



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“CUANTIFICACION DE GLICOALCALOIDES EN 12 VARIETADES COMERCIALES DE PAPA MEXICANA (Solanum tuberosum) POR CROMATOLOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

BEATRIZ SERRANO ALTAMIRANO



MEXICO, D. F.



QUIMICOS PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

PROFRA. ANGELA SOTELO LOPEZ.

VOCAL

PROF. BERNARDO LUCAS FLORENTINO.

SECRETARIO

PROFRA. LUCIA CORNEJO BARRERA.

1ER. SUPLENTE

PROFRA. LUCIA HERNANDEZ GARCIADIEGO.

2DO. SUPLENTE

PROFRA. LETICIA GIL VIEYRA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**Laboratorio 111, Departamento de Farmacia. División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Química. UNAM.**

ASESOR DEL TEMA



M. en C. Angela Sotelo López.

SUSTENTANTE



Beatriz Serrano Altamirano.

*Dedicada a la memoria de mi madre
Elodia Altamirano Reyes . . .*

*Gracias mamá por haberme dado el
regalo más hermoso, La Vida . . .
Y por haberme enseñado ha amarla.*

Agradecimientos . . .

Agradezco a mi padre todo el apoyo que me ha brindando a través de mi vida.

Gracias papá, te quiero.

Por su comprensión y cariño a mi hermanita Claudia.

Muchas gracias, te quiero.

A mi tío Angel por su apoyo, por las cosas maravillosas que he aprendido de él y porque me ha enseñado que la vida está simplemente conformada por las cosas más sencillas

Gracias tío, te quiero mucho.

A Oscar por su grandiosa amistad, por estar junto a mí en todo momento y por el maravilloso amor que me brinda.

Gracias Oscar, eres mi inspiración.

A mis amigos: Marisol, Yamiri, Lorena, Oscar Mercado, Marina, Genaro . . .

Gracias por brindarme su invaluable amistad.

Gracias a mi querida Universidad, a los profesores por sus consejos y enseñanzas y por haber sido parte fundamental de mi formación profesional.

Muchas gracias.

Agradezco infinitamente a Rosita Argote por su cariño y amistad

Gracias Rosita, te quiero mucho.

Gracias a la señora Vicky por escucharme, por motivarme y alentarme a seguir adelante.

Muchas gracias, la quiero mucho.

A Lety Gil por su valiosa amistad y por brindarme su ayuda y su confianza.

Por haberme brindando la oportunidad de participar y formar parte del laboratorio III y por su apoyo y ayuda muchas gracias a la M. en C. Angela Sotelo López.

Gracias por creer en mi.

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por proporcionarme las muestras de papa para la realización de este trabajo.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo proporcionado mediante los proyectos: M214394 e M202998. Así mismo agradezco a la Fundación UNAM por la beca otorgada para la realización del presente trabajo.

Agradezco a todos mis sinodales el haber aceptado participar en mi examen profesional

Agradezco a todas aquellas personas que han creído en mí y me han apoyado . . .

Gracias

Índice

I. Lista de tablas y gráficas.	III
II. Lista de figuras.	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
3. GENERALIDADES	
3.1 Papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	3
3.1.1 Clasificación Taxonómica.	4
3.1.2 Historia del procesamiento de la papa.	4
3.1.3 Usos de la papa.	5
3.1.4 Cultivo de papa en México.	7
3.1.5 Valornutritivo de la papa.	9
3.2 Glicoalcaloides.	12
3.2.1 Toxicología.	16
3.2.2 Propiedades de sabor.	17
3.2.3 Tolerancia de niveles de TGA en papas destinadas al consumo.	18
3.2.4 Distribución de glicoalcaloides.	18
3.2.5 Función de los glicoalcaloides en la papa.	20
3.2.6 Análisis de glicoalcaloides en la papa.	21
3.3 Principios de Cromatografía.	23
3.3.1 Desarrollo histórico.	23
3.3.2 Clasificación.	24
3.3.3 Cromatografía líquida "Clasica" y cromatografía líquida de alta presión.	25
3.3.4 Mecanismos de separación en cromatografía líquida.	26
3.3.5 Terminos más usuales, empleados en cromatografía de líquidos de alta eficiencia.	28
3.4 Instrumental en Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.	31

3.4.1 Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.	31
3.4.2 Sistema de bombeo.	32
3.4.3 Válvula inyectora.	32
3.4.4 Columnas.	32
3.4.5 Detectores.	33
3.4.6 Registrador.	34
3.5 Fundamentos de Validación.	35
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Preparación de la muestra.	39
4.2 Determinación de humedad.	43
4.3 Técnica de extracción de glicoalcaloides de papa.	43
4.4 Validación de la técnica cromatográfica.	45
4.5 Separación y cuantificación de glicoalcaloides en papas comerciales.	48
4.6 Tratamiento estadístico de los resultados	48
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
5.1 Técnica de extracción de glicoalcaloides de papa.	49
5.2 Validación.	51
5.3 Separación y cuantificación de glicoalcaloides en papas comerciales.	61
5.4 Determinación de humedad	75
6. CONCLUSIONES.	84
7. BIBLIOGRAFÍA.	85

I. LISTA DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla No. 1. Parámetros cromatográficos obtenidos bajo las condiciones de trabajo.	51
Tabla No. 2. Curva patrón de α -Solanina.	52
Tabla No. 3. Evaluación estadística para linealidad del sistema con α -Solanina.	53
Tabla No. 4. Curva patrón de α -Chaconina.	53
Tabla No. 5. Evaluación estadística para linealidad del sistema con α -Chaconina.	53
Gráfica No. 1. Linealidad de método para α -Solanina.	54
Gráfica No. 2. Linealidad de método para α -Chaconina.	54
Tabla No. 6. Datos de altura para obtener la precisión del método.	55
Tabla No. 7. Evaluación estadística para precisión del método.	55
Tabla No. 8. Datos de recobro de α -Solanina para linealidad del método.	55
Tabla No. 9. Evaluación estadística para linealidad del método con α -Solanina.	56
Tabla No. 10. Datos de recobro de α -Chaconina para linealidad del método.	56
Tabla No. 11. Evaluación estadística para linealidad del método con α -Chaconina.	56
Tabla No. 12. Datos de recobro de α -Solanina para exactitud del método.	57
Tabla No. 13. Evaluación estadística para exactitud del método con α -Solanina.	57
Tabla No. 14. Datos de recobro de α -Chaconina para exactitud del método.	58
Tabla No. 15. Evaluación estadística para exactitud del método con α -Chaconina.	58
Tabla No. 16. Datos para la determinación de repetibilidad del método por α -Solanina	59
Tabla No. 17. Evaluación estadística para repetibilidad del método por α -Solanina .	59
Tabla No. 18. Datos para la determinación de repetibilidad del método α -Chaconina.	59
Tabla No. 19. Evaluación estadística para repetibilidad del método por α -Chaconina.	59
Tabla No. 20. Datos obtenidos para límite de cuantificación y detección para α -Solanina	60
Tabla No. 21. Datos obtenidos para límite de cuantificación y detección para α -Chacon.	60
Tabla No. 22. Datos obtenidos en la evaluación de estabilidad de la muestra.	61
Tabla No. 23. Análisis de Varianza para estabilidad de la muestra para α -Solanina.	61
Tabla No. 24. Análisis de Varianza para estabilidad de la muestra para α -Chaconina.	61
Tabla No. 25. Glicoalcaloides presentes en cáscara de papa (en base seca).	74
Tabla No. 26. Glicoalcaloides presentes en pulpa de papa (en base seca).	74
Tabla No. 27. Contenido de humedad en cáscara y pulpa de diversas variedades de papa.	75
Tabla No. 28. Glicoalcaloides presentes en cáscara de papa (en base húmeda).	76
Tabla No. 29. Glicoalcaloides presentes en pulpa de papa (en base húmeda).	77

Gráfica No. 3. Glicoalcaloides Totales en cáscara de papa comercial.	78
Gráfica No. 4. Porcentaje de glicoalcaloides en cáscara de papa comercial.	79
Gráfica No. 5. Glicoalcaloides Totales en pulpa de papa comercial.	80
Gráfica No. 6. Porcentaje de glicoalcaloides en pulpa de papa comercial.	81

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de colestano.	12
Figura 2. Estructura de los alcaloides de Solanidina (glicosidos y aglicona)	13
Figura 3. Estructura de algunos espirosolanos presentes en las Solanaceas.	14
Figura 4. Ruta de biosíntesis de la aglicona de los glicoalcaloides presentes en papa.	15
Figura 5. Cromatograma típico.	28
Figura 6. Representación gráfica de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.	31
Figura 7. Válvula inyectora.	32
Figura 8. Cromatograma de extracto de pulpa de papa Alpha obtenido por el método 1.	49
Figura 9. Cromatograma de extracto de pulpa de papa Alpha obtenido por el método 2.	49
Figura 10. Cromatograma obtenido de estándares de α -Solanina y α -Chaconina.	50
Figura 11. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Alpha.	62
Figura 12. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Alpha.	62
Figura 13. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Atzimba.	63
Figura 14. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Atzimba.	63
Figura 15. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Juanita.	64
Figura 16. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Juanita.	64
Figura 17. Cromatograma del extracto de cáscara de papa López.	65
Figura 18. Cromatograma del extracto de pulpa de papa López.	65
Figura 19. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Marciana.	66
Figura 20. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Marciana.	66
Figura 21. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Michoacán.	67
Figura 22. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Michoacán.	67
Figura 23. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Montsama.	68
Figura 24. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Montsama.	68

Gráfica No. 3. Glicoalcaloides Totales en cáscara de papa comercial.	78
Gráfica No. 4. Porcentaje de glicoalcaloides en cáscara de papa comercial.	79
Gráfica No. 5. Glicoalcaloides Totales en pulpa de papa comercial.	80
Gráfica No. 6. Porcentaje de glicoalcaloides en pulpa de papa comercial.	81

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de colestano.	12
Figura 2. Estructura de los alcaloides de Solanidina (glicosidos y aglicona)	13
Figura 3. Estructura de algunos espirosolanos presentes en las Solanaceas.	14
Figura 4. Ruta de biosíntesis de la aglicona de los glicoalcaloides presentes en papa.	15
Figura 5. Cromatograma típico.	28
Figura 6. Representación gráfica de un cromatógrafo de líquidos de alta presión.	31
Figura 7. Válvula inyectora.	32
Figura 8. Cromatograma de extracto de pulpa de papa Alpha obtenido por el método 1.	49
Figura 9. Cromatograma de extracto de pulpa de papa Alpha obtenido por el método 2.	49
Figura 10. Cromatograma obtenido de estándares de α -Solanina y α -Chaconina.	50
Figura 11. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Alpha.	62
Figura 12. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Alpha.	62
Figura 13. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Atzimba.	63
Figura 14. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Atzimba.	63
Figura 15. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Juanita.	64
Figura 16. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Juanita.	64
Figura 17. Cromatograma del extracto de cáscara de papa López.	65
Figura 18. Cromatograma del extracto de pulpa de papa López.	65
Figura 19. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Marciana.	66
Figura 20. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Marciana.	66
Figura 21. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Michoacán.	67
Figura 22. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Michoacán.	67
Figura 23. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Montsama.	68
Figura 24. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Montsama.	68

Figura 25. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Murca.	69
Figura 26. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Murca.	69
Figura 27. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Norteña.	70
Figura 28. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Norteña.	70
Figura 29. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Puebla.	71
Figura 30. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Puebla.	71
Figura 31. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Rosita.	72
Figura 32. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Rosita.	72
Figura 33. Cromatograma del extracto de cáscara de papa Tollocan.	73
Figura 34. Cromatograma del extracto de pulpa de papa Tollocan.	73

1. Introducción

El presente proyecto de investigación forma parte de una serie de investigaciones encaminadas a caracterizar química y toxicológicamente a las principales variedades de papa que se comercializan y consumen en México. Las variedades de papa fueron desarrolladas (algunas de ellas son producto de investigaciones sobre mejoramiento genético), cultivadas y caracterizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) dependiente de la Secretaría de Agricultura.

Estudios recientes han mostrado que la papa es un cultivo que produce alta cantidad de proteína por hectárea, 2.2 % por ha, además de que esta proteína es de gran calidad, ya que tiene un adecuado balance de los aminoácidos indispensables, siendo solo deficiente en aminoácidos azufrados. También presenta riqueza en hidratos de carbono y vitamina C, y el cultivo es resistente a la sequía. Todas estas características indican que la papa es un cultivo importante para la alimentación humana, aun cuando en nuestro país no es ampliamente aprovechado en la dieta del mexicano. Por otro lado, los glicoalcaloides, Solanina y Chaconina se encuentran normalmente presentes en el género *Solanum* al cual pertenecen estas variedades de papa mexicana, por ello resulta de suma importancia determinar cuál es la concentración de dichos alcaloides en las papas, cuál o cuáles de ellas los contienen en mayor concentración y cómo es la distribución en cáscara y pulpa.

Estos glicoalcaloides son sustancias importantes por su potencial tóxico, ya que son inhibidores de la colinesterasa. Una concentración arriba de 20 mg por 100 g de peso fresco de papa puede ser causante de malestares gastrointestinales, desordenes neurológicos y daño hemolítico del tracto gastrointestinal. En casos graves provoca edemas cerebrales, coma, calambres y hasta la muerte.

Por todo lo antes mencionado resulta necesario realizar este trabajo para caracterizar toxicológicamente a estos tubérculos que se producen en México y de los cuales no se tiene informe del contenido de glicoalcaloides, empleando técnicas modernas como la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) en virtud de las ventajas que esta técnica ofrece en el análisis de alcaloides.

2. Objetivos

Objetivo General:

- Realizar la Cuantificación de los principales glicoalcaloides (α -Solanina y α -Chaconina) en las 12 variedades de papa mexicana de mayor comercialización en el país mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Objetivos Específicos:

- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la cuantificación de los glicoalcaloides α -Solanina y α -Chaconina en cáscara y pulpa de papa.
- Realizar el estudio de validación del método cromatográfico propuesto.

3

Generalidades

3.1 *Papa* (Palabra de origen Quechua).

Por definición la papa es un tallo subterráneo y no una raíz, ya que posee nodos, ojos y otras características de los tallos (1).

Las especies de papa pertenecen a la sección **Petota** del subgénero *Potatoe* del género *Solanum* de la familia de la Solanaceae. De esta sección existen 8 especies cultivadas, siendo las más importantes *Solanum tuberosum* L. y *Solanum tuberosum* var. *andigenum* (2).

La papa común pertenece al género ***Solanum***, especie ***tuberosum***, y es originaria de los Andes del Perú, Bolivia y Chile.

De todas las especies de papas que existen en el continente americano, 31 se encuentran en la parte boreal, principalmente en México, y el resto habita en la parte austral, sobre todo en Perú. Del grupo de papas cultivadas, *Solanum tuberosum* es cultivada desde épocas tempranas por los nativos sudamericanos y debe haber representado una fuente de alimento de trascendental importancia para el desarrollo de la civilización Inca. Posteriormente esta especie se convirtió en uno de los cultivos más importantes para todas las poblaciones humanas que viven en regiones templadas o frías del mundo (3).

Actualmente se cultiva en todo el mundo. En muchos países es la comida básica como el arroz, el pan o las pastas; en algunos países como Alemania Oriental, la Ex - Unión Soviética y Polonia se consumen alrededor de 180 Kg de papa per capita por año.

En otros países como los Estados Unidos de Norteamérica, la papa procesada ha alcanzado altos niveles de refinamiento industrial y gran variedad en la presentación del producto.

El cultivo de la papa en México esta considerado como de los más importantes en el contexto de la producción de alimentos, siendo solamente superado por el maíz, trigo, frijol y arroz (4).

3.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA. (4)

Reino	Vegetal
División	Tracheophyta
Sub-división	Pteropsida
Clase	Angiosperma
Orden	Metaclamideae
Familia	Solanaceae
Género	Solanum
Especie	tuberosum
Nombre común	papa

3.1.2 HISTORIA DEL PROCESAMIENTO DE LA PAPA.

El camino seguido por la papa, ha sido trazado desde 200 años antes de Cristo, época en la cual, los nativos incas la cultivaban, en las montañas y empleaban un método para su deshidratación, el cual consistía en la congelación durante la noche y una descongelación en el transcurso del día después de los cuales los tubérculos eran exprimidos con los pies para obtener su jugo; este ciclo se repetía hasta que el contenido de humedad era reducido lo suficiente como para preservar la papa durante mucho tiempo.

Cerca de 2000 años después este proceso fue "redescubierto" en Inglaterra, donde actualmente se emplea bajo el nombre de "deshidratación por congelamiento y presión".

Por muchos años, la papa sirvió como fuente primaria de alimento para los incas, ya que por el método de deshidratación que conocían, era posible tenerla disponible en épocas en las que era difícil su cultivo como por ejemplo durante las nevadas o con alguna condición desfavorable para su desarrollo. Cuando los españoles arribaron al nuevo mundo, la papa se distribuyó completamente por todo el Sur y Centroamérica, México y algunas partes del sur de los Estados Unidos. En Perú, los nativos a través de siglos de cultivo, han desarrollado variedades que raramente son reconocidas, como papa.

Tanto los ingleses como los españoles, reconocieron el gran valor de las papas como alimento, ya que inmediatamente las introdujeron en sus barcos como provisión, además de llevarlas a su país. En 1584, la papa se introdujo en España, donde era considerada como un lujo; en 1588 se emplearon en Italia como alimento para ganado y durante los últimos años del siglo XVI fue introducida en Inglaterra (en 1596) en donde solo era cultivada en los jardines, posteriormente paso a Alemania en 1601. No fue sino hasta fines del siglo XVIII y principios del XIX, que su uso como alimento vino a ser uno de los más importante en Europa, a pesar de presentar dos grandes desventajas con respecto a los cereales: A) su corta vida de anaquel, y B) el gran volumen que ocupaba.

Durante la primera guerra mundial, Europa y Estados Unidos manufacturaron un gran número de productos deshidratados a partir de papa para consumo militar; esta industria desapareció después de la guerra, quedando una considerable cantidad de harina de papa, la cual fue empleada para consumo humano y para ganado. Este producto se siguió produciendo en algunas partes de Europa y lentamente se extendió en Estados Unidos e Inglaterra.

Actualmente este tubérculo es uno de los de mayor producción en el mundo debido a que puede desarrollarse en una gran variedad de suelos y climas además de representar la mayor parte en la dieta de la gente de muchas partes del mundo.

Aunque el uso de la papa como alimento para humanos es muy grande en Europa, grandes cantidades de ésta son empleadas en la elaboración de alimento para ganado, producción de almidón y en la obtención de alcohol (2).

3.1.3 USOS DE LA PAPA.

Las principales formas procesadas de la papa son: congeladas (en su mayoría fritas a la francesa), en hojuelas deshidratadas, enlatadas y en forma de harina. Cantidades similares se preparan como ensaladas, sopas, estofados, pasteles y otros artículos.

En países como Estados Unidos, el procesamiento de la papa es muy importante por lo que su uso se encuentra dividido en la siguiente forma:

Disposición del cultivo	%
Alimento Fresco	54
Procesado	28
Almidón y otros	4
Perdidas	4
Semillas	10

Los porcentajes total para papa procesada es del 48% dividido en:

Producto	%
Hojuelas de papa	31
Papa congelada	44
Deshidratada	22
Enlatada	3

Una ventaja que presentan las formas procesadas de la papa, es que éstas mantienen un nivel de precio muy constante no solo dentro de un año, sino de un año a otro.

El tamaño de la cosecha y la abundancia del producto crudo, casi no se reflejan en los precios de las formas procesadas de la papa que se ofrecen al consumidor (1, 5).

En el mundo se cuentan más de un millar de variedades de papas, desde el punto de vista de su aprovechamiento se agrupan en:

- **Variedades Industriales:** se caracterizan por su riqueza en féculas del 19 al 20 %. Son resistentes al frío y a las enfermedades y son generalmente tardías. La pulpa esta formada por células grandes y de color blanco.
- **Variedades de gran consumo:** están constituidas por tubérculos de pulpa blanca, formados por células más pequeñas, son utilizadas tanto en la alimentación humana como en la de algunos animales domésticos, especialmente cerdos, también se emplea para la extracción de fécula.

- Otras variedades: consideradas como más finas, tienen pulpa amarilla, suelen ser precoces y de rápido desarrollo. La pulpa esta formada por células pequeñas y apretadas (4).

En el país existen básicamente dos tipos de papa empleada para el procesamiento y, de acuerdo a esto hay dos formas de consumo y diversos usos como son:

A. CONSUMO HUMANO.

***PAPA FRESCA**

B.CONSUMO INDUSTRIAL.

B1 INDUSTRIA TEXTIL

***APRESTO PARA TELAS**

B2 INDUSTRIA ALIMENTARIA

***FRITURAS**

***PAPA ENLATADA**

***ALIMENTOS INFANTILES**

***PASTAS**

***GALLETAS**

***PASTELES**

***PRODUCTOS LACTEOS**

***ADITIVOS**

***AROMATIZANTES**

***BEBIDAS ALCOHOLICAS**

***ALIMENTO PARA GANADO**

B3 INDUSTRIA FARMACEUTICA: ADHESIVOS

***TALCO QUIRURGICO (1, 5)**

3.1.4 CULTIVO DE PAPA EN MEXICO

En el país son 24 las entidades que siembran papa, destacando Veracruz, Sinaloa, Puebla, México, Chihuahua, Nuevo León, Guanajuato y Michoacán, en conjunto aportan aproximadamente el 72 % de toda la producción nacional.

La papa se da principalmente en Puebla, Veracruz, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán, así como en los valles altos, en la meseta central y en el eje volcánico del país, lo mismo en áreas de temporal como en las de riego (6).

Actualmente, en México se cultivan alrededor de 80 mil hectáreas de papa, con una producción cercana al millón de toneladas. México, desde hace muchos años, es autosuficiente en papa y en su cultivo aún se tiene un amplio potencial productivo (7).

Se cultivan en forma comercial diversas variedades de papa, siendo la más empleada las siguientes:

CASCARA ROJA	CASCARA AMARILLA O BLANCA
Sangema o rosita	Greta
Juanita	Alpha
Murca	Atzimba
López	

Atendiendo al color de la pulpa de los tubérculos, las papas pueden clasificarse en variedades de pulpa blanca y de pulpa amarilla. En México las variedades de siembra más usuales de acuerdo a la coloración de la pulpa, son:

BLANCA:

Alpha

Prevalent

Patrones

CREMA:

Greta

Furore

Rosita

Montsama

Amigo

Procura

Murca

Juanita

AMARILLA:

Atzimba

López

Yema

Leona

Tollocan

Las variedades de papa mexicana como la Atzimba, López, Yema, Leona, Tollocan, Rosita y Juanita entre otras, son el resultado de cruces entre *S. tuberosum* y *S. demissum* que se liberaron como resistentes al hongo *Phytophthora infestans*, causante de la más importante enfermedad de la papa, el "Tizón Tardío" (4).

Algunas variedades por sus características particulares de calidad o el lugar de producción típico, se pueden utilizar en uno o dos procesos diferentes de preparación para su consumo. Para la mayor parte del producto procesado, se desea tener papa de alto contenido de sólidos totales y de elevada gravedad específica, la cual está relacionada directamente con el rendimiento de los productos procesados.

Otra importante diferencia entre las variedades, es la cantidad y grado de acumulación de azúcar en el material crudo especialmente durante el periodo de almacenamiento. Esta característica en una variedad, es sumamente importante para los procesadores de la mayor parte de las formas de la papa.

Por lo tanto las características de una variedad que se evalúa entre las mejores para lograr una buena calidad en el producto son el contenido de sólidos totales y de azúcares reductores. Algunas características adicionales para el cultivador o el consumidor, así como para el procesador, son alta ductilidad, resistencia a la enfermedad, tamaño deseable, ser atractiva, etc.

México cuenta con un potencial alimentario de primer orden, pero aún desconocido por sus habitantes, como en el caso de la papa, la cual es rica en hidratos de carbono y vitaminas; sin embargo, por la diversidad de productos con que cuenta el agro mexicano, la papa ha pasado a un segundo término en la dieta del pueblo (6).

3.1.5 VALOR NUTRITIVO DE LA PAPA.

Los alimentos de origen vegetal representan el mayor aporte nutrimental en la alimentación de países subdesarrollados, debido al bajo costo que presentan en comparación con los productos de origen animal. Entre los alimentos de origen vegetal la papa representa un almacén de energía, también de nitrógeno y proteínas de alta calidad, minerales tales como: hierro y magnesio, además de vitaminas como

la vitamina C y algunas del complejo B (Tiamina, niacina y piridoxina). También se ha encontrado que la papa es un alimento bajo en grasas (aproximadamente 0.1 % en la papa fresca) y una fuente importante de fibra (la papa fresca contiene entre 1-2%).

La importancia del contenido de vitamina del complejo B en la papa radica en que la vitamina B₆ es un nutrimento que esta involucrado en el metabolismo lipídico, de porfirinas, de glicógeno, ácido nucleico y aminoácidos, y además participa en el tratamiento de algunas enfermedades crónicas tales como asma, anemia, enfermedades cardiovasculares y cáncer. La papa es la tercera fuente importante de vitamina B₆ para adultos de 19 a 74 años, superada por la carne de res.

La vitamina C –también encontrada en la papa- es un nutrimento antioxidante que atrapa radicales libres los cuales pueden iniciar cáncer o alguna enfermedad crónica. Además, los antioxidantes, pueden disminuir el cáncer de estómago, esófago y páncreas así como el desarrollo de cataratas. La papa puede contener 30 mg ó más de ácido ascórbico por 100 g de peso fresco, este valor disminuye cuando las papas son almacenadas, cocidas o procesadas. La vitamina C en la papa está presente tanto en forma reducida (ácido ascórbico) como en el estado oxidado (ácido deshidroascórbico), pero el contenido de este último es usualmente bajo.

La papa por su contenido en fibra contribuye al control del colesterol. Por el cobre que contiene ayuda a la prevención de enfermedades del corazón y la diabetes (esto bajo estudio).

La papa es un buen aportador de hierro, fósforo, magnesio y otros minerales. El contenido de hierro es comparable al encontrado en otras raíces y tubérculos, pero tiene una disponibilidad de hierro superior a la de otros alimentos vegetales. Las papas aportan poco sodio y calcio, pero son abundantes en potasio. Por lo cual, pueden usarse en dietas para restringir el contenido de sodio en pacientes con presión sanguínea alta.

Otros minerales encontrados en la papa son el magnesio, cobre, cromo, manganeso, selenio y molibdeno.

La descripción del valor nutritivo de la papa esta determinado con base en un estándar llamado DAYLI VALUES dictaminado por la Food and Drug Administration (FDA). (8)

El análisis de la papa, sugiere que tiene un valor nutritivo muy bajo en comparación con los cereales, para verificar esto, se incluye una tabla en la que puede compararse la composición de la papa con respecto a la del trigo:

CONSTITUYENTE	PAPA (g/100g peso neto)	HARINA DE TRIGO (g/100g peso neto)
PROTEINAS	1.60	10.2
GRASAS	0.10	1.20
CARBOHIDRATOS	17.5	80.5
FIBRA	0.50	0.30

Información obtenida de: Tablas de Valor Nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México; Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, (1992).

La papa es ciertamente baja en proteínas en comparación con el trigo pero contiene cantidades considerables de vitamina C, la cual esta ausente en el cereal.

En realidad, la papa al igual que cualquier cereal, mezclada con un poco de leche y mantequilla, da un alimento muy nutritivo y con un buen balance de proteínas ya que como fue mencionado con anterioridad la proteína de la papa es de muy buena calidad debido a su contenido de aminoácidos, además de que con este tipo de mezclas se provee a la dieta de vitaminas liposolubles.

El tubérculo es energético, proporciona 76 kcal/100g peso neto, y tiene como gran ventaja rendimientos muy altos por unidad de área, además de la facilidad y simplicidad que presenta para ser cocinada, en comparación con lo complejo y tardado que implica el manejo de los cereales (1).

3.2 Glicoalcaloides.

Los alcaloides y glicoalcaloides son metabolitos secundarios de las plantas que contienen nitrógeno (9, 10).

Existen más de 20 estructuras diferentes de alcaloides encontrados en papas, tomates y otras Solanaceas. Entre las solanaceas importantes para el hombre se incluyen a la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el toloache (*Datura stramonium*). Estas plantas producen compuestos antinutricionales y tóxicos durante su crecimiento y después de la cosecha (10).

Las especies del género *Solanum*, en especial la papa común (*Solanum tuberosum*), contienen alcaloides esteroidales que se encuentran en el tejido de la planta como glicósidos, por ello se les denomina "glicoalcaloides" o "glicoalcaloides esteroidales".

Los principales glicoalcaloides encontrados en el tubérculo de papa son α -*Solanina* y α -*Chaconina*, los cuales constituyen aproximadamente el 95 % de total de glicoalcaloides en papas cultivadas. Se ha encontrado que hay ligeramente más cantidad de α -chaconina que de α -solanina (11).

Los glicoalcaloides, presentes en la patata, estructuralmente constan de dos fragmentos, que son los siguientes:

1. Una parte esteroidal (alcamina o *aglicona*), denominada "Solanidina", que posee un esqueleto básico de 27 átomos de carbono del tipo colestano.
2. Una parte glucosídica, que puede estar constituida desde 1 hasta 4 monosacáridos, que generalmente son glucosa, ramnosa, galactosa y xilosa. Dichos monosacáridos se encuentran unidos al C₃ del esteroides por un enlace β -glicosídico (12).

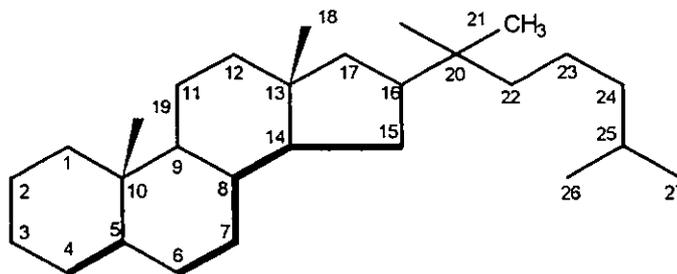


Figura 1. Estructura de COLESTANO

La Solanina y Chaconina son químicamente similares, ambas poseen la misma aglicona, *Solanidina*, pero difieren en el tipo de hidratos de carbono que constituyen el glucósido. En el α -Solanina, el glucósido (β -solatriosa) está constituido por D-galactosa, L-ramnosa y D-glucosa mientras que el α -Chaconina están presentes D-glucosa y dos moléculas de L-ramnosa, el glucósido es el β -Chacotriosa (13).

La β -Solanina y la β -Chaconina contienen únicamente dos monosacáridos, que son D-galactosa y D-glucosa para solanina, mientras que chaconina contiene D-glucosa y L-ramnosa.

La γ -Solanina contiene solo D-galactosa mientras que γ -Chaconina D-glucosa.

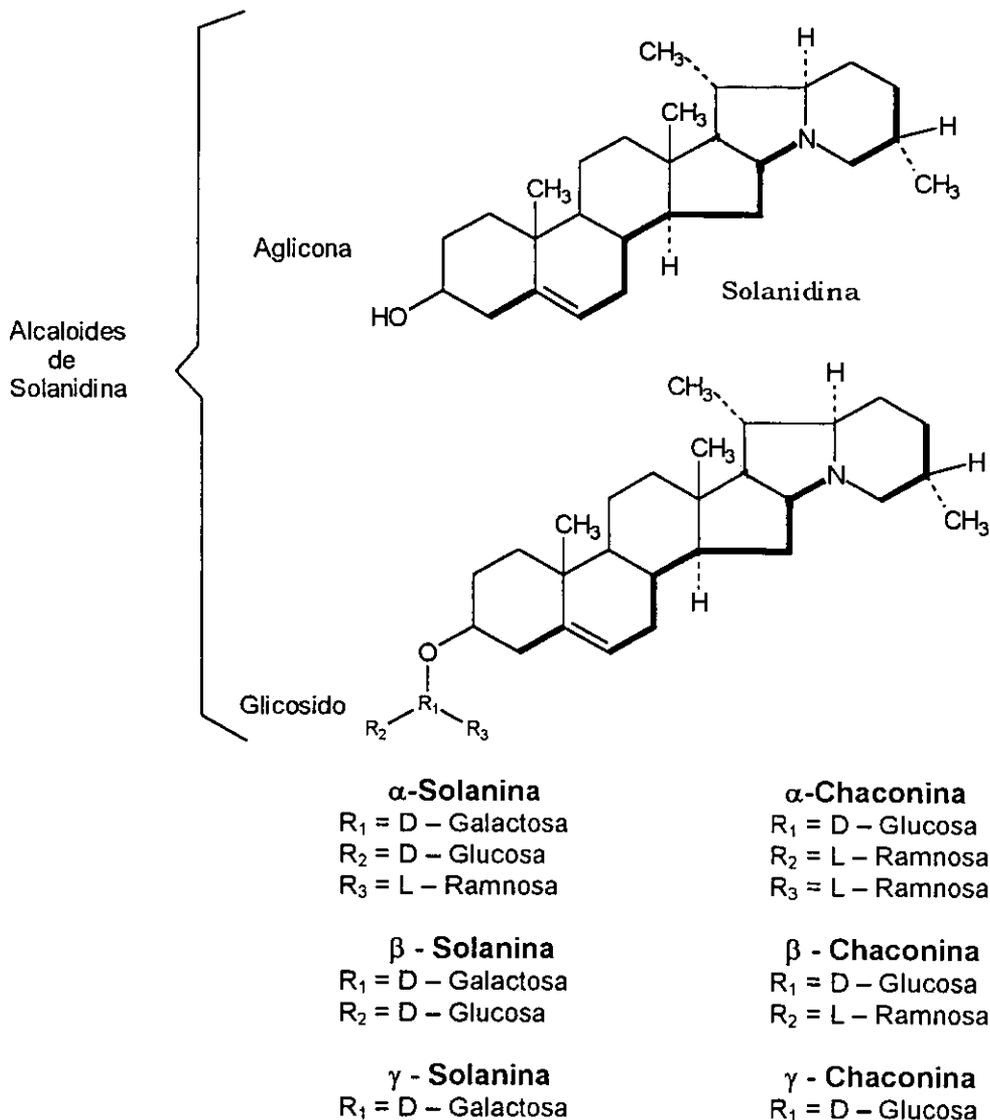
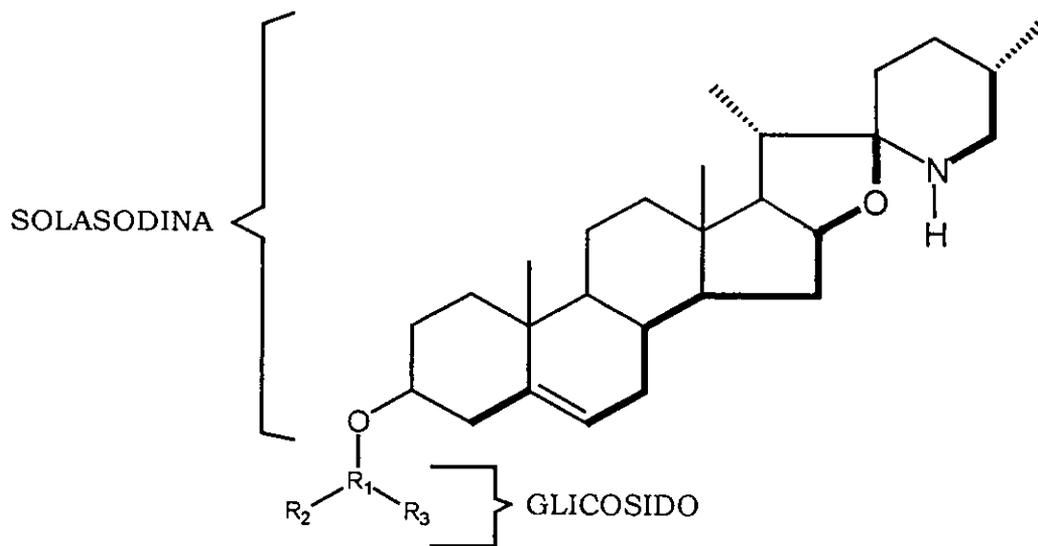


Figura 2. Estructura de los alcaloides de Solanidina (glicosidos y aglicona).

El aglicona Solanidina químicamente esta constituido por bases hexacíclicas unidas a una indolizidina. Fue aislada en 1820 por Desfosses de la planta *S. nigrum*, más tarde Baup la separó de las plantas de la papa (*S. tuberosum*) (14).

Además de los glicósidos de solanidina, se pueden encontrar otro tipo de glicoalcaloides como son los espirosolanos, ejemplos de estos son la Solasonina, Solamargina y Tomatidina (11).

Otra aglicona muy frecuente en las solanaceas es la *Solasodina*, la cual constituye los glicoalcaloides Solasonina (que tiene como glucósido a la β -solatriosa) y Solamargina (que tiene como glucósido a la β -chacotriosa).



Solasonina

$R_1 = D - \text{Galactosa}$

$R_2 = D - \text{Glucosa}$

$R_3 = L - \text{Ramnosa}$

Solamargina

$R_1 = D - \text{Glucosa}$

$R_2 = L - \text{Ramnosa}$

$R_3 = L - \text{Ramnosa}$

Figura 3. Estructura de algunos espirosolanos presentes en las Solanaceas

Los alcaloides son derivados biosintéticamente del colesterol, la síntesis de la aglicona de los glicoalcaloides de papa es la misma para cualquiera que este sea, el que se forme solanidina o solasodina, depende de la etapa final del proceso general de biosíntesis. Por ello no es extraño encontrar ambas estructuras en la planta (15).

La ruta de biosíntesis de la aglicona de los glicoalcaloides se muestra a continuación:

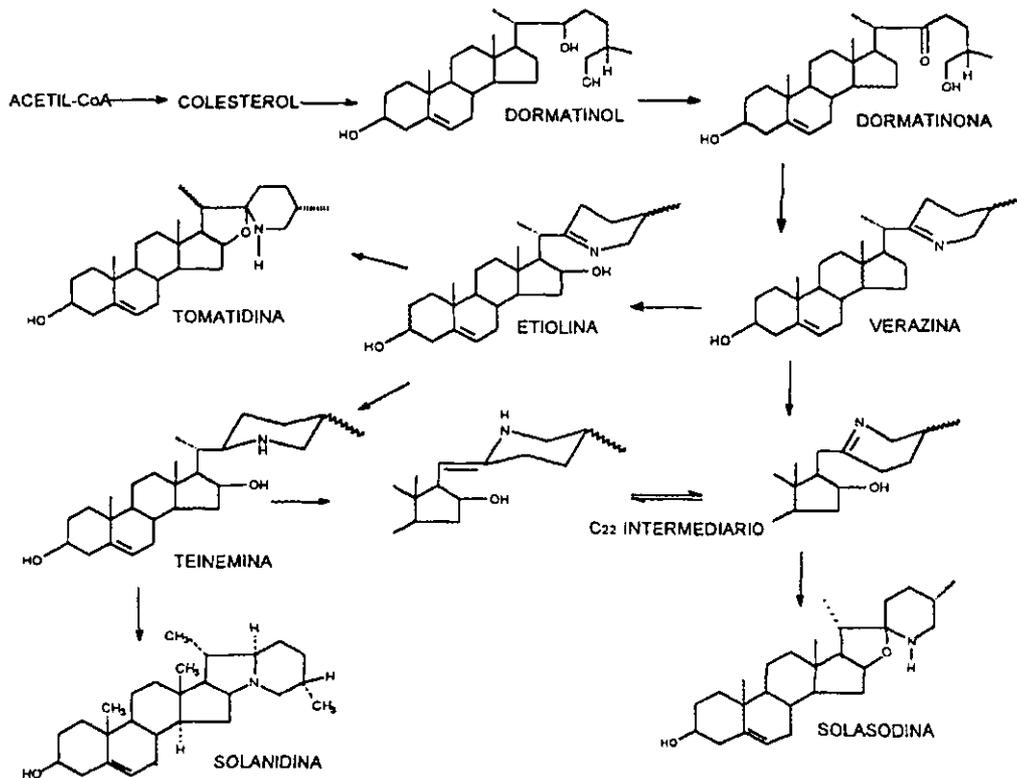


Figura 4. Ruta de biosíntesis de la aglicona de los glicoalcaloides presentes en papa

Los tubérculos de papa contienen típicamente alrededor de 20-60 mg de glicoalcaloides totales (TGA) por 100 g de materia seca que equivale de 4-12 mg TGA por 100 g de peso fresco. Ocasionalmente se encuentran tubérculos de papa que exceden estos valores de TGA, en cantidades de hasta más de 20 mg por 100 g de peso fresco (niveles elevados de GA se presenta normalmente en papas verdes, almacenadas, dañadas e irradiadas). A concentraciones normales, bajas, los glicoalcaloides son considerados como enaltecadores del sabor de la papa y confieren a la planta resistencia contra enfermedades e insectos. Sin embargo, a concentraciones en exceso de 20 mg de TGA por 100 g de peso fresco resultan tóxicos (10, 16, 17).

3.2.1 TOXICOLOGÍA.

El consumo de papas que contienen altos niveles de glicoalcaloides se ha asociado a casos de envenenamiento - ocasionalmente fatal - para hombres y animales. Los síntomas de intoxicación en humanos van desde vómito, diarrea, anorexia y dolor abdominal hasta confusión, delirio, alucinación y coma (12). En casos de intoxicación severos existen disturbios gastrointestinales y neurológicos e incluso puede causar la muerte por una depresión del sistema nervioso central. Lesiones hemolíticas y hemorrágicas pueden también ocurrir en el tracto gastrointestinal y la retina por la destrucción de las membranas celulares (10, 11). La solanidina y la α -solanina inhiben la actividad colinesterasa in vivo e in vitro (11).

Los glicoalcaloides son inhibidores de la colinesterasa; la acetilcolina es un neurotransmisor de gran importancia en la contracción del músculo liso, cuya función es transmitir información de una neurona a otra, para ello interactúa con receptores localizados en las membranas celulares; cuando la acetilcolina se adhiere a su receptor da lugar a la formación de un canal por el que pasan iones Na^+ y K^+ , lo cual origina un cambio en la polaridad de la membrana, la despolariza, hasta llegar a un valor umbral, el cual provoca la propagación del impulso nervioso. La acción de la acetilcolina es inactivada por acción de la colinesterasa que hidroliza la acetilcolina en colina. Si la colinesterasa no realiza la hidrólisis, todos los receptores de las membranas permanecen saturados de acetilcolina y se genera el fenómeno denominado "tétanos", es decir los músculos ya no se relajan. (18)

Los valores de LD_{50} para α -chaconina y α -solanina varían según la vía de administración y la especie de animal de laboratorio utilizado. Los valores de DL_{50} para α -chaconina y α -solanina son de 84 mg/kg y 75 mg/kg respectivamente, cuando son determinados por vía intraperitoneal en ratas. En ratones la LD_{50} para α -solanina administrada de igual forma es de 30 mg/kg y 19.2 mg/kg para α -chaconina.

Experimentos realizados muestran que una administración de α -solanina en ratones, de 1000 mg/Kg por vía oral, no causa efectos tóxicos en dichos animales. (19)

Estudios de embriotoxicidad de los glicoalcaloides de papa en ranas, han mostrado que α -chaconina es aproximadamente tres veces más tóxica que α -solanina y que la solanidina es menos tóxica que los glicósidos, esto indica que la presencia de hidratos de carbono, unidos a la aglicona, tiene una importante influencia en la actividad fisiológica y toxicológica (10, 18, 19). Otro factor que podría estar implicado en la toxicidad de los glicoalcaloides es la solubilidad, ya que estudios realizados sugieren que la α -chaconina es más soluble α -solanina bajo condiciones simuladas de digestión (20).

Los glicoalcaloides son pobremente absorbidos en el tracto gastrointestinal ya que son excretados rápidamente por orina y heces. La presencia de saponinas (las cuales también forman parte de los componentes de las papas de una forma paralela a la concentración de glicoalcaloides), facilitan su absorción ya que las saponinas tienen una gran actividad emulsificante lo que conduce a la absorción gastrointestinal. Sin embargo los glicoalcaloides por si solos se absorben pobremente.

La ingestión de papas enfermas y/o lesionadas esta relacionada con malformaciones como anacefaleas en el hombre, mientras que el consumo de papas germinadas puede producir deformidades congénitas en hámsters.

Así, los glicoalcaloides se han asociado con efectos teratogénicos ya que se ha reportado que la α -chaconina es teratogénica en ratón y hámster (11).

Estudios realizados en individuos sanos, a los cuales se les determino, por radioinmunoensayo, la concentración de *Solanidina* en el suero sanguíneo en función de su dieta, muestran que la *Solanidina* se encuentra normalmente en cantidades de nmoles en el suero de personas que consumen papas en su dieta habitual. Los individuos que se abstienen del consumo de papas y sus productos presentan una disminución marcada de *Solanidina* en el suero (14).

3.2.2 PROPIEDADES DE SABOR

Las papas cocinadas que contienen elevadas concentraciones de TGA han sido asociadas con un sabor amargo y una sensación ardiente en la garganta. La α -solanina y la α -chaconina son directamente responsables de estas propiedades de

sabor. Niveles de 11 mg por 100 g de tubérculo fresco se pueden percibir como un sabor amargo (11).

3.2.3 TOLERANCIA DE NIVELES DE TGA EN PAPAS DESTINADAS AL CONSUMO.

Los glicoalcaloides son constituyentes naturales del tubérculo de papa. Debido a que son tóxicos potenciales y a que están asociados con propiedades de mal sabor, se ha establecido que los niveles aceptables de glicoalcaloides en papas para el consumo humano no deben exceder los 20 mg por 100 g de tubérculo fresco. En países desarrollados, donde la papa es un producto de consumo altamente importante, las papas que exceden los límites recomendados por la Seguridad Alimentaria son retirados de la venta.

Un problema que se debe evitar es que las papas destinadas a consumo humano excedan los niveles de tolerancia para el contenido de glicoalcaloides, por lo que los cambios en la cantidad de TGA que se puedan presentar en la pre y postcosecha deben ser monitoreados para controlar posibles efectos adversos. Así mismo, debe hacerse un seguimiento del contenido de TGA en productos de papa procesada particularmente por la posible síntesis de nuevos alcaloides durante el procesamiento (11).

Además, es interesante hacer notar que los glicoalcaloides no son destruidos por los tratamientos típicos de preparación y procesamiento de alimentos, como son: cocción, cocción con agua a ebullición, horneado, horneado con microondas, freído, deshidratación a altas temperaturas o extrusión (20, 21, 22 y 23).

3.2.4 DISTRIBUCIÓN DE GLICOALCALOIDES.

La concentración mayor de glicoalcaloides en el tubérculo se encuentra principalmente en los retoños, la cáscara y en áreas de alta actividad metabólica tales como las regiones de los ojos. En tubérculos que contienen concentraciones excepcionalmente altas de TGA parece ser que los glicoalcaloides se difunden en la pulpa de la papa (11, 14 y 15).

A continuación se muestra la distribución de los glicoalcaloides totales en el tubérculo de papa:

Parte del Tubérculo	% del tubérculo	Mg TGA/100g peso seco
CÁSCARA (piel y corteza)	11	68 – 75
PIEL	2	64
PULPA	90	21

Referencia: Osman, S. F. , 1983

Las hojas y las flores de la planta de la papa son fuentes mucho más ricas en glicoalcaloides que el tubérculo.

A continuación se presenta la distribución del total de glicoalcaloides en la planta de papa (23):

Partes de la planta	Glicoalcaloides totales (mg/100 g de peso fresco)
Flores	300 – 500
Hojas	40 – 100
Tallo	3
Tubérculo	7.5
Cáscara y ojos	30 – 50
Cáscara (10 a 15 % del tubérculo)	15 – 30
Piel (2 a 3 % del tubérculo)	30 – 60
Pulpa	1.2 – 5
Retoños	200 – 400
Tubérculos amargos	25 – 80
Cáscara de tubérculos amargos	150 – 200

Los niveles de glicoalcaloides (GA) en el tubérculo dependen de tres factores:

1. Factor genético, la constitución genética es el factor de mayor influencia, ya que la habilidad de producir glicoalcaloides no es heredable en un patrón establecido, por lo que para el desarrollo y cultivo de nuevas variedades de papa se debe considerar un control de los niveles de glicoalcaloides (24).

1. De cultivo, el producto deberá seguir un control adecuado de plagas y deberá efectuar la cosecha de tubérculo de manera cuidadosa, para evitar que se produzcan lesiones.
2. De distribución, se deberá realizar un transporte y almacenamiento adecuado para evitar lesiones.
3. De consumidor, el cual debe asegurarse de comprar papa de buena calidad, sin daños físicos, ni áreas verdes y ni germinadas (15).

La identificación y la eliminación de los glicoalcaloides tóxicos al mismo tiempo que se conservan las defensas naturales contra plagas permitirían la modificación de cultivos existentes con características superiores de procesamiento, generalmente no disponible comercialmente debido a un contenido de alcaloides inaceptable (10).

3.2.6 ANÁLISIS DE GLICOALCALOIDES EN LA PAPA.

En los últimos 50 años, se han desarrollado programas de mejoramiento genético para generar variedades de papas resistentes a plagas y enfermedades. Sin embargo, esto representa un problema para la química en cuanto al análisis de glicoalcaloides. Estudios recientes han demostrado que no es posible establecer un patrón en cuanto al contenido de glicoalcaloides entre los híbridos obtenidos y el tubérculo madre del cual provienen, puesto que se ha observado que la progenie presenta contenido variable e incluso diferente de glicoalcaloides con respecto a la madre. Entre las mismas clonas, provenientes de un mismo origen, existen fluctuaciones en este sentido. Por otra parte, como se ha mencionado, las situaciones por las que atraviesan los tubérculos durante la cosecha, transporte, almacenamiento y venta, pueden ocasionar un incremento en el contenido de glicoalcaloides.

Las consideraciones anteriores indican la importancia de contar con métodos de análisis de glicoalcaloides que sea exactos, confiables, rápidos, sensibles y baratos (15, 17).

Tres son los métodos más ampliamente utilizados en la determinación del contenido de glicoalcaloides:

- Técnicas colorimétricas, principalmente titulaciones. Son poco específicas, la exactitud y precisión dependen de la pureza de la fracción de glicoalcaloides, se

consideran como un método cualitativo; un ejemplo de este método es el de fenol-ácido sulfúrico.

- Técnicas cromatográfica, como son:
 1. Cromatografía en capa fina. Tiene mayor especificidad que las titulaciones, es un método semi-cuantitativo.
 2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Es muy específico y sensible, presenta menor resolución que la cromatografía de gases, pero su resolución es buena. En ocasiones se limita por el gran número de muestras.
 3. Cromatografía de gases. Es muy específico, tiene buena resolución pero para el análisis es necesario formar derivados, mediante metilación y requiere altas temperaturas.

- Inmunoensayos. Es uno de los mejores métodos, tiene gran sensibilidad y especificidad, además de que elimina los problemas de extracción y purificación de la muestra. La desventaja de este método es que requiere tiempo la obtención de los anticuerpos, es costoso y no permite diferenciar entre α -solanina y α -Chaconina. Los inmunoensayos están basados en la interacción única de antígeno-anticuerpo, son técnicas muy simples y no requieren experiencia del analista. La primera determinación que se utilizó para el análisis de solanidina en plasma humano fue hecha por radioinmunoensayo así mismo, la solanidina también puede ser determinada en saliva. Una técnica inmunológica muy utilizada para la determinación de TGA en papa es la de ELISA. Los niveles de solanidina absorbidos por el organismo pueden reflejar el consumo de papa (11, 16).

3.3 Principios de Cromatografía.

La **cromatografía** es una técnica de separación que permite separar y aislar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. Esta técnica se basa en la distribución de los componentes a separar entre dos fase; una de ellas es una fase móvil, la cuál puede ser un gas o un líquido, y la otra es una fase estacionaria, la cual a su vez puede ser un líquido o un sólido.

El proceso cromatográfico tiene lugar como resultado de repetidas adsorciones o repartos durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionaria, alcanzándose la separación debido a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra (27).

3.3.1 DESARROLLO HISTÓRICO

La cromatografía como técnica de separación fue descubierta por el botánico y químico ruso Mijalt S. Tswett, quién en 1903 realizó un experimento que tenía como objeto la separación de la clorofila de extractos vegetales. En una columna de vidrio, rellena de carbonato de calcio, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo; a continuación agregó más éter de petróleo y observó que, a medida que el éter pasaba a través de la columna, se separaban bandas de diversos colores que correspondían a los carotenos (banda amarillo pálido), las clorofilas (banda verde) y las xantofilas (bandas amarillas). De aquí el origen de la palabra cromatografía que, literalmente, significa "color escrito".

En 1905, Ramsey utilizó técnicas cromatográficas para separar mezclas de gases y vapores.

En 1930, el investigador sueco Tiselius y sus colaboradores introdujeron dos técnicas diferentes a la técnica de elución, que son el análisis frontal y el análisis por desplazamiento; técnicas que hoy en día han caído en desuso.

En 1941, Martin y Synge introdujeron la cromatografía de reparto, lo que les valió el premio Nóbel de Química en 1952.

En 1952, Martin y James obtienen un logro particularmente importante, el desarrollo de la cromatografía de reparto gas-líquido.

En 1953, Wheaton y Bauman observan el principio de exclusión.

En 1954, Ray obtiene un cromatograma empleando un detector de conductividad térmica en cromatografía de gases.

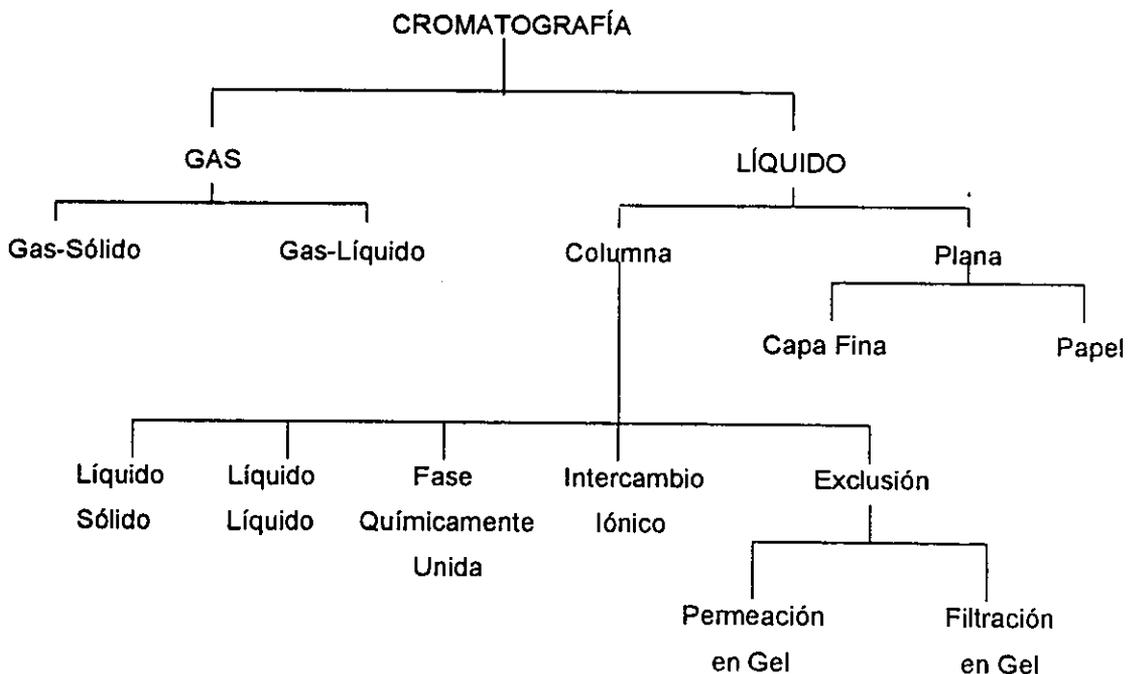
En 1959, Porath y Flodin desarrollan la cromatografía de exclusión en geles suaves de povidextranos, técnica que recibe el nombre de cromatografía de filtración en gel.

En 1962, el químico norteamericano Moore efectúa separaciones en geles rígidos de poliestireno (cromatografía de permeación por gel).

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica que por tantos años había permanecido olvidada; este avance fue gradual y se debió a la introducción de altas presiones de operación y de sistemas de detección continua (27, 28).

3.3.2 CLASIFICACIÓN

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en diferentes tipos, los cuales se indican en el diagrama siguiente (27):



3.3.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA “CLÁSICA” Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN.

Durante muchos años se practicó la cromatografía líquida en una forma clásica, la cual consiste básicamente en una columna de vidrio, cuyo diámetro varía entre 2 y 10 cm, rellena de algún material, como sílice, alúmina, azúcar, etc., se introduce la muestra disuelta en la fase móvil o disolvente, por medio de un cuentagotas o de una pipeta, y luego se agrega el disolvente, con el cual se eluye la muestra a través de la columna. Los tamaños de la muestra varían entre 0.1 y 1 g o más. El disolvente o fase móvil fluye a través de la columna por efecto de la gravedad. El disolvente se recolecta en la base de la columna en fracciones de determinado volumen.

Esta técnica cromatográfica presenta los siguientes inconvenientes:

1. Requiere largo tiempo de análisis (horas hasta días).
2. El material de relleno se utiliza una sola vez debido a que parte de la muestra se adsorbe en forma irreversible.
3. La identificación y cuantificación de los componentes que eluyen de la columna requiere el uso de técnicas auxiliares, como espectrofotometría, análisis químico, o simplemente un registro gravimétrico, para evaluar el contenido de cada uno de los componentes de la mezcla en las fracciones recolectadas.

La cromatografía líquida de alta presión utiliza columnas de diámetro muy reducido, rellenas de materiales cuyas partículas tienen un tamaño no mayor de 30-40 μm y con frecuencia hasta de 5 ó 10 μm , generalmente con una distribución de tamaños no mayor de $\pm 2 \mu\text{m}$. Este tipo de columna es muy eficaz, pero ofrece una gran resistencia al flujo de la fase móvil. Por esta razón es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. La cantidad de fase estacionaria dentro de la columna es pequeña, por lo que se requiere que la muestra también sea pequeña, entre 1 y 10 mg.

Un detector, colocado a la salida de la columna, proporciona un registro continuo de la composición del líquido que sale, lo que permite obtener un

cromatograma que se utiliza para identificar y cuantificar los componentes de la muestra.

La cromatografía líquida requiere que la muestra sea soluble en la fase móvil, y esto hace posible el análisis de compuestos de muy alto peso molecular: orgánicos e inorgánicos, iónicos o covalentes.

Características de la Cromatografía Líquida de Alta Presión.

Requerimientos de la muestra	Soluble.
Tipos de muestra	Moléculas orgánicas e inorgánicas de peso molecular intermedio y alto.
Cantidad mínima detectable	10^{-6} a 10^{-12} g
Tiempo de análisis	Minutos a horas.
Resolución	50000 platos teóricos por metro de columna.

3.3.4 MECANISMOS DE SEPARACIÓN EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

Existen cinco métodos de realizar la cromatografía líquida de alta presión, cada uno basado en diferentes mecanismos de separación de los componentes de la muestra.

Cromatografía por adsorción.

El mecanismo de separación de la cromatografía de adsorción (líquido-sólido) se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Este tipo de cromatografía es muy útil en la separación de moléculas de baja o media polaridad, de peso molecular no mayor de 1000.

Cromatografía por partición.

En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un líquido que se mantiene fijo por adsorción sobre un sólido inerte y poroso, en tanto que la fase móvil es un líquido.

El mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad que presentan las moléculas de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria debido a sus diferencias en sus coeficientes de reparto. Este tipo de cromatografía se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500.

Cromatografía por intercambio iónico.

La separación por intercambio iónico se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica por los sitios activos de una resina intercambiadora de iones. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

Este tipo de separación se aplica a compuestos de un intervalo de pesos moleculares muy amplio, y ejemplos característicos de éstos son los péptidos y los aminoácidos.

Cromatografía por exclusión.

En este tipo de cromatografía la separación se efectúa de acuerdo con el tamaño de las moléculas. El relleno de la columna es un material que posee poros de dimensiones comprendidos entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular. El intervalo de pesos moleculares en que se puede trabajar por cromatografía de exclusión varía desde 500 hasta varios millones.

Existen dos variantes en cromatografía por exclusión: 1) Cromatografía de filtración, que utiliza como material estacionario un gel reticulado y 2) Cromatografía de permeación, que emplea materiales de relleno semirrígidos o rígidos.

Cromatografía de fase químicamente unida.

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria está químicamente unida a la superficie de un soporte. Dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales de dicha fase estacionaria es el tipo de selectividad. Los grupos pueden ser de naturaleza polar, como los grupos amino ($-\text{NH}_2$) y nitrilo ($-\text{CN}$) en el caso de la cromatografía de fase normal, o bien no polar como el grupo octilo ($-\text{C}_8\text{H}_{17}$), octadecilo ($-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), fenilo ($-\text{C}_6\text{H}_5$), etc., en el caso de la cromatografía en fase inversa (27, 28).

VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN.

La cromatografía líquida moderna, al igual que toda técnica analítica, tiene algunas limitaciones, las cuales, junto con sus ventajas, se pueden observar en el cuadro siguiente:

VENTAJAS	LIMITACIONES
1. Velocidad de análisis.	1. Instrumentación costosa.
2. Alta resolución.	2. Dificil análisis cualitativo.
3. Resultados cuantitativos.	3. No existe detector universal y sensible.
4. Buena sensibilidad.	4. Elevado costo de operación.
5. Automatización.	5. Experiencia indispensable.
6. Amplio espectro de aplicación.	

3.3.5 TERMINOS MÁS USUALES EMPLEADOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN.

La cromatografía como técnica de separación tiene una teoría unificada que utiliza términos y símbolos característicos; a continuación se describen los más utilizados, indicando su importancia operacional y la forma en que son evaluados.

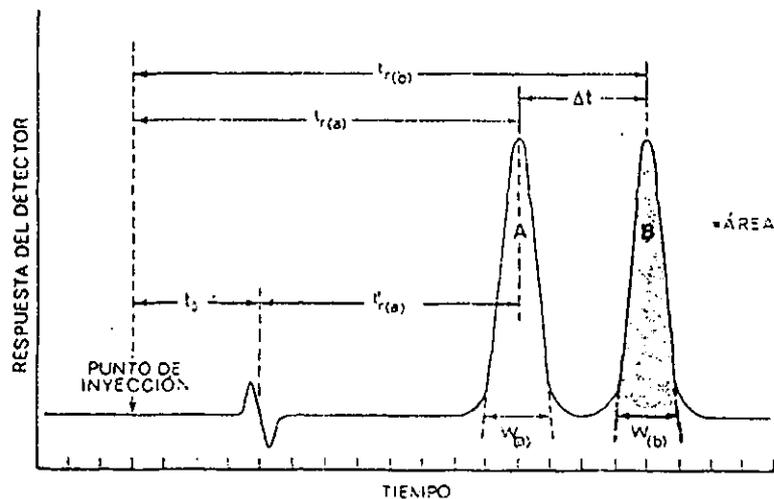


Figura 5. Cromatograma típico

1. **Tiempo de retención (t_r)**. Es el tiempo que un soluto permanece dentro de la columna. Se mide desde el momento en que la muestra se introduce en el sistema hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constante. Se emplea como medida de tipo cualitativo.
2. **Tiempo muerto (t_o)**. Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma.
3. **Tiempo de retención ajustado (t_r')**. Es la diferencia entre t_r y t_o , es decir la medida del tiempo que el soluto permanece retenido en la fase estacionaria.

$$t_r' = t_r - t_o$$

4. **Ancho a la base (W_b)**. Es la porción de la línea base interceptada por las tangentes trazadas a ambos lados de una señal cromatográfica; asumiendo que la forma de la señal es gaussiana, esta anchura es igual a 4 veces el valor de σ , o sea la dispersión de una distribución gaussiana de valores. Este valor se emplea en el cálculo de la resolución y eficiencia del sistema cromatográfico.
5. **Número de platos teóricos (N)**. Un plato teórico es un equilibrio del soluto entre las fases móvil y estacionaria, una buena columna tiene un número alto de platos teóricos.

$$N (\text{no. Platos teóricos}) = 16(t_r/W_b)^2,$$

donde t_r es el tiempo de retención y W_b es el ancho de la base del pico.

El número total de platos teóricos representa el poder de separación de la columna, es decir, su eficiencia.

6. **Altura equivalente a un plato teórico (H , AEPT)**. Es la longitud de columna requerida para obtener un equilibrio del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, cuando este valor es pequeño indica más platos teóricos por unidad de longitud y por lo tanto mayor eficiencia. Se calcula como:

$$H = L/N,$$

donde L es la longitud de la columna y N el número de platos teóricos.

7. **Factor de capacidad (K').** Es la relación entre el tiempo que el soluto permanece en la fase estacionaria y la fase móvil. Es un índice de la retención del soluto, un valor alto de K' indica una buena retención lo cual favorece una buena separación.

$$K' = tr'/t_0,$$

donde tr' es el tiempo de retención corregido y t₀ es el tiempo muerto.

8. **Resolución (Rs).** Es una medida cuantitativa del grado de separación obtenido entre dos compuestos.

$$R_s = 2(tr_2 - tr_1)/W_{b1} + W_{b2},$$

donde tr es el tiempo de retención, W_b es el ancho de la base del pico, 1 y 2 son los solutos. Un valor de R_s = 1.5 significa separación completa.

9. **Selectividad (α):** Mide las diferencias relativas en las fuerzas de interacción de dos solutos con la fase estacionaria, es decir, es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. Un valor mayor de α significa una columna más selectiva y por lo tanto una mejor separación de los solutos.

$$\alpha = tr_2/tr_1,$$

donde tr es el tiempo que el soluto permanece en la columna, 2 corresponde al soluto más retenido en la columna y 1 al soluto menos retenido.

3.4 Instrumental en Cromatografía Líquida.

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia incluyen: recipiente de almacenamiento de la fase móvil (recervorio), sistema de bombeo, inyector, columna, detector y registrador (27, 28).

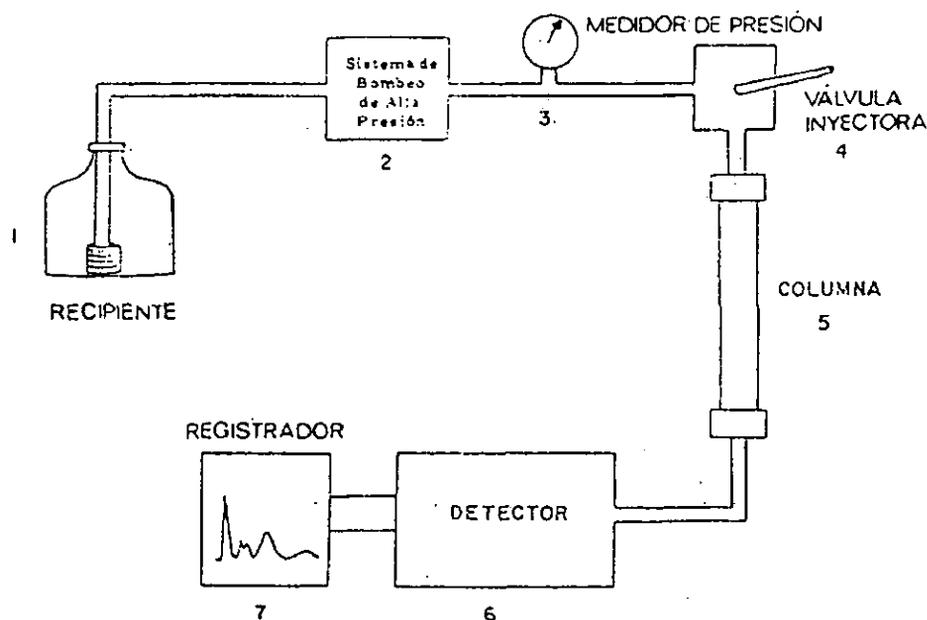


Figura 6. Representación gráfica de un cromatógrafo de líquidos de alta presión

3.4.1 Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.

Se utilizan recipientes de vidrio, acero inoxidable o plástico, de una capacidad entre 1 a 3 litros. La toma del disolvente se hace a través de un filtro, el cual tiene la finalidad de remover pequeñas partículas que puedan obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna. Las fases móviles deben ser filtradas antes de ser empleadas en el cromatógrafo, pasándolas a través de un filtro metálico o de cerámica de al menos 2 μm de porosidad.

En las fases móviles, principalmente en las de carácter polar, existe una tendencia del oxígeno y otros gases a disolverse en el líquido. Si estos gases entran en el instrumento forman burbujas, las cuales pueden afectar el funcionamiento del detector y la eficiencia de la columna. Por este motivo, es necesario remover de la fase móvil los gases disueltos.

3.4.2 Sistema de bombeo.

Las columnas utilizadas en cromatografía líquida de alta presión están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas (micras), lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por lo cual, se requiere un sistema de bombeo para transportar la fase móvil a través de la columna.

3.4.3 Válvula inyectora.

Las válvulas inyectoras se fabrican con materiales inertes como teflón y acero inoxidable. Están diseñadas para resistir presiones muy elevadas y algo muy importante, sus cavidades deben ser bien barridas por la fase móvil.

La muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero (loop o asa), generalmente el volumen contenido en el tubo es de 10 a 50 μl . La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte, tal como se muestra en la figura 7.

Esta forma de inyección permite manejar un amplio intervalo de tamaños de muestra con un alto grado de reproducibilidad (28).

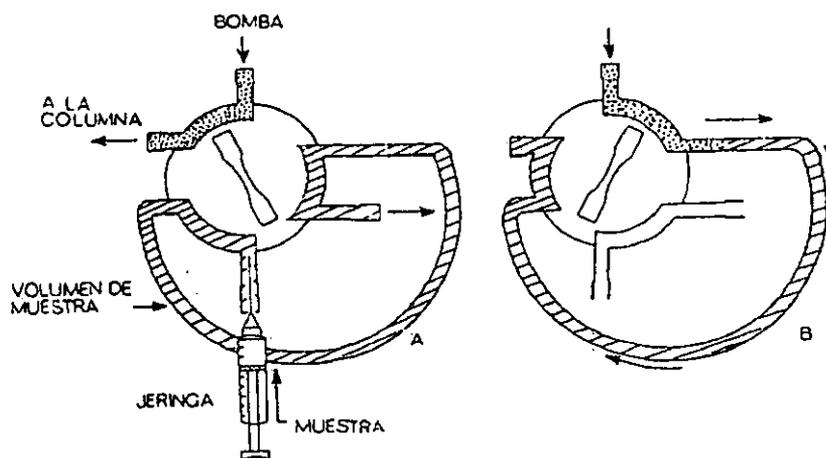


Figura 7. Válvula inyectora. A. Toma de la muestra. B. Inyección de la muestra.

3.4.4 Columnas.

La columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, generalmente acero inoxidable, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones.

La longitud de la columna es, por lo general, entre 10 y 50 cm. El diámetro, en el caso de las columnas analíticas, es de 3 a 4 mm, pero en las columnas de tipo preparativo puede ser de hasta 1 cm.

Los materiales de relleno (fase estacionaria), utilizados en cromatografía líquida de alta presión tienen la particularidad de presentar tamaño de partícula muy pequeño, y muchas veces estas partículas tienen forma regular. El tamaño de partícula es importante porque controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro y hacia fuera de los poros de la partícula. A medida que el tamaño de la partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento, es decir, la transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria es lenta, por esta razón se utilizan materiales porosos cuyas partículas sean de tamaño menor a 50 μm .

Además de los materiales porosos se utilizan los llamados adsorbentes peliculares o adsorbentes de capa porosa, los cuales consisten en partículas esféricas, generalmente vítreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de un adsorbente poroso, como gel de sílice o alúmina.

Ambos tipos de materiales mencionados se introducen fácilmente en la columna y proporcionan columnas muy eficientes que son utilizadas en cromatografía líquido-sólido, o en cromatografía líquido-líquido si son recubiertas de alguna fase líquida. Asimismo, se pueden unir químicamente en su superficie a diferentes fases obteniéndose una amplia gama de cromatografías (28).

3.4.5 Detectores.

Uno de los mayores requisitos instrumentales en la cromatografía de líquidos moderna es un detector sensible para un monitoreo continuo de los efluentes de la columna.

El detector ideal sería aquel que satisficiera los siguientes requisitos: altamente sensible, estable, de lectura continua y de respuesta universal. Desafortunadamente ningún detector actual posee todas estas características mencionadas. Sin embargo, los detectores que hay disponibles permiten una amplia variedad de aplicaciones.

Actualmente existen tres tipos de detectores de uso muy generalizado que se describen a continuación.

- **Detector de Índice de Refracción.** Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal dado que el índice de refracción es una característica física definida de todos los compuestos. La sensibilidad de este detector es moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón.
- **Detector de Luz Ultravioleta.** Es el detector mas ampliamente utilizado ya que tiene una alta sensibilidad para muchos compuestos si estos absorben luz en la región del U.V. o visible (190 a 600 nm).

Su funcionamiento se basa en la adsorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. La concentración de la muestra en la celda de flujo esta relacionada con la cantidad de luz transmitida a través de la celda por la "Ley de Beer".

En condiciones óptimas se pueden obtener sensibilidades de hasta 0.005 unidades de absorción, si el compuesto absorbe intensamente en el ultravioleta, es posible detectar cantidades de muestra del orden de nanogramos.

- **Detector de Fluorescencia.** En la actualidad es el detector más sensible, en condiciones adecuadas es posible detectar cantidades del orden de picogramos (10^{-12} g). Se utiliza para el análisis de compuestos que presentan fluorescencia natural o para compuestos no fluorescentes que pueden transformarse en otros que si son fluorescentes mediante formación de derivados químicos (27, 28).

3.4.6 Registrador.

Su función es representar en un registro gráfico (cromatograma) las señales dadas por el detector. Las señales producida por el detector se manifiesta en forma de picos (Gaussianos) representando la concentración de los componentes eluidos. Los registradores más utilizados son los potenciométricos de 1 ó 10 mV (28).

3.5 Fundamentos de Validación.

La Validación de un método analítico es fundamental para el desarrollo de una técnica de análisis, ya que es mediante esta secuencia de pruebas y análisis lo que proporciona evidencia confiable de que el método cumple con los propósitos para los que fue diseñado.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso, en términos de parámetros analíticos.

Los parámetros a evaluar en general en un proceso de validación son los que se definen a continuación:

Linealidad. La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, sean directamente proporcionales a la concentración de la sustancia en un intervalo determinado.

Este parámetro se divide en linealidad del sistema y linealidad del método.

- **Linealidad del sistema.** Se determina construyendo una curva de calibración empleando cuando menos cinco diluciones preparadas a partir de una misma disolución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución.
- **Linealidad del método.** Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos tres diferentes cantidades de la sustancia de interés, cada una de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Exactitud. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis por sextuplicado de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de las sustancias.

Se determina con placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100% utilizando el método propuesta haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Precisión. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o de coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

Se determina por el análisis de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

Repetibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, etc.).

Se determina con placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100% utilizando el método propuesto, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferente laboratorio, utilizando el mismo y/o diferente equipo).

Se determina a partir de una muestra homogénea de sustancia cercana al 100% de la concentración teórica analizada cuando menos por dos analistas en dos días diferentes y por triplicado.

Límite de detección. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

Se determina realizando diluciones de una referencia conocida y observando hasta que concentraciones puede detectar el aparato.

Límite de cuantificación. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación.

Especificidad. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta únicamente de la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Se determina con el método propuesto analizando placebos del producto e identificar la respuesta de la sustancia de interés.

Tolerancia. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipo de empaque (soporte y fase estacionaria, condiciones ambientales, etc.).

Estabilidad de la muestra. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas (29).

4

Parte

Experimental

MATERIAL DE LABORATORIO ESPECIAL

- Mechero Fisher.
- Tripie, tela de asbesto.
- Matraces Erlenmeyer de 100 mL.
- Magnetos agitadores.
- Equipo de destilación simple.
- Embudos de separación de 125 mL.
- Pesafiltro.
- Probeta de 20, 10, 100, 1000 mL.
- Vidrio de reloj.
- Embudos de filtración.
- Pipeta graduada de 10 mL.
- Soporte universal.
- Pinzas de tres dedos.
- Matraces aforados.
- Pipetas volumétricas 0.5-5 mL.
- Micropipetas automáticas.
- Mortero con pistilo.
- Papel whatman #42.
- Papel pH escala 8-14
- Filtros membrana 0.22 μm
- Jeringas de 1 mL.
- Cartucho Sep-Pak C₁₈
- Microjeringa de 100 μl .
- Viales de 2 mL.
- Varilla de vidrio.
- Termómetro 0 - 150 °C

REACTIVOS

- Acetona grado técnico.
- CO₂ (hielo seco)
- Ácido acético glacial (MERCK, R.A.)
- Agua destilada
- Hidróxido de amonio concentrado (J. T. Baker, R.A.)
- Alcohol iso-butílico al 100% (J. T. Baker, R.A.)
- Metanol absoluto (J. T. Baker, R.A.)
- Acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific)
- Metanol grado HPLC (MALLINCKRODT, ChromAR-HPLC)
- Agua grado HPLC (agua deionizada, filtrada a través membrana 0.22 μm)
- Disolución de fosfato monobásico de amonio 0.1 M (MALLINCKRODT, R.A.)
- Estándar de α -Solanina (SIGMA # S-3757, lote 88F7130)
- Estándar de α -Chaconina (SIGMA # C-37681, lote 56H7165)

EQUIPO

- ◆ Parrilla múltiple (THERMOLINE Multi-Stir plate 4, No. 29387).
- ◆ Estufa de secado (LAB-LINE Instruments, Inc., Imperial III).
- ◆ Molino (Thomas-Wiley, WILEY MILLS, Modelo 4, serie 3375-E10).
- ◆ Liofilizadora (LABCONCO Freeze Drier 5).
- ◆ Rotavapor (Büchi 461, Water Bath).
- ◆ Potenciómetro (CORNING, Modelo 10, No.29394).
- ◆ Equipo para obtener agua grado HPLC (MILLIPORE, Milli-Q Waters System, con un equipo de filtración Millipak 40, 0.22 μm de tamaño de poro).
- ◆ Equipo de Ultrasonido (METTLER ELECTRONIC Corp).
- ◆ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, consta de:
 - Interface (MILLIPORE Waters System, SIM 013822).
 - Bombas (MILLIPORE Waters 510, No. 510-145776).
 - Detector de absorbancia (UV) de longitud de onda variable (MILLIPORE Waters 486, No. 486-PRE823).
 - Columna μ Bonda.Pak C₁₈, dimensiones 3.9 x 300 mm, (MILLIPORE Waters, No. P31251B-01).
 - Computadora: Monitor (NEC/Multisync 24); C.P.U. (NEC PowerMate 386/25), Impresora (NEC Pinwriter P6200).

4.1 Preparación de la muestra.

4.1.1 El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) dependiente de la Secretaría de Agricultura proporcionó las papas de cada variedad a analizar, las papas fueron cosechadas y almacenadas a temperatura ambiente y en la oscuridad por un tiempo de 2 meses con el fin de simular el tiempo que tarda en llegar este producto hasta el consumidor a partir de la cosecha.

Las variedades de papa mexicana que se estudiarán, son las siguientes:

1. Alpha	5. Marciana	9. Norteña
2. Atzimba	6. Michoacán	10. Puebla
3. Juanita	7. Montsama	11. Rosita
4. López	8. Murca	12. Tollocan

De las 12 variedades estudiadas, 7 fueron caracterizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Variedad: ALPHA

Características: Planta sin pigmento.
 Precoz - intermedia.
 Flor rosada.
 Susceptible a Tizón tardío y virosis (PLRV).
 Tubérculo oblongo.
 Piel blanca lisa.
 Ojos superficiales.
 Pulpa crema.

Rendimiento comercial: 30 - 40 ton/ha.

Variedad: LÓPEZ

Características: Planta andígena pigmentada.
 Tardía.
 Flor morada.
 Susceptible a Tizón tardío y alternaria.
 Tubérculo redondo.
 Piel lisa rosa.
 Ojos profundos.
 Pulpa amarillo - crema.

Rendimiento comercial: 20 - 30 ton/ha.

Variedad: MICHOACÁN

Características: Planta verde sin pigmentos.
 Precoz.
 Flor blanca.
 Resistente a Tizón tardío y poco susceptible a virosis (PLRV).
 Tubérculo oblongo.
 Piel blanca lisa.
 Ojos superficiales.
 Pulpa crema.

Rendimiento comercial: 30 - 40 ton/ha.

Variedad: MONTSAMA

Características: Planta pigmentada.
Precoz - intermedia.
Flor morada.
Resistente a Tizón tardío y susceptible a virus (PLRV).
Tubérculo elíptico.
Piel lisa roja.
Ojos superficiales.
Pulpa amarillo huevo.

Rendimiento comercial: 25 - 35 ton/ha.

Variedad: NORTEÑA

Características: Planta poco pigmentada.
Intermedia - tardía.
Flor blanca.
Resistente a Tizón tardío y poco susceptible a punta morada.
Susceptible a pierna negra.
Tubérculo elíptico.
Piel lisa blanca.
Ojos superficiales.
Pulpa amarillo - crema.

Rendimiento comercial: 40 - 50 ton/ha.

Variedad: ROSITA

Características: Planta verde sin pigmentos.
Tardía.
Flor rosada.
Resistente y tolerante a Tizón tardío.
Tolerante a virosis (PVY).
Tubérculo oblongo.
Piel rosa lila.
Ojos superficiales.
Pulpa amarillo huevo.

Rendimiento comercial: 40 - 50 ton/ha.

Variedad: TOLLOCAN

Características: Planta verde sin pigmentos.
Precoz - intermedia.
Flor blanca abundante.
Resistente a Tizón tardío.
Muy susceptible a virus (PLRV) y nemátodo dorado
Tubérculo oblongo elíptico.
Piel blanca áspera.
Ojos semiprofundos.
Pulpa crema.

Rendimiento comercial: 30 - 40 ton/ha.

- 4.1.2 Después de transcurrido el tiempo de almacenamiento de las muestras de papas, se selecciono 10 piezas por cada variedad, cuidando que las papas no presentarán ningún defecto, daño físico o áreas verdes.
- 4.1.3 Después de seleccionar la muestra se realizó una limpieza de la misma, lavando con agua corriente para eliminar tierra y cualquier impureza que tuvieran las papas. La muestra limpia se seca perfectamente.
- 4.1.4 El siguiente paso es la separación de cáscara y pulpa, procurando obtener la cáscara libre de pulpa, esto se logro utilizando un "cutter" o "exacto".
- 4.1.5 La pulpa de la papa se cuece en agua a ebullición (92 °C) durante 60 minutos para inhibir las enzimas causantes de oxidación; cuando las papas están cocidas se dejan escurrir y luego se pesan en balanza granataria, después se cortan y se colocan en charolas que se introdujeron en una estufa de secado con corriente de aire a temperatura controlada (50-55 ° C) durante 14 hrs. Cuando las papas están completamente secas, se pesan nuevamente, después se muelen y tamizan utilizando una malla de ½ mm de diámetro, para obtener una harina fina.
- La harina de pulpa de papa se coloca en un frasco de plástico limpio que cierra perfectamente y que contiene los datos pertinentes. Esta muestra se almacena a temperatura ambiente y oscuridad hasta el momento de su análisis.
- 4.1.6 En el caso de la cáscara se comienza pesándola en balanza granataria, después se congela con una mezcla acetona-CO₂ (hielo seco) para que alcance una temperatura de - 78 °C (congelación rápida que evita que la estructura del tejido vegetal se dañe), enseguida se liofiliza.
- Cuando la cáscara se encuentra seca, se muele en un mortero para obtener una harina fina, la cual es trasvasada a un frasco de plástico limpio, rotulado con los datos necesarios, y almacenada a temperatura ambiente y oscuridad para su posterior análisis.

4.2 Determinación de humedad.

Se realizó la determinación de la humedad en cáscara y pulpa de cada una de las variedades de papa en estudio, de acuerdo a la metodología descrita por el AOAC (30).

4.3 Técnica de extracción de glicoalcaloides en papa.

Las metodologías para la extracción y análisis de los glicoalcaloides de papa se han estudiado ampliamente y existe un gran número de métodos reportados en la bibliografía; sin embargo ningún método ha logrado una aceptación general.

En resumen, la amplia gama de métodos desarrollados, indica que un método de análisis útil consiste en tres pasos principales:

1. Extracción de los glicoalcaloides con disolventes acuosos o no acuosos. La literatura sugiere extraer con metanol, metanol-cloroformo (2:1 v/v), agua que contiene ácido 1-heptanosulfónico 0.02 M y ácido acético al 1%, ácido acético acuosos al 1 ó al 5%, agua-ácido acético-bisulfito de sodio (95:5:0.5 v/v/w) y Tetrahidrofurano-agua-acetonitrilo-acético (50:29:20:1).
2. Eliminación de sustancias que interfieren, lo cual se logra precipitando el extracto de alcaloides bajo condiciones básicas ó purificando el extracto utilizando un cartucho Sep-Pak antes de análisis. Según la literatura, el uso de cartuchos Sep-Pak ofrece ciertas desventajas como son pérdidas de muestra y variaciones de lote a lote en los cartuchos.
3. El análisis del extracto limpio de glicoalcaloides por cromatografía de líquidos de alta eficiencia. (31, 32)

Teniendo en cuenta lo anterior se adaptó y modificó procedimientos reportados en la literatura para extraer los dos principales glicoalcaloides en papa. Los métodos de extracción propuestos en este trabajo son:

1. Serie de 3 reflujos con 20 mL de ácido acético al 5% en metanol de una muestra seca en polvo (papa Alpha cargada con una concentración conocida de glicoalcaloides), filtración a través de papel whatman #40 después de cada reflujo (30 min.), alcalinización a pH 11 del extracto acético-metanólico, 3

extracciones líquido-líquido con 20 mL de alcohol isobutílico saturado con agua y concentración a sequedad del extracto butanólico por destilación simple y reconstitución del mismo con 2 mL de metanol para trasvasar a un vial, finalmente la evaporación a sequedad del extracto metanólico al vacío (33).

2. Serie de 4 agitaciones con 20 mL de ácido acético acuoso al 5% de una muestra seca en polvo (papa Alpha cargada con una concentración conocida de glicoalcaloides), filtración a través de papel whatman #42 después de cada periodo de agitación (30 min.), alcalinización a pH 11 del extracto acético, 4 extracciones líquido-líquido con 10 mL de alcohol isobutílico saturado con agua, concentración a sequedad del extracto butanólico por destilación simple y reconstitución del mismo con 2 mL de metanol para trasvasar a un vial, finalmente la evaporación a sequedad del extracto metanólico al vacío (33).

Los dos métodos de extracción propuestos anteriormente están basados principalmente en el método propuesto por Dao y Friedman en 1996 (31); al cual se le hicieron modificaciones con el fin de incrementar su eficiencia y reducir el tiempo de extracción. La idea de utilizar metanol - ácido acético como medio de extracción fue tomada del método propuesto por Carman *et al.* en 1986 (22).

Ambos métodos se probaron en muestras de pulpa de papa Alpha seca (se eligió la pulpa de la papa Alpha para el estudio del método de extracción así como para el estudio de validación debido a que esta variedad contiene cantidades muy pequeñas, no cuantificables, de los glicoalcaloides en estudio, según estudios preliminares realizados), con adición de estándares de glicoalcaloides a diferentes concentraciones para cada glicoalcaloide, respectivamente. La extracción se realizó por triplicado.

La concentración adicionada de α -solanina fue de 0.5 mg en 500 mg de pulpa de papa. La concentración adicionada de α -chaconina fue: 1 mg en 500 mg de pulpa de papa.

Para determinar cual era el mejor método de extracción se analizaron los extractos obtenidos en el cromatógrafo de líquidos y los cromatogramas obtenidos se compararon con el cromatograma obtenido de una muestra de estándares puros que

no se sometieron a ninguna extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la figuras 8, 9 y 10.

4.4 Validación de la técnica cromatográfica (HPLC).

Como en el caso de los métodos de extracción, las condiciones cromatográficas para el análisis de glicoalcaloides de papa, encontradas en la bibliografía son variadas, sin embargo, en todos los casos utilizan como eluyente principal acetonitrilo:amortiguador de fosfatos.

Las condiciones cromatográficas para este trabajo se establecieron con base en la metodología propuesta por Dao y Friedman (1996), con algunas modificaciones.

Antes de validar la técnica cromatografía, se realizó un periodo de adiestramiento para el manejo adecuado del cromatografo de líquidos y se estableció el método de extracción de glicoalcaloides.

Los parámetros a validar fueron: linealidad del sistema, linealidad del método, exactitud (% de recobro, permite validar el método de extracción), precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad de la muestra.

Antes de comenzar la validación del método es necesario establecer las condiciones cromatográficas que permitan separar y por tanto cuantificar los glicoalcaloides α -solanina y α -chaconina en papa. Para ello es necesario el calculo de los parámetros cromatográficos siguientes:

- **Eficiencia (N)**
- **Selectividad (α)**
- **Factor de capacidad (K')**
- **Resolución (Rs)**

Condiciones cromatográficas de trabajo.

1. Columna de fase inversa μ Bonda-Pak C₁₈ modelo Waters de dimensiones 3.9 x 300 mm.

2. Una mezcla de elución (fase móvil) Acetonitrilo (CH_3CN) : Fosfato monobásico de amonio acuoso 0.05 M (30:70); el pH del amortiguador de fosfatos es 6.5 ajustado con NH_4OH concentrado.
3. Un flujo de la columna de 1.5 mL/min.
4. Una detección a 200 nm y una sensibilidad del detector de 0.05 AUFS.
5. Un inyector de 20 μl (loop).

Para determinar si las condiciones cromatográficas eran adecuadas se analizaron dos soluciones (a la misma concentración) que contenía una mezcla de α -solanina y α -chaconina (estándares puros), en una proporción 2:3 respectivamente.

Las concentraciones de los estándares fueron: para α -Solanina, 1 mg/mL y para α -Chaconina, 1.5 mg/mL.

Con los resultados obtenidos se calcularon los parámetros cromatográficos para las condiciones de trabajo propuestas, éstos se muestran en la tabla No. 1.

4.4.1 VALIDACION DEL SISTEMA.

4.4.1.1 Linealidad del sistema.

Se determina mediante la elaboración de una curva de calibración, para cada uno de los dos glicoalcaloides, utilizando 7 diluciones de 0.24 mg/mL a 0.012 mg/mL para α -Solanina y 0.30 mg/mL a 0.015 mg/mL para α -Chaconina, preparadas a partir de una solución patrón y haciendo un análisis por duplicado para cada dilución. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No. 2, 3, 4 y 5; la gráfica de linealidad se muestra en las gráficas No. 1 y 2.

4.4.1.2 Precisión del sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% de concentración, 0.24 mg/mL para α -Solanina y 0.30 mg/mL para α -Chaconina. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No. 6 y 7.

4.4.2 VALIDACION DEL METODO.

4.4.2.1 Linealidad del método.

Se adicionan 4 diferentes concentraciones de cada uno de los glicoalcaloides, a muestras de pulpa de papa alpha y se hace un análisis por triplicado. Los resultados se muestran en las tablas No. 8, 9, 10 y 11

4.4.2.2 Exactitud (recobro).

Se analizan por sextuplicado extractos de glicoalcaloides obtenidos de muestras de pulpa de papa alpha adicionada con 0.12 mg de α -Solanina y 0.15 mg de α -Chaconina y 0.24 mg de α -Solanina y 0.30 α -Chaconina. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No. 12, 13, 14 y 15.

4.4.2.3 Repetibilidad

Se analizan 6 muestras de papa alpha adicionadas de forma independiente con estándares de α -Solanina y α -Chaconina, 0.18 mg/mL y 0.30 mg/mL, respectivamente. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas No. 16, 17, 18 y 19.

4.4.2.4 Límite de detección y de cuantificación.

Se analizan diluciones de una solución estándar de concentración baja (la primera concentración de la curva patrón para linealidad del sistema, 0.012 mg/mL para α -Solanina y 0.015 mg/mL para α -Chaconina), en las que se reduce la concentración de 10 en 10% de la inicial. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No. 20 y 21.

4.4.2.5 Estabilidad de la muestra.

Se evaluó analizando muestras de extracto de glicoalcaloides en diferentes tiempos de almacenamiento. Las condiciones de almacenamiento fueron refrigeración convencional durante 4 semanas. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas No. 22, 23 y 24.

5

Resultados y Discusión

5.1 TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE GLICOALCALOIDES DE PAPA.

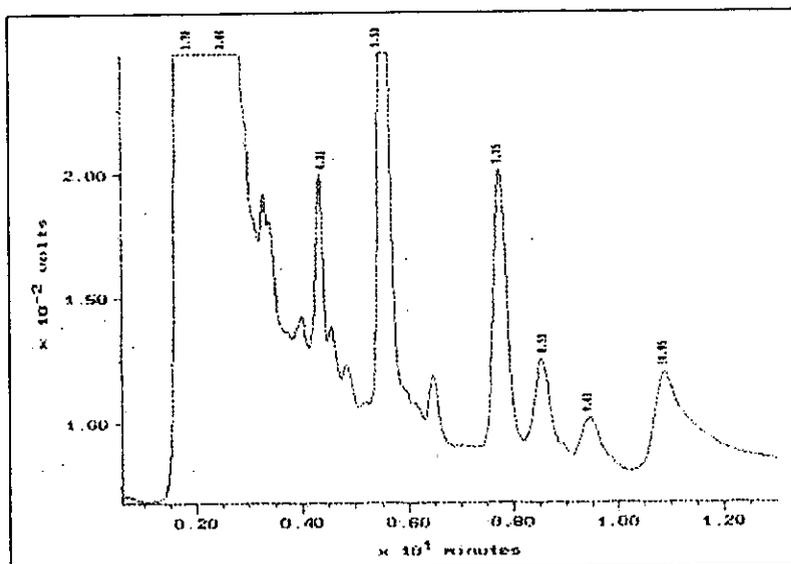


Figura 8. Cromatograma del extracto obtenido a partir de la muestra de papa Alpha adicionada con estándares de glicoalcaloides tratada por el método 1. Columna: μ Bonda-Pak C18, 30 cm x 3.9 i.d.; Fase móvil: acetonitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detección, U.V. 200 nm y 0.05 AUFS.

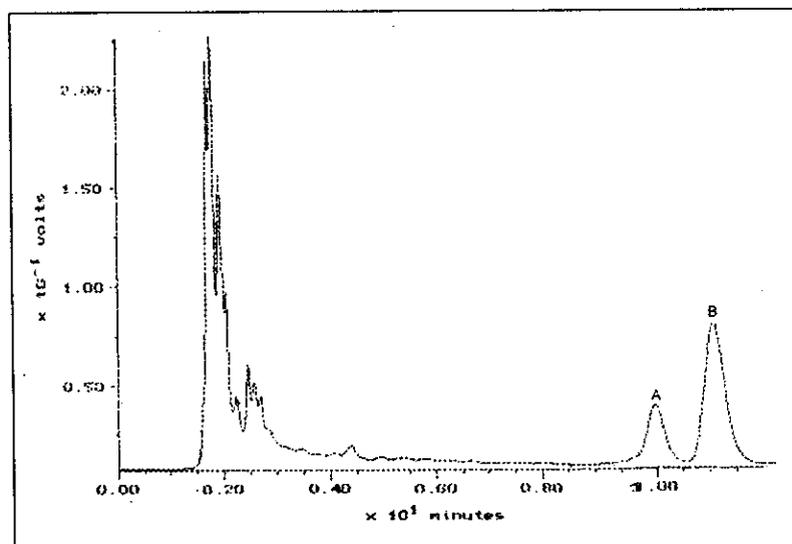


Figura 9. Cromatograma del extracto obtenido a partir de la muestra de papa Alpha adicionada con estándares de glicoalcaloides tratada por el método 2. A = α -Solanina y B = α -Chaconina. Columna: μ Bonda-Pak C18, 30 cm x 3.9 i.d.; Fase móvil: Acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detección, U.V. 200 nm y 0.05 AUFS.

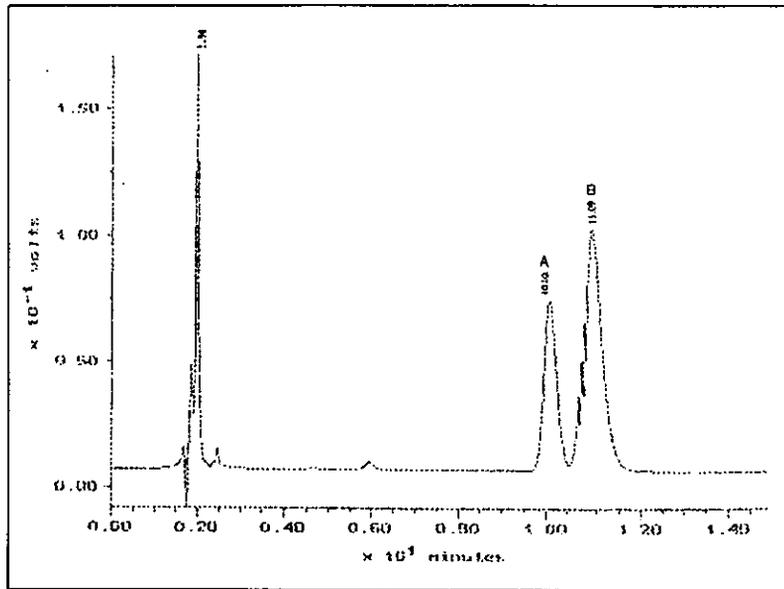


Figura 10. Cromatograma de los estándares de α -Solanina (A) y α -Chaconina (B). El cromatograma representa la respuesta obtenida para 1 mg de α -Solanina y 1.5 mg de α -Chaconina. Columna: μ Bonda-Pak C18, 30 cm x 3.9 i.d.; Fase móvil: acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detección, U.V. 200 nm y 0.05 AUFS.

Observando los resultados obtenidos podemos decir que el método de extracción 1, figura 8, no es selectivo para extraer glicoalcaloides, ya que se observan muchos picos en el cromatograma (compuestos ajenos a los analitos), los cuales interfieren con la separación y cuantificación de los glicoalcaloides de interés, además el perfil de los picos que podrían ser glicoalcaloides, es muy distinto al de los estándares puros. La baja eficiencia de este método de extracción se debe principalmente al disolvente usado, metanol, el cual solubiliza una amplia gama de compuestos, por ejemplo algunos pigmentos, mientras que los glicoalcaloides son poco solubles en metanol frío.

Los resultados obtenidos por el método de extracción 2, figura 9, indican que este método es eficiente y selectivo para extraer glicoalcaloides de papa, ya que el perfil obtenido en el cromatograma es muy similar al cromatograma obtenido de la solución de estándares, figura 10. Por otra parte, los tiempos de retención de los glicoalcaloides tanto en el estándar puro como en el extracto obtenido a partir de pulpa de papa alpha son muy similares: para α -Solanina es de 10.02 min. en el

estándar y 10.05 min. en pulpa de papa alpha y para α -Chaconina es de 11.09 min. en el estándar y 11.16 min. en pulpa de papa alpha.

El método de extracción 2 permite una buena extracción de glicoalcaloides debido a que el ácido acético, aunque es un ácido débil, ayuda a que el nitrógeno que presenta la estructura de los glicoalcaloides adquiera una carga positiva, haciéndolos de esta manera más solubles en el medio acuoso.

Para realizar la extracción de los glicoalcaloides, α -Solanina y α -Chaconina, en las 12 variedades de papa en estudio, se utilizará el método No. 2 por presentar un mejor perfil de los glicoalcaloides de interés, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los picos mostrados en el cromatograma del extracto obtenido por el método No.1 pudieran ser compuestos del tipo de los alcaloides esteroidales.

5.2 VALIDACION.

• PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS.

Con las condiciones establecidas se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla No. 1			
PARÁMETROS	α -solanina : α -chaconina		
	Mtra 1	Mtra 2	Promedio
Eficiencia (N)	1553.15:1585.11	1559.32:1582.84	1556.23:1583.97
Resolución (R)	1.01	1.00	1.005
Selectividad (α)	1.1076	1.1067	1.1071
Factor de Capacidad (K)	3.035:3.469	3.039:3.470	3.037:3.469

Parámetros cromatográficos obtenidos de la evaluación cromatográfica de dos muestras (mezcla de estándares de glicoalcaloides: α -Solanina y α -Chaconina) bajo las condiciones propuestas.

MUESTRA 1:

to. = 2.483 min.

α -Solanina

tr. = 10.02 min

Wb = 1.017 min

α -Chaconina

tr. = 11.098 min.

Wb = 1.115min.

MUESTRA 2:

to. = 2.483 min.

α -Solanina

tr. = 10.03 min.

Wb = 1.016 min.

α -Chaconina

tr. = 11.100 min.

Wb = 1.116 min.

Los resultados obtenidos en cuanto a eficiente (N) muestran que la columna utilizada, μ Bonda-Pak C₁₈, tiene un buen poder de separación para los glicoalcaloides α -Solanina y α -Chaconina, ya que los valores obtenidos son altos.

Los valores de resolución (R) obtenidos muestran que hay una separación aceptable entre α -Solanina y α -Chaconina, esto con base en lo que nos dice la literatura: la resolución mínima aceptable en mezclas sencillas (dos compuestos) es 1.0 lo cual corresponde a un 98% de separación entre dos compuestos. El valor promedio obtenido para la mezcla de glicoalcaloides es 1.005, lo cual corresponde con el valor mínimo aceptable.

Se considera que hay una buena selectividad en el sistema cuando $\alpha \geq 1$, en el caso de la mezcla de glicoalcaloides se obtuvo un valor promedio de $\alpha = 1.1071$, lo cual indica que ambos compuestos, α -Solanina y α -Chaconina, tiene solubilidades semejantes con respecto a la fase estacionaria, por lo cual sus tiempos de retención son muy cercanos, pero lo suficiente para su separación. La solubilidad similar de ambos glicoalcaloides con respecto a la fase estacionaria, se explica por la semejanza que tienen en su estructura química.

Los valores promedio del factor de capacidad obtenidos para los glicoalcaloides nos indican que la α -Chaconina es ligeramente más retenida por la columna que la α -Solanina, puesto que su valor de K' es mayor, 3.469 para α -Chaconina y 3.037 para α -Solanina. Debido a lo antes mencionado, la α -Chaconina tarda más tiempo en eluir que la α -Solanina. Se considera que los valores óptimos de K' son de 2 a 6, considerando dicho rango de valores, podemos decir que ambos glicoalcaloides en estudio presentan una adecuada retención por el sistema, lo cual facilita su separación.

- **LINEALIDAD DEL SISTEMA.**

Conc. de dilución (mg/mL)	Altura (μ V) 1	Altura (μ V) 2	Promedio
0.0120	1798	1771	1784.5
0.0300	5032	5183	5107.5
0.0600	8856	8535	8695.5
0.0912	11085	11239	11162.0
0.1200	14950	15240	15095.0
0.1800	20346	22347	21346.5
0.2400	26926	26830	26878.0

Datos de concentración (mg/mL) de α -solanina y altura (μ V) para obtener la linealidad del sistema.

Tabla No. 3		
Resultados de la evaluación estadística Para linealidad del Sistema por HPLC Para la cuantificación de α -solanina		
$r = 0.9966$	$b = 1093.07$	$m = 110917.137$
$r^2 = 0.9932$		

DADO QUE $r > 0.9900$ Y $r^2 > 0.98$. SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

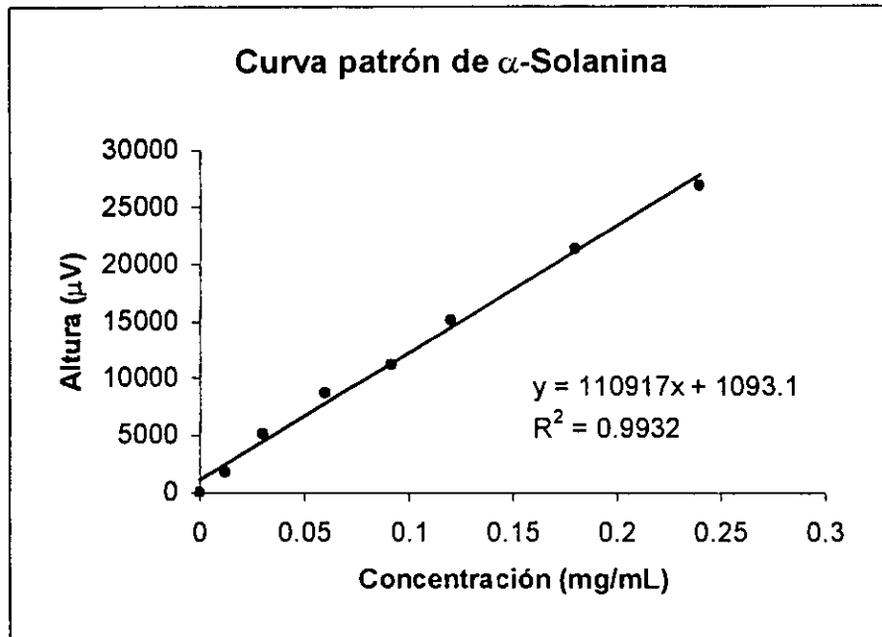
Tabla No. 4.			
Curva patrón de α -Chaconina			
Conc. de dilución (mg/mL)	Altura (μ V) 1	Altura (μ V) 2	Promedio
0.0150	2288	2333	2310.5
0.0375	6600	6807	6703.5
0.0750	9758	9404	9581.0
0.1140	12195	12306	12250.5
0.1500	16382	16709	16545.5
0.2250	22763	25439	24101.0
0.3000	31478	31495	31486.5

Datos de concentración (mg/mL) de α -Chaconina y altura (μ V) para obtener la linealidad del sistema.

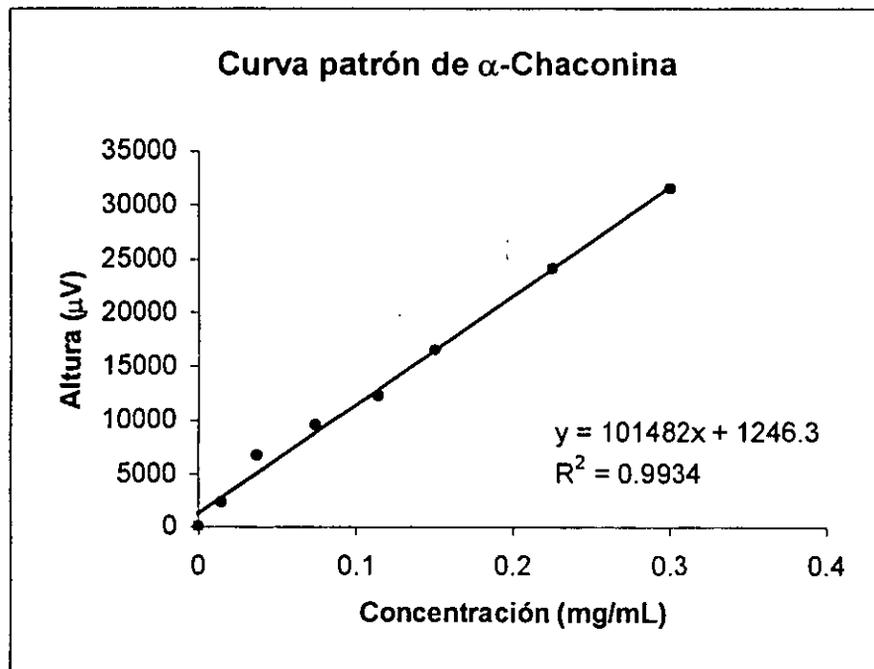
Tabla No. 5		
Resultados de la evaluación estadística Para linealidad del Sistema por HPLC Para la cuantificación de α -Chaconina		
$r = 0.9967$	$b = 1246.333$	$m = 101481.544$
$r^2 = 0.9934$		

DADO QUE $r > 0.9900$ Y $r^2 > 0.98$. SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL SISTEMA.

Al evaluar la linealidad de sistema se obtuvo que existe una relación lineal entre la cantidad adicionada de estándares y la respuesta del equipo (altura del pico en μ V, Tablas No. 2 y 4) presentando un coeficiente de correlación de 0.9966 para α -Solanina y de 0.9967 para α -Chaconina (Tablas No. 3 y 4, gráficas No. 1 y 2), con lo cual se afirma que cumple con los criterios para linealidad del sistema para ambos glicoalcaloides.



Gráfica No. 1. Curva estándar de α -solanina vs respuesta para evaluar la linealidad del método.



Gráfica No. 2. Curva estándar de α -Chaconina vs respuesta para evaluar la linealidad del método.

- **PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

Tabla No. 6 Datos de altura (μV) para obtener La precisión del sistema α -Solanina α -Chaconina			
Análisis (#)	Altura (μV)	Análisis (#)	Altura (μV)
1	27100	1	30803
2	26234	2	30787
3	27268	3	31882
4	26926	4	31478
5	26830	5	31495
6	25794	6	30207

Tabla No. 7 Resultados de la evaluación estadística para precisión Del sistema por HPLC para la cuantificación de:	
α -Solanina	α -Chaconina
DE = 563.59	DE = 615.41
CV = 2.11 %	CV = 1.978%

DADO QUE $CV < 3\%$, SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA PRECISION DEL SISTEMA.

De los resultados obtenidos (Tablas No. 6 y 7) se observa que el sistema es preciso para ambos glicoalcaloides debido a que el coeficiente de variación es menor a 3 %, 2.11% para α -Solanina y 1.978 % para α -Chaconina, cumpliendo así con el criterio para precisión del sistema.

- **LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

Tabla No. 8 Datos de mg recuperados y % de recobro de α -Solanina para obtener la linealidad del método.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado
0.0300	0.0297	99.1710
0.0300	0.0298	99.2317
0.0300	0.0297	99.0808
0.0600	0.0604	100.5995
0.0600	0.0603	100.5545
0.0600	0.0594	99.0218
0.1200	0.1199	99.9166
0.1200	0.1198	99.8487
0.1200	0.1206	100.5000
0.2400	0.2398	99.9505
0.2400	0.2399	99.9580
0.2400	0.2401	100.0444

Tabla No. 9	
Resultados de la evaluación estadística para la linealidad del método por HPLC para la α - Solanina.	
$r = 0.99999$	$r^2 = 0.99998$
Pendiente: $m = 1.0004$	
Ordenada al origen: $b = - 1.0434 E -4$	
Promedio de recobro: $R = 99.8256$	
Desviación estándar: $DE = 0.57727$	
Coeficiente de variación: $CV = 0.578282 \%$	

YA QUE $b \cong 0$, $m \cong 1$, $r^2 > 0.98$ Y $CV < 2 \%$. SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Tabla No. 10		
Datos de mg recuperados y % de recobro de α -Chaconina para obtener la linealidad del método.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado
0.0375	0.03698	98.6364
0.0375	0.03707	98.8729
0.0375	0.03710	98.9518
0.0750	0.07443	99.2452
0.0750	0.07463	99.5080
0.0750	0.07472	99.6393
0.1500	0.14930	99.5496
0.1500	0.14971	99.8123
0.1500	0.14981	99.8780
0.3000	0.29935	99.7839
0.3000	0.29929	99.7642
0.3000	0.29917	99.7247

Tabla No. 11	
Resultados de la evaluación estadística para la linealidad del método por HPLC para la α - Chaconina	
$r = 0.99999$	$r^2 = 0.99999$
Pendiente: $m = 0.99884$	
Ordenada al origen: $b = - 3.31739 E -4$	
Promedio de recobro: $R = 99.44719$	
Desviación estándar: $DE = 0.419334$	
Coeficiente de variación: $CV = 0.421665 \%$	

YA QUE $b \cong 0$, $m \cong 1$, $r^2 > 0.98$ Y $CV < 2 \%$. SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA LINEALIDAD DEL MÉTODO.

Los resultados obtenidos del estudio de linealidad del método, muestran una relación lineal entre la cantidad adicionada de estándares de glicoalcaloides y la cantidad recuperada en el análisis, lo cual indica la proporcionalidad existente en el intervalo de concentración analizado para ambos glicoalcaloides (Tablas No. 8 y 10). En este parámetro, se obtuvo para α -solanina una pendiente igual a la unidad, la ordenada al origen se aproxima a cero y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 (Tabla No. 9); para α -Chaconina se obtuvo una pendiente cercana a la unidad, la ordenada al origen se aproxima a cero y el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 (Tabla No. 11), los resultados antes mencionados permiten afirmar que se cumple con los criterios de linealidad del método.

- **EXACTITUD DEL MÉTODO.**

Tabla No. 12		
Datos de mg recuperados y % de recobro De α -Solanina para obtener la exactitud del método.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado
0.1200	0.1198	99.80371
0.1200	0.1190	99.22520
0.1200	0.1202	100.20190
0.1200	0.1204	100.31460
0.1200	0.1189	99.07494
0.1200	0.1188	99.01483
0.2400	0.2401	100.06317
0.2400	0.2398	99.95048
0.2400	0.2402	100.10074
0.2400	0.2395	99.80021
0.2400	0.2389	99.57482
0.2400	0.2379	99.16160

Tabla No. 13	
Resultados de la evaluación estadística para la exactitud del método por HPLC para la α -Solanina.	
Promedio de recobro:	R = 99.6905
Desviación estándar:	DE = 0.46668
Coficiente de variación:	CV = 0.46813 %

YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y CV < 2 %, SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA EXACTITUD DEL MÉTODO.

Tabla No. 14		
Datos de mg recuperados y % de recobro De α -Chaconina para obtener la exactitud del método.		
mg Adicionados	mg Recuperados	% Recuperado
0.1500	0.14952	99.68096
0.1500	0.14931	99.54300
0.1500	0.14893	99.28680
0.1500	0.14824	98.82695
0.1500	0.14794	98.62987
0.1500	0.15011	100.07512
0.3000	0.29925	99.75013
0.3000	0.29890	99.63600
0.3000	0.30034	100.11234
0.3000	0.30078	100.26016
0.3000	0.30097	100.32585
0.3000	0.29792	99.30760

Tabla No. 15	
Resultados de la evaluación estadística para la exactitud del método por HPLC para la α -Chaconina.	
Promedio de recobro:	R = 99.6196
Desviación estándar:	DE = 0.53957
Coefficiente de variación:	CV = 0.54163 %

YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y CV < 2 %.
SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA EXACTITUD DEL MÉTODO.

La exactitud presentada por el método analítico a los niveles de concentración de 0.12 y 0.24 mg/mL para α -Solanina (Tabla No. 12) y de 0.15 y 0.30 mg/mL para α -Chaconina (Tabla No. 14) cumple con los criterios establecidos, debido a que los promedios de recobro están entre el 98 y 102 %, 99.69 % para α -Solanina y 99.62 % α -Chaconina, y dado que los coeficientes de variación para ambos compuestos son menores al 2 % (Tablas No. 13 y 15) podemos decir que el método analítico es exacto.

- REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Tabla No. 16	
Datos obtenidos para la determinación de Repetibilidad del método analítico para α -Solanina.	
Altura (μ V)	% Recuperado
21264	101.03103
21208	100.75054
21156	100.49008
21117	100.29474
21050	99.95915
21178	100.60027

Tabla No. 17	
Resultados de la evaluación estadística para la repetibilidad del método por HPLC Para α - Solanina.	
Promedio de recobro: R = 100.5209	
Desviación estándar: DE = 0.37065	
Coeficiente de variación: CV = 0.36874 %	

YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y CV < 2 %.
SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

Tabla No. 18	
Datos obtenidos para la determinación de Repetibilidad del método analítico para α -Chaconina.	
Altura (μ V)	% Recuperado
31420	99.11052
31370	98.94629
31400	99.04483
31390	99.01193
31460	99.24191
31385	98.99556

Tabla No. 19	
Resultados de la evaluación estadística para la repetibilidad del método por HPLC Para α - Chaconina.	
Promedio de recobro: R = 99.0585	
Desviación estándar: DE = 0.10512	
Coeficiente de variación: CV = 0.10612 %	

YA QUE R SE ENCUENTRA DENTRO DEL 98 AL 102 % Y CV < 2 %.
SE CUMPLE CON LOS CRITERIOS PARA REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

En los resultados para repetibilidad del método se observa que hay concordancia entre los valores obtenidos (tablas No. 16 y 18) para ambos glicoalcaloides, los promedios de recobro obtenidos están entre el 98 y 102 % y los coeficientes de variación son menores al 2 % (Tablas No. 17 y 19), con lo cual se afirma que el método es repetible.

- LIMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LIMITE DE DETECCIÓN.

Tabla No. 20 Datos obtenidos para la determinación del Limite de Cuantificación y Limite de Detección Para α -Solanina.	
Concentración (mg/mL)	Altura (μ V)
0.0120	1771
0.0096	1406
0.0072	Si detecta / No cuantifica
0.0048	Si detecta / No cuantifica
0.0024	Si detecta / No cuantifica
0.0012	No detecta

Tabla No. 21 Datos obtenidos para la determinación del Limite de Cuantificación y Limite de Detección Para α -Chaconina.	
Concentración (mg/mL)	Altura (μ V)
0.0150	2310
0.0120	1559
0.0090	1230
0.0060	Si detecta / No cuantifica
0.0030	Si detecta / No cuantifica
0.0015	No detecta

Los resultados obtenidos muestran que el límite de cuantificación para α -Solanina es de 0.0096 mg/mL mientras que para α -Chaconina es de 0.0090 mg/mL.

El límite de detección para α -Solanina esta a una concentración de 0.0024 mg/mL y el de α -Chaconina a una concentración de 0.0030 mg/mL, concentraciones inferiores a las mencionadas ya no dan respuesta bajo las condiciones establecidas.

- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA.

mg adicionados	To	Semana 1	Semana 2	Semana 3
α-Solanina 0.1200	0.1225	0.1204	0.1218	0.1211
	0.1227	0.1204	0.1215	0.1210
	0.1207	0.1203	0.1203	0.1210
	0.1208	0.1202	0.1202	0.1208
α-Chaconina 0.1500	0.1488	0.1487	0.1488	0.1487
	0.1487	0.1487	0.1488	0.1487
	0.1496	0.1485	0.1493	0.1497
	0.1496	0.1485	0.1495	0.1496

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Tiempo	3	3.525 E - 6	1.175 E - 6	2.556
Error	12	5.515 E - 6	4.595 E - 7	
Total	15	9.040 E - 6		

Fuente de Variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada
Tiempo	3	9.250 E - 7	3.083 E - 7	1.800
Error	12	2.055 E - 6	1.712 E - 7	
Total	15	2.980 E - 6		

Al realizar el análisis estadístico (ANDEVA), Tablas No. 23 y 24, de los datos obtenidos para el estudio de estabilidad de la muestra (Tabla No. 22) se observa que el contenido de glicoalcaloides (α -Solanina y α -Chaconina) en las muestras permanece estable durante el almacenamiento, ya que en ambos casos la F calculada es menor a la F de tablas ($F = 2.61$ para un nivel de significancia de 0.1).

5.3 SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GLICOALCALOIDES EN PAPAS COMERCIALES.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos para las diferentes variedades de papa analizadas, tanto de cáscara como de pulpa.

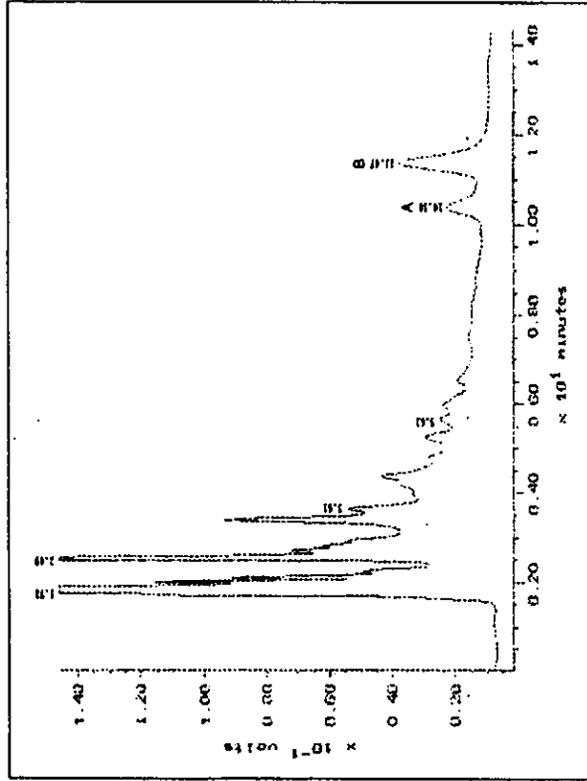


Figura 11. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa ALPHA, A = α -Solanina ($t_r = 10.38$ min) y B = α -Chaconina ($t_r = 11.47$ min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

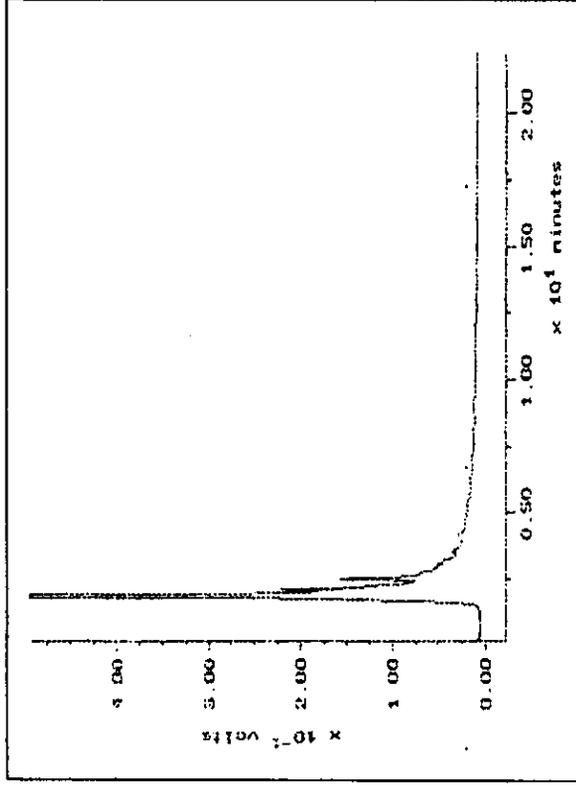


Figura 12. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa ALPHA. Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

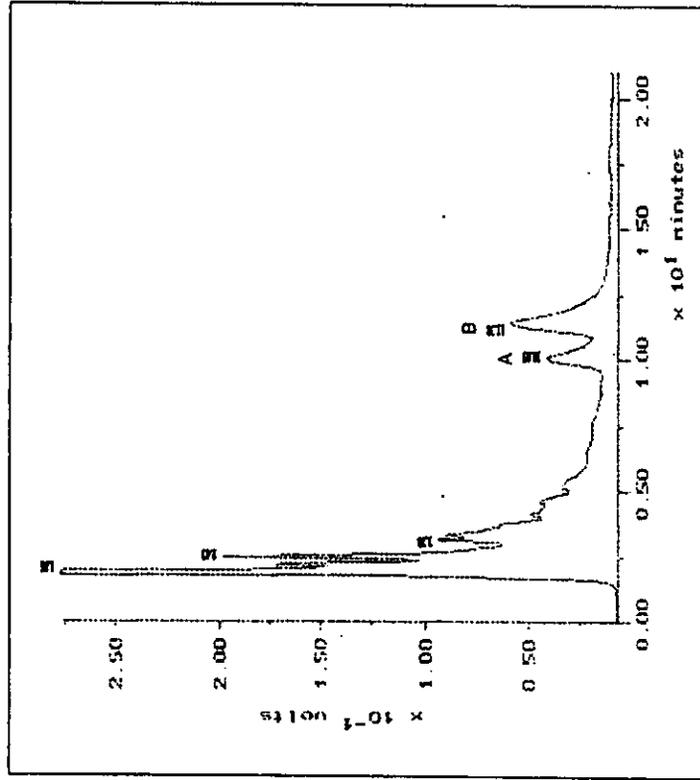


Figura 13. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa ATZIMBA, A = α -Solanina (tr = 10.03 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.38 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

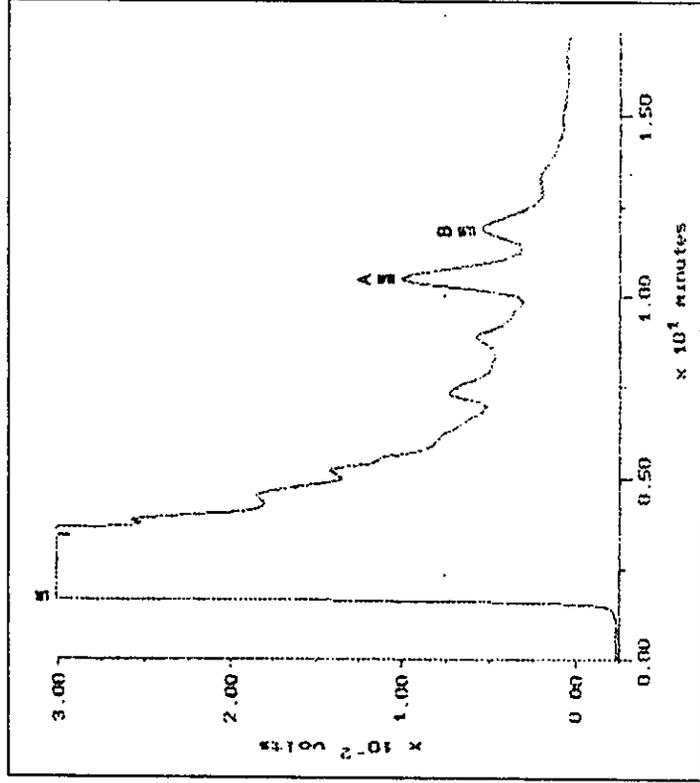


Figura 14. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa ATZIMBA, A = α -Solanina (tr = 10.48 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.93 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

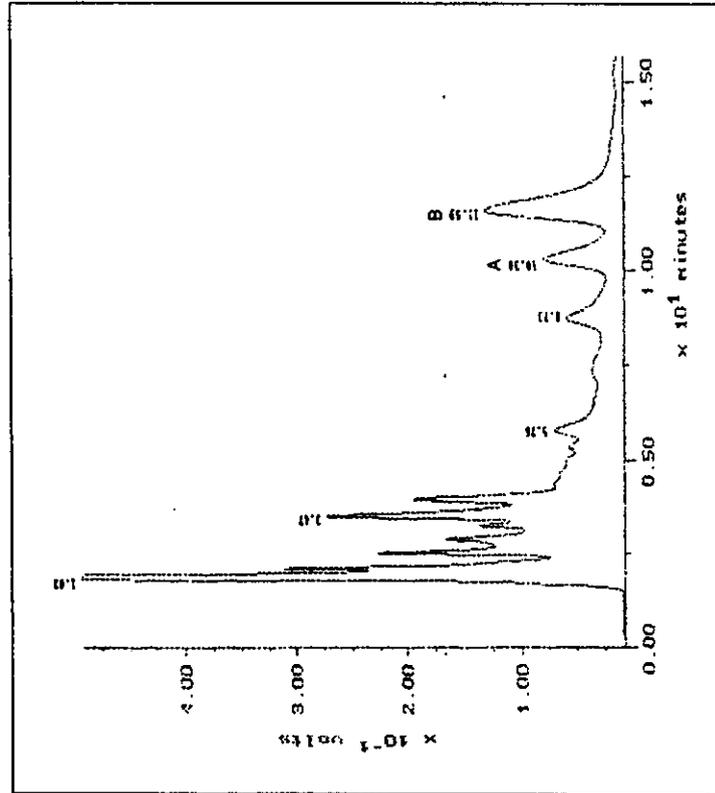


Figura 15. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa JUANITA, A = α -Solanina (tr = 10.30 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.59 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

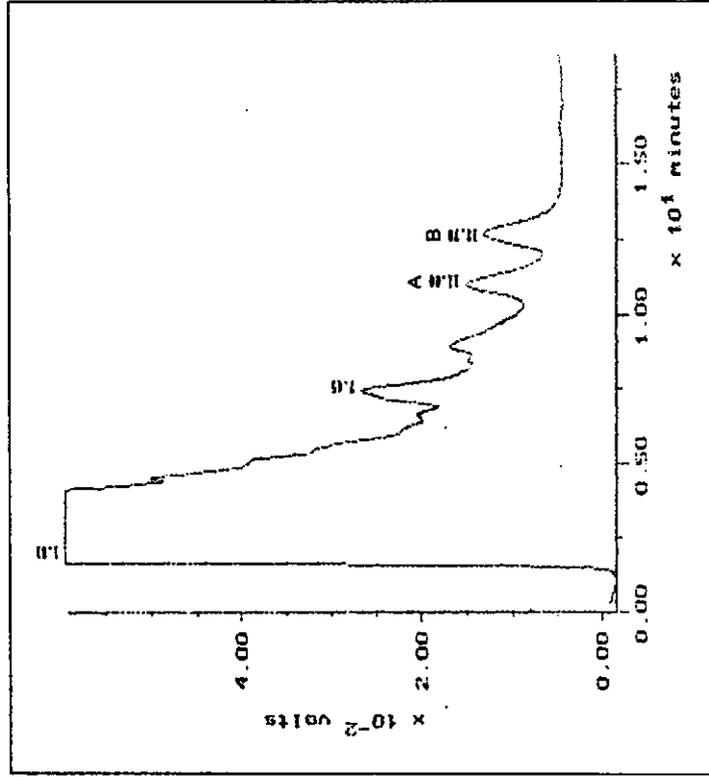


Figura 16. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa JUANITA, A = α -Solanina (tr = 11.00 min) y B = α -Chaconina (tr = 12.70 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

VARIEDAD LÓPEZ

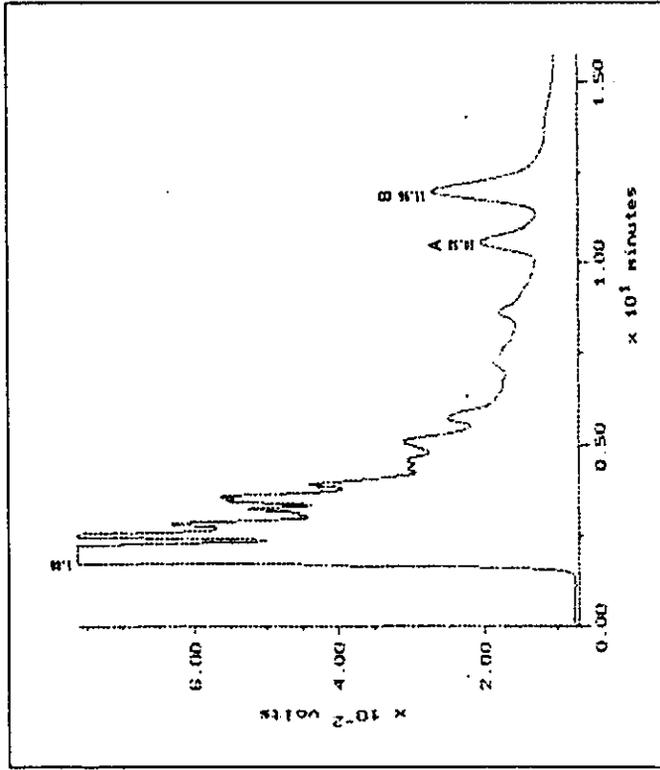


Figura 17. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa LÓPEZ, A = α -Solanina (t_r = 10.52 min) y B = α -Chaconina (t_r = 11.96 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetonitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

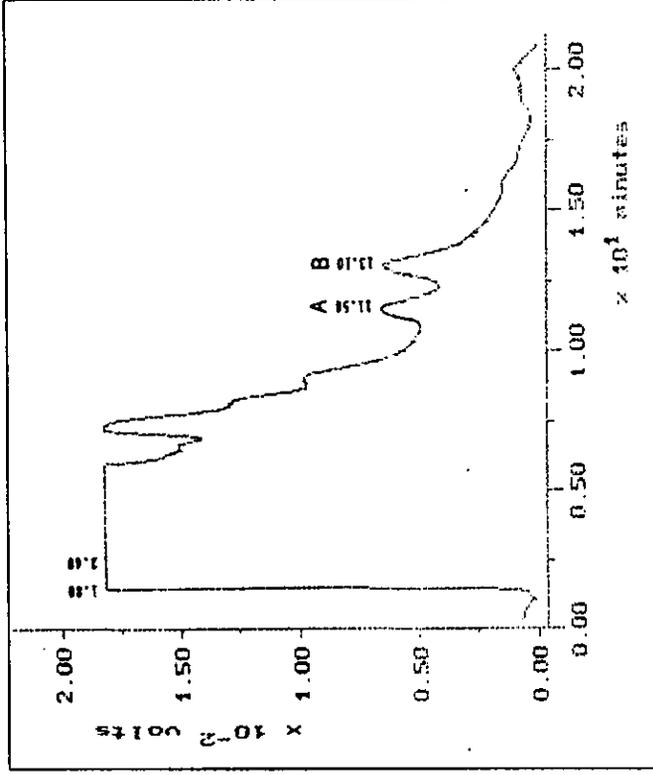


Figura 18. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa LÓPEZ, A = α -Solanina (t_r = 11.58 min) y B = α -Chaconina (t_r = 13.10 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetonitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

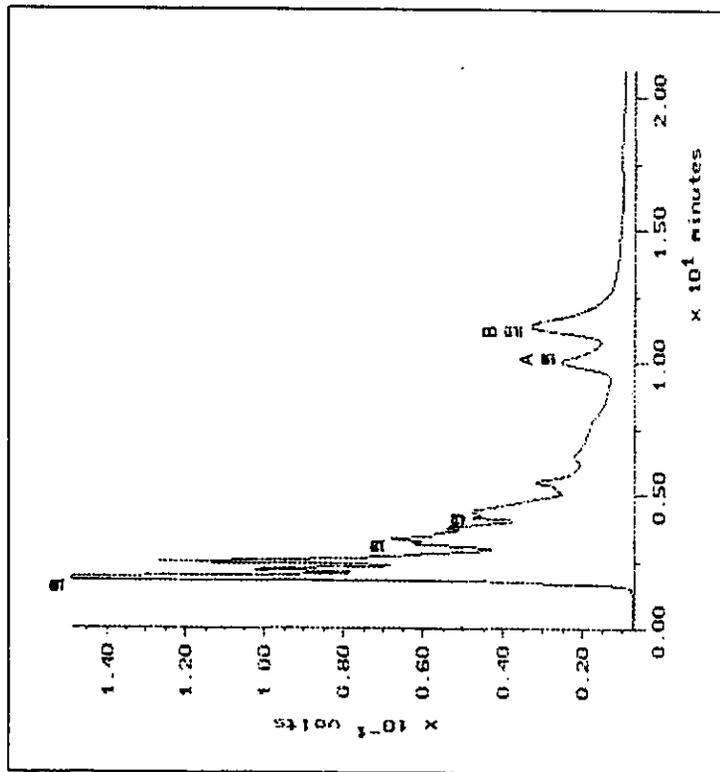


Figura 19. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa MARCIANA, A = α -Solanina (tr = 9.98 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.33 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

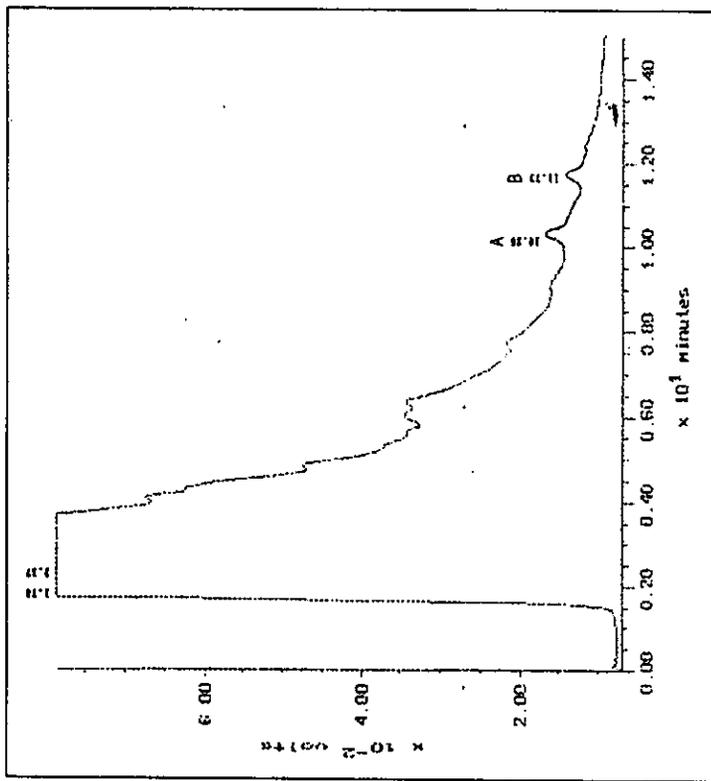


Figura 20. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa MARCIANA, A = α -Solanina (tr = 10.26 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.73 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

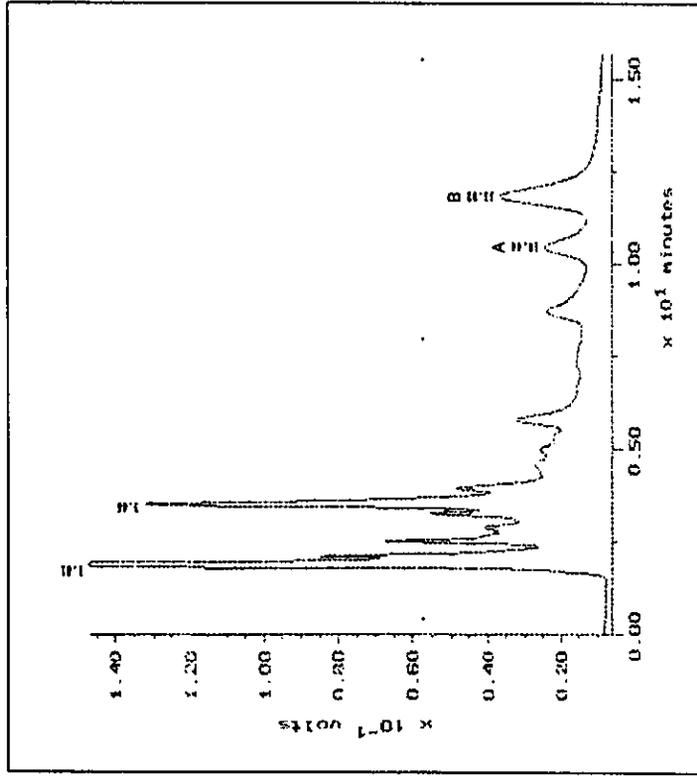


Figura 21. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa MICHUOACAN, A = α -Solanina (tr = 10.44 min) y B = α -Chaconina (tr=11.82 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetronitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

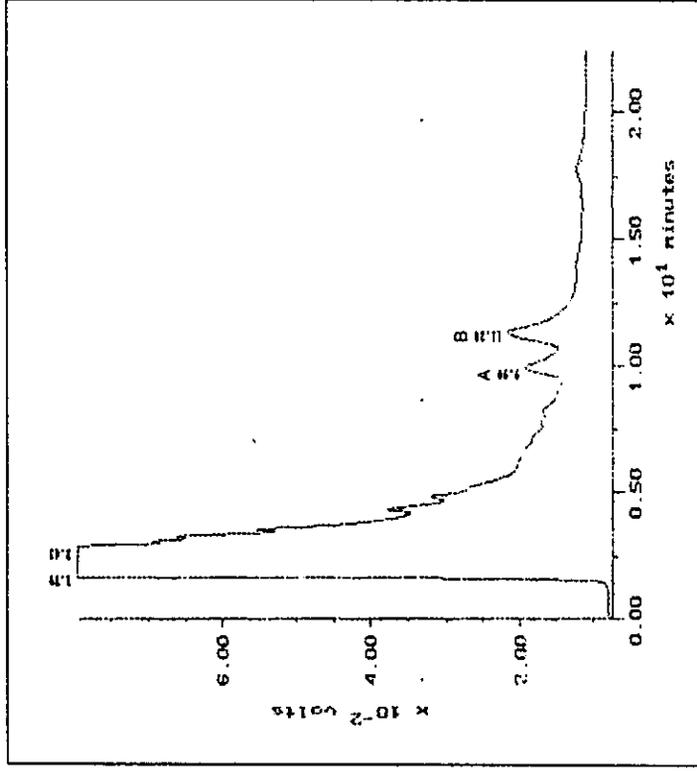


Figura 22. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa MICHUOACAN, A = α -Solanina (tr = 9.90 min) y B = α -Chaconina (tr=11.28 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetronitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

VARIEDAD MONTSAMÁ

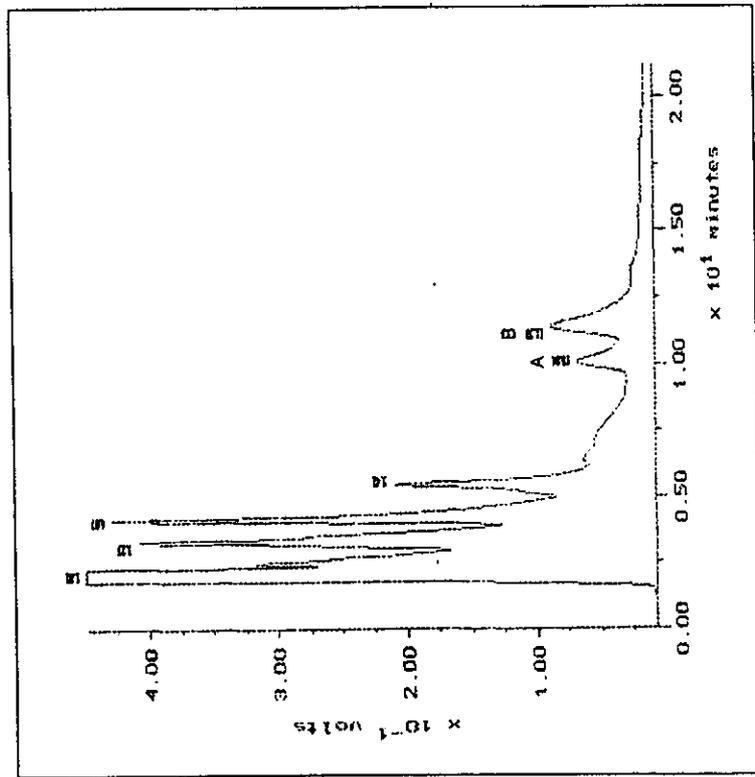


Figura 23. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa MONTSAMÁ, A = α -Solanina ($t_r = 10.04$ min) y B = α -Chaconina ($t_r = 11.38$ min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C-18 ($10 \mu\text{m}$, 3.9×300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M ($30:70$), pH 6.50 ; Flujo 1.5 mL/min ; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: $20 \mu\text{L}$.

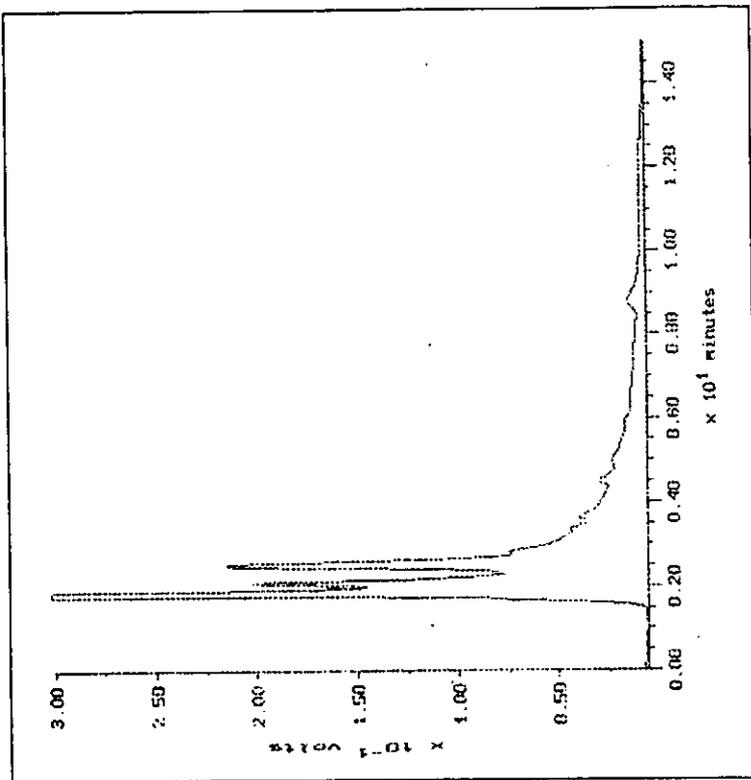


Figura 24. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa MONTSAMÁ. Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C-18 ($10 \mu\text{m}$, 3.9×300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M ($30:70$), pH 6.50 ; Flujo 1.5 mL/min ; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: $20 \mu\text{L}$.

VARIEDAD MURCA

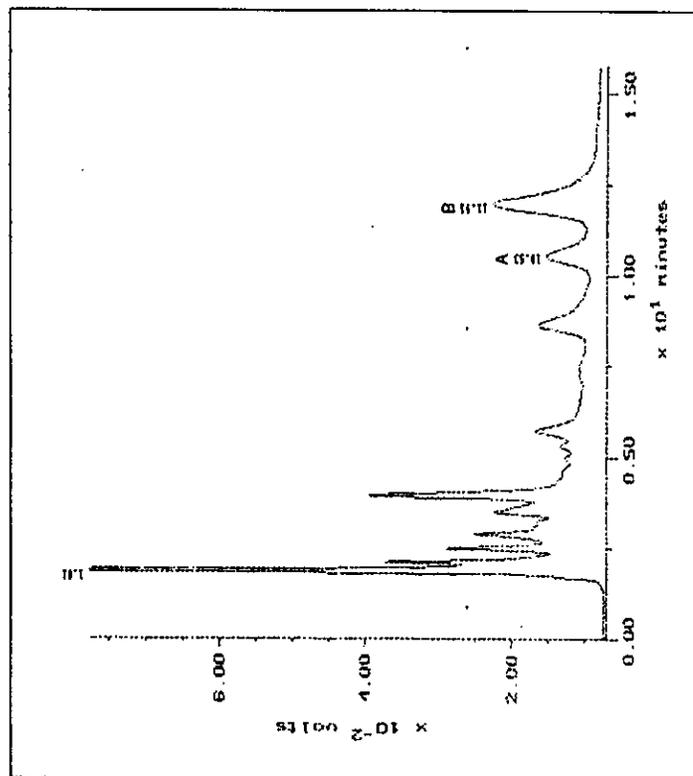


Figura 25. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa MURCA, A = α -Solanina (t_r = 10.53 min) y B = α -Chaconina (t_r = 11.93 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

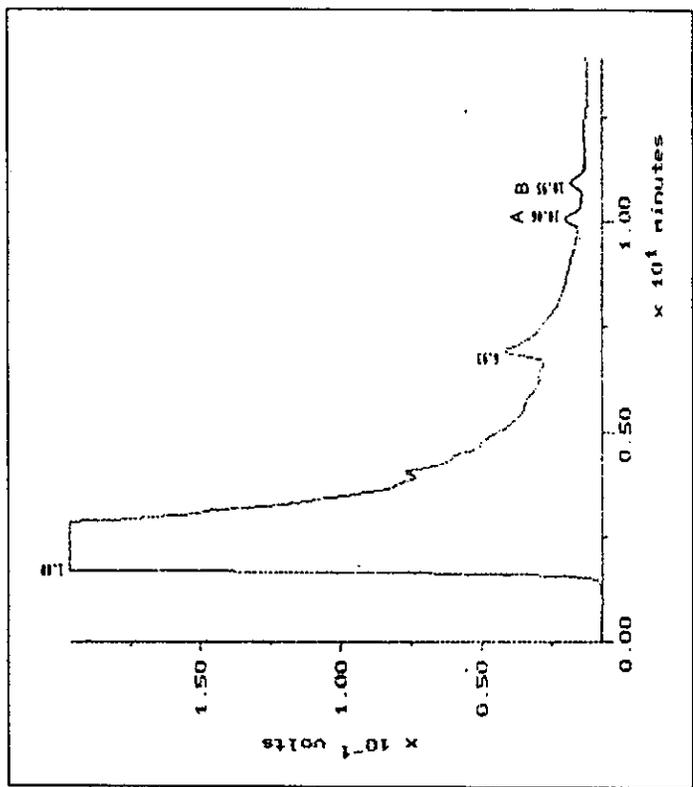


Figura 26. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa MURCA, A = α -Solanina (t_r = 10.06 min) y B = α -Chaconina (t_r = 10.95 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

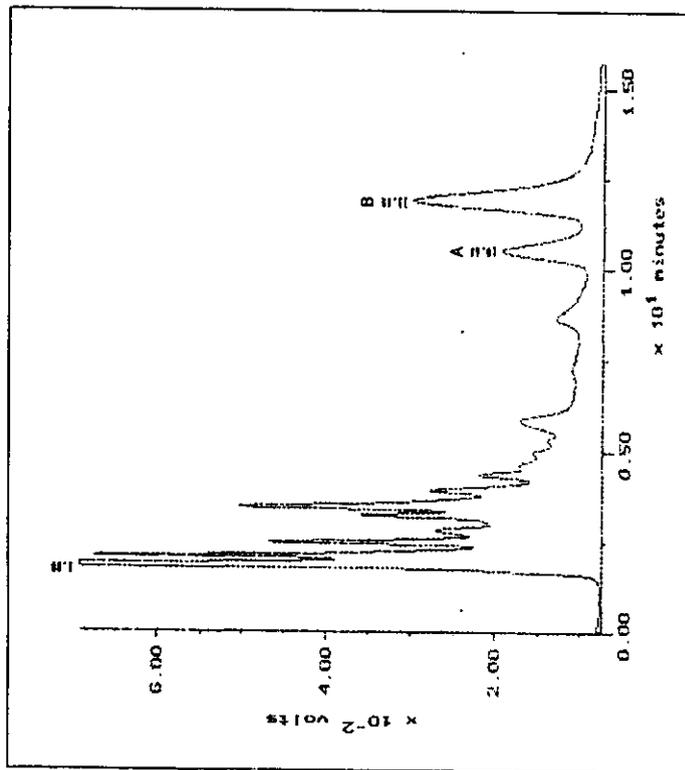


Figura 27. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa NORTEÑA, A = α -Solanina (tr = 10.48 min) y B = α -Chaconina (tr=11.88 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador defosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

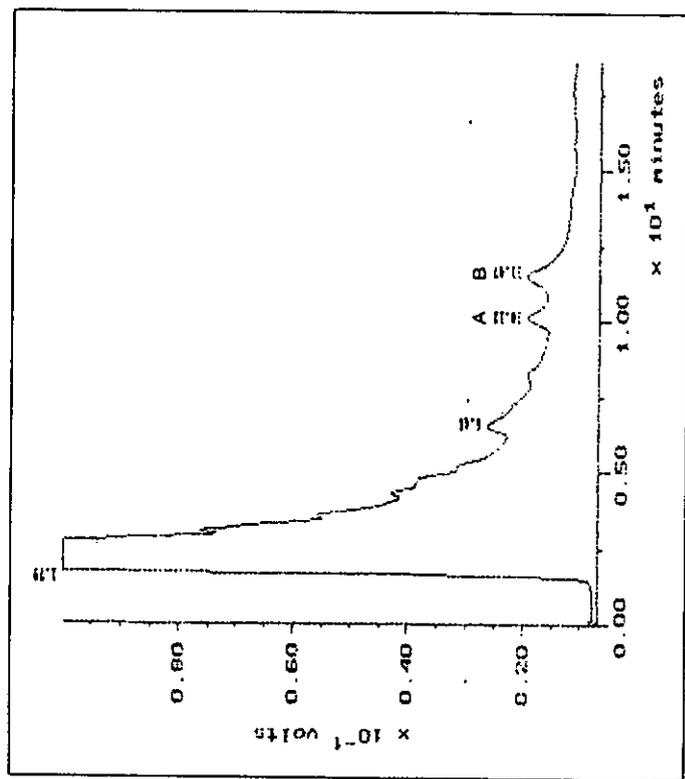


Figura 28. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa NORTEÑA, A = α -Solanina (tr = 10.12 min) y B = α -Chaconina (tr=11.47 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

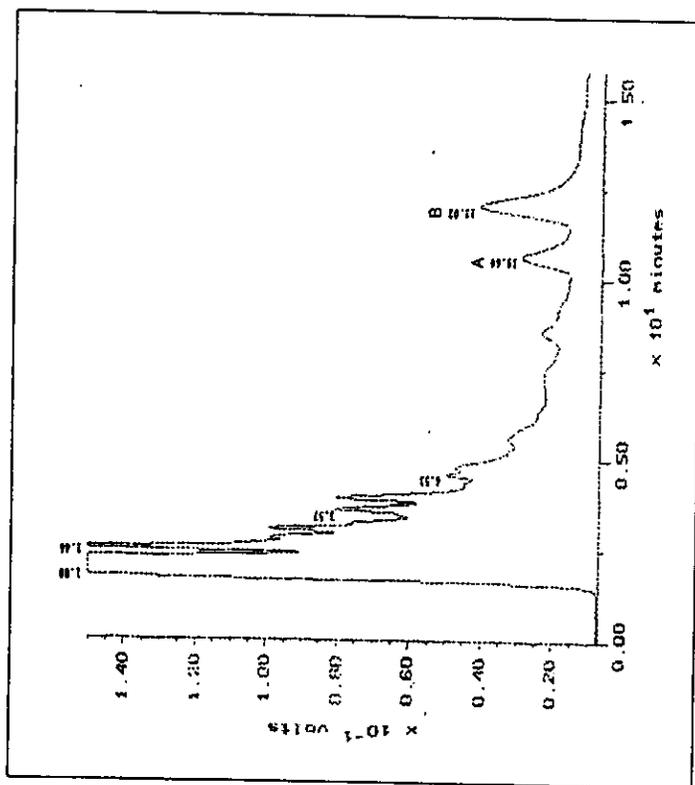


Figura 29. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa PUEBLA, A = α -Solanina (t_r = 10.60 min) y B = α -Chaconina (t_r = 12.02 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetonitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

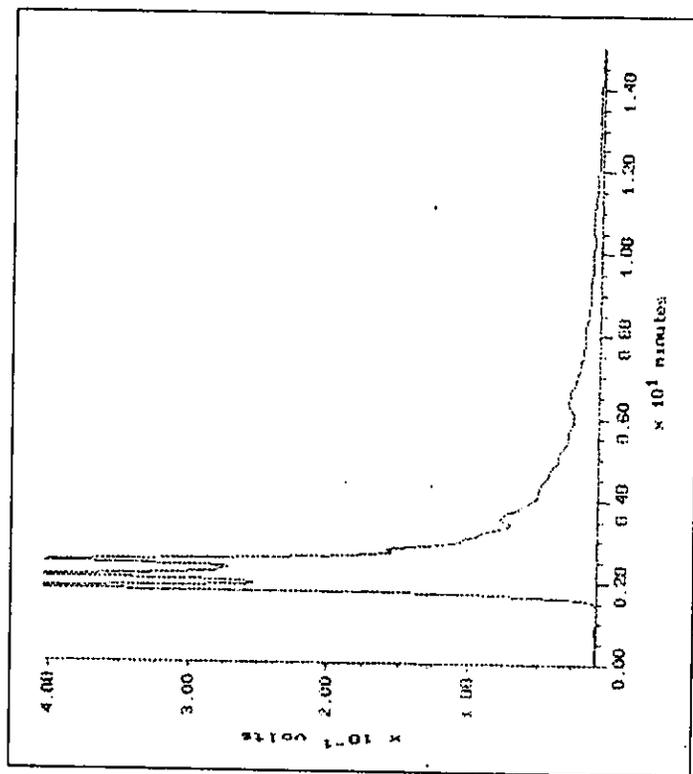


Figura 30. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa PUEBLA. Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetonitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

VARIEDAD ROSITA

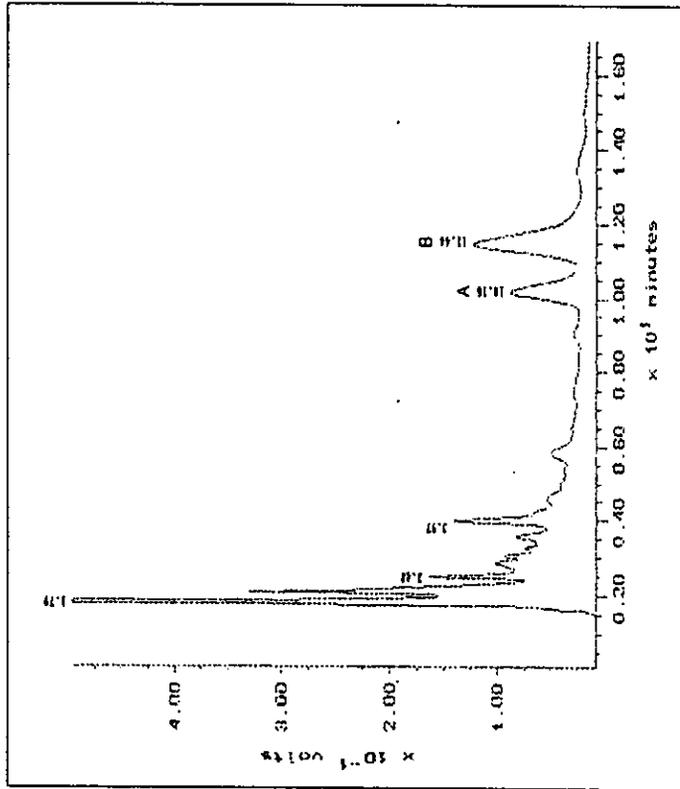


Figura 31. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa ROSITA, A = α -Solanina (t_r = 10.16 min) y B = α -Chaconina (t_r = 11.44 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetoniitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

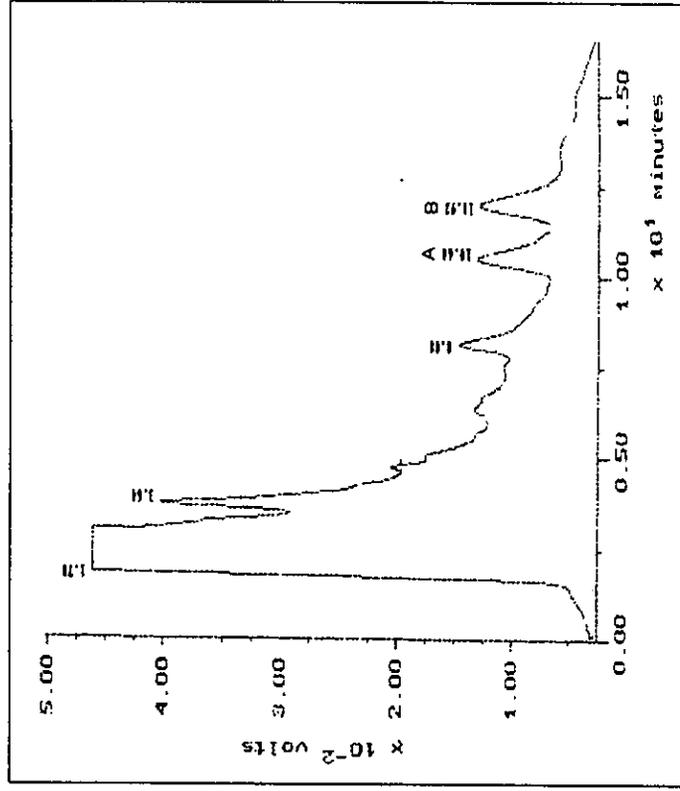


Figura 32. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa ROSITA, A = α -Solanina (t_r = 10.44 min) y B = α -Chaconina (t_r = 11.92 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetoniitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

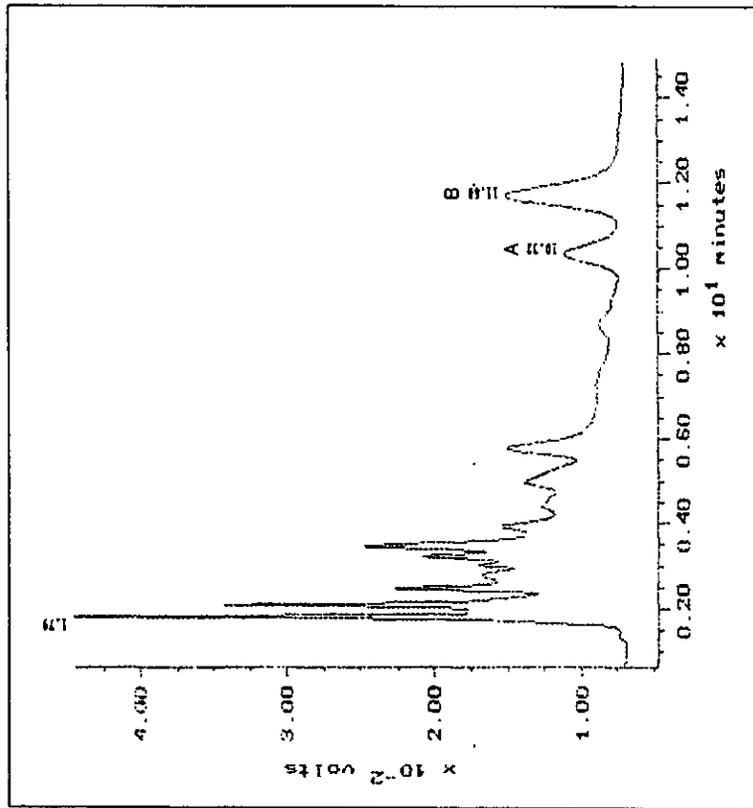


Figura 33. Cromatograma obtenido del extracto de cáscara de papa TOLLOCAN, A = α -Solanina (tr = 10.32 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.68 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

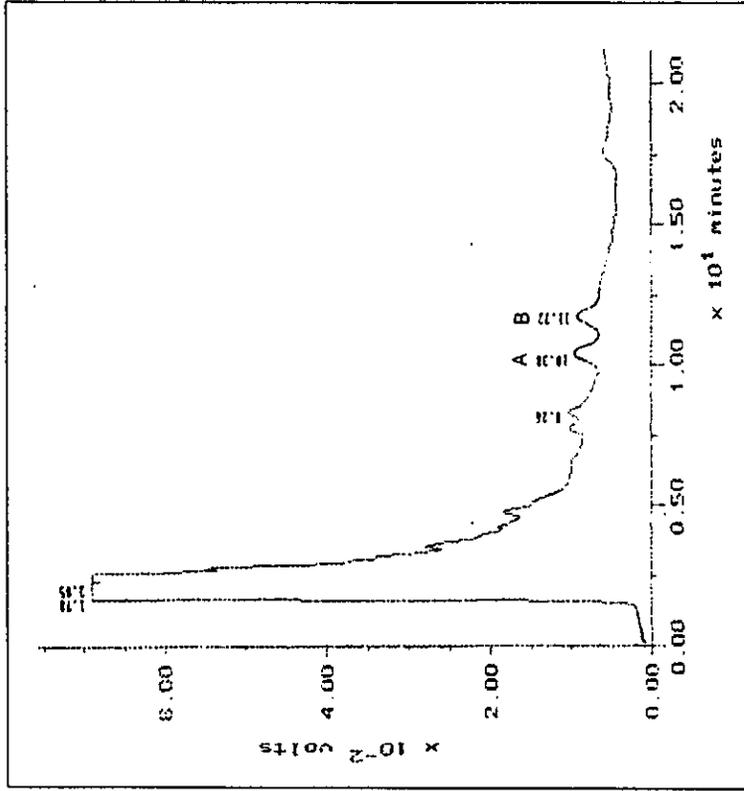


Figura 34. Cromatograma obtenido del extracto de pulpa de papa TOLLOCAN, A = α -Solanina (tr = 10.38 min) y B = α -Chaconina (tr = 11.72 min). Condiciones cromatográficas: columna μ Bonda-Pak C18 (10 μ m, 3.9 x 300 mm); Fase móvil acetónitrilo:amortiguador de fosfatos 0.05M (30:70), pH 6.50; Flujo 1.5 mL/min; detector: U.V. a 200 nm (sensibilidad 0.05 AUFS); volumen de inyección: 20 μ L.

Tabla No. 25. Glicoalcaloides, α -Solamina y α -Chaconina, presentes en cáscara de 12 variedades comerciales de papa mexicana (en base seca).

VARIEDAD	Glicoalcaloides totales			% α -Solamina : % α -Chaconina
	α -Solamina (mg/100 g peso seco)	α -Chaconina (mg/100 g peso seco)	(mg/100 g peso seco)	
Alpha	42.3489 \pm 1.2296	96.1612 \pm 0.6479	138.5101 \pm 1.1151	30.5712 \pm 0.6896: 69.4288 \pm 0.6896
Atzimba	22.3919 \pm 0.2085	43.9231 \pm 0.6212	66.3150 \pm 0.7493	33.7674 \pm 0.2754: 66.2325 \pm 0.2754
Juanita	75.0113 \pm 0.2916	145.4339 \pm 0.5788	220.4453 \pm 0.6984	34.0272 \pm 0.1115: 65.9727 \pm 0.1115
López	30.0686 \pm 0.0728	49.6826 \pm 0.4929	79.7512 \pm 0.5017	37.7041 \pm 0.2370: 62.2958 \pm 0.2370
Marciana	40.9261 \pm 0.0541	75.4369 \pm 0.0824	116.3631 \pm 0.0990	35.1710 \pm 0.0389: 64.8289 \pm 0.0389
Michoacán	114.4185 \pm 0.2937	220.5454 \pm 0.8508	334.9639 \pm 0.9919	34.1586 \pm 0.0858: 65.8414 \pm 0.0858
Montsama	6.6965 \pm 0.0651	10.8331 \pm 0.0099	17.5297 \pm 0.0712	38.2003 \pm 0.2181: 61.7996 \pm 0.2181
Murca	18.4678 \pm 0.4494	45.4001 \pm 0.4292	63.8679 \pm 0.7233	28.9120 \pm 0.3453: 71.0879 \pm 0.3453
Nortefa	161.4891 \pm 1.0724	388.2567 \pm 0.9244	549.7458 \pm 1.7407	29.3845 \pm 0.1254: 70.6448 \pm 0.1239
Puebla	29.5183 \pm 0.7896	41.1415 \pm 0.7885	70.6618 \pm 1.5761	41.7704 \pm 0.1914: 58.2295 \pm 0.1914
Rosita	106.4815 \pm 0.6189	201.0909 \pm 0.4651	307.5724 \pm 1.0451	34.6197 \pm 0.0910: 65.3803 \pm 0.0910
Tollocan	74.1850 \pm 0.6415	165.9131 \pm 0.3202	240.0981 \pm 0.8983	30.8973 \pm 0.1575: 69.1026 \pm 0.1575

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar para n = 9, (Se prepararon 3 extractos de glicoalcaloides de cáscara y cada uno de ellos se analizó por triplicado).

Tabla No. 26. Glicoalcaloides, α -Solamina y α -Chanonina, presentes en pulpa de 12 variedades comerciales de papa mexicana (en base seca).

VARIEDAD	Glicoalcaloides totales			% α -Solamina : % α -Chaconina
	α -Solamina (mg/100 g peso seco)	α -Chaconina (mg/100 g peso seco)	(mg/100 g peso seco)	
Alpha	ND	ND	ND	ND
Atzimba	20.9454 \pm 0.5830	4.3412 \pm 0.0444	25.2866 \pm 0.5413	82.8224 \pm 0.5360: 17.1776 \pm 0.5360
Juanita	13.3038 \pm 0.1938	14.6627 \pm 0.2539	27.9665 \pm 0.1408	47.5718 \pm 0.7642: 52.4281 \pm 0.7642
López	5.1338 \pm 0.0738	5.0151 \pm 0.0860	10.1488 \pm 0.0287	50.5856 \pm 0.7770: 49.4144 \pm 0.7770
Marciana	4.8733 \pm 0.0336	1.2914 \pm 0.0152	6.1647 \pm 0.0478	79.0524 \pm 0.1066: 20.9475 \pm 0.1066
Michoacán	6.4305 \pm 0.0267	9.6618 \pm 0.0092	16.0923 \pm 0.0335	39.9598 \pm 0.0859: 60.0401 \pm 0.0859
Montsama	ND	ND	ND	ND
Murca	2.8047 \pm 0.0453	1.3358 \pm 0.0486	4.1405 \pm 0.0638	67.7433 \pm 0.8926: 32.2567 \pm 0.8926
Nortefa	6.3878 \pm 0.0331	9.2684 \pm 0.0326	15.6562 \pm 0.0220	40.8004 \pm 0.1985: 59.1995 \pm 0.1985
Puebla	ND	ND	ND	ND
Rosita	33.1781 \pm 0.1137	31.0191 \pm 0.2453	64.1972 \pm 0.2134	51.6820 \pm 0.2509: 48.3179 \pm 0.2509
Tollocan	6.8672 \pm 0.1118	3.1735 \pm 0.0644	10.0407 \pm 0.0890	68.3915 \pm 0.7129: 31.6084 \pm 0.7129

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar para n = 9, (Se prepararon 3 extractos de glicoalcaloides de pulpa y cada uno de ellos se analizó por triplicado).

ND = no detectado

5.4 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.

Tabla No. 27.
Contenido de humedad en cáscara y pulpa de 12 variedades comerciales de papa mexicana, expresada en porcentaje.

VARIEDAD	Cáscara (% humedad)	Pulpa (% humedad)
Alpha	81.985	84.114
Atzimba	80.749	85.195
Juanita	84.810	87.430
López	82.000	84.130
Marciana	84.415	87.565
Michoacán	87.324	86.600
Montsama	83.478	82.407
Murca	88.768	84.792
Norteña	83.333	85.075
Puebla	80.573	87.799
Rosita	83.501	86.956
Tollocan	82.155	82.179

Los valores son expresados como media para n = 2.

La papa común (*Solanum tuberosum*), es un tubérculo con alto contenido de agua. En las variedades de papa estudiadas se encontró que las cáscaras presentaban un contenido de humedad entre el 80 y 89 %, mientras que las diferentes pulpas presentaban un contenido de humedad entre el 82 y 88 %.

Los anteriores valores de humedad obtenidos para cada una de las variedades de papa (en cáscara y pulpa), fueron utilizados para calcular el contenido de glicoalcaloides en cáscara y pulpa de papa fresca. Los resultados se muestran en las tablas No. 28 y 29 y en las gráficas No. 3, 4, 5 y 6.

Tabla No. 28. Glicoalcaloides, α -Solanina y α -Chanonina, presentes en cáscara de 12 variedades comerciales de papa mexicana (en base húmeda).

VARIEDAD	α -Solanina (mg/100 g peso fresco)	α -Chaconina (mg/100 g peso fresco)	Glicoalcaloides totales (mg/100 g peso fresco)	% α -Solanina : % α -Chaconina
Alpha	7.4367 \pm 0.3538	17.0954 \pm 0.8632	24.5321 \pm 1.0049	30.3310 \pm 1.2620: 69.6689 \pm 1.2620
Atzimba	4.3107 \pm 0.0401	8.4556 \pm 0.1196	12.7663 \pm 0.1443	33.7674 \pm 0.2754: 66.2325 \pm 0.2754
Juanita	11.3942 \pm 0.0443	22.2025 \pm 0.2953	33.4856 \pm 0.1061	34.0272 \pm 0.1115: 65.9727 \pm 0.1115
López	5.4123 \pm 0.0131	8.9429 \pm 0.0887	14.3552 \pm 0.0903	37.7041 \pm 0.2370: 62.2958 \pm 0.2370
Marciana	6.3783 \pm 0.0084	11.7568 \pm 0.0128	18.1352 \pm 0.0154	35.1710 \pm 0.0389: 64.8289 \pm 0.0389
Michoacán	14.5037 \pm 0.0372	27.9563 \pm 0.1078	42.4600 \pm 0.1257	34.1586 \pm 0.0858: 65.8414 \pm 0.0858
Montsama	1.1064 \pm 0.0108	1.7898 \pm 0.0016	2.8963 \pm 0.0118	38.2003 \pm 0.2181: 61.7996 \pm 0.2181
Murca	2.0743 \pm 0.0505	5.0993 \pm 0.0482	7.1736 \pm 0.0956	28.9120 \pm 0.3453: 71.0879 \pm 0.3453
Norteña	26.9165 \pm 0.1769	64.7107 \pm 0.1540	91.6273 \pm 0.2888	29.3845 \pm 0.1254: 70.6448 \pm 0.1239
Puebla	5.7345 \pm 0.1534	7.9929 \pm 0.1532	13.7275 \pm 0.3062	41.7704 \pm 0.1914: 58.2295 \pm 0.1914
Rosita	17.5684 \pm 0.1021	33.1779 \pm 0.0767	50.7464 \pm 0.1724	34.6197 \pm 0.0910: 65.3803 \pm 0.0910
Tollocan	13.2383 \pm 0.1145	29.6072 \pm 0.0571	42.8455 \pm 0.1603	30.8973 \pm 0.1575: 69.1026 \pm 0.1575

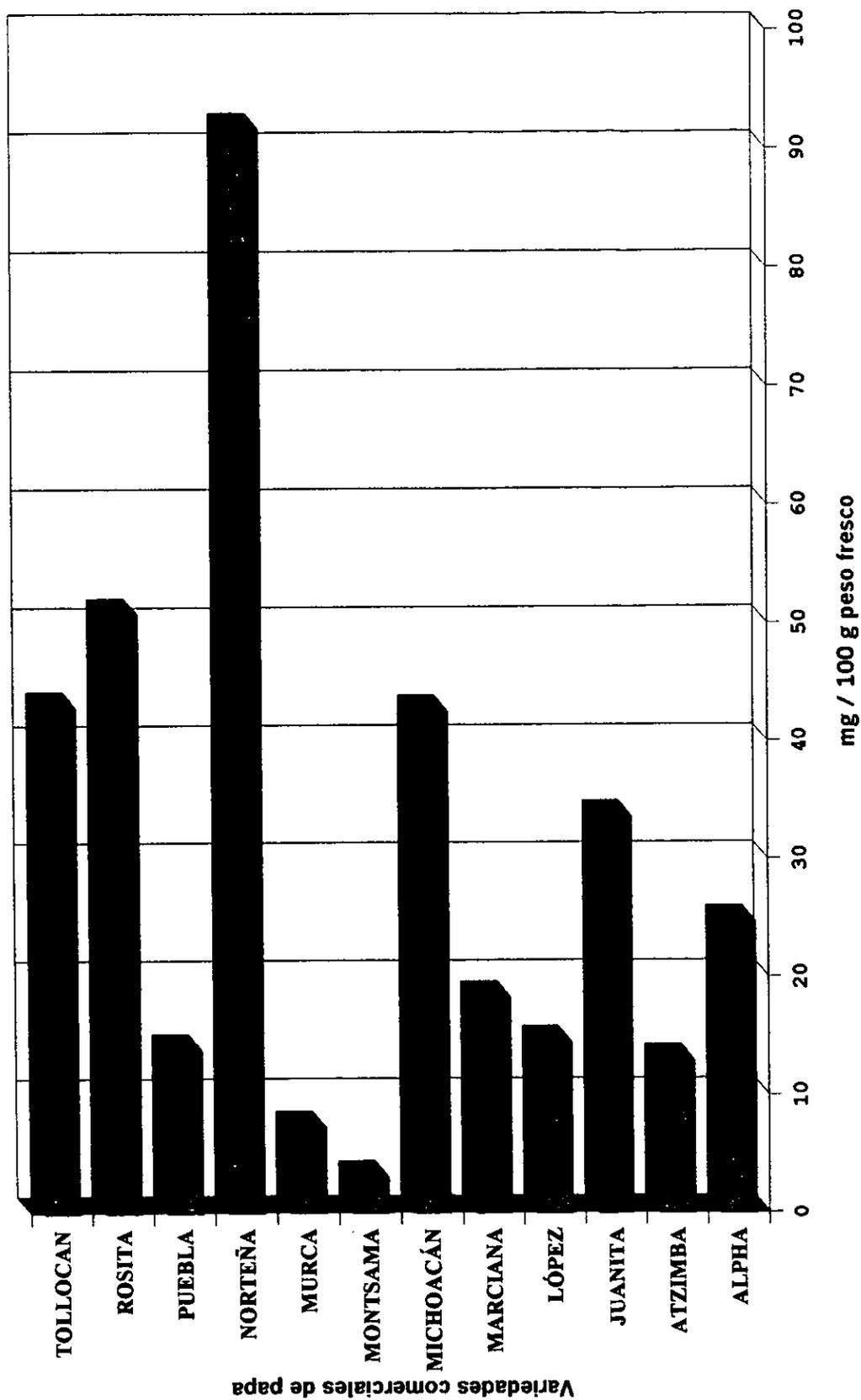
Los valores son expresados como media \pm desviación estándar para n = 9, (Se prepararon 3 extractos de glicoalcaloides de cáscara y cada uno de ellos se analizó por triplicado). Para obtener los valores en peso fresco se consideró la humedad de cada variedad.

Tabla No. 29. Glicoalcaloides, α -Solanina y α -Chaconina, presentes en pulpa de 12 variedades comerciales de papa mexicana (en base húmeda).

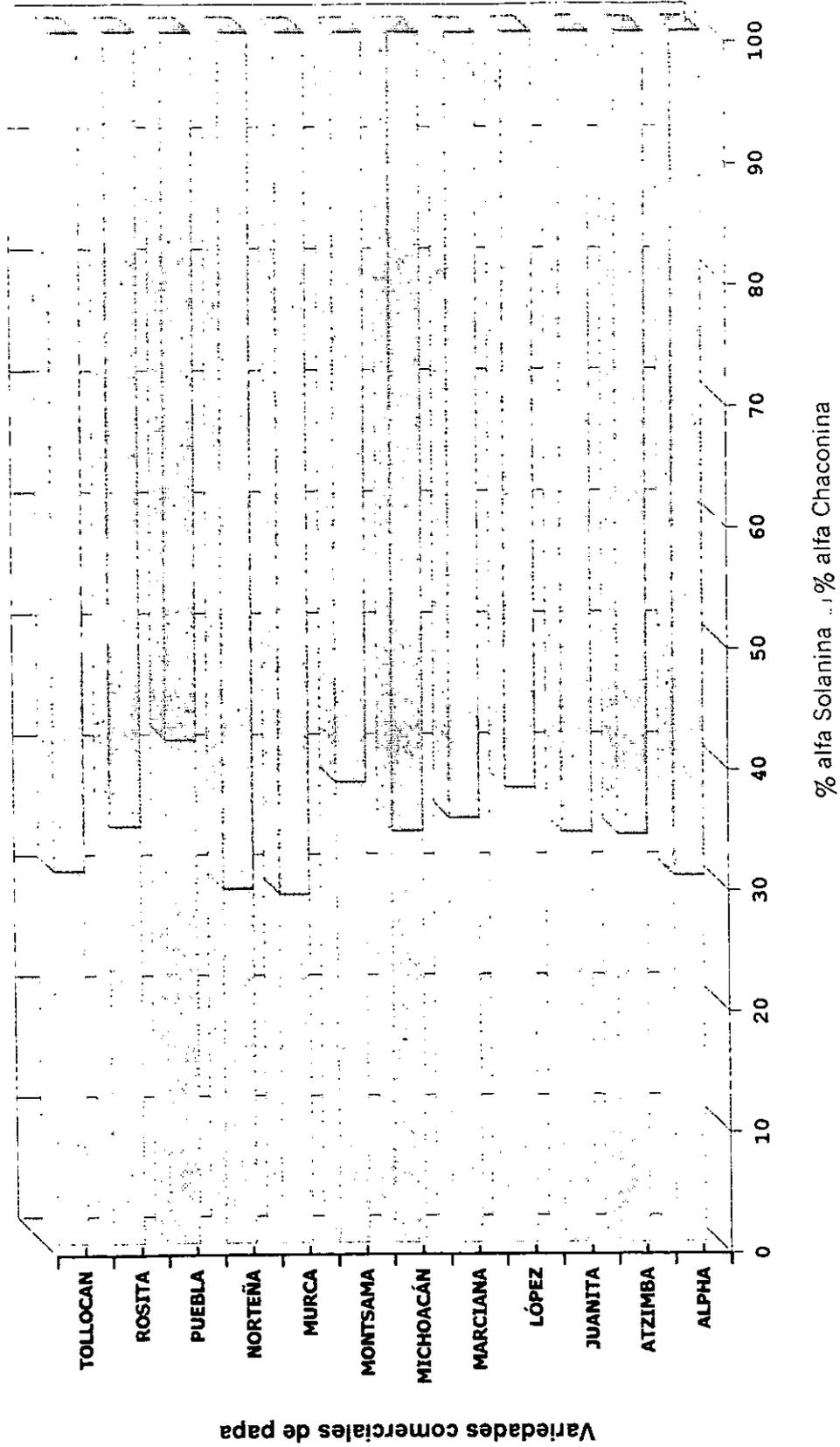
VARIEDAD	α -Solanina (mg/100 g peso fresco)	α -Chaconina (mg/100 g peso fresco)	Glicoalcaloides totales (mg/100 g peso fresco)	% α -Solanina : % α -Chaconina
Alpha	ND	ND	ND	ND
Atzimba	3.1009 \pm 0.0863	0.6427 \pm 0.0066	3.7437 \pm 0.0801	82.8224 \pm 0.5360: 17.1776 \pm 0.5360
Juanita	1.6723 \pm 0.0243	1.8431 \pm 0.0319	3.5154 \pm 0.0177	47.5718 \pm 0.7642: 52.4281 \pm 0.7642
López	0.8147 \pm 0.0117	0.7959 \pm 0.0136	1.6106 \pm 0.0046	50.5856 \pm 0.7770: 49.4144 \pm 0.7770
Marciana	0.6059 \pm 0.0042	0.1606 \pm 0.0019	0.7666 \pm 0.0059	79.0524 \pm 0.1066: 20.9475 \pm 0.1066
Michoacán	0.8617 \pm 0.0036	1.2947 \pm 0.0012	2.1564 \pm 0.0045	39.9598 \pm 0.0859: 60.0401 \pm 0.0859
Montsama	ND	ND	ND	ND
Murca	0.4265 \pm 0.0069	0.2031 \pm 0.0074	0.6297 \pm 0.0097	67.7433 \pm 0.8926: 32.2567 \pm 0.8926
Norteña	0.9533 \pm 0.0049	1.3833 \pm 0.0049	2.3367 \pm 0.0033	40.8004 \pm 0.1985: 59.1995 \pm 0.1985
Puebla	ND	ND	ND	ND
Rosita	4.3277 \pm 0.0148	4.0461 \pm 0.0319	8.3739 \pm 0.0278	51.6820 \pm 0.2509: 48.3179 \pm 0.2509
Tollocan	1.2238 \pm 0.0199	0.5655 \pm 0.0115	1.7894 \pm 0.0159	68.3915 \pm 0.7129: 31.6084 \pm 0.7129

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar para n = 9, (Se prepararon 3 extractos de glicoalcaloides de pulpa y cada uno de ellos se analizó por triplicado). Para obtener los valores en peso fresco se consideró la humedad de cada variedad.
ND = no detectado

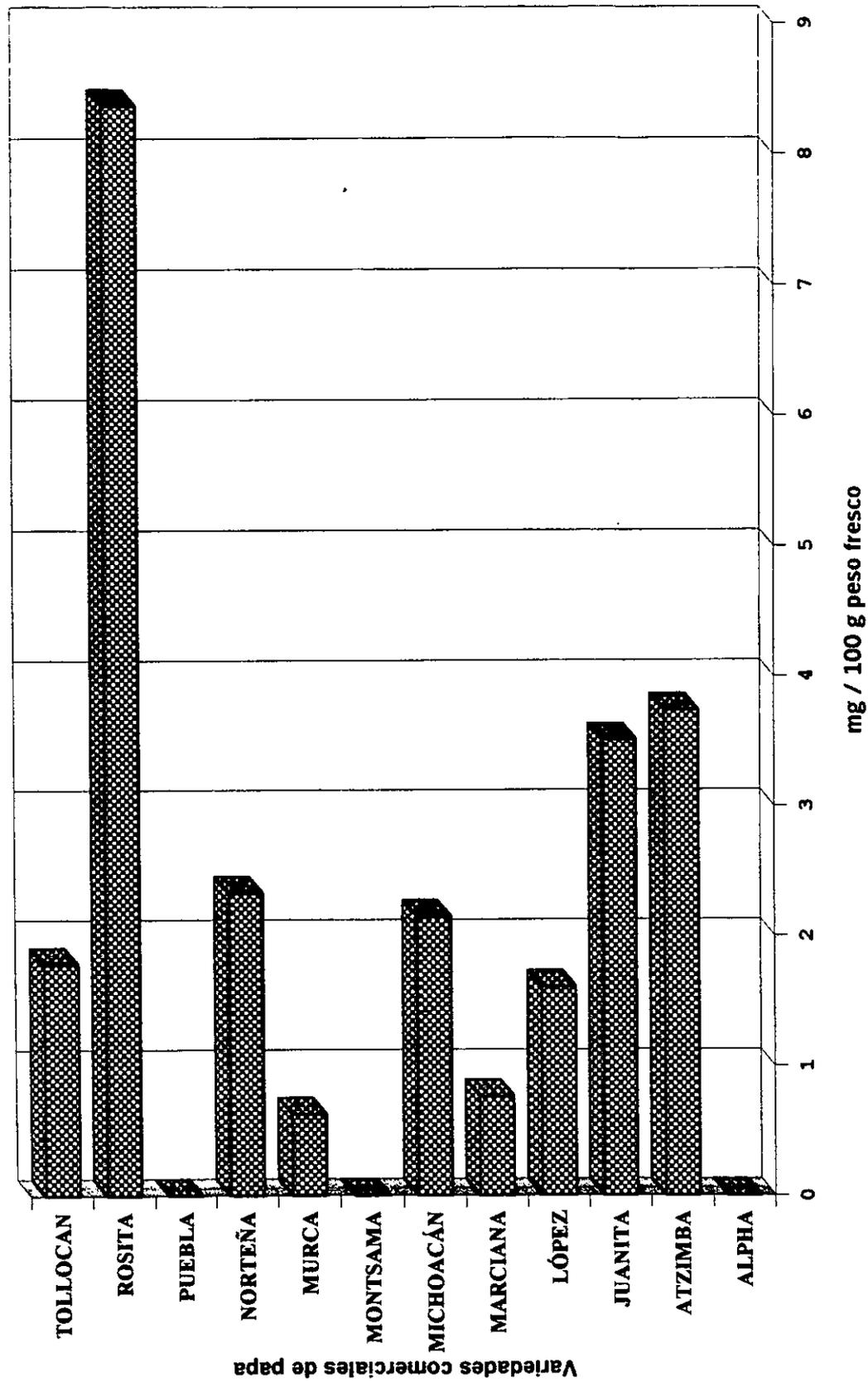
GRÁFICA No. 3
Contenido de "GLICOALCALOIDES TOTALES" en cáscaras de papa comercial



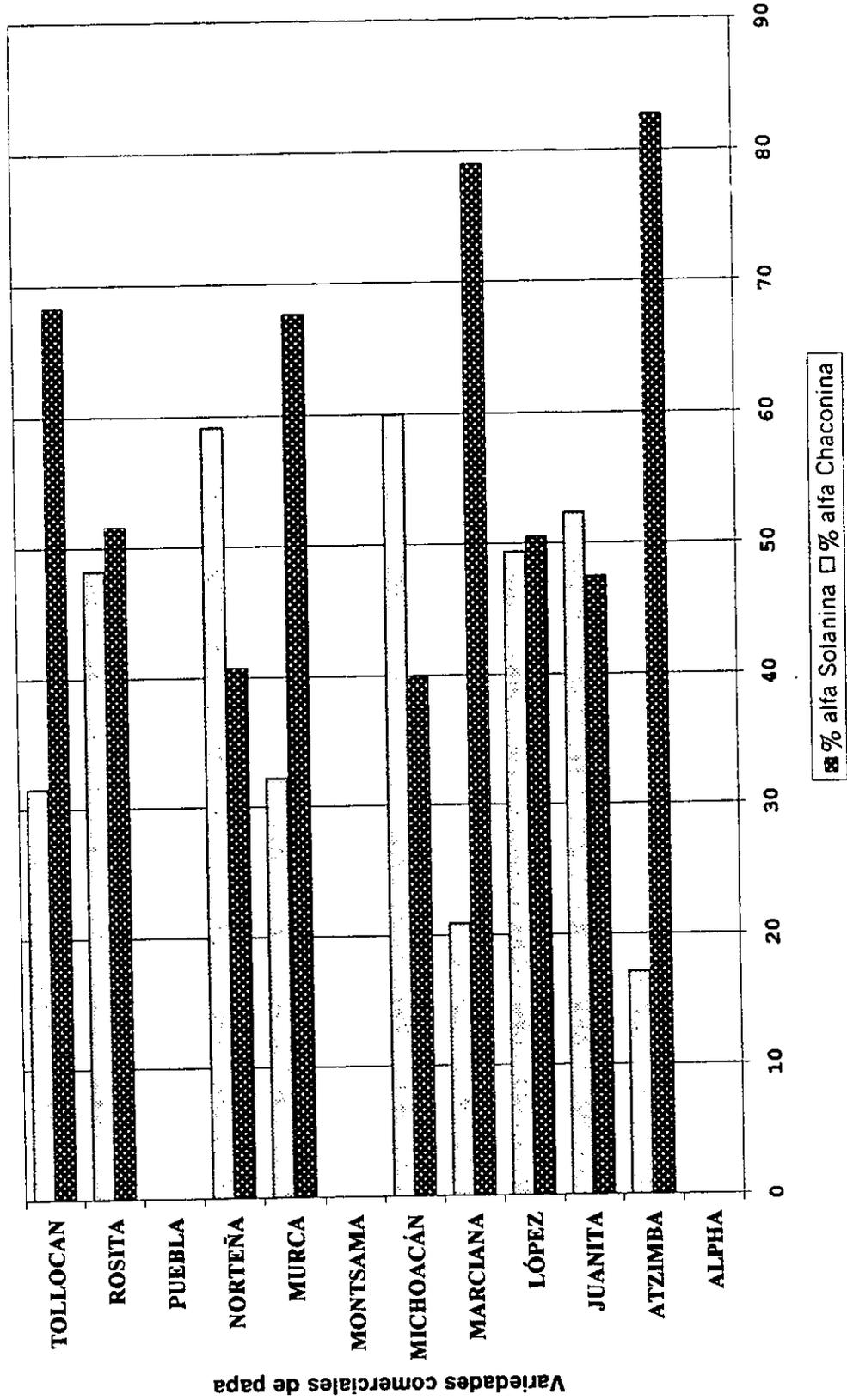
GRÁFICA No. 4
Porcentaje de "GLICOALCALOIDES" presentes en cáscaras de papa comercial
(en peso fresco)



GRÁFICA No.5
Contenido de "GLICOALCALOIDES TOTALES" en pulpas de papa comercial



GRÁFICA No. 6
Porcentaje de "GLICOALCALOIDES" presentes en pulpas de papa comercial
 (en peso fresco)



Los cromatogramas obtenidos muestran, en forma general, que todas las variedades de papas estudiadas contienen los glicoalcaloides, α -Solanina y α -Chaconina, en su cáscara; sin embargo, no todas las variedades de papa contienen glicoalcaloides en su pulpa, como es el caso de las variedades Alpha, Montsama y Puebla (Figuras 12, 24 y 30).

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido de glicoalcaloides en cáscara, Tabla No. 28 y gráfica No. 4, muestran que el glicoalcaloide mayoritario presente en la cáscara de las papas es α -Chaconina, el cual representa entre un 65 a 71% del total de glicoalcaloides en las variedades de papa estudiadas. La alta concentración de α -Chaconina con respecto a α -Solanina tiene un significado fisiológico, dado que α -Chaconina es más tóxico que α -Solanina (según estudios realizados sobre embriones de rana por Friedman *et al.* en 1992 (10)), elevadas concentraciones de α -Chaconina confiere mayor protección y resistencia al tubérculo contra el ataque de insectos y otros depredadores.

En el caso de las pulpas, no se encontró un patrón de comportamiento en cuanto al contenido de α -Solanina y α -Chaconina para las variedades de papa estudiadas, Tabla No. 29 y gráfica No. 6. Pero se puede decir que el glicoalcaloide mayoritario es α -Solanina, en el caso de las variedades Atzimba, Marciana, Murca y Tollocan. En las variedades Juanita, López y Rosita, α -Solanina y α -Chaconina se encuentran casi en la misma proporción (50:50). En las variedades Michoacán y Norteña, α -Chaconina es el glicoalcaloide mayoritario. En las variedades Alpha, Montsama y Puebla no se encontró α -Solanina y α -Chaconina.

Al comparar el contenido de glicoalcaloides totales de cáscara con respecto a pulpa de cada variedad, se observa en forma general que la cáscara tiene una concentración muy superior de estos tóxicos con respecto a pulpa. Esto se debe a que la cáscara de la papa esta expuesta al medio ambiente y por lo tanto es la parte primeramente afectada por el ataque de insectos, hongos y otros depredadores.

La concentración total de glicoalcaloides en cáscara de papa, gráfica No. 3, es muy elevada en el caso de las variedades Alpha, Juanita, Michoacán, Norteña, Rosita y Tollocan. En estas variedades se excede los límites recomendados por la seguridad Alimentaria, 20 mg por 100 g de peso fresco. Sin embargo, si

consideramos que la cáscara sólo representa aproximadamente el 10 % del tubérculo total, entonces la cantidad de glicoalcaloides aportada por la cáscara es muy baja, por ejemplo, la variedad Norteña, que es la variedad con mayor contenido de glicoalcaloides totales en cáscara (91.62 mg por 100 g de cáscara fresca), aportaría únicamente 9.162 mg por 100 g de tubérculo fresco. Así, podemos decir que el contenido de glicoalcaloides de cáscara no representa un problema para los consumidores en el tubérculo integro.

Las variedades Atzimba, López, Marciana, Montsama, Murca y Puebla presentan un contenido de glicoalcaloides totales en cáscara, inferior al contenido límite recomendado por la seguridad alimentaria.

La concentración total de glicoalcaloides en la pulpa de las variedades estudiadas, gráfica No. 5, es muy bajo, 0.6297 a 3.7437 mg/100 g pulpa fresca, con excepción de la variedad Rosita que contiene 8.3739 mg/100 g pulpa fresca. Como se observa, todas las variedades tiene concentraciones totales de glicoalcaloides en pulpa, inferiores al límite recomendado por la seguridad alimentaria, por lo que el consumo de papa de cualquiera de estas variedades no representan ningún riesgo para la salud.

6. Conclusiones:

- El ácido acético acuoso es mejor disolvente para extraer glicoalcaloides de papa que el ácido acético al 5% en metanol.
- El método desarrollado es lineal para concentraciones de 0.012 a 0.24 mg/mL para α -Solanina y de 0.015 a 0.30 mg/mL para α -Chaconina.
- El método es exacto para α -Solanina y α -Chaconina, ya que se obtuvieron recobros de 99.6905 % y 99.6196 %, respectivamente.
- Con el método desarrollado es posible detectar concentraciones de 0.0024 mg/mL de α -Solanina y 0.0030 mg/mL de α -Chaconina y se pueden cuantificar cantidades de 0.0096 mg/mL de α -Solanina y 0.0090 mg/mL de α -Chaconina. Sin embargo, el método cuantifica confiablemente concentraciones desde 0.012 mg/mL y 0.015 mg/mL, respectivamente, debido a que dichas concentraciones están en el intervalo de linealidad del sistema.
- El método es lineal, repetible y exacto para las concentraciones esperadas de glicoalcaloides en las muestras de papa.
- Los extractos de glicoalcaloides en metanol son estables durante 3 semanas si se almacenan en refrigeración convencional.
- La concentración de glicoalcaloides, en todas las variedades estudiadas, es mayor en cáscara que en pulpa.
- En las cáscaras de papa común (*Solanum Tuberosum*), la α -Chaconina representa aproximadamente el 60 % de los glicoalcaloides totales, mientras que el 40 % restante corresponde a α -Solanina.
- El contenido de glicoalcaloides, α -Solanina y α -Chaconina, en las 12 variedades de papa en estudio es menor al límite establecido como tóxico (20 mg/100 g de peso fresco), por lo que su consumo no implica riesgo a la salud.

7. Bibliografía.

1. Desrosier, N. W. Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial Continental, México, pp. 225-233, (1986).
2. Contreras, L. E.; Estudio bromatológico y toxicológico de cuatro especies de papas silvestres nativas de México. Tesis de Maestría. UNAM, Facultad de Química, México D.F, pp.1-21, (1995).
3. Galindo, A. J.; La papita güera, Naturaleza, 3, 175-180 (1982).
4. INIFAP; Generalidades acerca de la papa (Solanum tuberosum), (1996)
5. Madrid, V.; Manual de industrias alimentarias (La patata y sus productos derivados); España, pp. 496-503, (1991).
6. INIFAP; La papa, alternativa alimentaria, Síntesis Hortícola, 30 (1989).
7. INIFAP; Nuevas variedades de papa, Síntesis Hortícola, 26 (1990).
8. Kolasa, M. K.; The potato and human nutrition. Am. Potato J, 70, 375-384 (1993).
9. Friedman, M. and Dao, L.; Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. J. Agric. Food Chem., 40, 419-423 (1992).
10. Friedman, M., Rayburn, J. R. and Bantle, J. A.; Structural Relationships and developmental toxicity of Solanum alkaloids in the frog embryo teratogenesis Assay-Xeropus. J. Agric. Food Chem., 40, 1617-1624 (1992).
11. Watson, D. M.; Natural toxicants in foods (Progress and Prospects); Elii Horwood, International publishers in science and technology; pp. 221-230, England (1987).
12. Roddick, J. G.; Solanaceae, Biology and Systematics; Columbia University Press; U.S.A.; pp. 201-222; (1986).
13. Percival, G. and Dixon, G.; Glycoalkaloid concentration of potato tubers following continuous illumination. J. Sci. Food Agric., 66, 139-144 (1994).
14. Harvey, M. H., McMillan, M., Morgan, M. R. A. and Chan, H. W. S.; Solanidine is present in sera of healthy individuals and in amounts dependent on their dietary potato consumption. Human Toxicol., 4, 187-194 (1985).
15. Osman, S. F.; Glycoalkaloids in potatoes, Food Chemistry, 11, 235-247 (1983).
16. Abell, D. C. and Sporns, P.; Rapid quantitation of potato glycoalkaloids by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem., 44, 2292-2296 (1996).

17. Edwards, E. J. and Cobb, A. H.; Improved high-performance liquid chromatographic method for the analysis of potato (*Solanum Tuberosum*) glycoalkaloids. J. Agric. Food Chem., 44, 2705-2709 (1996).
18. Goodman, L. S. and Gilman, A.; Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Interamericana, México, pp. 374-391 (1978).
19. Cheeke, P. R.; Toxicants of plant origin; Volumen 1. Alkaloids; CRC, Press; U.S.A., (1989).
20. Jianxin, Z.; Camire, M. E.; Bushway, R. J. and Bushway, A. A.; Glycoalkaloid content and in vitro glycoalkaloid solubility of extruded potato peels, J. Agric. Food Chem., 42, 2570-2573 (1994).
21. Bushway, R. J. and Ponnampalam R.; α -Chaconine and α -solanine content of potato products and their stability during several modes of cooking. J. Agric. Food Chem., 29, 814-817 (1981).
22. Carman, A. S.; Kuan, S. S.; Ware, G. M.; Francis, O. J. And Kirschenheuter; Rapid High-Performance Liquid Chromatographic determination of the potato glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine. J. Agric. Food Chem., 34, 279-282 (1986).
23. Salunkhe, D. K.; Kadam, S. S. and Jadhav, S. J.; Potato: Production, Processing and Products; CRC, Press; U.S.A., (1990).
24. Hellenäs, K. E.; A Simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by HPLC; Comparison with ELISA and a colorimetric method. J. Sci. Food Agric., 37, 776-782 (1986).
25. Dao, L. and Friedman, M.; Chlorophyll, Chlorogenic Acid, Glycoalkaloid, and Protease inhibitor content of fresh and green potatoes. J. Agric. Food Chem., 42, 633-639 (1994).
26. Hlywka, J. J.; Stephenson, G. R.; Sears, M. K. and Yada, R. Y.; Effects of insect damage on glycoalkaloid content in potatoes (*Solanum tuberosum*), J. Agric. Food Chem., 42, 2545-2550 (1994).
27. Perkin-Elmer; Cromatografía de líquidos de alta resolución, (Manual); Perkin-Elmer de México, S.A.; pp. 1-79 (1993).
28. M., McNair H. y Esquivel, H. B.; Cromatografía Líquida de Alta Presión, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C., pp 1-63 (1980).
29. Validación de métodos analíticos; Comité de elaboración de guías oficiales de validación de la Dirección General de Control de Insumos para la salud, SSA. (1991).

30. Helrich, K. (Editor); Official Methods of Analysis the Association of Official Analytical Chemists; 15th Edition, Published by AOAC, INC. Vol. 1. Arlington (1990).
31. Popl, M., Fährnich, J., Tatar, V.; Chromatographic analysis of Alkaloids; Vol. 53; Marcel Dekker; U.S.A., (1990).
32. Bushway, R. J., Bureau, Janice L. and King Joan; Modification of the Rapid High-Performance Liquid Chromatographic method for the determination of potato glycoalkaloids. J. Agric. Food Chem., 34, 277-279 (1986).
33. Dao, L. and Friedman, M.; Comparison of glycoalkaloid content of fresh and freeze-dried potato leaves determined by HPLC and colorimetry. J. Agric. Food Chem., 44, 2287-2291 (1996).