los métodos de determinación de los aminoácidos lisina y triptófano han sido la precisión (repetitividad y reproducibilidad), linealidad y veracidad (error absoluto y error relativo).

La tabla 4 muestra los resultados de la desviación estándar, la varianza, el coeficiente de variabilidad y los errores absoluto y relativo para el análisis de lisina, en los tres tipos de chufa.

Tabla 4. Desviación estándar, varianza, coeficiente de variabilidad y errores relativo y absoluto de la determinación de lisina.

Muestra	[Lys] (g/100 g)	Desviación estándar	Varianza	CV (%)	Er(%)	Ea
CONVENCIONAL	0.295	0.030	0.0009	11.74	16.60	0.04
	0.301	0.034	0.0012	13.42	18.97	0.05
	0.349	0.068	0.0046	26.83	37.94	0.10
	0.333	0.057	0.0032	22.36	31.62	0.08
	0.328	0.053	0.0028	20.96	29.64	0.08
	0.220	0.023	0.0005	9.22	13.04	0.03
	0.245	0.006	0.0000	2.24	3.16	0.01
	0.226	0.019	0.0004	7.55	10.67	0.03
	0.217	0.025	0.0006	10.06	14.23	0.04
	0.224	0.021	0.0004	8.11	11.46	0.03
	0.208	0.032	0.0010	12.58	17.79	0.05
	0.217	0.025	0.0006	10.06	14.23	0.04
	0.213	0.028	0.0008	11.18	15.81	0.04
	0.195	0.041	0.0017	16.21	22.92	0.06
0.214	0.028	0.0008	10.90	15.42	0.04	
ECO 2	0.280	0.042	0.0017	18.88	26.70	0.06
	0.273	0.037	0.0014	16.64	23.53	0.05
	0.238	0.012	0.0001	5.44	7.69	0.02
	0.246	0.018	0.0003	8.00	11.31	0.03
	0.246	0.018	0.0003	8.00	11.31	0.03
	0.183	0.027	0.0007	12.16	17.19	0.04
	0.190	0.022	0.0005	9.92	14.03	0.03
	0.199	0.016	0.0002	7.04	9.95	0.02
	0.257	0.025	0.0006	11.52	16.29	0.04
	0.232	0.008	0.0001	3.52	4.98	0.01
	0.224	0.002	0.0000	0.96	1.36	0.00
	0.206	0.011	0.0001	4.80	6.79	0.02
	0.198	0.016	0.0003	7.36	10.41	0.02
	0.148	0.052	0.0027	23.36	33.03	0.07
0.198	0.016	0.0003	7.36	10.41	0.02	
ECO 1	0.313	0.013	0.0002	4.57	6.46	0.02
	0.322	0.020	0.0004	6.73	9.52	0.03
	0.319	0.018	0.0003	6.01	8.50	0.03
	0.322	0.020	0.0004	6.73	9.52	0.03

0.353	0.042	0.0017	14.19	20.07	0.06
0.283	0.008	0.0001	2.65	3.74	0.01
0.299	0.004	0.0000	1.20	1.70	0.01
0.311	0.012	0.0001	4.09	5.78	0.02
0.322	0.020	0.0004	6.73	9.52	0.03
0.313	0.013	0.0002	4.57	6.46	0.02
0.226	0.048	0.0023	16.35	23.13	0.07
0.252	0.030	0.0009	10.10	14.29	0.04
0.246	0.034	0.0012	11.54	16.33	0.05
0.253	0.029	0.0008	9.86	13.95	0.04
0.276	0.013	0.0002	4.33	6.12	0.02

Se observa que, en general, el método en la determinación de lisina es bastante preciso, la repetitividad es buena y los errores absolutos son inferiores, en la mayoría de los casos, a 0.05. La chufa de producción convencional parece que da valores ligeramente más variables, con coeficientes de variabilidad que en algunos casos supera el 20%.

La tabla 5 muestra los resultados de la desviación estándar, la varianza, el coeficiente de variabilidad y los errores absoluto y relativo para el análisis de triptófano, en los tres tipos de chufa.

Tabla 5. Desviación estándar, varianza, coeficiente de variabilidad y errores relativo y absoluto de la determinación de triptófano.

Muestra	[Trp] (g/100 g)	Desviación estándar	Varianza	CV (%)	Er(%)	Ea
CONVENCIONAL	0.063	0.00283	0.00001	4.229	5.981	0.004
	0,067	0,00007	0,00000	0,101	0,142	0,000
	0,067	0,00024	0,00000	0,364	0,515	0,000
	0,060	0,00497	0,00002	7,418	10,491	0,007
	0,065	0,00126	0,00000	1,877	2,655	0,002
	0,070	0,00227	0,00001	3,387	4,790	0,003
	0,065	0,00137	0,00000	2,044	2,890	0,002
	0,062	0,00352	0,00001	5,261	7,440	0,005
	0,049	0,01250	0,00016	18,655	26,382	0,018
	0,062	0,00354	0,00001	5,290	7,481	0,005
	0,070	0,00205	0,00000	3,061	4,328	0,003
	0,074	0,00513	0,00003	7,660	10,833	0,007
	0,072	0,00329	0,00001	4,913	6,948	0,005
	0,077	0,00703	0,00005	10,491	14,837	0,010
	0,082	0,01028	0,00011	15,338	21,691	0,015
ECO 2	0.025	0.01944	0.00038	29.011	52.862	0.027
	0.073	0.01477	0.00022	28.403	40.168	0.021
	0.028	0.01698	0.00029	32.654	46.180	0.024
	0.026	0.01806	0.00033	34.728	49.112	0.026
	0.069	0.01173	0.00014	22.566	31.913	0.017
	0.033	0.01355	0.00018	26.064	36.860	0.019
	0.074	0.01578	0.00025	30.337	42.902	0.022
	0.070	0.01289	0.00017	24.787	35.054	0.018
	0.059	0.00501	0.00003	9.627	13.614	0.007
	0.063	0.00786	0.00006	15.114	21.374	0.011
	0.082	0.02129	0.00045	40.936	57.892	0.030
	0.074	0.01528	0.00023	29.385	41.556	0.022
	0.038	0.00979	0.00010	18.830	26.630	0.014
	0.032	0.01442	0.00021	27.731	39.218	0.020
	0.030	0.01528	0.00023	29.390	41.564	0.022

ECO 1	0.068	0.00690	0.00005	13.267	16.821	0.010
	0.076	0.01257	0.00016	21.675	30.653	0.018
	0.043	0.01070	0.00011	18.454	26.098	0.015
	0.035	0.01647	0.00027	28.391	40.151	0.023
	0.063	0.00329	0.00001	5.681	8.034	0.005
	0.063	0.00360	0.00001	6.210	8.782	0.005
	0.047	0.00806	0.00006	13.897	19.653	0.011
	0.070	0.00868	0.00008	14.966	21.165	0.012
	0.061	0.00239	0.00001	4.115	5.820	0.003
	0.054	0.00311	0.00001	5.356	7.575	0.004
	0.025	0.02353	0.00055	40.572	57.378	0.033
	0.035	0.01606	0.00026	27.687	39.155	0.023
	0.084	0.01857	0.00034	32.018	45.280	0.026
	0.065	0.00521	0.00003	8.985	12.706	0.007
	0.084	0.01866	0.00035	32.176	45.504	0.026

Para la determinación del triptófano, el método muestra mayor variabilidad, sobre todo cuando las matrices son de muestras ecológicas.

En relación a la linealidad del método, la verificación del comportamiento del analito mediante una curva de calibración requiere un mínimo de cinco puntos para un intervalo de confianza del 95%. Los rangos de calibración para las muestras de lisina se prepararon a partir de seis diluciones sobre un patrón estándar de lisina de 2500 µg por ml y las muestras de triptófano a partir de ocho diluciones sobre un patrón estándar de triptófano de 200 µg por ml. Los coeficientes de regresión determinados a partir de las curvas de calibración fueron mayores de 0.99, para los dos casos.

Contenido en lisina y triptófano en muestras de chufa. Los métodos optimizados para la determinación de lisina y triptófano en chufa se han aplicado en la determinación cuantitativa de estos aminoácidos en muestras de chufa (ecológicas y convencional) de la zona productora de L'Horta Nord. La tabla 6 muestra los resultados promedios (g/100 g de chufa) del contenido en lisina y triptófano en cada caso, así como los intervalos de confianza basados en el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) ($p=0.05$).

Tabla 6. Análisis comparativo tipo del contenido en lisina [Lys] y triptófano [Trp] en muestras de chufa

Procedencia	[Lys]		[Trp]	
	Significación	Promedio±LSD	Significación	Promedio±LSD
Convencional	A	0.252±0.0136	B	0.067 ± 0.0020
ECO 2	A	0.221±0.0094	A	0.051 ± 0.0056
ECO 1	B	0.294±0.0093	AB	0.058 ± 0.0046

Se observa que en el estudio de composición de los contenidos de lisina y triptófano en chufas existen diferencias significativas ($p<0.05$) en función de la procedencia de la chufa. Las muestras de chufa de producción ecológica, con una larga trayectoria productiva, son las que mayor contenido en lisina presenta, con diferencias significativas frente a los niveles de las concentraciones que presentan las muestras de chufa convencionales y las ECO 2 (de corta trayectoria ecológica). No se observan diferencias

significativas entre los niveles de lisina de las chufas de producción convencional y las ECO 2. Según la FAO (1970) el contenido en lisina en la chufa cruda es de 0.175 g/100 g de chufa, en todos los casos, los niveles de lisina obtenidos en las chufas de L'Horta Nord son superiores a los que se indican en bibliografía.

Para el contenido en triptófano, se observan también diferencias estadísticamente significativas (95% de confianza) de forma que las chufas de producción convencional son las que presentan mayor contenido en este aminoácido, presentando diferencias frente a los niveles de triptófano de la chufa ecológica de corta trayectoria. Mientras que no se presentan diferencias entre los niveles de la chufa convencional y la ecológica de larga trayectoria, ni entre los dos tipos de ecológicas. Según la FAO (1970) el contenido en triptófano en la chufa cruda es de 0.035 g/100 g de chufa, en todos los casos, los niveles de triptófano obtenidos en las chufas de L'Horta Nord son superiores a los que se indican en bibliografía. El triptófano, es un aminoácido que favorece la síntesis de serotonina como neurotransmisor ayudando a la transmisión del impulso nervioso, favorece la síntesis de melatonina regulando el sueño y es precursor de la vitamina B3 (Estruch, 2003).

Los resultados del presente estudio dan unos valores más altos de lisina y triptófano que los valores estipulados en la referencia bibliográfica. La variación en los resultados del estudio comparativo puede deberse principalmente a que las concentraciones dependen de la fertilización del cultivo, la etapa de maduración y la edad de la planta en la cosecha, así como a las condiciones climáticas (Cooper *et al.*, 2007), tal y como muestran los análisis de la composición de los suelos de donde proceden los tres tipos de chufas y la composición nutricional de las mismas.

Las diferencias encontradas en los contenidos de los aminoácidos en función de las diferentes procedencias de la chufa, son concluyentes con otros ensayos reportados en estudios comparativos entre sistemas productivos ecológicos y convencionales (Huber *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2018; Granstedt *et al.*, 1997). Algunos estudios encontraron que los alimentos orgánicos tenían un alto contenido de proteína, tal vez porque el metabolismo de las plantas se dirigió hacia el proceso de aumentar algunos aminoácidos esenciales cuando la fuente de nitrógeno era limitada (Rembiałkowska, 2007). Un mayor contenido de proteínas en alimentos ecológicos puede deberse a una mayor capacidad de translocación de nitrógeno en condiciones de fertilización orgánica. Esta capacidad puede ser debida a una mayor adaptación a condiciones de poca disponibilidad de nitrógeno, frente a los sistemas de producción convencional, bajo condiciones de uso abundante de fertilizantes nitrogenados.

El mayor contenido en triptófano de las chufas de producción convencional es concluyente con otros estudios donde se ha encontrado concentraciones totales de N más altas, pero una menor calidad de la proteína en cultivos convencionales, expresados como índice de aminoácidos esenciales y nivel de utilización de proteínas netas (Worthington, 2001;

Benbrook *et al.*, 2008; Herencia *et al.*, 2011). Estos autores indican que la mayor tasa de fertilización con nitrógeno en los sistemas de producción convencionales puede ser la causa que explique la diferencia.

CONCLUSIONES

La espectrofotometría de UV-visible permite cuantificar de manera sensible, rápida y sencilla determinados aminoácidos esenciales involucrados en la calidad proteica de los cereales. El método validado es reproducible y cumple con los criterios de aceptación requeridos en las pautas de validación para la aplicabilidad del método en otras matrices como es el caso de los tubérculos. Por lo tanto, el método servirá como una herramienta confiable para evaluar la composición de aminoácidos en chufa. El uso de éstas técnicas analíticas simples para el análisis de los aminoácidos esenciales, permitirá determinar el contenido de aminoácidos presentes en los alimentos y que estos métodos sean aptos para cualquier laboratorio con el fin de poder determinar la calidad proteica de los alimentos.

Las diferencias encontradas en la aplicación de los métodos en la cuantificación de los aminoácidos lisina y triptófano en muestras de chufa ecológica y convencional, indican que la fertilización nitrogenada, tanto a nivel de dosis, como de fuente de nitrógeno, como de las diferencias que se pueden generar con el metabolismo de la planta, son los factores que pueden influir no sólo en la cantidad de la proteína, sino en la composición de los aminoácidos y con ello en la calidad proteica.

REFERENCIAS

Albors, A.; Raigon, M.D., García-Martínez, M.D.; Martín-Esparza, M.E. (2016). "Assessment of techno-functional and sensory attributes of tiger nut fresh egg tagliatelle". *LWT-Food Science and Technology*, 74: 183-190.

BEDCA (2006). <http://www.bedca.net/> [Consulta: 06 de agosto de 2018].

Benbrook, C.; Zhao, X.; Yáñez, J.; Davies, N.; Andrews, P. (2008). "New evidence confirms the nutritional superiority of plant-based organic foods". Boulder, CO: The Organic Center. Disponible en: <http://organic-center.org/reportfiles/NutrientContent-Report.pdf>

Bixquert Jiménez, M. (2016). "La horchata de chufa: propiedades saludables y de prevención de enfermedades digestivas". *Tesis doctoral. Universidad de Valencia, área docente de Digestivo del Departamento de Medicina*.

Bosch, L.; Alegria, A.; Farre, R. (2005). "RP-HPLC determination of tiger nut and orgeat amino acid contents". *Food science and technology international*, 11(1): 33-40.

Cooper, J.; Niggli, U.; Leifert, C. (2007). "Manual of organic food quality and safety". Handbook of organic food safety and quality. Woodhouse Publishing Ltd., Cambridge, Reino Unido, 544 pp.

Estruch S.S. (2003). *Triptófano: aminoácido amigo. Dietética y nutrición. Revisiones monográficas*. Natura. 21(1): 34-38.

Eurachem Guide. (2014). "The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". 2nd ed. Disponible en: www.eurachem.org

FAO. (1970). "Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas". *Servicio de Ciencia y Política de la Alimentación*. Italia, p.84.

FOSS. (2007). "Determinación de la grasa total en alimentos generales utilizando la combinación de SoxCap™ 2047 con sistemas de extracción Soxtec". *Nota de aplicación 3903*, Suecia.

Granstedt, A.; Kjellenberg, L.; Roinila, P. (1997). "Effects of organic and inorganic fertilizers on soil fertility and crop quality". *International Conference on Agricultural Production and Nutrition*: Boston, Massachusetts: 79-90.

Herencia, J.F.; García-Galavís, P.A.; Dorado, J.A.R.; Maqueda, C. (2011). "Comparison of nutritional quality of the crops grown in an organic and conventional fertilized soil". *Scientia horticulturae*, 129(4): 882-888.

Hernandez, H.H.; Bates, L.S. (1969). "A modified method for rapid tryptophan analysis of maize". *CIMMYT. Research Bulletin*, 13. Mexico City, Mexico. 7 pp.

Huber, M.; Rembiałkowska, E.; Średnicka, D.; Bügel, S.; Van De Vijver, L.P.L. (2011). "Organic food and impact on human health: Assessing the status quo and prospects of research". *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3-4): 103-109.

Iqbal, A.; Khalil, I.A.; Ateeq, N.; Khan, M.S. (2006). "Nutritional quality of important food legumes". *Food Chemistry*, 97(2): 331-335.

Johansson, E.; Prieto-Linde, M.L.; Svensson, G.; Jönsson, J.Ö. (2003). "Influences of cultivar, cultivation year and fertilizer rate on amount of protein groups and amount and size distribution of mono- and polymeric proteins in wheat". *The Journal of Agricultural Science*, 140(3): 275-284.

Melián, N.A. (2002). "El cultivo de la chufa en la Comunidad Valenciana: Importancia económica". *Agrícola Vergel*, 246: 368-374.

National Research Council. (1989). "Recommended Dietary Allowances". 10th ed. *National Academies Press* (US). United States.

Oladele, A.K.; Aina, J.O. (2007). "Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tiger nut (*Cyperus esculentus*)". *Afr. J. Biotechnol.*, 6: 2473-2476.

Opienska-Blauth, J.; Charęziński, M.; Berbec, H. (1963). "A new, rapid method of determining tryptophan". *Analytical Biochemistry*, 6(1): 69-76.

Ott, L. (1977). "An introduction to statistical methods and data analysis". *Duxbury Press, a Division of Wadsworth Publishing*. Belmont, CA, 1-208.

Rembiałkowska, E. (2007). "Quality of plant products from organic agriculture". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(15): 2757-2762.

Rolfes, S.R.; Pinna, K.; Whitney, E. (2011). "Understanding Nutrition and Clinical Nutrition". (9th ed.). Belmont, USA: Wadsworth, Cengage Learning.

Sánchez, J.; Villalobos, M. (2010). "Tratamiento de los resultados analíticos: Aplicación de la estadística en el laboratorio". Ediciones Ceysa. Cano Pina, S.L. España.

Sandoval, S.; Duffau, B.; Rojas, F.; Guerrero, I.; Roa, L.; Rodríguez, L.; ... Aguilera, M. (2010). "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía Técnica, número 1. *Instituto de Salud Pública de Chile*. Santiago de Chile.

Sun, S.W.; Lin, Y.C.; Weng, Y.M.; Chen, M.J. (2006). "Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification". *Journal of food composition and analysis*, 19(2-3): 112-117.

Tavarini, S.; Sgherri, C.; Ranieri, A.M.; Angelini, L.G. (2015). "Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and antioxidant

properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni". *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(31): 7041-7050.

Tezcan, F.; Uzaşçı, S.; Uyar, G.; Öztekin, N.; Erim, F.B. (2013). "Determination of amino acids in pomegranate juices and fingerprint for adulteration with apple juices". *Food chemistry*, 141(2): 1187-1191.

Tsai, C.Y.; Dalby, A.; Jones, R.A. (1975). "Lysine and tryptophan increases during germination of maize seed". *Cereal Chem.*, 52: 356-360.

Villegas, E.; Ortega, E.; Bauer, R. (1984). "Chemical methods used at CIMMYT for determining protein quality in cereal grains". Mexico: CIMMYT. México. 35 pp.

Worthington, V. (2001). "Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains". *J. Altern. Complement. Med.*, 7: 161-173.

Yu, X.; Guo, L.; Jiang, G.; Song, Y.; Muminov, M.A. (2018). "Advances of organic products over conventional productions with respect to nutritional quality and food security". *Acta Ecologica Sinica*, 38(1): 53-60.