



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR EN LÍNEA PARA
LA DETERMINACIÓN AUTOMATIZADA (FIA) DE
ASPARAGINA EN PAPAS

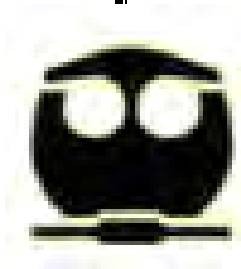
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JURADO DE LA ROSA VERÓNICA



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Objetivos.....	3
2. Marco Teórico.....	4
2.1. Acrilamida.....	4
2.2. Papa.....	5
2.2.1. Importancia nutrimental.....	6
2.2.2. La papa en México.....	7
2.2.3. Variedades.....	11
2.2.4. Ciclos productivos.....	12
2.3. Variedades empleadas.....	13
2.4. Asparagina.....	13
2.5. Pardeamiento no enzimático.....	15
2.6. Formación de acrilamida en alimentos.....	18
2.7. Métodos de análisis.....	19
2.7.1. Colorimetría.....	19
2.7.2. HPLC en fase reversa.....	20
2.7.3. CG/EM.....	21
2.7.4. Métodos enzimáticos.....	21
2.8. Análisis por inyección en flujo.....	23
2.8.1. Antecedentes.....	23
2.8.2. Componentes.....	23
2.8.3. Parámetros.....	25
2.8.4. Características fundamentales.....	25
2.9. Enzimas.....	28
2.9.1. Inmovilización enzimática.....	29
2.9.2. Métodos de inmovilización.....	29
2.9.2.1. Métodos físicos.....	29
2.9.2.2. Métodos químicos.....	30
2.9.3. Efectos de la inmovilización.....	32
2.9.4. Aplicaciones.....	32
2.10. Biosensores.....	33
2.10.1. Transductores.....	33
2.10.2. Biocatalizadores inmovilizados.....	36
2.11. Enzimas en FIA.....	36
2.11.1. Enzimas inmovilizadas.....	36

3. Desarrollo Experimental.....	40
3.1. Instrumentación.....	40
3.2. Reactivos y disoluciones.....	41
3.3. Inmovilización de la enzima.....	44
3.4. Método propuesto para la determinación de asparagina.....	46
3.5. Evaluación del reactor enzimático.....	47
3.6. Determinación del intervalo lineal, LD y LC.....	48
3.7. Robustez del método.....	48
3.8. Análisis de muestras.....	49
4. Resultados y análisis.....	55
4.1. Espectro de absorción del indofenol.....	55
4.2. Eficiencia enzimática.....	55
4.3. Intervalo lineal.....	59
4.4. LD y LC del método.....	63
4.5. Robustez del método.....	65
4.5.1. Longitud de onda.....	65
4.5.2. Flujo de reactivos.....	70
4.6. Muestras.....	74
4.6.1. Características organolépticas.....	74
4.6.2. Método inicial, separación por centrifugación.....	74
4.6.3. Optimización del método, separación por filtrado.....	80
5. Conclusiones.....	87
5.1. Recomendaciones.....	88
6. Bibliografía.....	89
7. Anexo I.....	94
8. Anexo II.....	104

1 INTRODUCCIÓN

La acrilamida es un compuesto que se forma de la materia orgánica, por lo que son frecuentes niveles altos de aductos de acrilamida con los N-terminal de la hemoglobina (Hb) en personas adultas fumadoras o en aquellas que están expuestas directamente a la acrilamida o la poliacrilamida, que se utiliza en la industria del papel, minera, adhesivos, tratamientos de aguas, procesamiento de concreto, producción de aceite crudo, etc (1-4)

La acrilamida es neurotóxica por que ataca al sistema nervioso central y periférico. Está clasificado como mutagénico, pues al metabolizarse forma un epóxido capaz de reaccionar con el DNA. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer lo ha clasificado como probable carcinógeno en humanos (grupo 2A (4-5), pues la exposición prolongada a la acrilamida está asociada con el incremento en la incidencia de cáncer en el SNC, tiroides, glándulas mamarias y sistema reproductivo. La Agencia de Protección del medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés), estableció la cantidad de 1µg de acrilamida /kg de peso corporal, como un factor de riesgo de cáncer para los humanos (1). Su DL₅₀ por vía oral es de 150-180mg/kg de peso corporal para ratas, conejillos de indias y conejos (4).

En mayo del 2002 la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la EPA, anunciaron que 0.5 ppb de acrilamida sería el límite permisible en agua potable; sin embargo en productos como papas fritas, se encontró una media de 1200ppb (6-7), lo que representa miles de veces más a lo permitido para el agua. Al analizar alimentos de grandes consorcios de comida rápida como McDonald's®, Burger King®, KFC® y Cereales Kellogg's® (8), todos ellos presentaron niveles altos de acrilamida en sus productos (por ejemplo: 497 ppb Acrialmida en papas a la francesa de McDonald's ®) (9-11)

Desde el descubrimiento de la presencia en altas concentraciones de acrilamida en alimentos por la Administración Nacional de Alimentos Sueca (NFA) (12) e investigadores suecos en abril del 2002; el Centro de Investigaciones Nestlé en Suiza, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la OMS y el Reino Unido de la Gran Bretaña (UK) se han dado a la tarea de desarrollar técnicas de

cuantificación de dicho compuesto. Así mismo dilucidar el o los mecanismos por los que la acrilamida se forma en alimentos procesados y no en alimentos crudos o hervidos (3).

Informes recientes demuestran que el precursor mayoritario en la formación de acrilamida en los alimentos es la asparagina (Asn) que forma el aducto N-glucosil-asparagina (base de Schiff), al reaccionar con la glucosa vía la Reacción de Maillard (1,3, 13-14). A través del marcaje isotópico con ^{13}C y ^{15}N , se ha podido demostrar que el esqueleto carbonado de la acrilamida corresponde precisamente a los carbonos de la asparagina (14).

La asparagina, aminoácido no esencial (15), se encuentra en gran proporción como aminoácido libre en las papas (2-4g/kg en base húmeda). Este aminoácido, junto con los azúcares reductores, son precursores de los componentes que dan color y sabor a las papas fritas, a través de la reacción de Maillard, lo que quiere decir que la acrilamida se forma paralelamente a los compuestos que le confieren las características sensoriales deseables a las papas (3, 5, 16). Al realizarse experimentos *in vitro*, y mezclar cantidades equimolares de asparagina y glucosa a una temperatura de 180°C (pirolización), se forman 368 μmol acrilamida/mol asparagina. Si se aumenta el contenido de agua, la cantidad de acrilamida aumenta a 960 μmol acrilamida/mol asparagina (13), por lo tanto la unión de aminoácidos libres y azúcares reductores a altas temperaturas, favorecen la formación de acrilamida en los alimentos.

En el presente proyecto se busca cuantificar mediante la adaptación de un biosensor en línea con asparaginasa de *Escherichia coli* inmovilizada, la cantidad de asparagina en la papa cruda. Esta medición serviría como indicador, asumiendo que a mayor cantidad de Asparagina presente, mayor será la producción de acrilamida.

El análisis se realiza utilizando una técnica denominada "Análisis por inyección en flujo" (FIA, por sus siglas en inglés), que ofrece ventajas en sensibilidad, menor cantidad de muestra (50-500 μL), reproducibilidad, y precisión (17). Por ser en continuo, el tiempo de análisis se reduce considerablemente y con esto los costos debidos a gastos por reactivos; al incluirse un biosensor selectivo se combinan las características antes mencionadas del FIA, con la selectividad de los métodos enzimáticos (18).

La cuantificación de asparagina se realiza de manera indirecta. El amonio producido en la reacción enzimática, se hace reaccionar con hipoclorito de sodio y fenolato formando el indofenol, compuesto de color azul intenso que presenta una banda ancha de absorción entre 600-660nm (“Reacción de Berthelot”) (19).

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Desarrollar y validar un método de análisis automatizado (FIA) a través de la incorporación de un biosensor en línea, para determinar asparagina en papas.

Objetivos Específicos

- ❧ Inmovilizar asparaginasa en vidrio de poro controlado.
- ❧ Diseñar un biosensor selectivo para asparagina.
- ❧ Establecer un método para el análisis automatizado de asparagina por FIA.
- ❧ Determinar asparagina en diferentes variedades de papas y sometidas a dos tipos de procesamientos después de ser cortadas: sumergidas en agua y expuestas al aire (sin agua).

1.1 OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Desarrollar y validar un método de análisis automatizado (FIA) a través de la incorporación de un biosensor en línea, para determinar asparagina en papas.

Objetivos Específicos

- ⌘ Inmovilizar asparaginasa en vidrio de poro controlado.
- ⌘ Diseñar un biosensor selectivo para asparagina.
- ⌘ Establecer un método para el análisis automatizado de asparagina por FIA.
- ⌘ Determinar asparagina en diferentes variedades de papas y sometidas a dos tipos de procesamientos después de ser cortadas: sumergidas en agua y expuestas al aire (sin agua).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Acrilamida

La acrilamida es ampliamente utilizada como poliacrilamida en la industria de plásticos, papel, minera, tratamiento de aguas, procesamiento de concreto, producción de aceite crudo, etc. En menor escala es usada en: aditivos cosméticos, electroforesis en biología molecular, emulsiones fotográficas, y manufactura de adhesivos (8,20-21)

Es por ello que los efectos de la acrilamida son bien conocidos. Sólo el monómero es neurotóxico. La glicinamida, metabolito de la acrilamida se une al ADN provocando cambios y daños (mutagénico), en altas dosis afecta a nivel neurológico y reproductivo. La exposición prolongada induce la formación de tumores en las ratas y probablemente cáncer en los humanos (Grupo 2A), aunque no ha sido confirmado por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) (8, 20-21).

La acrilamida es soluble y fácilmente absorbida en el tracto digestivo. Su excreción por vía urinaria es rápida y cerca de la mitad de la acrilamida es eliminada en las siguientes dos horas en las ratas, sin embargo en humanos no hay datos suficientes (20)

Análisis recientes indican que la exposición a la acrilamida es considerablemente alta por el consumo de alimentos que han sido calentados, los cuales se caracterizan por ser ricos en proteína y carbohidratos.

Utilizando modelos de laboratorio, para simular lo que ocurre en las papas fritas, se ha demostrado que la asparagina (que es el aminoácido predominante), junto con la D-glucosa son responsables de la formación de acrilamida en las papas (14). La glutamina, metionina y fructosa, son otros compuestos que al reaccionar vía la Reacción de Maillard generan también acrilamida, al igual que el 3-aminopropionamida que se considera como componente minoritario pero potente precursor (14,22)

2.2 Papa

Tabla 2. 1 Taxonomía de la papa (23).

Nombre Común	Nombre Científico	Clase	Subclase
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>	Angiospermae	Dicotyledoneae
Orden	Familia	Género	Especie
Tubiflorae	Solanácea	Solanum	tuberosum

Pese a que la papa es un producto originario de América, la principal zona productora se localiza en Asia y Europa (Figura 2.1), donde casi el 60% de la producción mundial se concentra en países como China, Rusia, Polonia, Estados Unidos, India y Ucrania (24). México se ubica en la posición número 31 (25) (1992-2001)

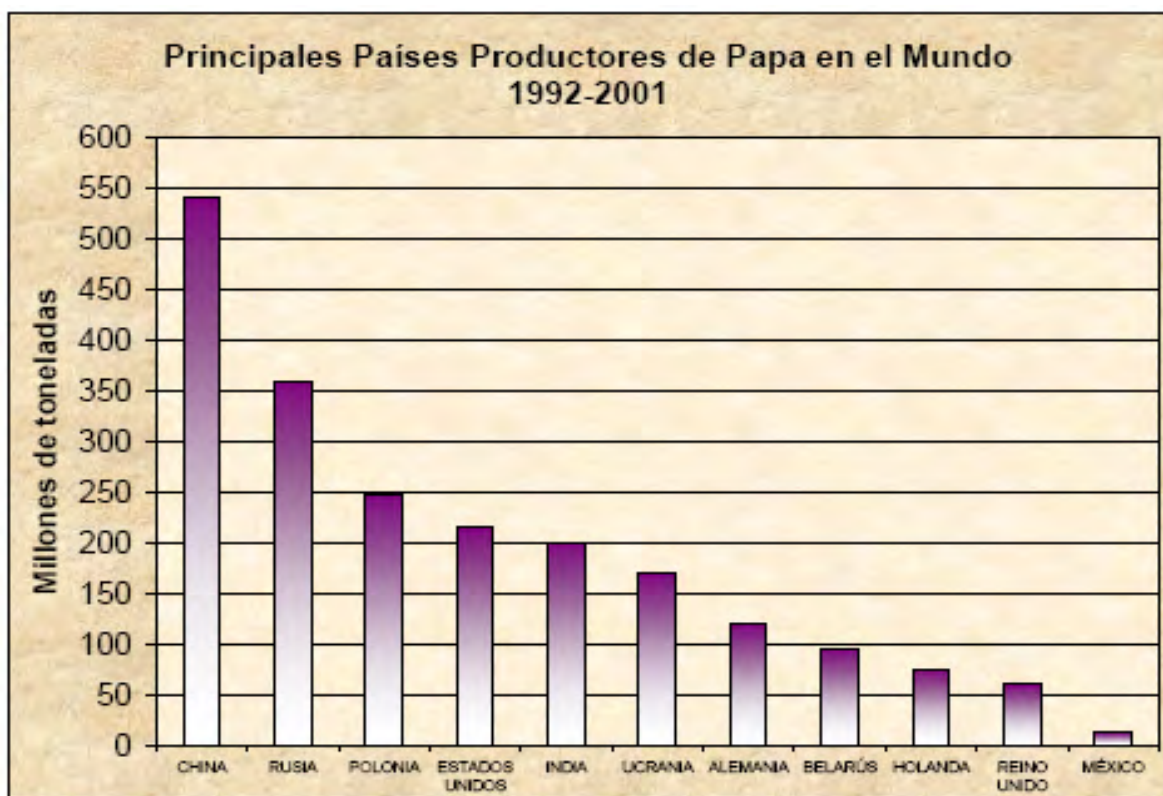


Figura 2. 1 Principales países productores de papa en el ámbito mundial, en el periodo 1992-2001. Tomada de "Panorama Mundial de la Papa" (24).

2.2.1 Importancia Nutrimental

La composición nutrimental (Tabla 2.2) y química de las papas varía con el tipo de variedad, razón de crecimiento, tipo de suelo, uso de fertilizantes, almacenamiento, etc. (26). Una misma variedad sembrada en diferentes zonas, puede presentar cambios significativos.

Tabla 2. 2 (*)Cantidad por cada 100g de peso fresco (26-27).

Composición de los tubérculos de papa en base húmeda		
Constituyente	Según Mondri (23) (%)	Intervalo (%)
Agua	80	63-86
Materia seca	20	13-36
Carbohidratos Totales	18	13-30
Proteína (N * 6.25)	2.2	0.7-4.6
Lípidos	0.1	0.02-0.96
Cenizas	1.0	0.44-1.9
Glicoalcaloides (Solanina)	9mg	0.2-41mg/100g
Vitamina C	25mg*	1-54mg/100g
Tiamina	0.1mg*	
Riboflavina	0.02mg*	
Niacina	0.5mg*	
Hierro	1mg*	
pH	5.6-6.2	

El contenido de sólidos de la papa, aumenta desde la piel al córtex y disminuye desde el córtex a la médula interna, por lo que la composición no es homogénea en todo el tubérculo (28).

La mitad del nitrógeno total de la papa está como proteína y el resto como aminoácidos libres y péptidos (28). La fracción no-proteínica está constituida de una a

dos terceras partes por aminoácidos libres, y cerca de la mitad del total de estos, lo constituyen la asparagina y glutamina en cantidades casi equivalentes (26).

La sacarosa, glucosa y fructosa son los azúcares mayoritarios de las papas, sin embargo pueden encontrarse trazas de melobiosa, rafinosa, cetoheptosa, melasitosa, etc. Por otra parte los carbohidratos almidonosos constituyen la mayoría de los sólidos presentes y están conformados por amilosa y amilopectina en una proporción 1:3 (Tabla 2.3).

Tabla 2. 3 Carbohidratos en la papa. Valores por cada 100g en base seca (26).

Constituyente	Intervalo reportado	Intervalo promedio
Almidón	60-80	70
Sacarosa	0.25-15	0.5-1.0
Azúcares reductores	0.25-3.0	0.5-2.0

El almacenaje de las papas a bajas temperaturas, provoca una gran acumulación de carbohidratos, el fenómeno es conocido como “Low-temperature-sweetening”. Este proceso es indeseable cuando las papas son la materia prima de la industria de las frituras y botanas, ya que genera un ennegrecimiento y sabor dulce en el producto final, debido a la caramelización de los azúcares. La utilización de atmósferas de nitrógeno impide la acumulación de azúcares en el tubérculo, pero repercute en el contenido de almidón, lo que representa una desventaja, si las papas se destinan a la industria de extracción de almidón (26).

2.2.2 La papa en México (24)

La papa es la segunda hortaliza, después del jitomate más consumida en México y ocupa el quinto lugar en importancia, superado tan solo por el maíz, frijol, arroz y el trigo.

Actualmente se siembran alrededor de 67 mil hectáreas, de las que se obtiene una producción aproximada de 1 millón 350 mil toneladas, mismas que permiten satisfacer las

demandas de consumo interno. El consumo per capita de la papa en México es 16.5kg/habitante.

De esta superficie (67 mil hectáreas) una primera región está formada por los valles que cuentan con riego o poseen un temporal estable, y donde se realiza una agricultura altamente tecnificada, la cual abarca alrededor de 17 mil hectáreas del total sembrado con papas. Una segunda región la constituye las sierras y los valles altos en donde se practica una agricultura de subsistencia, que abarca 50 mil hectáreas. Sin embargo, la superficie sembrada con semilla de alta calidad (certificada) ocupa un porcentaje ligeramente superior al 13%, mientras que la papa de autoabastecimiento ocupa el resto de la superficie (23).

En la Figura 2.2 se presenta un mapa del país para visualizar geográficamente las principales zonas productoras de papa, donde destacan Sinaloa, Estado de México, Nuevo León, Chihuahua, Sonora y Guanajuato como los estados más importantes en la siembra y producción de papa, que en conjunto aportan el 60% de la producción nacional (Figura 2.3).

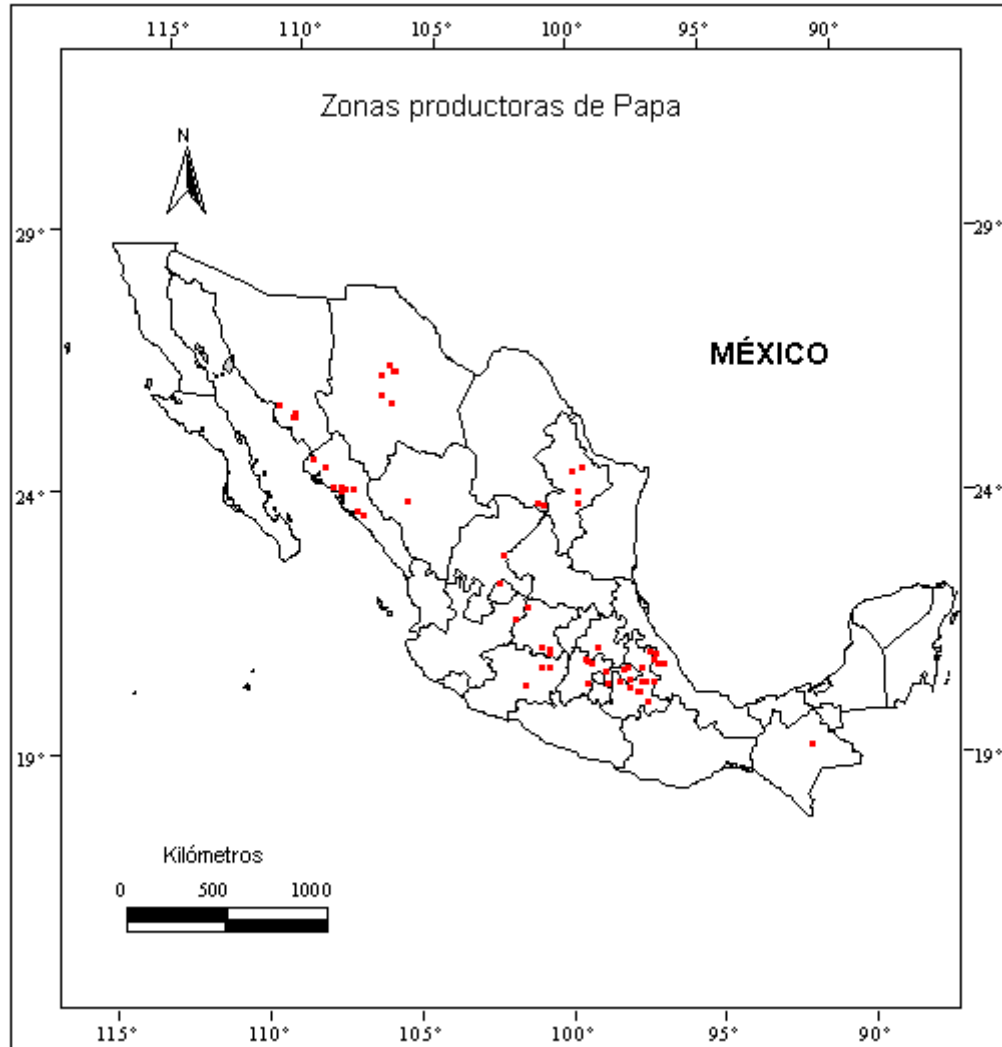


Figura 2. 2 Mapa de la República Mexicana, mostrando las principales zonas productoras de papa (29).

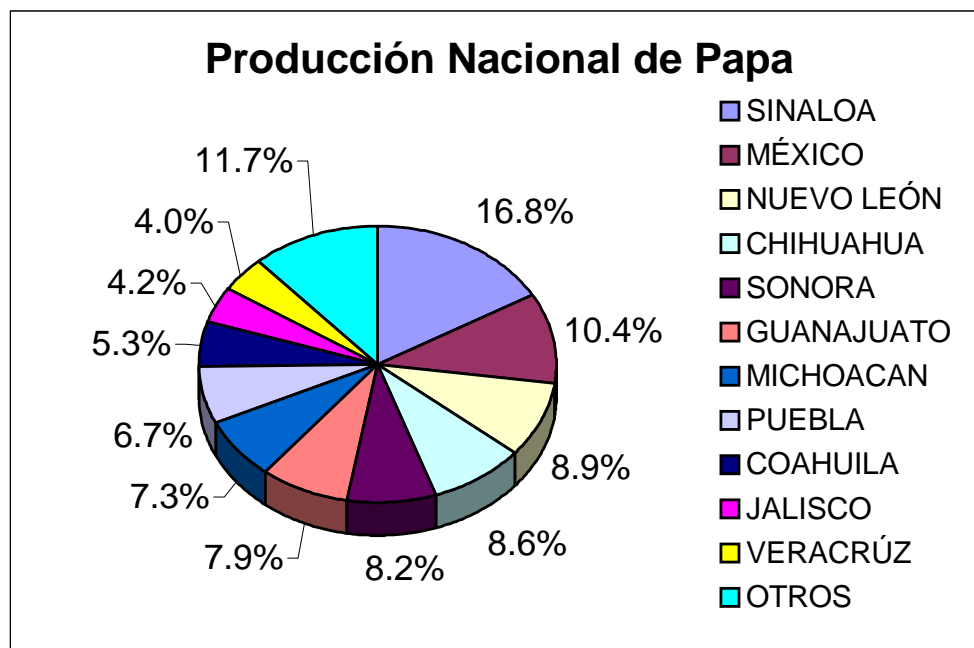


Figura 2. 3 Principales estados productores de papa en México en el 2001, según el Servicio de Información y estadística agroalimentaria y pesquera <SIAP> (24)

En México la producción de papa se ha incrementado con el tiempo (Tabla 2.4), lo que no necesariamente significa una mayor cantidad de hectáreas sembradas, sino un mayor rendimiento, mejores semillas y el uso de más tecnología.

Tabla 2. 4 Datos del cultivo de papa en México del 2000-2004, Hg: Hectogramos (100g); Mt: Tonelada métrica; Ha: Hectárea.(*) Datos "última actualización febrero 2004" (30).

México Papa	Elemento			
	Superficie cultivada (Ha)	Rendimiento (Hg/Ha)	Producción (Mt)	Semillas (Mt)
2000	67,965	239,420	1,627,217	56,800
2001	68,480	237,799	1,628,450	51,600
2002	62,448	237,558	1,483,500	56,800
2003	68,810	252,116	1,734,809	56,800
2004*	68,810	252,116	1,734,809	56,800

2.2.3 Variedades

México cuenta con 17 variedades endémicas de papa, el cual sólo es superado por Perú que tiene 55 variedades propias (27).

En nuestro país, se siembran tubérculos de variedades endémicas y no endémicas cuyo nivel de adaptación es diferente, así como sus características referentes al rendimiento, sistema de producción, características del producto como contenido de harina, textura, sabor, y adecuación al procesamiento industrial (31). A continuación se presentan las variedades no endémicas de importancia comercial que se cultivan en cada región (Tabla 2.5) (24).

Tabla 2. 5 Región productora de papa y variedades producidas según adaptabilidad climática (23)

Región	Clima	Variedad
Guanajuato, Aguas Calientes y Zacatecas.	Templado, con precipitación de 400 a 600 mm	Alpha, Gigant, Mondial, Herta, Granola y Atlantic.
Sinaloa, Sonora y Baja California	Templado, Precipitaciones de 500 a 700 mm	Alpha, Gigant, Granola, Atlantic, White Rose y Diamante.
Michoacán	Templado, precipitaciones de 600 a 1000 mm	Alpha, Mondiel e Ireri.
Coahuila y Nuevo León	Templado, precipitaciones de 300 a 500 mm	Alpha y Atlantic.

Dentro de las principales características de una variedad que influye en el cultivo son:

- Rendimiento
- Calidad de tubérculo.
- Calidad de conservación
- Resistencia a enfermedades.
- Tolerancia a problemas agro-climáticos y fisiológicos.

2.2.4 Ciclos Productivos

La papa se produce tanto en el ciclo otoño-invierno (que comprende de octubre a marzo) como en el primavera-verano, aunque el más importante es éste último (32), ya que durante el periodo que abarca los meses de abril a septiembre se obtienen alrededor del 60% de la producción nacional (24) (Tabla 2.6).

Tabla 2. 6 Región productora de papa respecto a la variedad sembrada. Incluye los periodos de siembra y cosecha por estado productor (23).

Principales Estados productores de papa, por región y periodo productivo.				
Estado	Regiones	Siembra	Cosecha	Variedad*
Sinaloa	Los Mochis y Guasave	Noviembre-Marzo	Febrero-Agosto	Alpha, Gigant, Granola, Atlantic, White Rose, y Diamante
Sonora	Huatabampo y Navojoa			
Baja California	Ensenada			
Guanajuato	León, San Francisco del Rincón, Romita y Silao.	Enero-Marzo y Julio-Agosto.	Abril-Mayo y Octubre-Noviembre.	Alpha, Gigant, Mondial, Herta, Granola, y Atlantic,
Jalisco	Tapalpa	Mayo-Junio	Noviembre-Agosto	
Aguascalientes	Rincón de Romo y pabellón	Enero-Marzo	Julio-Agosto	
Zacatecas	Calera y Enrique Estrada	Enero-Mayo	Mayo-Agosto	
Coahuila	Parras y Artiaga	Marzo-Mayo	Julio-October	Alpha y Atlantic
Nuevo León	Galeana			
Chihuahua	Jiménez, Aldama y Cuathemoc	Abril-Mayo	Agosto-Noviembre	
Estado de México	Valle de Toluca, San Felipe del Progreso, Calimaya, Valle de Bravo y Tenango del Valle.	Mayo-Junio	Octubre-Diciembre	
Puebla	Libres, Guadalupe Victoria y Tlatlauqui.	Mayo-Junio		
Michoacán	Zamora, Tenancicuaro y Jacona.	Julio-October	Noviembre-Marzo	Alpha, Mondiel e Ileri
Tlaxcala	Huamalta	October-Diciembre	Marzo-Mayo	
Veracruz	Perote			

El cultivo de la papa se realiza tanto en condiciones de temporal como de riego. Por lo tanto en México la producción de papa abarca todo el año (Tabla 2.6), lo que garantiza su disponibilidad en el mercado (23-24).

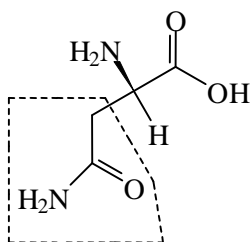
2.3 Variedades empleadas en el trabajo de investigación

Tabla 2. 7 Caracterización de las papas empleadas en el trabajo de investigación. (33)

Variedad	Alpha	Los Mochis
Características	Planta sin pigmento	
Crecimiento	Precoz-intermedia	
Susceptible	Tizón tardío y virosis	
Tubérculo	Oblongo	Largo-Oblongo
Piel	Blanca y lisa	Oscura y rugosa
Ojos	Superficiales	Superficiales
Pulpa	crema	Amarilla-cremosa

2.4 Asparagina

La asparagina (Figura 2.2) fue el primer aminoácido que se aisló de la naturaleza por Vauquelin y Robiquet en 1806 del jugo de espárragos y de ahí su nombre. Posteriormente se descubrió que la asparagina está extensamente distribuida y presente en considerables concentraciones en plantas superiores. Es el aminoácido mayoritario en las papas y cereales, representa aproximadamente el 40% del total de los aminoácidos (5, 15).



L-Asparagina

Figura 2. 4 Estructura química de las asparagina

Es uno de los 20 α -aminoácidos más abundantes (34). Considerando su polaridad (Tabla 2.8) la asparagina es un aminoácido neutro, con grupo R no cargado (Tabla 2.9). Es uno de los aminoácidos más solubles en agua y más hidrofílicos. (35)

Tabla 2. 8 Clasificación de los 20 aminoácidos comunes, según su polaridad (34)

Neutros		Ácidos	Básicos
<ul style="list-style-type: none"> • Alanina • Asparagina • Cisteína • Glutamina • Glicina • Isoleucina • Leucina • Metionina 	<ul style="list-style-type: none"> • Fenilalanina • Prolina • Serina • Treonina • Triptófano • Tirosina • Valina 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido glutámico • Ácido aspártico 	<ul style="list-style-type: none"> • Arginina • Histidina • Lisina

La asparagina es la amida del ácido aspártico o también llamado ácido α -aminosuccínico, que es otro aminoácido abundante, que primero se conoció como el producto de la hidrólisis de la asparagina (15).

Tabla 2. 9 Valores de pKa de la asparagina y el ácido aspártico, en el que se comprueba las características neutras del grupo R de la asparagina en comparación al ácido aspártico (34)

Nombre	Abreviatura	PM	pK ₁ -COOH	pK ₂ -NH ₃	pK ₃ -R	PI
Asparagina	Asn	132	2.02	8.80	----	5.41
Ácido aspártico	Asp	133	1.88	9.60	3.65	2.77

Para los humanos la asparagina es un aminoácido no esencial para su desarrollo, junto con la Glicina, Alanina, Serina, Ácido glutámico, Glutamina, Prolina, Ácido Aspártico, Tirosina, Cisteína, Arginina e Histidina, a diferencia de los ocho aminoácidos indispensables o esenciales como la Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Triptófano, Treonina, Metionina y la Lisina (29, 35).

2.5 Pardeamiento no enzimático

El pardeamiento no enzimático consta de una serie de reacciones, todavía no completamente elucidadas, pero que incluyen los fenómenos de caramelización y la interacción de proteínas o aminas con carbohidratos (reacción de Maillard) (36); la caramelización (pirólisis) ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión, provocando isomerización y deshidratación de los carbohidratos. La deshidratación furfural y los derivados que se producen se polimerizan consigo mismo y con otras sustancia similares para formar macromoléculas de pigmentos y otros compuestos como la 2,5-dimetilpirazina y la trimetilpirazina que contribuyen al aroma típico de las frituras de papa; la “Reacción de Maillard”, es un grupo complejo de transformaciones que trae consigo la producción de melanoidinas (pigmentos de color amarillo claro hasta café oscuro, incluso negro) y numerosos productos responsables del sabor y olor de los alimentos procesados (Figura 2.5) (37).

La reacción de Maillard se ve afectada por diversos factores de la siguiente manera (38):

- El pH alcalino favorece la reacción, y alcanza su máximo a pH=10. Se inhibe en condiciones ácidas.
- Aumenta su velocidad de reacción de 2 a 3 veces por cada 10°C más de temperatura. Su energía de activación (E_a) es baja por lo que dicha reacción también ocurre a temperaturas de refrigeración (4-6°C)
- Los alimentos de humedad intermedia, son más propensos (0.6 a 0.9 de actividad acuosa)
- Los azúcares reductores favorecen la reacción de la siguiente forma: reaccionan primero las pentosas que las hexosas; los monosacáridos que los disacáridos y entre los monosacáridos la galactosa>glucosa>Fructosa>lactosa>maltosa, aunque en los alimentos el orden no es riguroso, pues en las papas fritas es más activa la fructosa que la glucosa.
- Metales como el Cu y el Fe, catalizan la formación de melanoidinas, al igual que la presencia de oxígeno y luz en la polimerización final, sin embargo su ausencia no inhibe la reacción.

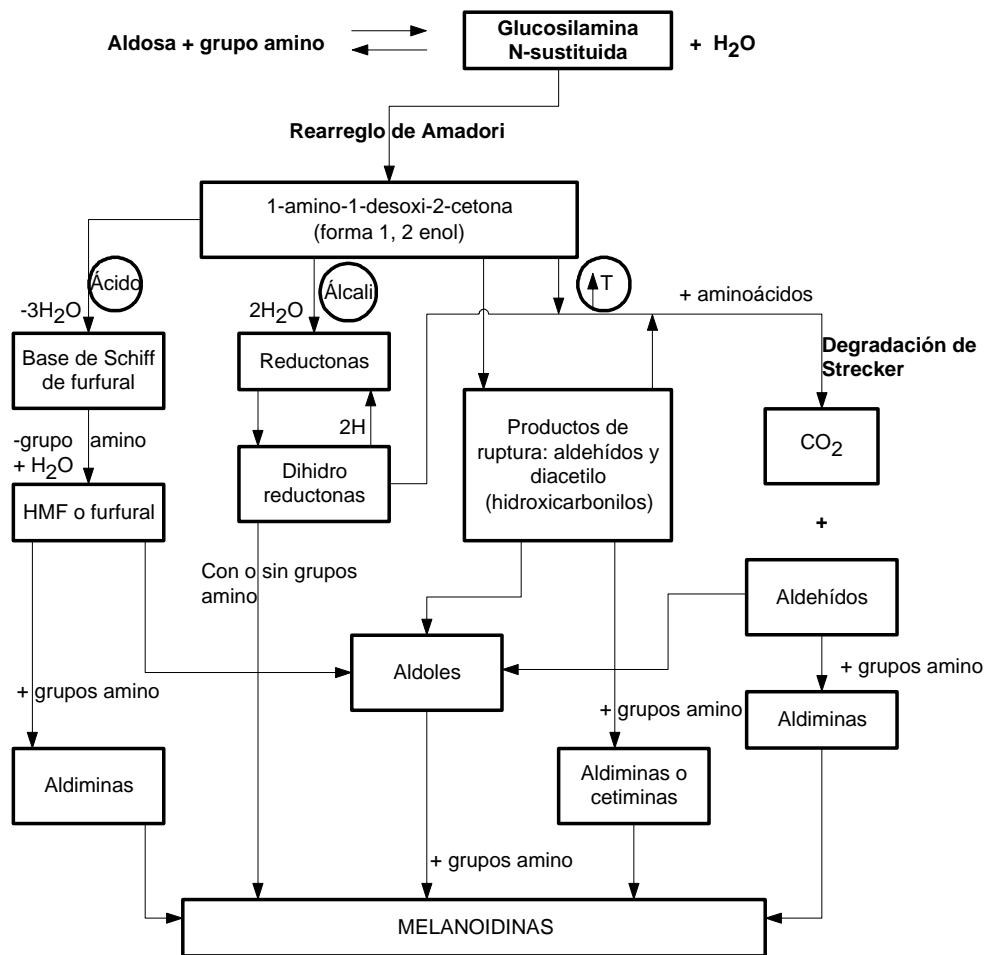


Figura 2. 5 Reacciones de oscuramiento de Maillard (38)

Entre las reacciones generalmente aceptadas, se encuentran las esquematizadas en las siguientes ecuaciones con la aldosa de la glucosa.

1. Formación de la glucosilamina, vía una base de Schiff entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y el grupo amino de una amina. Es una reacción reversible catalizada por ácido, se ve favorecida por un bajo contenido de agua (Figura 2.6).

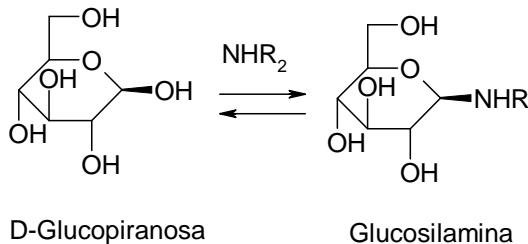
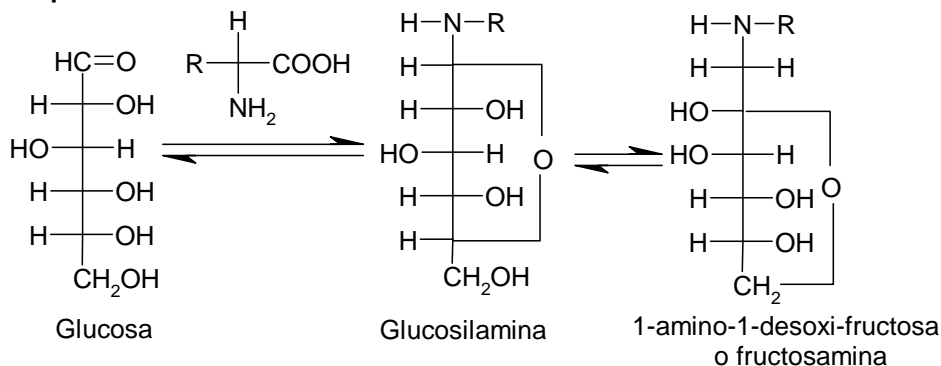


Figura 2. 6 Reacción de formación de la glucosilamina, que es la forma cíclica de la base de Schiff. En esta etapa no hay formación de compuestos coloridos.

2. Transposición de los productos de condensación: las aldósaminas se isomerizan a cetosas por el mecanismo de Amadori, en el que la glicosamina se transforma en una cetosamina, por ejemplo; las cetosaminas se transforman en aldosas por la transposición de Heyns. El mecanismo se cataliza por los ácidos débiles, o por el grupo carboxilo de los aminoácidos que suministra el protón necesario para que se lleve a cabo la reacción (Figura 2.7).

Transposición de Amadori:



Transposición de Heyns:

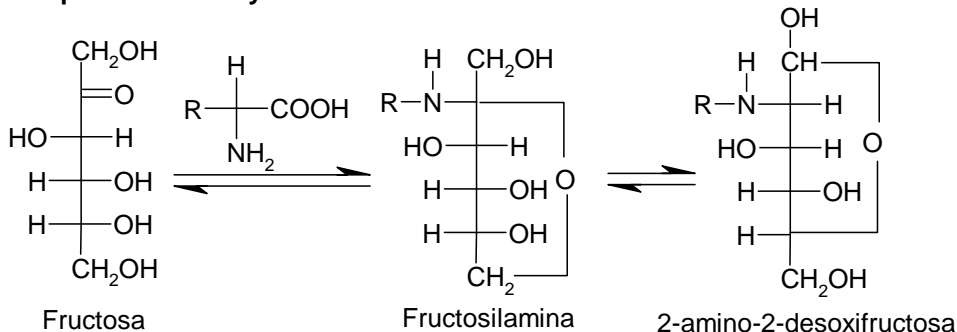


Figura 2. 7 Formación del producto Amadori para aldosas y la transposición de Heyns para cetosas

3. Reacciones de los productos de transposición: De acuerdo con el pH, la actividad acuosa y la temperatura, puede ocurrir la deshidratación de los azúcares por isomerización enólica formando furfural (Figura 2.8) y sus derivados, reductonas y dehidro reductonas, maltol, isomaltol, etc o fragmentación de los azúcares enólicos con la formación de aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes de bajo peso molecular

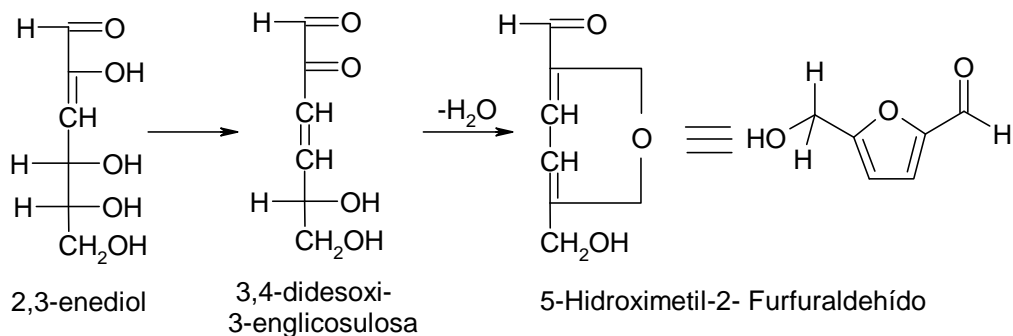


Figura 2. 8 Formación del hidroximetil furfural (compuesto indicador de la degradación química de los alimentos) a partir de una cetosa.

2.6 Formación sugerida de Acrilamida en alimentos, vía la reacción de Maillard

El mecanismo propuesto para la formación de la acrilamida con base en los experimentos efectuados utilizando un modelo (de papa fritas), con marcado isotópico y confirmación-identificación utilizando CL/EM, sugiere la siguiente secuencia de reacciones (Figura 2.9) en donde se observa la necesidad de la presencia de un grupo carbonilo en la formación de la acrilamida.

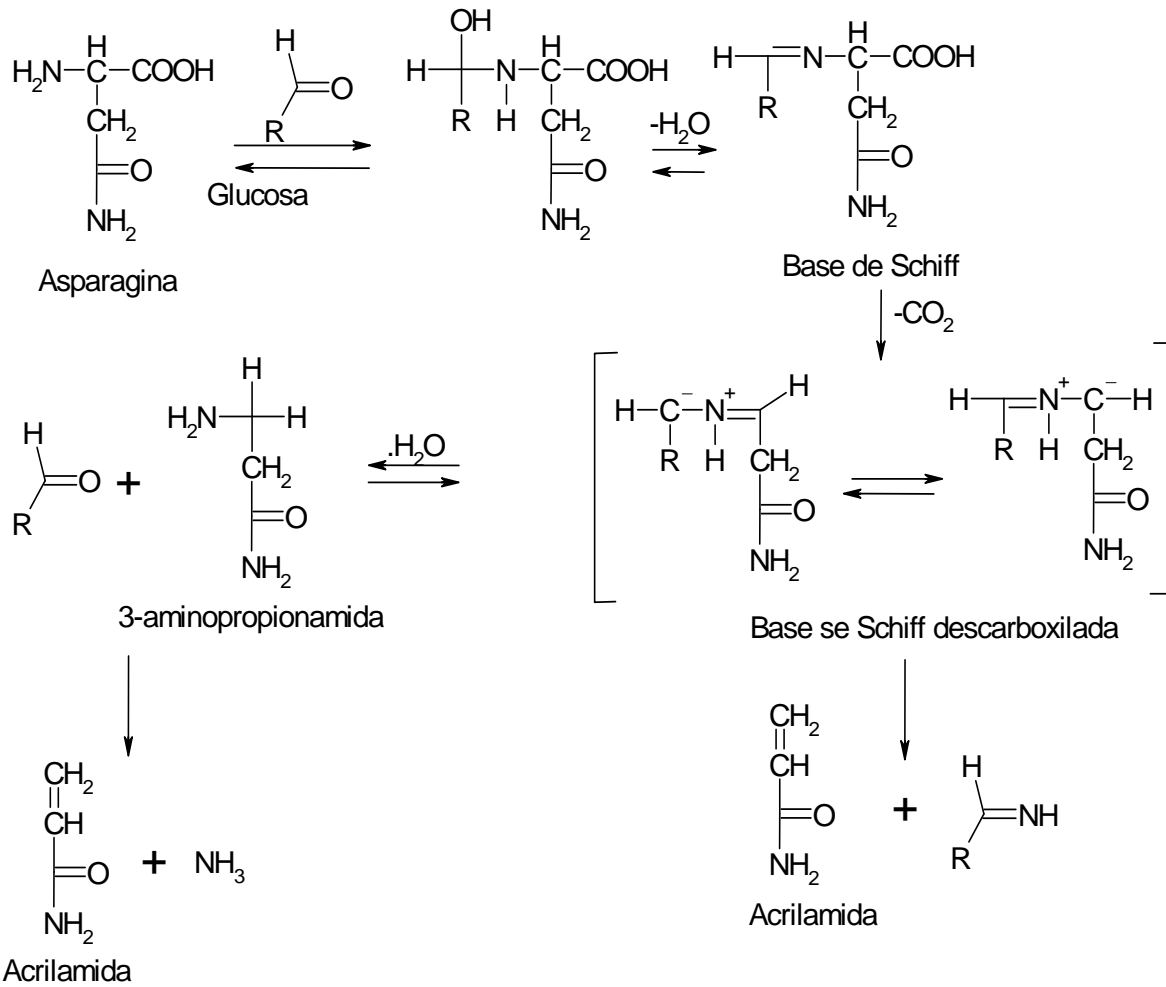


Figura 2. 9 Mecanismo de formación de la Acrilamida propuesto por Zizak (14).

2.7 Métodos de Análisis

Existen actualmente numerosas métodos para la determinación de asparagina, entre las que destacan:

2.7.1 Colorimetría

- Reacción entre la ninhidrina (15) con cualquier grupo amino libre (Método de Moore y Stein). El compuesto colorido se forma no sólo con aminoácidos sino también con péptidos, proteínas y otros compuestos con grupos aminos libres. La reacción es extremadamente sensible pero poco selectiva, por lo que es muy usada para cuantificar aminoácidos totales.

- Utilizando genipina (reactivo extraído de *Gardenia jasminoides*), en donde la reacción entre la genipina y el aminoácido genera un color azul que puede ser medido a una longitud de onda entre 500-600nm especialmente para el complejo Asn-genipina. La metodología asegura ser más estable y no muestra interferencias por la presencia de iones de cobre o hierro, que afectan de manera importante la reacción con ninhidrina (39).

2.7.2 HPLC en fase reversa

Al realizar la investigación bibliográfica, esta es la técnica instrumental más utilizada para la determinación de aminoácidos libres y/o asparagina en papas. El análisis consta de los siguientes pasos:

1. Extracción de los aminoácidos.
2. Derivatización.
3. Limpieza de la muestra (opcional)
4. Análisis cuantitativo en HPLC

La extracción de los aminoácidos se puede realizar utilizando diferentes disolvente como:

- Etanol absoluto en ebullición (40),
- Mezcla etanol / agua en frío (41-43),
- Buffer de acetatos a pH=7 (44) o
- Agua (3),

Una vez extraídos los aminoácidos, puede liofilizarse el extracto o pasar directamente a la derivatización de los aminoácidos con:

- Cloruro de dansil (40),
- 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-Cl) (3, 43), ó
- o-ftalaldehído-2-mercaptoetanol (41), o
- Mediante una multiderivatización con una mezcla de OPA (o-ftalaldehído) y FMOC (45)

El siguiente paso es opcional y se refiere a la limpieza de la muestra, con diálisis por ejemplo para eliminar el posible crecimiento de bacterias si las muestras han permanecido almacenadas largo tiempo (45).

Para el análisis se inyecta una cantidad de muestra derivatizada a la columna del HPLC para separar los distintos derivados formados y detectarlos usando un detector de fluorescencia. La cuantificación se realiza:

- Por comparación de cromatogramas (muestra vs estándar) (12) o con
- Estándar interno: glicina (3, 41) ó α amino-caprílico (43)

2.7.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (46)

Técnica desarrollada para la determinación de aminoácidos dentro de una matriz compleja como son los alimentos, las muestras biológicas, etc. El procedimiento consta de tres etapas:

1. Derivatización
2. Extracción
3. Análisis

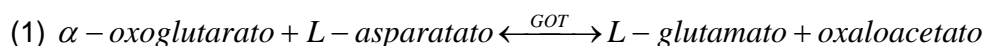
- La derivatización se realiza utilizando isobutil-cloroformato, para obtener derivados volátiles.
- Los derivados formados son extraídos con cloroformo y de esta fase se toma la alícuota a inyectar al sistema.
- La fragmentación iónica en el espectro de masas, de los derivados de la asparagina, favorece la determinación selectiva de este compuesto en una mezcla compleja.

2.7.4 Métodos enzimáticos

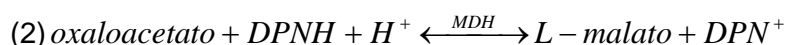
Los análisis enzimáticos son una herramienta valiosa para la determinación cuantitativa de concentraciones de analitos, utilizando las enzimas como reactivos analíticos (47). Cuando el reactivo es una enzima, el cambio puede darse o bien en el analito (sustrato de la reacción enzimática), o en el producto de la reacción. Debe de cumplir con dos características fundamentales: selectividad y sensibilidad; selectividad, indica que el reactivo reacciona únicamente con el analito a determinar, aún en presencia de otros analitos; y sensibilidad, indica que el reactivo es tanto mejor, si es capaz de reconocer al analito en muy baja concentración.

De la revisión ortográfica se encontraron dos procedimientos:

- a) Determinación de Ácido L-aspartico y L-asparagina con “Glutamato-oxaloacetato-transaminasa (GOT) y Deshidrogenasa Malica (MDH)” (48) cuyo principio es que: “GOT en presencia del ácido aspártico, convierte α -oxo-ácido-glutárico a ácido glutámico



La MDH reduce oxaloacetato a L-malato en presencia de piridin-di-nucleótido fosfato reducido (DPNH)



La disminución en la densidad óptica de DPNH puede ser seguida espectrofotométricamente de 340 a 366nm. El equilibrio de la reacción (2) esta desplazado a la formación del L-malato. La constante de Michaelis, para la enzima con respecto al L- aspartato es muy pequeña, lo que indica una alta selectividad. El L- aspartato es cuantitativamente convertido a L-(+)-malato con la de una cantidad estequiométrica de DPNH.

Para medir asparagina en presencia de ácido aspártico , se debe de calentar una porción de solución por 2h en baño maría con HCl 1N, enfriar, posteriormente neutralizar con NaOH 2N y diluir con agua destilada hasta un volumen conocido. Usar esta solución para el ensayo(*). La suma de asparagina y ácido aspartico es obtenida¹. Para la determinación enzimática de asparagina la muestra no debe ser hidrolizada. El orden de los reactivos es el siguiente: (*), DPNH, MDH, GOT, se mezclan y se lee la densidad óptica a 340 o 366nm contra un blanco de agua. Iniciar la reacción mezclando con α -cetoglutarato. La reacción es completa después de 10 minutos.

¹ Para la determinación enzimática de la asparagina, la muestra no debe de ser hidrolizada. En cambio se adiciona asparaginasa a la solución de ensayo después de que la reacción con aspartato es finalizada. El decremento adicional en la densidad óptica corresponde al contenido de asparagina en la muestra, según D.H. Williamson, no publicado.

El contenido de asparagina en la muestra se calcula como la diferencia en las evaluaciones de las muestras antes y después de la hidrólisis ácida, o del decremento de la densidad óptica después de adicionar la asparaginasa.

b) Metodología Análisis por inyección en flujo (FIA) (49)

Técnica selectiva para asparagina. Basada en la utilización de asparaginasa de *Erwina chrysantemi* inmovilizada en resina epoxi, y realizando su determinación indirecta con base en la "Reacción de Berthelot". El compuesto colorido (indofenol) generando por la reacción entre el amonio (liberado enzimáticamente), hipoclorito de sodio y fenol. La detección es espectrofotométrica a 626nm. Su intervalo lineal es de 60µM a 15mM y su LD= 1.2ppm, lo cual puede considerarse como inadecuado para la cuantificación de asparagina en papas, dado que la cantidad que se espera es cientos de veces más alta.

2.8 Análisis por Inyección en Flujo

2.8.1 Antecedentes

Jaromir Růžicka y Elo Harold Hansen en 1974, realizaron el primer experimento utilizando esta metodología, que tiempo más tarde sería denominada "Flow -Injection Analysis" (FIA por sus siglas en inglés)(50).

El primer trabajo desarrollado utilizando esta novedosa técnica fue para la determinación de la concentración de amonio de efluentes, utilizando un sensor de gas (50).

2.8.2 Componentes en FIA (17, 51)

El FIA está basado en la inyección de una muestra líquida dentro de un portador continuo. La muestra inyectada forma una zona (o bolo) que es transportada hacia el detector que registra continuamente los cambios. El sistema FIA consta de:

- **Sistema de propulsión o bombeo**, comúnmente se utiliza una bomba peristáltica, cuya función es establecer un flujo constante para transportar los

reactivos, la muestra y el portador, según se requiera. Sin embargo existen otros sistemas de propulsión como son: sistema de presión de gas o de gravedad (17).

- **Sistema de Inyección**, cuya finalidad es insertar un volumen conocido y reproducible de muestra, en el flujo portador sin detenerlo. El volumen de la muestra es controlado al utilizarse “loop” o “bucles” de capacidad establecida. (los más utilizados son de 50, 100, 200 y 500 μ L, sin embargo se puede hacer un loop de cualquier volumen, conociendo el diámetro interno y la longitud del tubo) El sistema de inyección más conocido es la Válvula de inyección de dos posiciones: llenado y vaciado (o inyección), que a continuación se muestra (Figura 2.10).

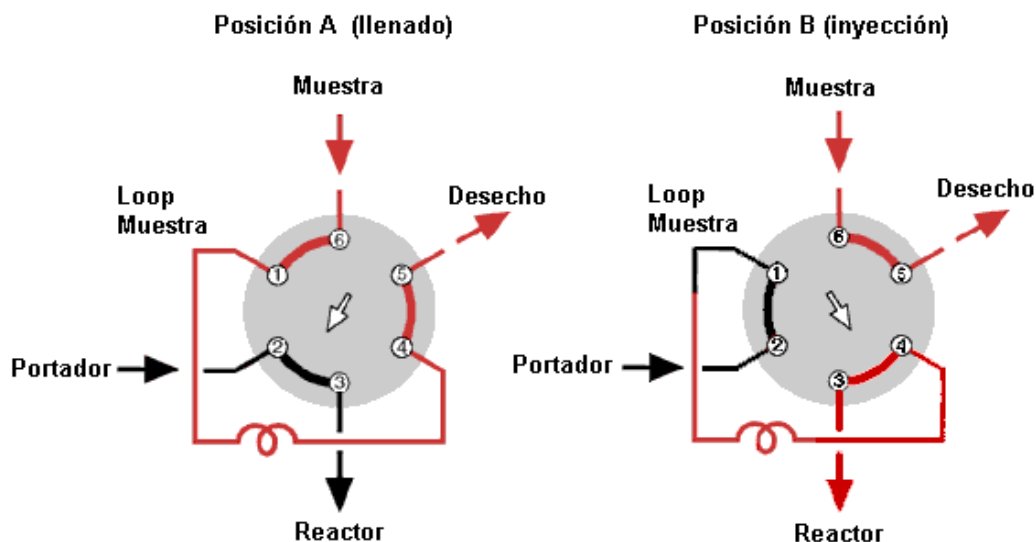


Figura 2. 10 Diagrama de la válvula de inyección. Posición A-llenado y posición B-inyección.

- **Sistema de transporte y reacción**, está constituido por una serie de tubos, por los que fluyen las diferentes disoluciones utilizadas en la configuración FIA. Existen diferentes tipos de “Reactor”: recto, enrollado o anudado, cámara de mezclado, etc.
- **Sistema de detección**, requiere de una celda de flujo ubicada en el mismo instrumento. El sistema de detección tiene la capacidad de traducir la señal del analito y registrarlo, actualmente se puede tener adaptada una computadora.

En las configuraciones FIA, puede utilizarse tanto sistemas selectivos como no selectivos: *Selectivos*, como los espectrofotómetros de absorción atómica y los electrodos de oxígeno; y entre los *No selectivos*, destacan los espectrofotométricos (UV-vis, infrarrojo) y electroquímicos.

2.8.3 Parámetros en FIA (17, 51)

Considerando una configuración simple la señal obtenida sería como la que se observa en la figura 2.11, donde:

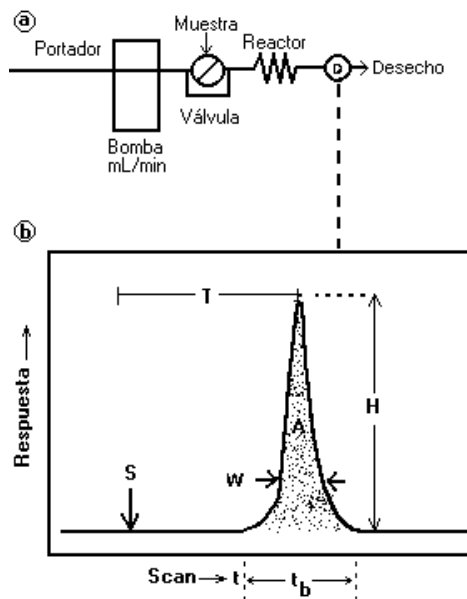


Figura 2. 11(a) Esquema de una configuración FIA simple, donde D es la celda de flujo en el detector (b) Señal obtenida al inyectar un bolo de muestra donde S, es en el tiempo cero al momento de la inyección de la muestra; H, es la altura del pico; W, el ancho del pico a cierto nivel y A, es el área del pico, y todos están relacionados con la concentración del analito; T, es el tiempo de residencia hasta la altura máxima del pico; y t_b es el ancho del pico sobre la línea base

La altura del pico H, es la dimensión más frecuentemente medida, ya que es fácil identificarla y está directamente relacionada con la respuesta del detector (absorbancia, pH, potencial, corriente, fluorescencia) y por tanto de la concentración del analito (C):

$$H = k * C$$

Donde k es una constante de proporcionalidad. Similarmente el área del pico esta relacionado de la siguiente forma:

$$A = k * C$$

El ancho del pico (W) es proporcional al logaritmo de la concentración, sin embargo esta medición es poco precisa.

2.8.4 Características fundamentales del FIA (17, 50-51)

El FIA está sustentado sobre la combinación de cuatro principios fundamentales:

- Flujo continuo
- Inyección directa de la muestra
- Dispersión controlada
- Reproducibilidad en el tiempo, desde la inyección hasta el detector.

La reacción química que se lleva a cabo, no requiere llegar al equilibrio, lo que es una ventaja más de este método analítico.

La muestra inyectada se diluye conforme avanza hacia el detector y que esto depende del tiempo transcurrido entre la inyección y la lectura del detector. Para evaluar esta dispersión Ruzicka propuso el coeficiente de dispersión D , que esta definido como la relación entre la concentración de la muestra antes y después del proceso de dispersión.

$$D = C^0 / C$$

El coeficiente de dispersión D depende de la geometría del canal, del volumen de inyección y del flujo. Por lo tanto la curva de respuesta tiene la forma de un pico que demuestra un gradiente de concentración (Figura 2.12).

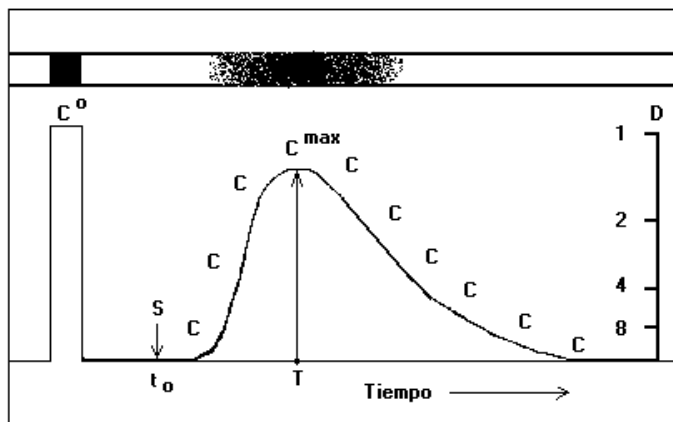


Figura 2. 12 Concentración original C^0 , a un continuo gradiente de concentración hasta la concentración máxima C^{max} .

Si la lectura analítica esta basada en la medición de la altura máxima del pico, la concentración que le corresponde es h_{max} , por tanto la dispersión máxima esta dada por:

$$D_{max} = h^0 / h_{max}$$

Se dice que la dispersión en limitada si $D = 1 - 3$, media $D = 3 - 10$ y alta sí $D > 10$.

El pico FIA, es el resultado de dos procesos cinéticos que ocurren simultáneamente: el proceso físico en la zona de dispersión y el proceso químico resultado de la reacción entre la muestra y las especies reactivas.

El coeficiente de dispersión considera sólo el proceso físico y no está relacionado con la reactividad química.

La dispersión está influenciada por otras variables FIA, por lo que puede ser considerada como la suma de las dispersiones originadas en tres partes diferentes del sistema FIA.

$$D = D_{\text{inyección}} + D_{\text{transporte}} + D_{\text{detector}}$$

Donde:

$D_{\text{inyección}}$ es la dispersión del volumen de muestra y los aspectos geométricos del sistema.

$D_{\text{transporte}}$ incluye la contribución de la geometría del reactor y la velocidad de flujo.

D_{detector} depende de la geometría de la celda de flujo y la dilución.

De acuerdo con Ruzicka la dispersión es inversamente proporcional al volumen de muestra inyectado (figura 2.11): $D = \frac{k}{V_i}$, cuando el volumen inyectado es muy grande, la

señal obtenida es máxima y corresponde a la concentración original de la muestra y $D=1$. Esto no es común en FIA por que los volúmenes de muestra son usualmente del 1-15% del volumen del reactor.

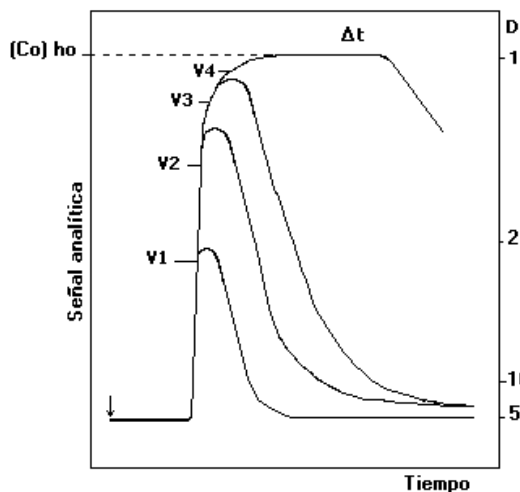


Figura 2. 13 Influencia del volumen de inyección ($V1 < V2 < V3 < V4$) sobre el coeficiente de dispersión. Cuando el volumen inyectado es muy grande comparado con la distancia hacia el detector, la muestra no presenta dispersión.

Cuando el tubo del reactor está enrollado, la fuerza centrífuga genera un flujo radial, si la velocidad de flujo es baja el perfil de la velocidad es parabólico, pero si es rápida, se tiene un flujo secundario en el que se presenta un efecto de difusión radial, que disminuye la dilución o dispersión de la muestra (Figura 2.14).

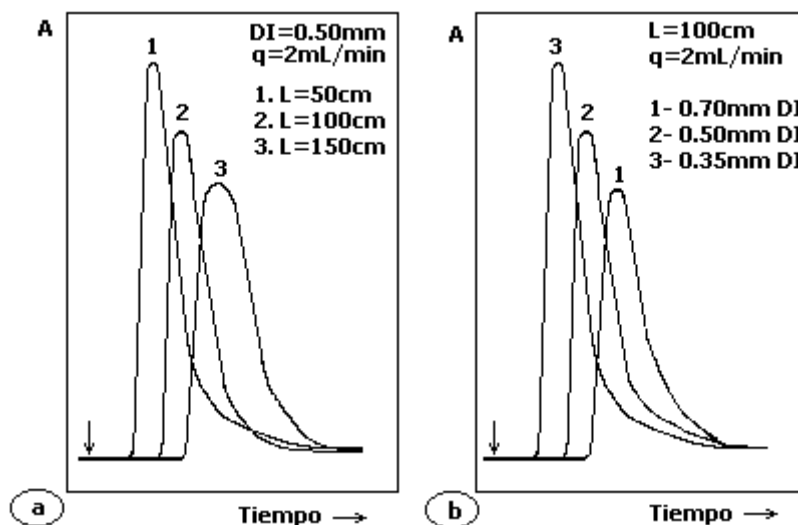


Figura 2. 14 (a) Señales obtenidas con un sistema FIA simple con diferentes longitudes de reactor y manteniendo constante el diámetro interno del tubo y la velocidad de flujo. El coeficiente de dispersión, el tiempo que tarda en observarse la señal y el ancho del pico se incrementa conforme aumenta la longitud del reactor. (B) Señales obtenidas variando el diámetro interno del reactor y manteniendo constante la longitud del reactor y el flujo. La dispersión, el tiempo que tarda la muestra en llegar al detector y el ancho del pico se incrementa conforme aumenta el diámetro del tubo.

2.9 Enzimas

Las enzimas tienen una gran variedad de aplicaciones, en donde se observa su comportamiento típico de catalizador altamente eficiente en condiciones de reacción suave y con una especificidad muy precisa tanto para el sustrato como para la reacción catalizada (52).

Las enzimas tienen las siguientes características:

- Eficacia
- Estabilidad
- Especificidad
- Reutilización (si está inmovilizada)

2.9.1 Inmovilización Enzimática

La inmovilización enzimática permite el empleo de cantidades elevadas de enzima, misma que mantendrá su actividad durante más tiempo, logrando que los costos disminuyan considerablemente (comparado con los métodos enzimáticos en disolución). Sin embargo, la velocidad de reacción, la constante de Michaelis Menten, la temperatura y el pH óptimo pueden cambiar, al igual que el efecto de los inhibidores. Todas estas modificaciones dependen de la técnica empleada para inmovilizar y de las características propias de la enzima (53).

2.9.2 Métodos de inmovilización

En general, los **métodos de inmovilización** (54) se suelen clasificar en dos grandes categorías: 1) *Métodos físicos* y 2) *Métodos químicos*

2.9.2.1 Métodos físicos que incluye la adsorción y el atrapamiento

- La adsorción física, es un método usado por décadas, fácil de implementar en el que no hay cambios físicos ni químicos en el adsorbente, pero sí pueden ocurrir en la conformación de la enzima. El proceso de inmovilización se basa en poner una solución acuosa de enzima en contacto con la superficie de algún material adsorbente insoluble en agua, en donde se aprovechan las fuerzas ligantes como interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, o ligamientos de alta afinidad con ligandos específicos unidos al polímero, puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals (52). El soporte puede ser un material inorgánico como: carbón activado, vidrio poroso, alúmina, sílica, etcétera; o polímeros naturales como polisacáridos o sintéticos como poliacrilatos.

Frecuentemente la adsorción es un proceso reversible, que tiende a la desorción durante su utilización, por fluctuaciones de pH, temperatura, fuerza iónica, reparto iónico (si tiene la misma carga) o arrastre mecánico (55)

- El atrapamiento consiste en una retención física de las enzimas en las cavidades interiores de una matriz porosa constituida generalmente por prepolimeros

fotoentrecruzables tipo poliacrilamida, o polímeros naturales como colágeno, alginato, carragenina, o resinas de poliuretano. El proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una solución del monómero o polímero soluble y posteriormente se inicia la polimerización con un cambio de temperatura o mediante la adición de un reactivo químico ó la inducción de la gelificación del polímero. El atrapamiento de una molécula de enzima puede ser dividida en tres grupos: 1) inclusión en una matriz polimérica; 2) microencapsulación y 3) disolución en una fase no acuosa.

2.9.2.2 Métodos Químicos

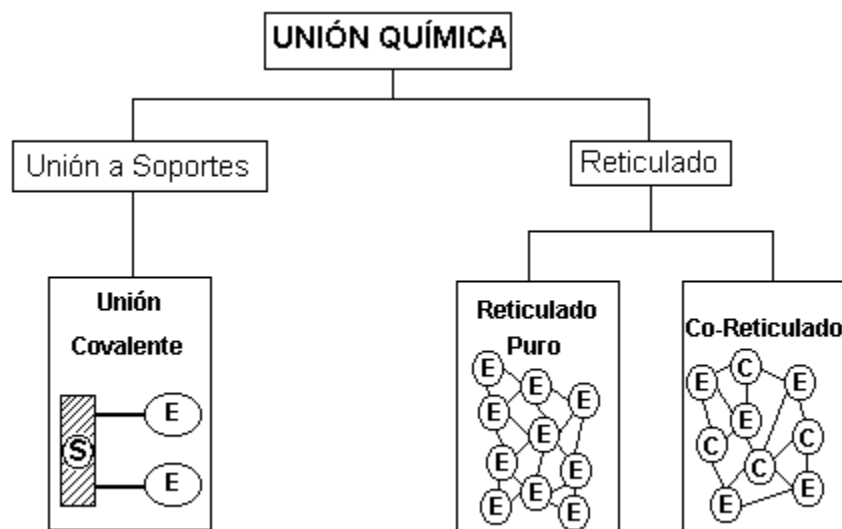


Figura 2. 15 Métodos de Inmovilización mediante unión química. Donde S es el soporte; E la enzima y C es el compuesto de unión.

▪ **Unión covalente**

La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. De entre los 20 aminoácidos diferentes que se encuentran en la estructura de las enzimas, los más empleados para la formación de enlaces con el soporte son principalmente la lisina, la tirosina y la histidina, y en menor medida la metionina, el triptófano, la arginina y el ácido aspártico y glutámico. El resto de aminoácidos, debido a su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia el exterior de la superficie proteica, y no pueden

intervenir en la unión covalente. Este método presenta las siguientes ventajas y desventajas (Tabla 2.10)

Tabla 2. 10 Ventajas y desventajas de la inmovilización por unión covalente (34).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla; • La carga de la enzima permanece constante después de la inmovilización; • Los derivados pueden utilizarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado. • Una mayor resistencia a la desactivación por el efecto de la temperatura, de los disolventes orgánicos o del pH, al tener estabilizada su estructura terciaria. • Mayor resistencia mecánica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría, que puede ser distorsionada y conducir a derivados inactivos. • El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo. Para evitar esta posible alteración, se realiza la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el centro activo, lo cual no siempre puede realizarse. • La inmovilización covalente no es aconsejable en aquellas enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

▪ **Reticulado Puro**

También denominado entrecruzamiento, es un método basado en la formación de un enlace químico, con la diferencia de que el portador no debe de ser insoluble en agua. La reacción involucra el uso de reactivos bifuncionales que originan uniones intermoleculares con las moléculas de enzima. Como reactivos bi o multifuncionales están: el glutaraldehído (base de Schiff), derivados de isoicianato (enlace peptídico), y otros. Como resultado del reticulado se tienen enzimas con enlaces intermoleculares irreversibles capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (55)

▪ **Co-reticulado con reactivos multifuncionales**

Permite evitar pérdidas de actividad enzimática debidas a efectos difusionales, mediante el entrecruzamiento de las enzimas con una proteína sin actividad enzimática y rica en residuos de lisina (por ejemplo albúmina bovina) o mediante reactivos como el glutaraldehído, 2,4-dinitro-3,5-difluorobenceno, etcétera. El mayor problema con este método es que los reactivos bifuncionales pueden atacar el centro activo de la enzima, lo que resulta en una pérdida de la actividad (53).

2.9.3 Efecto de la inmovilización sobre la actividad (54)

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir, aumentar e incluso perderse por diversas razones. La actividad enzimática puede perderse totalmente debido a que:

- la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido,
- los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima,
- la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva,
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, una disminución o aumento de la actividad enzimática se deberán principalmente a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del microentorno.

2.9.4 Aplicaciones

Las aplicaciones analíticas (53) de las enzimas inmovilizadas pueden dividirse en dos áreas: a) electrodos y b) analizadores automatizados. Las características particulares del primero, son que se genera un potencial eléctrico como resultado de la reacción catalizada por la enzima inmovilizada; y los analizadores automatizados son usados cuando se necesita reemplazar a métodos con enzima soluble, para realizar análisis

repetidos de muestras pequeñas (por ejemplo: muestras de sangre) y cuando se monitorean grandes volúmenes bombeados continuamente. Puede usarse una columna empacada con la enzima inmovilizada que brinda la ventaja adicional de crear una mayor resistencia al flujo, lo cual es conveniente. Las dimensiones del tubo son dependientes del flujo y en general de las condiciones óptimas para el sistema utilizado (por ejemplo, monitoreo de la concentración de un producto, un contaminante, fluidos biológicos, etc). Los cambios de temperatura en la columna son muy pequeños, por lo que no se tienen problemas por pequeñas fluctuaciones, sin embargo se deben realizar frecuentes estandarizaciones de los requerimientos de la columna.

2.10 Biosensores

El primer reporte de un biosensor se atribuye a Clark y Lyons en 1962, quienes lo describieron como un “electrodo enzimático” y lo usaron como un sistema de bioreconocimiento selectivo de moléculas de glucosa, mediante la utilización de glucosa oxidasa (56).

Un biosensor se define como un “mecanismo analítico que combina una enzima con un transductor para producir una señal proporcional a la concentración del analito”. Esta señal puede ser el resultado de un cambio en la concentración de protones, la liberación de un gas como amoníaco u oxígeno, la emisión, absorción o reflectancia de luz, etcétera debida a la reacción catalizada por la enzima (57).

2.10.1 Transductores

Los transductores (Tabla 2.11) convierten esta señal en una respuesta medible que puede ser amplificada, procesada y/o almacenada para su posterior análisis (57).

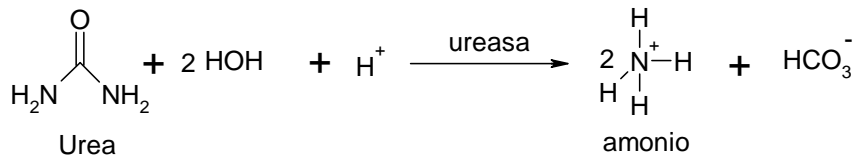
Tabla 2. 11 Clasificación de los diferentes tipos de transductores y el tipo de señal que reciben para relacionarla con la concentración del analito.

Tipos de Transductores	
<u>Electroquímicos</u>	
• Amperométricos	Aplicación de corriente
• Potenciométricos	voltaje
• Conductimétricos	impedancia
<u>Ópticos</u>	
• Colorimétricos	color
• Luminiscentes	intensidad luminosa
• Fluorescentes	intensidad luminosa
<u>Calorimétricos</u>	
• Termistor	temperatura

2.10.1.1 Transductores electroquímicos

- Amperométricos: Opera a un potencial fijo con respecto a un electrodo de referencia, y se mide la corriente generada por la oxidación o reducción de las especies en la superficie del electrodo de trabajo. Los biosensores amperométricos se basan en las reacciones enzimáticas redox.
- Potenciométrico: consiste de un electrodo ion selectivo (por ejemplo de pH, amonio, fluoruro, etcétera), o un electrodo sensible a un gas (como CO₂ y NH₃) con una capa de enzima inmovilizada. La diferencia de potencial que se genera por el cruce de iones a través de la membrana selectiva que separa las dos soluciones, se mide con un potenciómetro (57).

Por ejemplo la siguiente reacción enzimática catalizada por la ureasa (56):



La concentración de urea puede ser medida indirectamente, inmovilizando la enzima en la superficie de un electrodo de amonio

- Conductimétricas: Muchas reacciones catalizadas por enzimas, involucran un cambio en las especies iónicas. La asociación con estos cambios es un cambio neto en la conductividad de la solución de reacción.

2.10.1.2 Transductores ópticos

Este tipo de biosensores están basados en métodos ópticos, el cambio en las propiedades ópticas como absorción UV/vis, bio y quimiluminiscencia, reflectancia y fluorescencia. El analito es monitoreado ópticamente. Los biosensores ópticos pueden ser de dos tipos, de acuerdo a su configuración óptica; intrínsecos, cuando no hay una incidencia directa de la luz a través de la muestra, pero se propaga por el simple contacto con la superficie de la muestra; y la extrínseca cuando la luz interacciona directamente con la muestra.

Por ejemplo, la oxidación y reducción de NAD(P)H durante la reacción enzimática catalizada por la deshidrogenasa, puede ser monitoreado por la medición del NAD(P)H fluorescente y los cambios en la intensidad de fluorescencia, están relacionados con la concentración del sustrato.

Los biosensores de fibra óptica, se están investigando como posibles alternativas para realizar determinaciones a nivel nanomolar, de sistemas enzimáticos luminiscentes ligados a un transductor óptico, ya que tienen la ventaja de ser más compactos, flexibles, resistentes al ruido eléctrico y menor tamaño (la fibra óptica actúa como guía para transmitir la información). Por ejemplo enzimas bacterianas luminiscentes y su deshidrogenasa son co-inmovilizadas sobre una membrana activada de poliamida y luego esta membrana se une a la parte final de la fibra óptica que se pone en la celda en contacto con el flujo. El NADH formado por la reacción del analito con NAD^+ en presencia de la deshidrogenasa, es detectado usando la luminiscencia bacteriana del sensor de fibra óptica (56-57).

2.10.1.3 Transductores Térmicos

Están basados en el principio que involucra al calor generado por una reacción enzimática, la cual puede ser utilizada como un indicador medible para determinar por calorimetría la cantidad de sustrato que reaccionó. Las entalpías molares de las reacciones enzimáticas deben ser de 5-100kJ/mol.

2.10.2 Los biosensores (58) de biocatalizadores inmovilizados

Se usan no solo en el análisis de alimentos como una nueva alternativa, debido a su inherente especificidad, simplicidad y rápida respuesta sino también en el área de salud humana y animal, en la agricultura y defensa (57). Estos se caracterizan por su selectividad, que permite detectar y cuantificar el analito deseado en una matriz compleja, sin la necesidad de costosos procedimientos de separación antes de realizar el análisis de muestras como son los alimentos (52).

La aplicación de los biocatalizadores puede dividirse en cuatro categorías: 1) utilidades terapéuticas, 2) analíticas, 3) manipulativas, y 4) industriales.

Entre los biosensores se incluyen los electrodos enzimáticos y fibra óptica para la investigación, detección, determinación y monitoreo de varias sustancias como la fructosa, glutamato, aspartame, peróxido de hidrógeno, glucosa, sulfitos, etc. Los biosensores están basados en su propia reacción enzimática, y siempre debe realizarse una curva de calibración usando las condiciones óptimas del sistema.

2.11 Enzimas en sistemas FIA (59)

Existen dos posibilidades generales de uso de enzimas en sistemas de flujo continuo:

1. Enzimas en disolución, que puede ser aspirada o inyectada dentro del sistema en una configuración FIA inversa o FIA normal.
2. Las enzimas inmovilizadas son tradicionalmente utilizadas en reactores empacados. La enzima puede también ser inmovilizada en el sistema de detección, cuando actúa como un sensor bioquímico.

2.11.1 Enzimas inmovilizadas

El uso de enzimas inmovilizadas en sistemas automatizados FIA, ofrece ventajas substanciales de sensibilidad, selectividad, rapidez, precisión, automatización, etcétera, frente a los sistemas que utilizan enzimas en disolución.

Las técnicas analíticas de detección más frecuentemente utilizadas son: amperometría, conductimetría, potenciometría, espectrofotometría, termometría, etc. (Tabla 2.12) (18, 56)

Tabla 2. 12 Biosensores potenciométricos, amperométricos* y sus enzimas (57)

Analito	Enzima	Tipo de sensor ion selectivo
Urea	Ureasa	cación, pH, gas (NH ₃ o CO ₂)
Glucosa	Glucosa oxidasa	pH, I ⁻
L-asparagina	Asparaginasa	Cación
L-lactato*	Lactato oxidasa	O ₂

El reactor con la enzima inmovilizada puede estar insertado (Figura 2.16) en diferentes partes de una configuración FIA: 1) en la zona de transporte-reacción; 2) en el loop de la válvula de inyección; y 3) en la celda de flujo de un espectrómetro o de un detector electroanalítico. Los primeros dos involucran el uso de un reactor empacado convencionalmente.

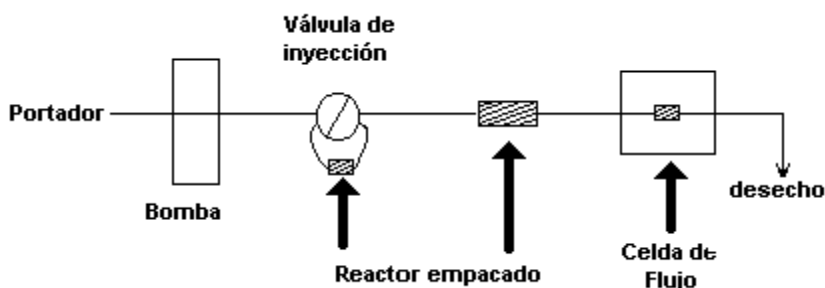


Figura 2. 16 Diagrama de una configuración FIA simple, indicando las ubicaciones probables del reactor empacado con enzima.

- **Uso del reactor enzimático en el loop de la válvula de inyección**

Una de las ventajas de la incorporación del reactor enzimático empacado dentro del loop de la válvula de inyección, es que la medición del blanco es automática, si la configuración FIA se arma para dicha opción.

En la Figura 2.17, se observa una configuración en donde el reactor enzimático (RE) se encuentra empacado en el loop. Esta configuración utiliza sólo una válvula de inyección. En la posición de llenado, la muestra (sustrato) pasa a través del loop en donde se lleva a cabo la conversión y se dirige al desecho; y el portador se dirige hacia el detector. En la posición de inyección, la mitad de la muestra que reside en el loop esta como sustrato y otra como producto, el portador pasa a través del loop empujando la mitad de la muestra que nunca paso por el RE y que genera el primer pico FIA considerado como la señal del blanco, seguido de la porción de muestra que se encuentra como producto (y que paso dos veces a través del reactor enzimático), y que produce el segundo pico FIA que corresponde a la concentración del analito.

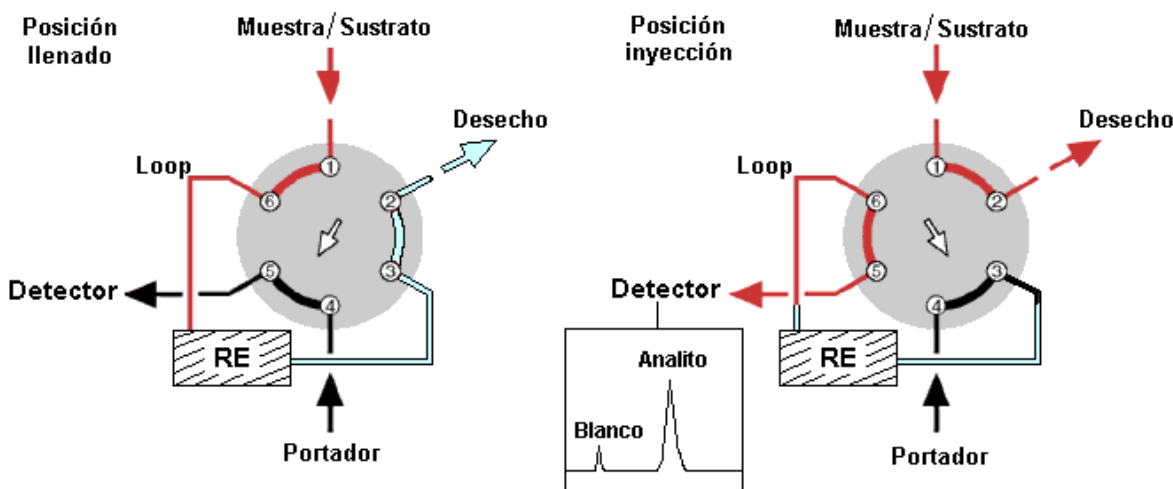


Figura 2. 17 Configuración de la válvula de inyección con la adición del reactor enzimático (RE) en el loop, que permite la obtención de la señal del blanco de forma automática. En rojo, recorrido del sustrato; en azul el producto de la reacción enzimática; y en negro el portador.

- **Uso de enzimas en el sistema de transporte**

Está basada en la incorporación del reactor enzimático (RE) en la posición más conveniente de acuerdo a la configuración FIA requerida. El RE en el sistema de transporte, es la posición más frecuentemente usada, la cual también se propone en el presente trabajo. La inmovilización y empacado de la enzima se realiza de forma convencional utilizando la técnica y el soporte más adecuado (49).

- **Uso de enzimas en la celda de flujo**

Está basada en la integración de reacción (y/o retención) y detección. Esto puede ser considerado como una alternativa de sensores (bio) químicos convencionales. La celda de flujo de un detector no destructivo puede ser utilizada para inmovilizar uno de los participantes de la reacción como: 1) el analito (inmovilización temporal); 2) el reactante (inmovilización permanente); 3) el catalizador (inmovilización permanente) o el producto de la reacción (inmovilización transiente).

3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación

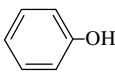
- Balanza analítica, marca OHAUS.
- Balanza Harvard Trip, marca OHAUS.
- Espectrofotómetro. Lambda 25 UV/Vis Perkin-Elmer Instruments, acoplado al software UV WINLAB versión 2.85.04 Molecular Spectroscopy.
- Baño COLORA, Ultra-Thermostat NB-34735
- Válvula semiautomática, Smart Valve Actuator THAR DESINGS INC.
- Bomba peristáltica de 4 canales, Minipuls 2, Gibson
- pH-metro Digital Benchtop. Cole-Parmer® Model 05669-20.
- Electrodo combinado-pH Thermo – Orion 915600.
- Agitador automático de velocidad ajustable Spin-master Model 4803
- Celda de Flujo de cuarzo 5Q, con paso óptico de 1cm y 70μL de volumen interno
- Centrífuga J-600 Solbat de 0-4500rpm; Tiempo 1-99minutos 59segundos; Temperatura ambiente. Utilizando tubos CORNING de 15mL de capacidad.
- Equipo Millipore, con membrana Millipore.
- Cortador de papas fritas Leifheit AG de 1cm².
- Micropipetas:

Marca	Pipetman Gilson	Finnpipette Digital Labsystems	
Volumen	50-200μL	200-1000μL	1000-5000μL
No. Serie	F95400	B-23625	A-43480
Punta	Gilson C-20V ref 23800	Finntip 61	Finntip 62

- Para el sistema de transporte /reacción en la configuración FIA se utilizó:
 - ✓ Tubo capilar de teflón de 1/16 “ por 0.5mm D.I.
 - ✓ Conectores: lineales ¼-28 y en T ¼-28
 - ✓ Tornillos
 - ✓ Férulas
- Loop de 200μL de capacidad
- Tubo de bomba Tygon: negro-negro (0.030”) 0.76mm DI y naranja-naranja (0.035”) 0.89mm DI.

3.2 Reactivos y Disoluciones

3.2.1 Reactivos químicos

Compuesto	Fórmula	Marca	Pureza	PM	Lote
Acetato de sodio	CH_3COONa	J.T. Baker		82.037	M-37074
Ácido acético glacial	CH_3COOH	Mallinckrodt		60.06	2504 V02D53
Ácido Clorhídrico	HCl	J.T. Baker		36.465	404904
Ácido nítrico	HNO_3	Merck	65%	63.01	011519R
3-aminopropil-trietoxi silano	$\begin{array}{c} (\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2 \\ \\ \text{OCH}_2\text{CH}_3 \end{array}$	Aldrich Chemical	98%	221.37 $\rho=0.942$	04414JZ
Tetraborato de sodio	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Sigma		381.4	37H1295
Hipoclorito de sodio	NaOCl	Clorox®	5.5%		L150C
Cloruro de amonio	NH_4Cl	Merck	99.8%	53.49	31251
Fenol		Mallinckrodt		94.11	0028 KJNB
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	Química JVC		136.075	S/n
Fosfato de potasio dibásico	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Mallinckrodt	99.6%	228.23	7088 KJEV
Glutaraldehído	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	Aldrich	25%	100.12	02913PZ
Hidróxido de sodio	NaOH	Sigma	98.9%	40.00	67H 15601
L-Asparagina	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	Sigma	98%	132.1	22K5405

3.2.2 Otros materiales

Nombre	Clasificación	Marca	Proteína	U/mg sólido	Lote	Sólido (mg)
Asparaginasa 103.8 U	E.C.3.5.1.1. E. coli	Sigma- Aldrich	60%	173	123K4138	0.6

Vidrio de poro controlado	CPG	Sigma Chemical	Malla 120-200	Diámetro Poro 242Å	Lote 11H0735

3.2.3 Disoluciones amortiguadoras

- Buffer de fosfatos, (0.1M pH 8.0): Se pesaron aproximadamente pero con precisión 0.1862g de KH_2PO_4 y 1.5032g de K_2HPO_4 y aforó a 100mL. Verificar el pH y de ser necesario ajustarlo.
- Buffer de Acetatos, (0.5M pH 5.0): Se pesaron aproximadamente pero con precisión 2.6252g de CH_3COONa y se midió 1.03mL de CH_3COOH , posteriormente se aforó a 100mL. . Verificar el pH y de ser necesario ajustarlo.
- Buffer de Boratos, (0.1M pH 8.5): Se pesaron aproximadamente pero con precisión 3.814g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, se ajustó el pH y se aforó a 100mL.

3.2.4 Disoluciones

- Disolución madre de amonio 1000 ppm: Se pesaron aproximadamente pero con precisión 0.1g de Cloruro de Amonio anhidro y se aforó a 100mL con agua desionizada.
- Disoluciones estándar de amonio correspondientes al intervalo de concentraciones de 53 a 13 ppm
- Disolución madre de asparagina 1000 ppm: Se pesaron aproximadamente pero con precisión 0.1g de asparagina y se aforó a 100mL con agua desionizada.
- Disoluciones estándar de asparagina de 53 a 13 ppm.

- Disolución silanizante: Se tomó 5mL de 3-aminopropiltriethoxi-silano y 45mL de buffer de acetatos pH 5.0
- Disolución de asparaginasa: Al frasco de 100U con 0.6mg sólidos de enzima asparaginasa se le adicionaron 2mL de buffer de boratos. La concentración final fue de 51.9U/mL. Se almacenó bien cerrada a 4°C.
- Disolución de glutaraldehído al 12% en buffer de fosfatos 0.1M y pH 8.5. Se tomaron 4.8mL de glutaraldehído 25% y se aforó a 10mL con buffer de fosfatos.

3.2.5 Preparación de reactivos para la reacción de cuantificación

- Disolución de ácido hipocloroso al 1% de hipoclorito de sodio, a partir de blanqueador comercial (Clorox®). Para preparar 100mL, se tomaron 20mL de Clorox® y 80mL de agua. Y se ajustó el pH entre 6.5-7.0 con HCl concentrado.
- Disolución de fenolato: Se pesaron aproximadamente pero con precisión 10 g de Fenol y 2.5g de NaOH, se aforó a 100mL con agua desionizada.
- Agua desionizada ajustada a pH 8.5 con NaOH.

La determinación de asparagina se realizó utilizando un reactor empacado con asparaginasa unida químicamente al vidrio de poro controlado (CPG), por lo que el trabajo experimental se divide en:

- Inmovilización de la enzima
- Método para la determinación de asparagina
- Evaluación del reactor enzimático
- Robustez del método
- Análisis de muestras

3.3 Inmovilización de la enzima

Se utilizó el método descrito por Massoon y Townshend (60). La inmovilización consta de 4 pasos fundamentales:

1. Limpieza del vidrio
2. Silanización
3. Acoplamiento del glutaraldehído
4. Unión de la enzima

3.3.1 Limpieza del vidrio de poro controlado (CPG)

- Se pesó aproximadamente 0.2g de CPG.
- Se hirvió con HNO_3 al 5% durante 30min, en la campana de extracción.
- Se enfrió, filtró y lavó abundantemente con agua destilada, sobre placa porosa en equipo Millipore, para eliminar el ácido nítrico.
- Se transfirió el CPG limpio a un vidrio de reloj y se secó a 95°C en horno durante el tiempo necesario. La coloración del vidrio no debe de cambiar, en caso contrario repetir el procedimiento.

3.3.2 Silanización

- Se añadió el vidrio seco a la disolución silanizante y se puso en baño maría durante 2h ($90\text{-}100^\circ\text{C}$), con agitación constante.
- Se dejó enfriar y posteriormente se filtró sobre placa porosa, lavando abundantemente con agua destilada.
- Posteriormente se secó en estufa a 95°C por el tiempo necesario.

La reacción que se llevó a cabo es la siguiente (Figura 3.1):

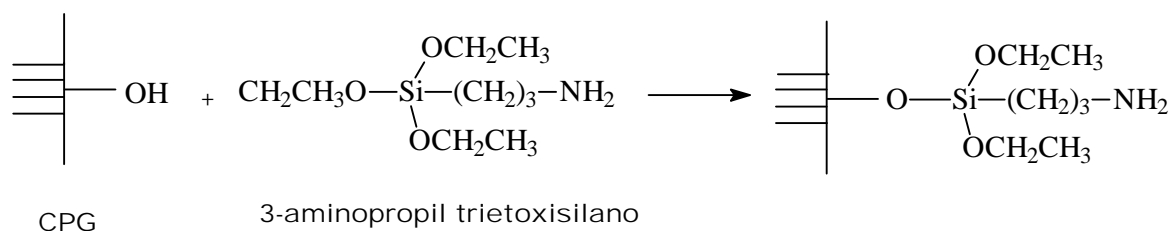


Figura 3. 1 Reacción de silanización del vidrio de poro controlado con 3-aminopropil trietoxisilano.

3.3.3 Acoplamiento del Glutaraldehído

- El CPG silanizado y seco se añadió a la disolución de glutaraldehído y se mantuvo en agitación suave por 1h a temperatura ambiente. En este paso se observó un cambio en la coloración del vidrio, el cual adquiere una tonalidad rojo-ladrillo, indicativo de que se está llevando a cabo la reacción entre los grupos silano y el glutaraldehído.
- Una vez transcurrido el tiempo, se filtró con un filtro de vidrio sinterizado y se lavó con agua destilada para eliminar el glutaraldehído no ligado al CPG, ahí mismo se dejó secar al vacío durante el tiempo necesario. Una vez seco se guardó en un vial ámbar bien cerrado, cubierto con papel aluminio y a temperatura ambiente.

La reacción que se llevó a cabo es la siguiente (Figura 3.2):

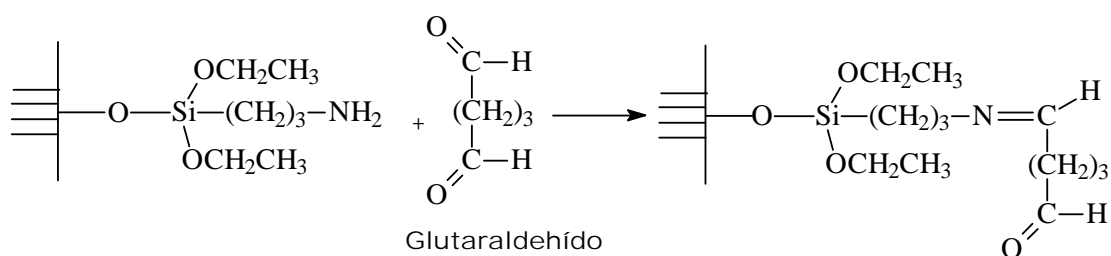


Figura 3. 2 Acoplamiento del grupo bifuncional (glutaraldehído) al vidrio silanizado. Reacción entre el grupo amino del vidrio silanizado y uno de los carboxilos del glutaraldehído.

3.3.4 Unión de la enzima

- Se pesaron aproximadamente pero con precisión 0.05g de CPG activado y seco, al cual se le adicionaron 200 μ L de disolución de asparaginasa y 200 μ L de buffer de boratos 0.1M pH 8.5 para que cubra totalmente el CPG.
- Se dejó en contacto la enzima-soporte durante 5 días a una temperatura de 5 $^{\circ}$ C, y con agitación eventual. El CPG activado es capaz de reaccionar con cualquier grupo amino de la asparaginasa de la forma que a continuación se muestra:

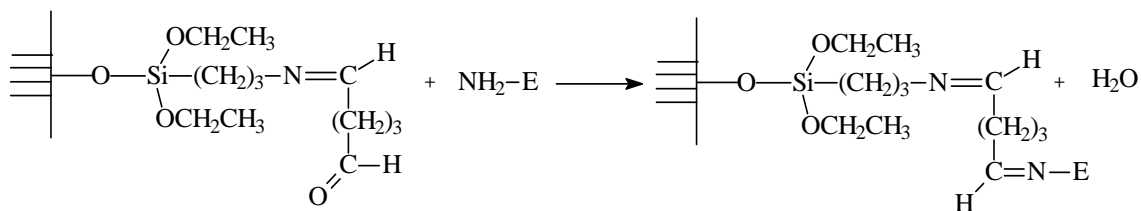


Figura 3. 3 Unión de la asparaginasa (E), al grupo bifuncional unido al vidrio silanizado, que tiene un grupo carboxilo libre capaz de reaccionar con los grupo amino libres de la enzima.

- La enzima inmovilizada en el CPG, se lavó con agua desionizada fría y buffer de boratos, posteriormente se empacó en tubo de tygon (Gilson naranja-naranja) de 8 cm de longitud y 0.89mm de diámetro interno.

3.4 Método propuesto para la determinación de asparagina

El método se basa, en la hidrólisis enzimática de la asparagina para dar aspartato y amonio. El amonio producido reacciona con el hipoclorito y el fenolato para formar indofenol. El mecanismo de esta reacción (“Reacción de Berthelot”) es complejo y no está completamente establecido, pero puede suponerse la siguiente secuencia (19), que a continuación se presenta (Figura 3.4):

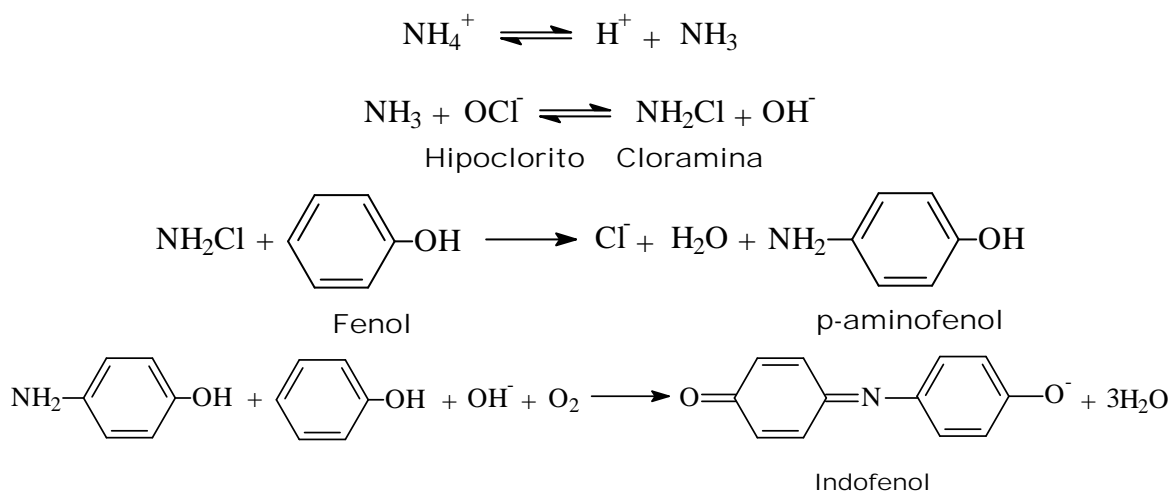


Figura 3. 4 Mecanismo de la Reacción de Berthelot propuesto (19).

Con base en lo anterior, se utilizó la siguiente configuración FIA (Figura 3.5)

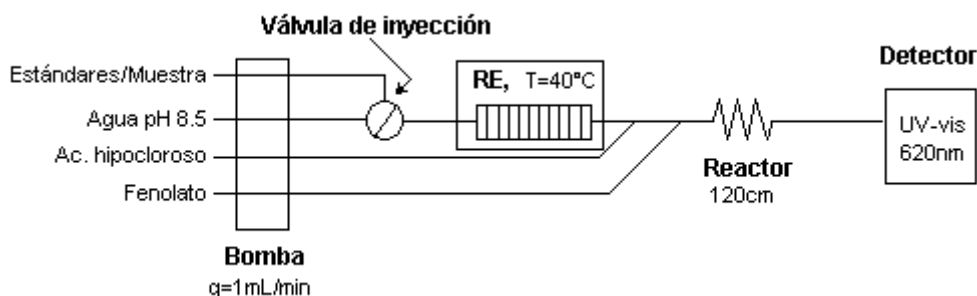


Figura 3. 5 Esquema de la configuración FIA propuesta para la determinación de asparagina en papas. Donde (q) es el flujo de la muestra y/o estándares, portador (agua pH 8.5) y reactivos (ácido hipocloroso y fenolato)

200 μ L de la disolución estándar o muestra se inyectó en la disolución portadora (agua a pH ajustado 8.5) y se pasó a través del reactor enzimático que se encontraba termostatado con agua a 40°C. El amonio, producido por la reacción enzimática confluye con las disoluciones de hipoclorito y fenolato. La reacción para la formación del indofenol tiene lugar en el reactor de 120cm de longitud, posteriormente pasa por la celda de flujo para ser detectado a 620nm. Se obtuvo un pico FIA (señal transiente, ver capítulo 2), donde la altura de la señal en unidades de absorbancia, es proporcional a la concentración del analito (Asparagina) en la disolución inyectada.

El volumen de inyección, flujo y longitud del reactor (variables FIA) así como las concentraciones de los reactivos (variables químicas) utilizados fueron las establecidas en un trabajo previo. (61) Cabe recordar que se utilizó una válvula de inyección semiautomática programable, la cual realizaba cambio de posición cada 45 segundos, es decir, 45 segundos en la posición de llenado y 45 segundos en la posición de inyección, lo que garantiza el llenado del loop con la muestra o el estándar y su posterior inyección a la configuración FIA establecida.

3.5 Evaluación del reactor enzimático

Para evaluar la eficiencia del reactor enzimático de asparaginasa, se calculó la fracción de conversión del sustrato, de la siguiente forma: se inyectaron por triplicado disoluciones estándar de amonio y de asparagina, que abarcan un intervalo de 0.1 a 0.4mM. Con los valores de altura de pico resultantes (en unidades de absorbancia) y correspondientes a las disoluciones de amonio, se construye la curva de calibración de amonio y lo mismo se hace con los datos de asparagina, de tal forma que se tienen dos curvas de calibración. Los cálculos para la evaluación de la eficiencia ($\eta = [P]/[S]$) a partir de los datos experimentales, se encuentran detallados en el anexo I sección 3 (61).

3.6 Determinación del intervalo lineal, Limite de detección y límite de cuantificación (62).

Se prepararon disoluciones estándar de asparagina en un intervalo amplio de concentraciones (130 a 10 ppm), los cuales se inyectaron por triplicado en la configuración FIA establecida; posteriormente se graficaron los valores de altura de pico en unidades de absorbancia contra la concentración de asparagina correspondiente, se calculó la ordenada al origen (A), la pendiente (B) y el factor de correlación (R). El intervalo lineal de trabajo se estableció considerando la mejor correlación existente en un intervalo de concentraciones. Una vez establecido el límite superior del intervalo lineal, se prepararon disoluciones de concentración 50-5 ppm. Se inyectaron estas disoluciones y con los valores de altura de pico en unidades de absorbancia, se construyó la curva de calibración correspondiente a los 5 puntos de concentraciones más altas, y se evaluó el ajuste de la curva con el valor del coeficiente de correlación R. A partir de esta curva inicial, se van añadiendo puntos procesados de igual forma pero de concentración continuamente menores, con el objeto de definir de forma clara el límite de detección y obtener una evaluación correcta de la curva. Se utilizaron en el análisis de regresión lineal tan sólo los últimos 5 puntos, de manera que al añadir un punto de concentración más baja, se eliminó el de más alta concentración, en cada ocasión se evaluó R y se comparó con el valor anterior. En el momento en el que el valor de R cambia de manera significativa, indica que la curva de calibración pierde linealidad y que el último punto incluido está cercano al valor del límite de detección, por lo que la evaluación se realiza con el intervalo anterior.

La evaluación matemática del LD y LC, se realizó considerando la recta de calibración y los intervalos de confianza de la misma, de acuerdo al método descrito en el anexo I, sección 4.

3.7 Robustez del método

Para evaluar la robustez del método, se debe establecer aquellos factores relacionados con el método que se consideran críticos y se realizan variaciones pequeñas pero deliberadas. En cada condición de operación distinta, así como en la condición normal, se analiza una misma muestra. Se calcula la media aritmética de la condición normal de

operación y de cada condición diferente, así como la diferencia absoluta de la media aritmética de cada condición respecto a la condición normal.

Para métodos espectrofotométricos esta diferencia debe ser menor o igual al 5%, para que el método se considere robusto (47).

Se prepararon 8 disoluciones estándar de asparagina y se inyectaron por triplicado en la configuración FIA propuesta, para cada una de las variables indicadas. Con los datos promedio se procede a graficar absorbancia vs concentración de asparagina y se calculan los parámetros de regresión lineal (A, B y R) para cada uno de los diagramas obtenidos.

3.7.1 Longitud de onda

De acuerdo al método oficial del Standard Methods (63), se puede realizar la medición en el intervalo de 600 a 660 nm. En la presente tesis, se propone realizar la detección a 620nm y las siguientes dos variaciones:

- 610nm
- 630nm

3.7.2 Flujo

Siendo el propuesto 1.0mL/min. Se hacen los siguientes dos cambios:

- 1.2mL/min
- 0.8mL/min

3.8 Análisis de muestras

3.8.1 Características organolépticas de las muestras

- Forma y tamaño
- Color y textura de la piel
- Firmeza de la papa
- Daños físicos

3.8.2 Preparación de las muestras (Figura 3.6):

Se partió de aproximadamente 1kg de papa lo más fresco posible y que no se haya sometido a algún tipo de almacenamiento previo, ya sea a temperatura ambiente por tiempos prolongados o refrigeración. Se procedió a pelar manualmente cada papa y cortarlas longitudinalmente en tiras de 1cm^2 con ayuda del cortador manual de papas fritas. Cada tira a su vez se cortó en cubos de aproximadamente 1cm^3 , se homogenizaron manualmente e inmediatamente se pesaron 10 cubos tomados al azar para cada una de las muestras. Estas se tomaron por duplicado, una se dejó expuesta al aire (sin agua) y otra se sumergió en 50mL de agua (con agua).

3.8.2.1 Tejido

Los diez cubos de papa se muelen con 50mL de agua desionizada en licuadora por 5min a velocidad 3, hasta lograr una suspensión lechosa. Dada la cantidad de muestra y la capacidad de la centrífuga, primero se pasa el extracto a una probeta y se deja reposar aproximadamente 5min. Se decanta el sobrenadante #1 para centrifugarlo por 5min a 3000rpm. El sobrenadante #2 (obtenido después de centrifugar) se lleva a un matraz de 100mL y se afora. Se hace la dilución correspondiente y se inyecta por triplicado. Ambos sedimentos se eliminan.

3.8.2.2 Disolución

El agua que cubre a la muestra se pasa a un matraz y se afora a 50mL, se hacen las diluciones correspondientes y se inyecta por triplicado, para cuantificar la cantidad de asparagina que se disolvió en el agua.

3.8.3 Optimización del Método

Dado que el tratamiento de cada muestra requería mucho tiempo en su procesamiento, se buscó la forma de optimizar las condiciones. La centrifugación se estableció como la etapa más lenta, debido a que la capacidad de la centrífuga se vio superada, por la cantidad de muestra utilizada. El extracto de papa se tenía que dejar reposar para eliminar la mayor cantidad de tejido y almidón, dejando además en la probeta un volumen apreciable después de la decantación. Lo que contribuyó a la necesidad de evitar ambos pasos.

La decantación y la centrifugación, se sustituyeron por una doble filtración al vacío. Primero utilizando un papel filtro de poro grande para eliminar las partículas de mayor tamaño y después volver a filtrar el sobrenadante #1 con un papel de poro medio. El resultado fue un líquido claro libre de partículas, que pudiesen interferir en la medición.

Del sobrenadante #2 obtenido de la segunda filtración, se realizó la dilución correspondiente para obtener una señal en la parte media de la curva de calibración y se inyectó por triplicado cada muestra.

3.8.4 Diagrama de flujo

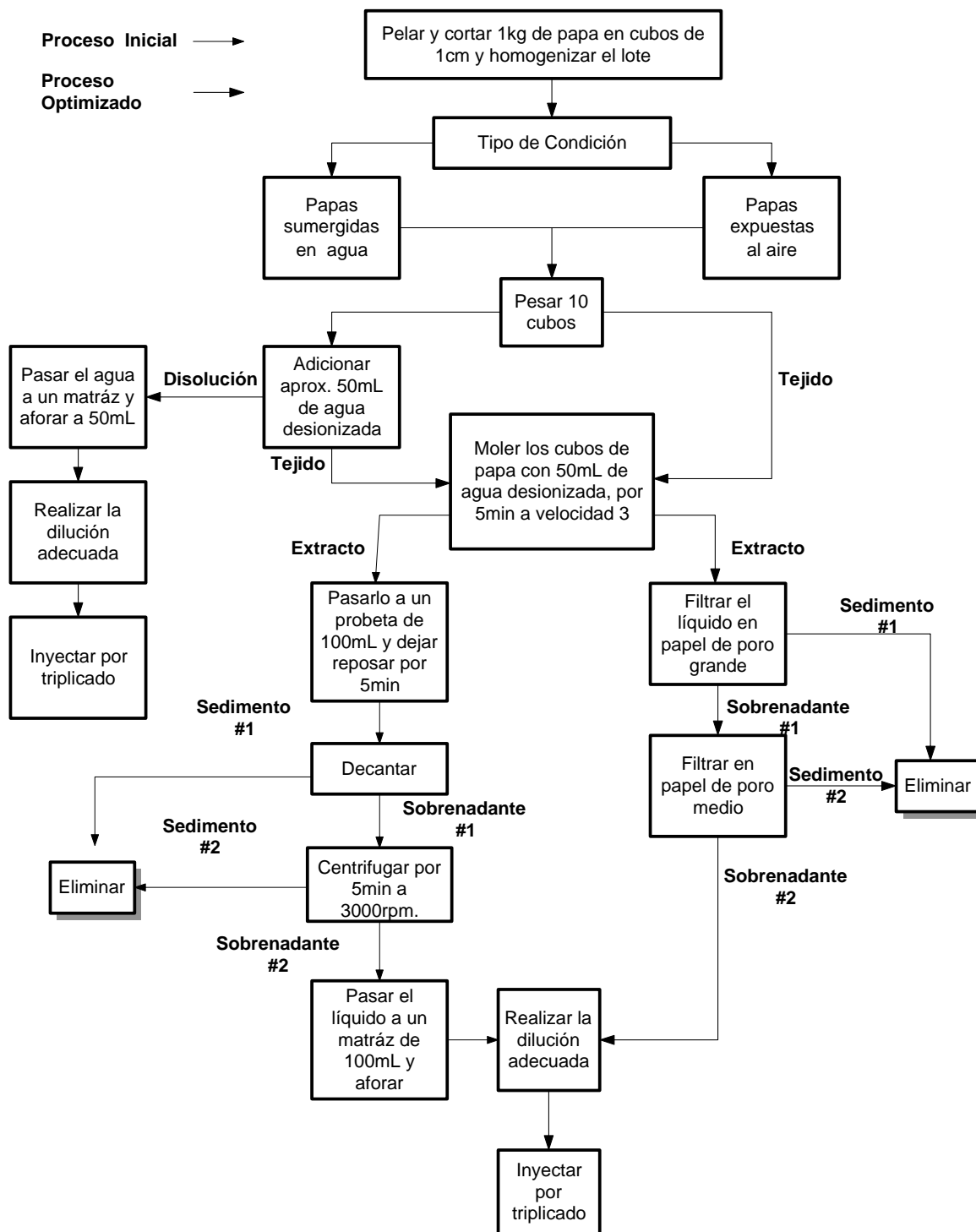


Figura 3. 6 Representación esquemática del procedimiento establecido para el tratamiento de las muestras, en sus dos modalidades (tejido y disolución). Las líneas continuas representan el proceso optimizado, que tiene un menor número de etapas y por lo tanto un menor manipuleo lo que lo hace más rápido y eficiente.

3.8.5 Inyección de muestras y estándares

Una vez preparadas las disoluciones estándar y las muestras, se inyectaron por triplicado en la configuración FIA, obteniéndose un diagrama como el que se muestra en la figura 3.7. Cada se pico se genera en aproximadamente 90 segundos (1.5min), por lo que la inyección por triplicado de una sola muestra es de 4,5 minutos en total (desde el llenado del loop hasta el detector).

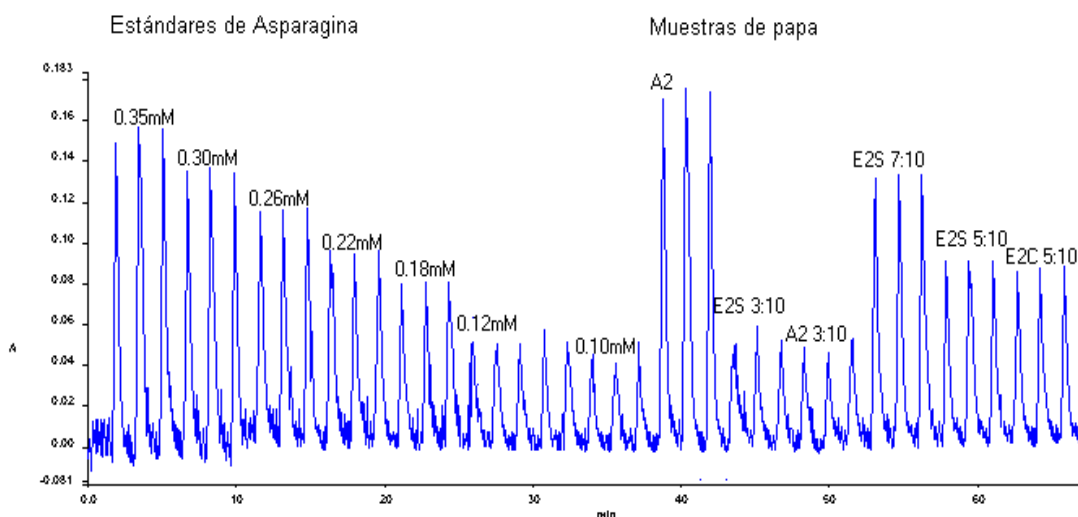


Figura 3. 7 Diagrama representativo, en donde se inyectaron por triplicado siete estándares de asparagina y seis diferentes muestras de extractos de papa.

3.8.6 Curva de calibración

Con los valores de la altura de los picos (en unidades de absorbancia) correspondientes a las disoluciones estándar, se realizó la curva de calibración correspondiente a cada análisis y se calcularon los parámetros de regresión: ordenada al origen (A), pendiente (B) y factor de correlación (R).

3.8.7 Cuantificación de asparagina en las papas

Con los valores de altura de los picos correspondientes a las inyecciones de las disoluciones de las muestras, se calculó su concentración.

3.8.7.1 Asparagina en tejido

El contenido de asparagina en el tejido se calculó con la siguiente relación:

$$\frac{mg \dots asparagina}{kg \dots papa} = \frac{C * FD * V}{g} * 100$$

En donde:

C = Concentración obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

FD = Factor de dilución.

V = Volumen de aforo (0.1L)

g = Peso en gramos de 10 cubos de papa.

3.8.7.2 Asparagina en la superficie

A partir de la concentración calculada de asparagina en la disolución se estimó la concentración de asparagina en la superficie de la papa, asumiendo que:

- Los cubos de papa tienen 1cm^2 por cada cara.
- Debidos a la solubilidad de la asparagina en agua, toda la asparagina presente en la superficie expuesta de la papa se disuelve.

En base a lo anterior, el contenido de asparagina en la superficie de la papa, se calculó con la siguiente expresión:

$$\frac{mg \dots asparagina}{\text{cm}^2 \dots papa} = \frac{C * FD * V}{S}$$

En donde:

C = Concentración obtenida a partir de la curva de calibración (mg/L)

FD = Factor de dilución

V = Volumen de aforo (0.05mL)

S = Superficie de papa (60cm^2)

4 RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Espectro de absorción del Indofenol

El indofenol compuesto de color azul, parte fundamental en la cuantificación indirecta de la asparagina, puede ser medido satisfactoriamente en un intervalo de 600-660nm (Figura 4.1), como se comprueba al observar la banda ancha del espectro de absorción, cuya longitud de onda de máxima absorción es de 629.22nm.

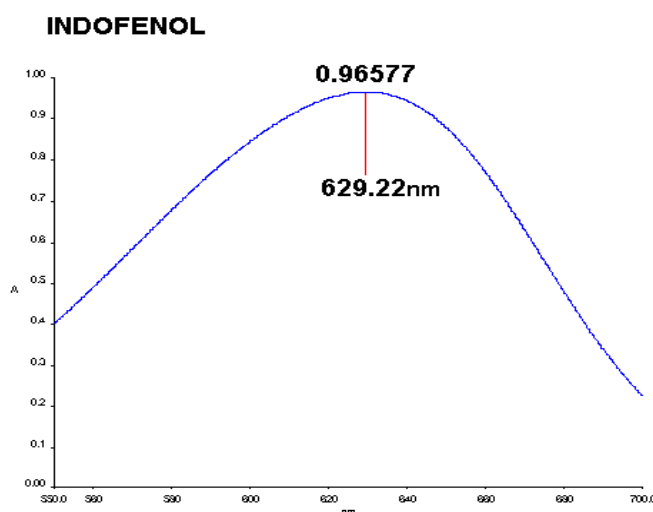


Figura 4. 1 Espectro de absorción del indofenol, obtenido por el Método del Fenato (43)

4.2 Eficiencia Enzimática

Se prepararon estándares de asparagina y amonio, que cubren un intervalo de 0.1mM a 0.4mM y se inyectó por triplicado, obteniéndose el fiagrama correspondiente (Figura 4.2), donde primero se observan los picos generados por los estándares de asparagina e inmediatamente los picos correspondientes a la inyección de los estándares de amonio. Al comparar la altura de las concentraciones equivalentes de los estándares de asparagina y amonio, se observa que la señal producida es igual, lo que corrobora que por cada mol de asparagina, se libera un mol de amonio (Figura 4.3)

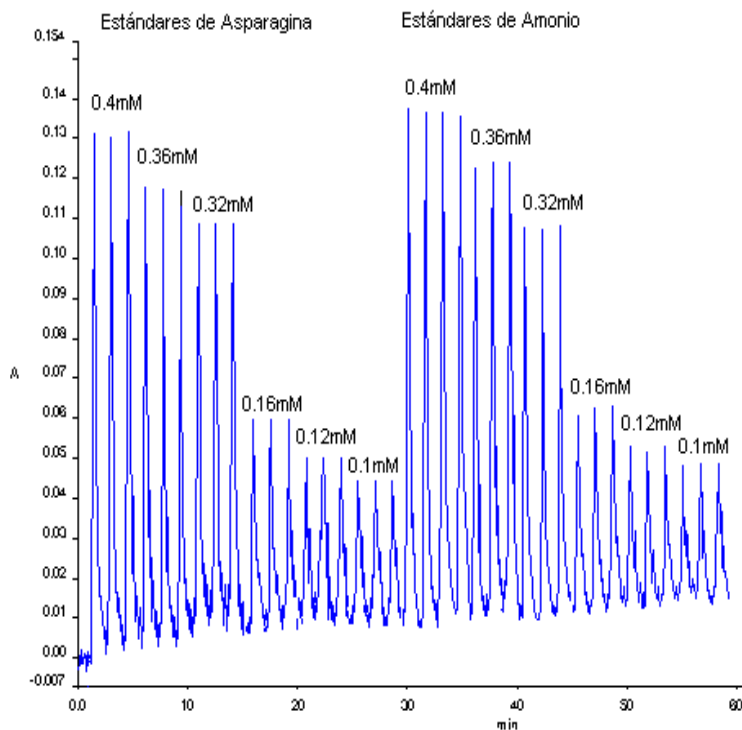


Figura 4. 2 a) Diagrama obtenido después de inyectar por triplicado estándares de asparagina y amonio, utilizando el RE empacado con la asparaginasa y la configuración FIA propuesta.

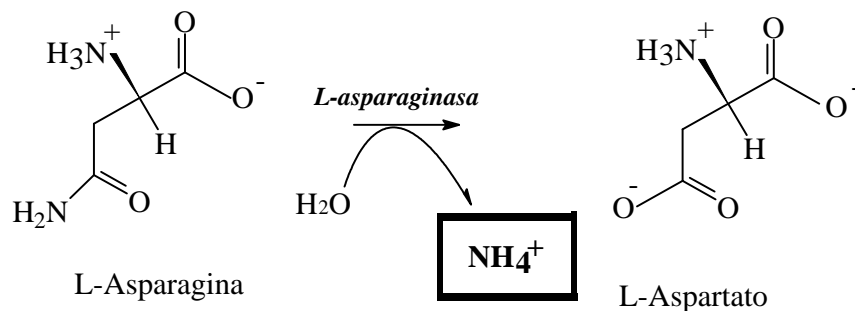


Figura 4. 3 Reacción enzimática de la asparagina, donde se observa la formación de amonio y aspartato, como productos de la reacción catalizada por la L-asparaginasa.

Con los resultados promedio en unidades de absorbancia se grafican los datos de manera conjunta como absorbancia vs concentración (amonio y asparagina) (Figura 4.4), donde se observa que las curvas generadas son iguales, es decir tienen la misma pendiente, lo que indica que las disoluciones estándares de asparagina generan una señal equivalente a la obtenida por un estándar de amonio de la misma concentración.

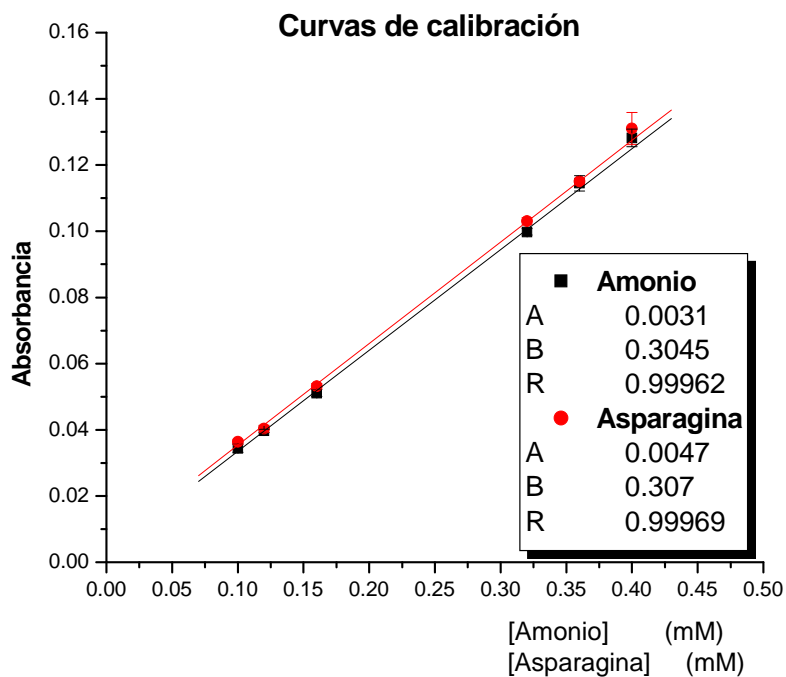


Figura 4. 4 Curvas de calibración para amonio y asparagina.

La obtención de la eficiencia del RE utilizado, puede realizarse de diferentes formas:

1. Medida como la relación de pendientes del sustrato y del producto (Figura 4.4), donde el producto es amonio y el sustrato la asparagina, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\eta = \frac{|P|}{|S|} = \frac{m_{Asn}}{m_{NH_4^+}} = \frac{0.307}{0.3045} = 1.01$$

Una eficiencia enzimática (η) de 1.01, significa que el poder de conversión de la asparaginasa es tal, que toda la asparagina inyectada es hidrolizada y el amonio liberado enzimáticamente reacciona para generar una respuesta comparable a la obtenida al inyectar los estándares de amonio de misma concentración.

2. Eficiencia enzimática calculada como la relación de concentraciones del sustrato y el producto, medido para cada estándar inyectado.

Los datos de concentración del amonio liberado enzimáticamente (Tabla 4.1), fueron calculados a partir de las señales obtenidas al inyectar los diferentes estándares de asparagina, cuyas unidades de absorbancia se interpolan en la curva de calibración del amonio, para establecer en unidades de concentración, la cantidad de amonio liberado por dichos estándares. La eficiencia enzimática medida como la relación de concentraciones del producto entre el sustrato, expresada en porcentaje es de 104 ± 2.9 por ciento.

Tabla 4. 1 Eficiencia enzimática del reactor, calculado para cada punto de la curva de calibración.

Estándar Amonio (mM)	Absorbancia	Estándar Asparagina (mM)	Absorbancia	Amonio liberado enzimáticamente (mM)	Eficiencia Enzimática (%η)
0.40	0.1282	0.40	0.1310	<i>0.42</i>	105.0
0.36	0.1145	0.36	0.1151	<i>0.37</i>	102.2
0.32	0.0998	0.32	0.1031	<i>0.33</i>	102.6
0.16	0.0511	0.16	0.0532	<i>0.16</i>	102.8
0.12	0.0397	0.12	0.0403	<i>0.12</i>	101.8
0.10	0.0344	0.10	0.0364	<i>0.11</i>	109.4
					$\bar{X} = 104.0$ DE= 2.9

- Al graficar amonio liberado vs concentración del estándar de asparagina, la pendiente de la gráfica representa la eficiencia de la asparaginasa (Figura 4.5)

La eficiencia enzimática obtenida de esta forma es excelente, ya que la pendiente de la recta (B) es "1.0", es decir su poder de conversión es del 100%, con un coeficiente de correlación (R) de 0.9993

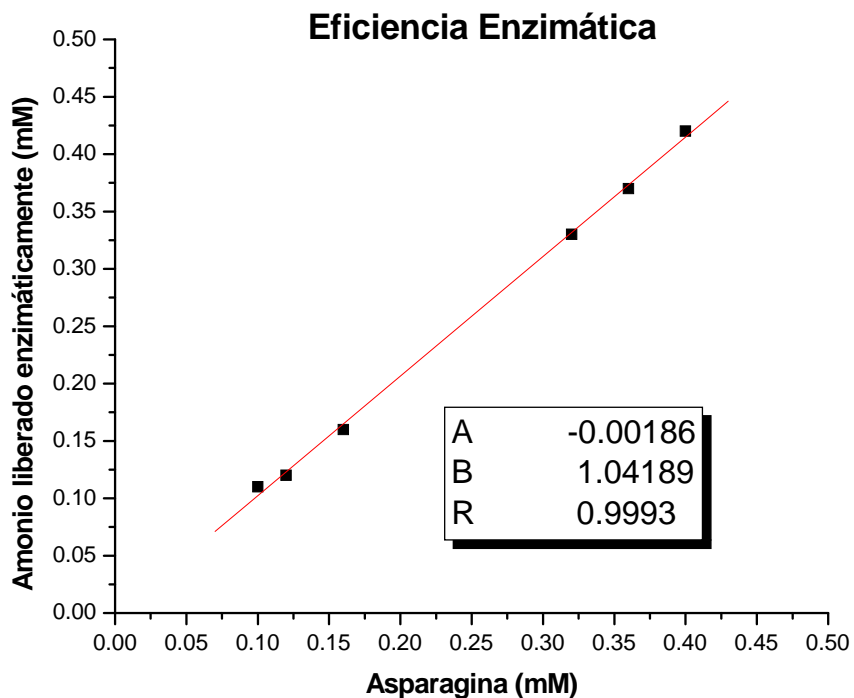


Figura 4. 5 Representación de la Eficiencia enzimática, con los valores de concentración de amonio liberado (producto) contra unidades de concentración de los estándares de asparagina (sustrato), donde la pendiente de la curva representa la eficiencia del RE utilizado.

4.3 Intervalo Lineal

Para la determinación del intervalo lineal, se prepararon e inyectaron por triplicado una serie de estándares de asparagina que abarcan un intervalo amplio de concentraciones de 132 a 11 ppm, obteniéndose el diagrama siguiente (Figura 4.6):

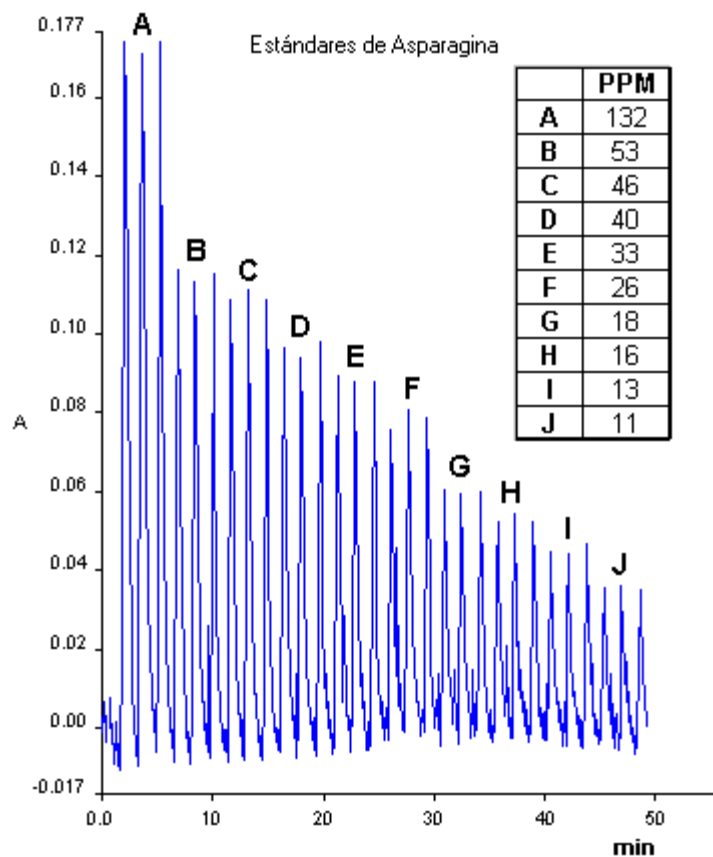


Figura 4. 6 Inyección de estándares de asparagina para la determinación del intervalo lineal del RE utilizado.

Con los datos de absorbancia promedio, se construye la curva correspondiente para establecer la tendencia de los resultados (Figura 4.7) y visualizar cuales puntos corresponden al intervalo lineal del RE.

En la figura 4.7, se observa que el intervalo lineal del método va de 46 a 13 ppm. A concentraciones mayores se observa la saturación de la enzima. Claramente la reacción sigue el modelo de Michaelis-Menten.

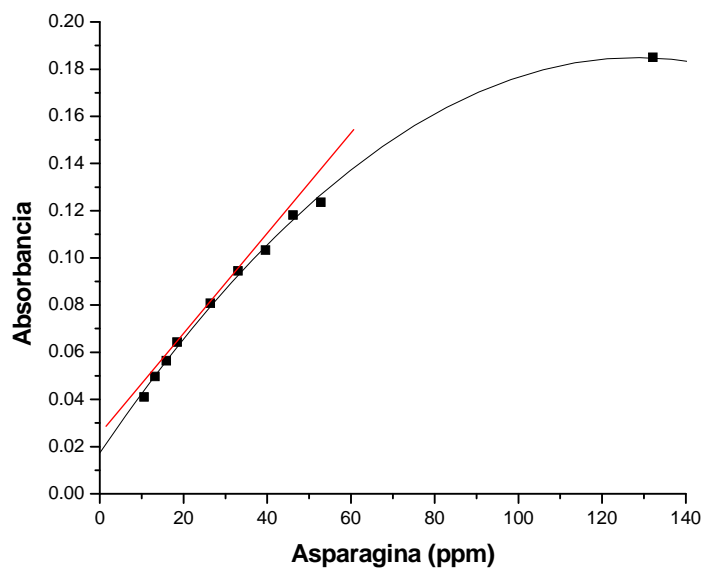


Figura 4. 7 Curva demostrativa del tipo de respuesta generada al inyectar diferentes concentraciones de asparagina, donde se observa que la enzima tiene un intervalo lineal seguido de una etapa de saturación debida a la elevada concentración del estándar inyectado.

Cabe aclarar que en las determinaciones realizadas por FIA siempre se inyectan los estándares de la curva de calibración y las muestras, obteniéndose una curva de calibración para cada lote de muestras analizado. Las pequeñas diferencias obtenidas en cada curva de calibración son debidas a las condiciones hidrodinámicas del sistema.

Como ejemplo representativo se puede considerar el fiagrama de la Figura 4.8 y su respectiva gráfica (Figura 4.9). Donde se realizaron inyecciones por triplicado de 6 estándares, que cubren un intervalo de 46 a 13 ppm de asparagina y se obtiene que todos los datos tienen un comportamiento lineal, con una valor de R de 0.999.

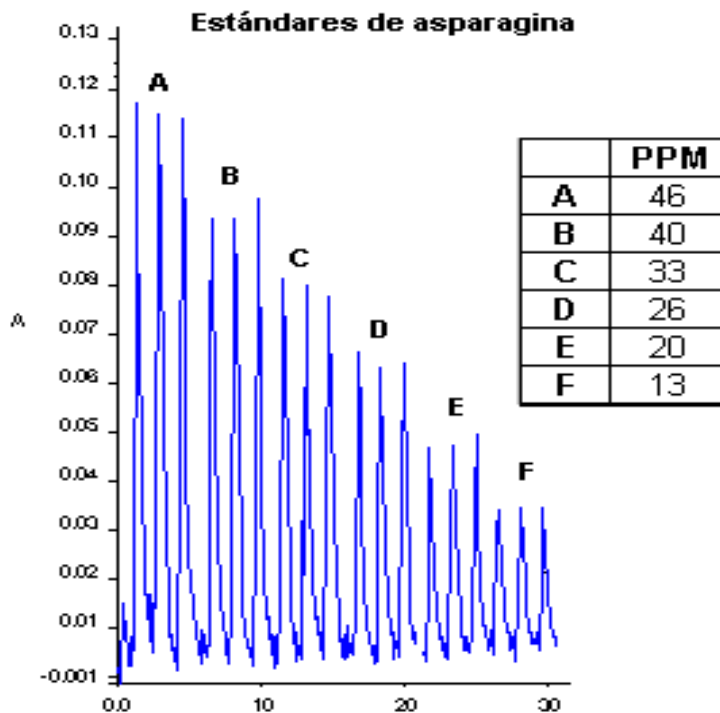


Figura 4. 8 Señales obtenidas al inyectar por triplicado seis disoluciones estándar de asparagina, empezando con la de mayor concentración . Intervalo de 46 a 13 ppm.

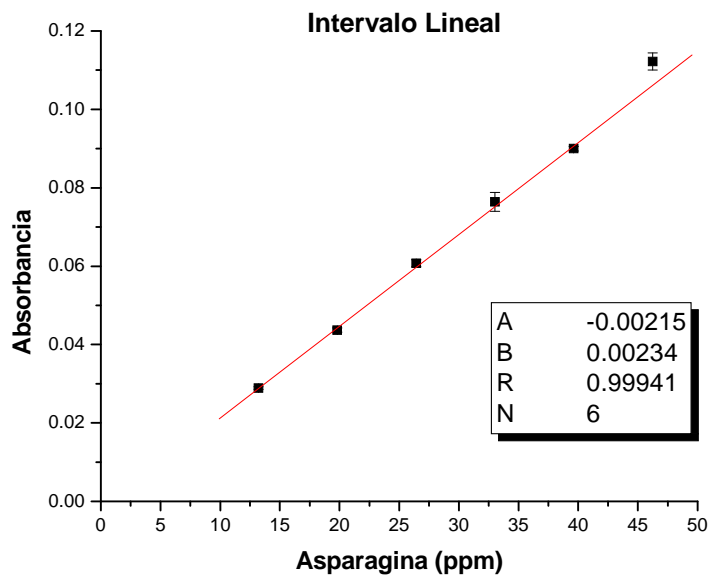


Figura 4. 9 Curva generada al graficar los valores promedio (3 inyecciones) en unidades de absorbancia, de cada estándar inyectado. Intervalo lineal de 46 a 13 ppm de asparagina

4.4 Límite de Detección y cuantificación del método

Se prepararon una serie de disoluciones estándar de asparagina que abarca un intervalo de 53 a 5 ppm. Posteriormente se inyectó por triplicado cada estándar de asparagina preparado, de mayor a menor concentración, generando el siguiente diagrama (Figura 4.10):

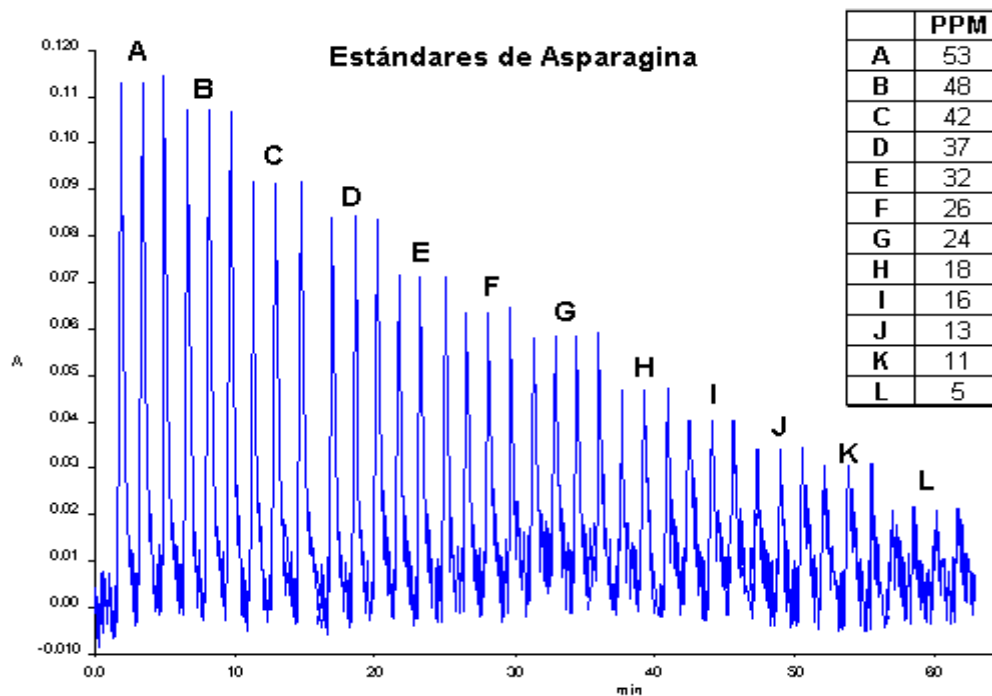


Figura 4. 10 Inyección por triplicado de estándares de asparagina, de 53 a 5 ppm para la determinación de límite de detección y cuantificación de *asparagina*, utilizando la configuración FIA propuesta.

Con los valores promedio en unidades de absorbancia se obtuvo la respectiva curva (Figura 4.11), que representa a todas las disoluciones estándar inyectadas, cuyo comportamiento es lineal a lo largo de todo el intervalo analizado (53 a 5 ppm), con un factor de correlación $R=0.99899$

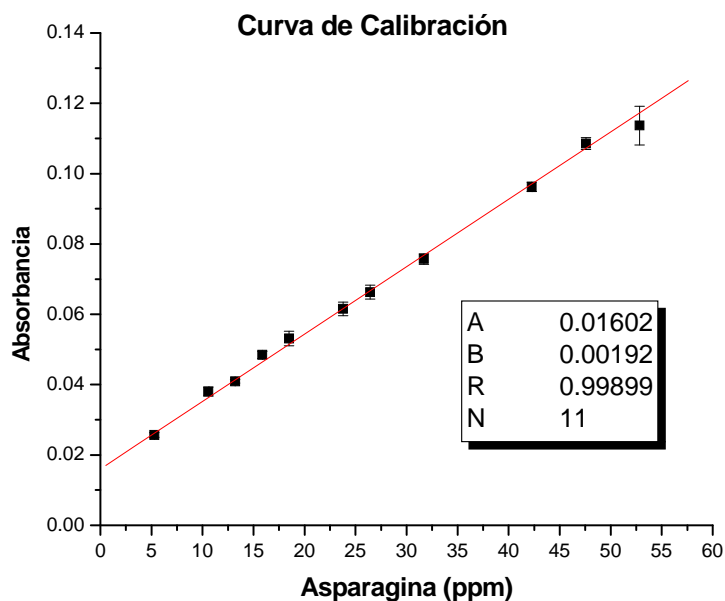


Figura 4. 11 Curva de calibración de asparagina de amplio intervalo (53 a 5 ppm), para la obtención del LD y LC del RE utilizado.

El análisis de los datos se realizó como se describe en la sección 3.6, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 4.2, donde el intervalo de 24 a 11 ppm tiene un coeficiente de correlación R, significativamente diferente al anterior, por lo tanto es el intervalo de 26 a 13 ppm, el usado para la determinación del LD y LC (Tabla 4.3)

Tabla 4. 2 Parámetros de regresión lineal, calculados para cada cinco puntos de la curva de calibración.

Parámetros de regresión lineal			
INTERVALO (ppm)	A	B	R
53 a 26	0.014	0.0020	0.9981
48 a 24	0.014	0.0020	0.9989
42 a 18	0.018	0.0018	0.9993
32 a 16	0.021	0.0017	0.9998
26 a 13	0.015	0.0020	0.9915
24 a 11	0.016	0.0020	0.9821
18 a 5	0.015	0.0020	0.9947

Tabla 4. 3 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) de asparagina, utilizando el reactor enzimático con asparaginasa inmovilizada en CPG y la configuración FIA establecida.

Asparagina	ppm
L.D.	7
L.C.	13

Cabe mencionar que el contenido de asparagina en papas es muy alto, por lo que no se espera que en las disoluciones de los extractos se tengan concentraciones tan bajas.

4.5 Robustez del método

Se procedió a evaluar la robustez del método como se describe en la sección 3.7. Para las dos variables estudiadas (longitud de onda de detección y flujo) se construyeron las respectivas curvas de calibración.

Para demostrar la robustez del método se calculó la concentración de una disolución a partir de un valor de absorbancia obtenido y su correspondiente curva de calibración. Se calculó la concentración obtenida a partir de los valores de absorbancia y la correspondiente curva de calibración de una disolución de 33 ppm (para variación de la longitud de onda) y de 26 ppm (para variación de flujo), con los respectivos valores de desviación estándar e intervalo de confianza. Posteriormente se procedió a realizar una comparación de medias, entre el valor obtenido en las condiciones normales de operación y los correspondientes a cada diferente condición realizada.

4.5.1 Cambio en la longitud de onda

En las figuras 4.12, 4.13 y 4.14, se muestran las respuestas obtenidas al inyectar disoluciones estándar de asparagina y realizando la detección a 630nm, 620nm y 610nm respectivamente.

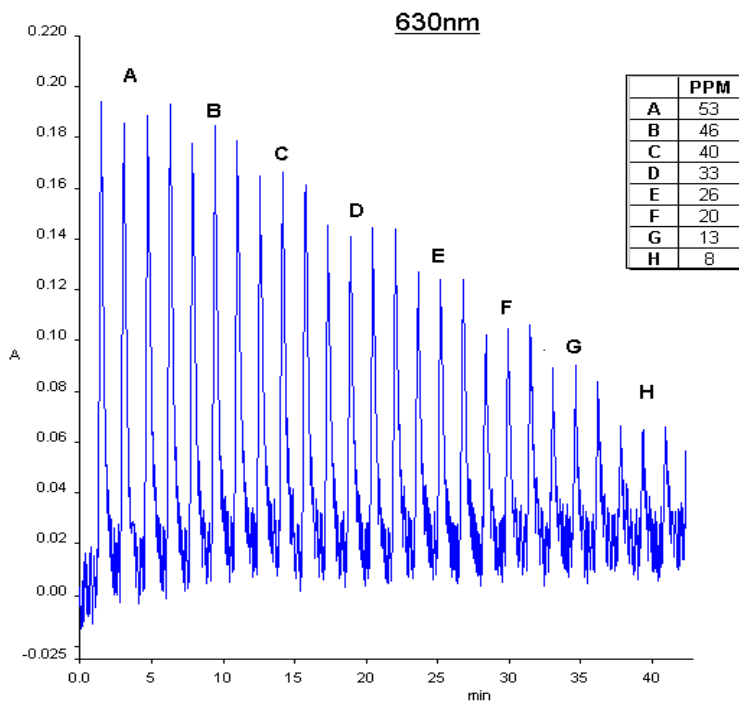


Figura 4. 12 Fiagrama obtenido a 630nm.

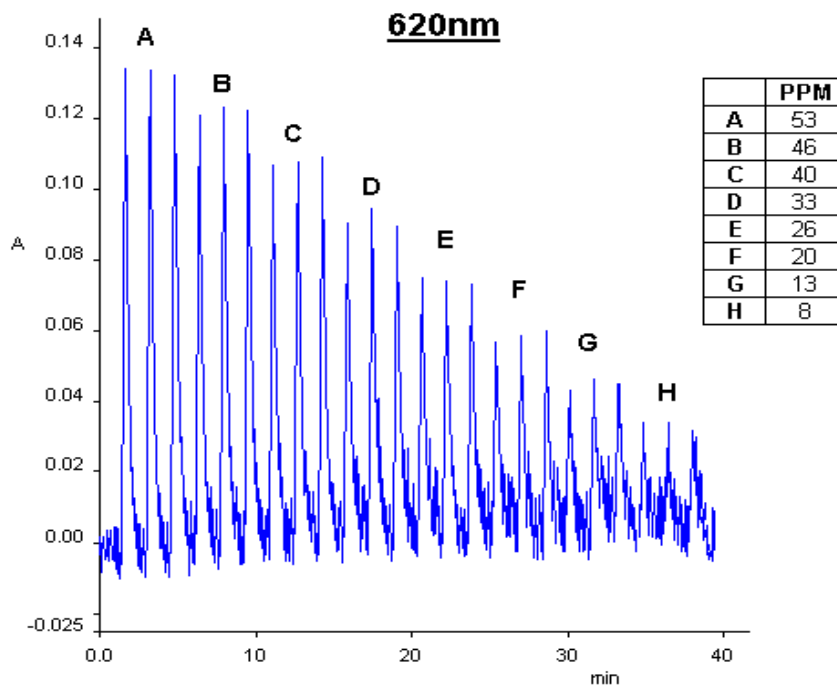


Figura 4. 13 Fiagrama obtenido a 620nm.

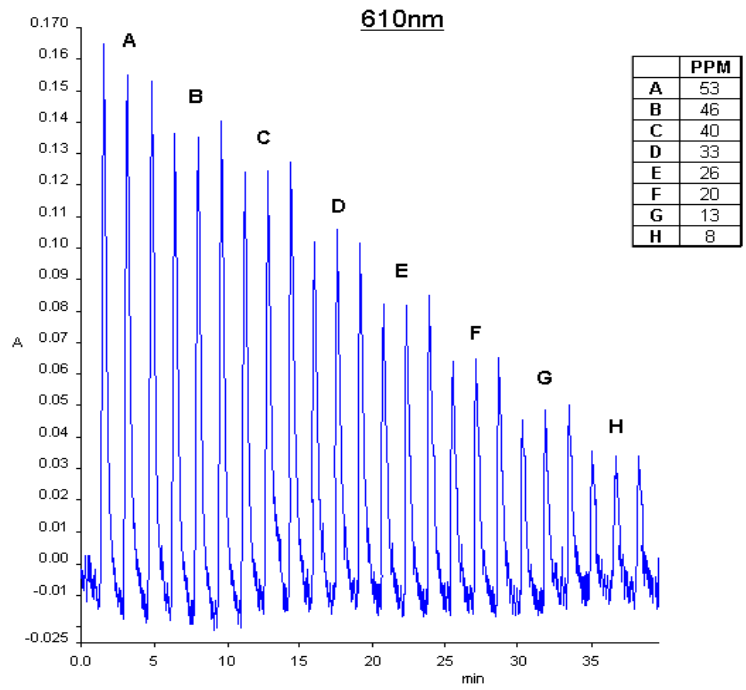


Figura 4. 14 Diagrama obtenido a 610nm en el espectrofotómetro UV-vis

En la figura 4.15 se muestran las correspondientes curvas de calibración y en la tabla 4.4, se resumen los resultados obtenidos.

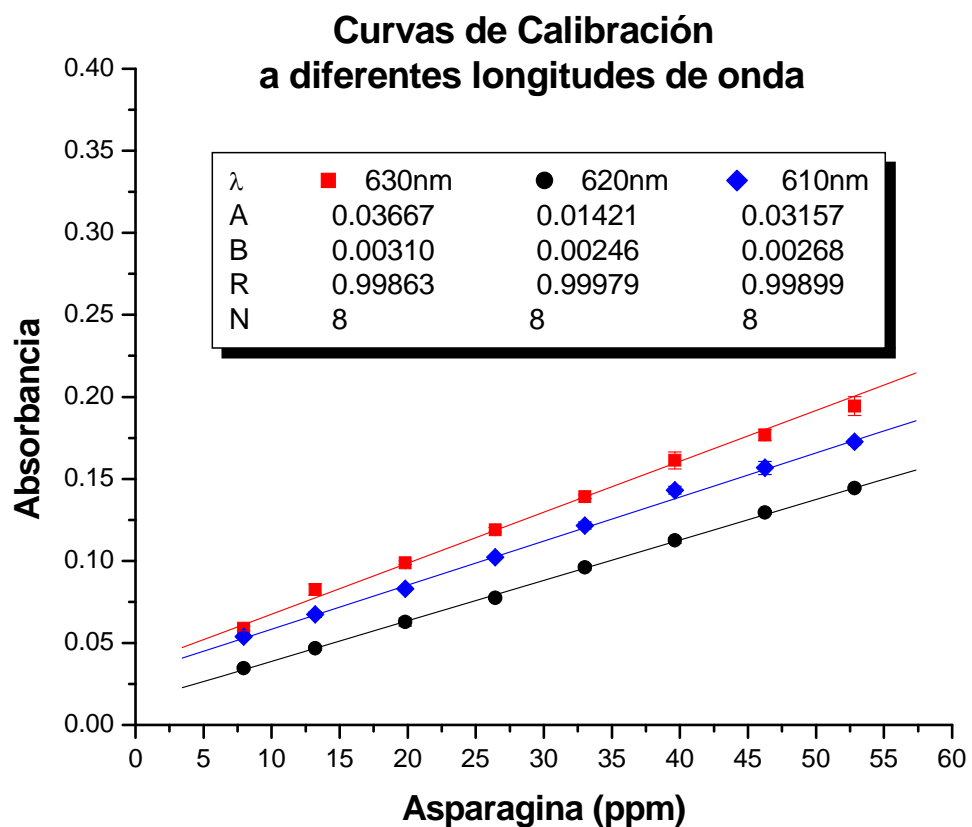


Figura 4. 15 Comparación de las curvas obtenidas, para cada longitud de onda

Tabla 4. 4 Comparación de los parámetros de regresión lineal, de las variaciones de longitud de onda (λ) propuestas: 630, 620 y 610 nm.

Longitud de onda (λ)	Ordenada (A)	Pendiente (B)	Factor de Correlación (R)
630nm	0.037	0.0031	0.99863
620nm	0.014	0.0025	0.99979
610nm	0.032	0.0027	0.99899

A 630nm se obtuvo la pendiente más grande, debido a que ésta es la longitud de máxima absorción (ver figura 4.1).

En la tabla 4.5 se muestran los resultados de concentración calculados para una disolución de 33 ppm y su respectivo intervalo de confianza, para cada longitud de onda de detección.

Tabla 4. 5 Resultados de robustez del método, variación de la longitud de onda.

Longitud de onda (nm)	Concentración de la disolución (ppm)	Absorbancia Experimental*	Concentración calculada* (ppm)	Intervalo de Confianza (p=0.05)
630	33	0.139	33.04	0.69
620**		0.096	33.29	0.33
610		0.122	33.59	0.68

*Valores promedio; **Condición normal de operación

Con estos valores se realizó la comparación de medias entre la condición normal de operación (620nm) y las condiciones de operación diferentes (610nm y 630nm). La hipótesis nula (Ho) planteada dice: “El cambio de longitud de onda de 620 ± 10 nm, no afecta de forma significativa la cantidad de asparagina cuantificada en las muestras”.

Se calculó la t de student experimental como se describe en el anexo I. Si el valor absoluto de la $t_{calculada}$ es menor al valor de la t_{tablas} , entonces se acepta Ho.

Tabla 4. 6 Valores de concentración calculados para las tres longitudes de onda experimentales. Donde \bar{X}_1 , \bar{X}_2 y \bar{X}_3 es el valor promedio en unidades de concentración (ppm) de cada condición de operación; S_1 , S_2 y S_3 es la desviación estándar.

630nm		620nm		610nm	
Y medida	X calculada	Y medida	X calculada	Y medida	X calculada
0.1396	33.20	0.0958	33.17	0.1200	33.00
0.1377	32.59	0.0980	34.06	0.1240	34.49
0.1405	33.49	0.0945	32.64	0.1208	33.29
\bar{X}_1	33.09	\bar{X}_2	33.29	\bar{X}_3	3.59
S_1	0.46	S_2	0.72	S_3	0.79

La comparación de medias se hace por parejas, donde la varianza conjunta se calcula con base en la ecuación 26 (Anexo I) y cuyos resultados se resumen en la tabla 4.7:

Tabla 4. 7 Parámetros para la comparación de medias

Comparación de \bar{X}_1 y \bar{X}_2		Comparación de \bar{X}_2 y \bar{X}_3	
S ²	0.3646	S ²	0.4564
S	0.6038	S	0.6756
t calculada	-0.396	t calculada	-0.552
g.l.		4	
t tablas		2.776	
Se acepta Ho		Se acepta Ho	

Si $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ y $\bar{X}_2 = \bar{X}_3$, entonces $\bar{X}_1 = \bar{X}_3$, por lo tanto no hay diferencia significativa entre las tres longitudes de onda de detección del analito, por lo tanto el método es robusto.

4.5.2 Flujo de reactivos

Siendo el valor de flujo de operación 1.0mL/min, se varió a 1.2 y 0.8 mL/min, como se describe en la sección 3.7.2. Se inyectaron por triplicado los estándares de asparagina, que abarcan el intervalo de 34 a 16 ppm, obteniéndose los siguientes diagramas (Figura 4.16, 4.17, y 4.18):

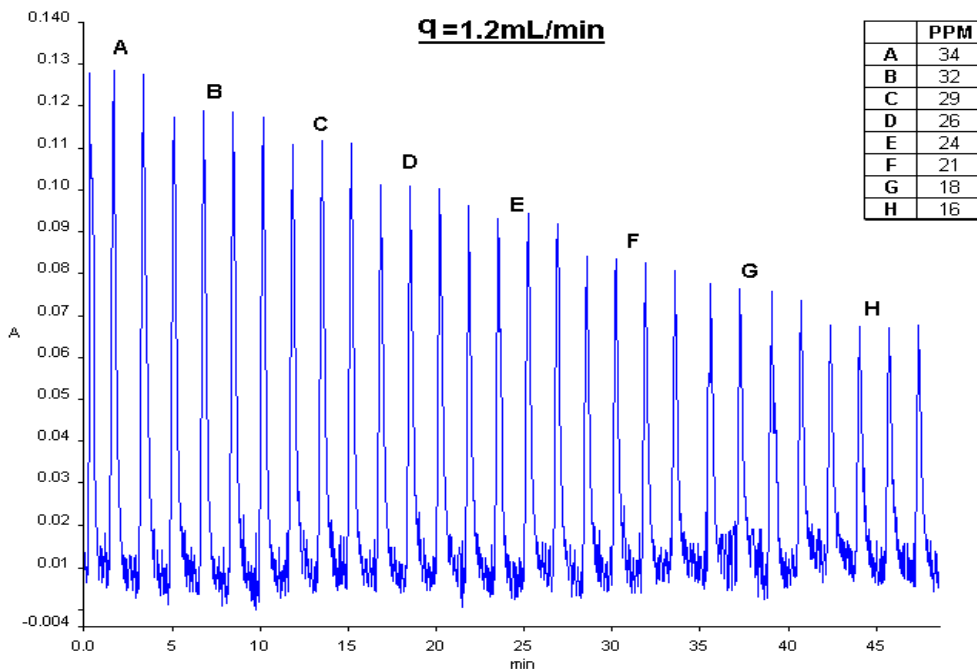


Figura 4. 16 Variación del flujo (q) a 1.2mL/min. Cubre el intervalo de 34 a 16 ppm

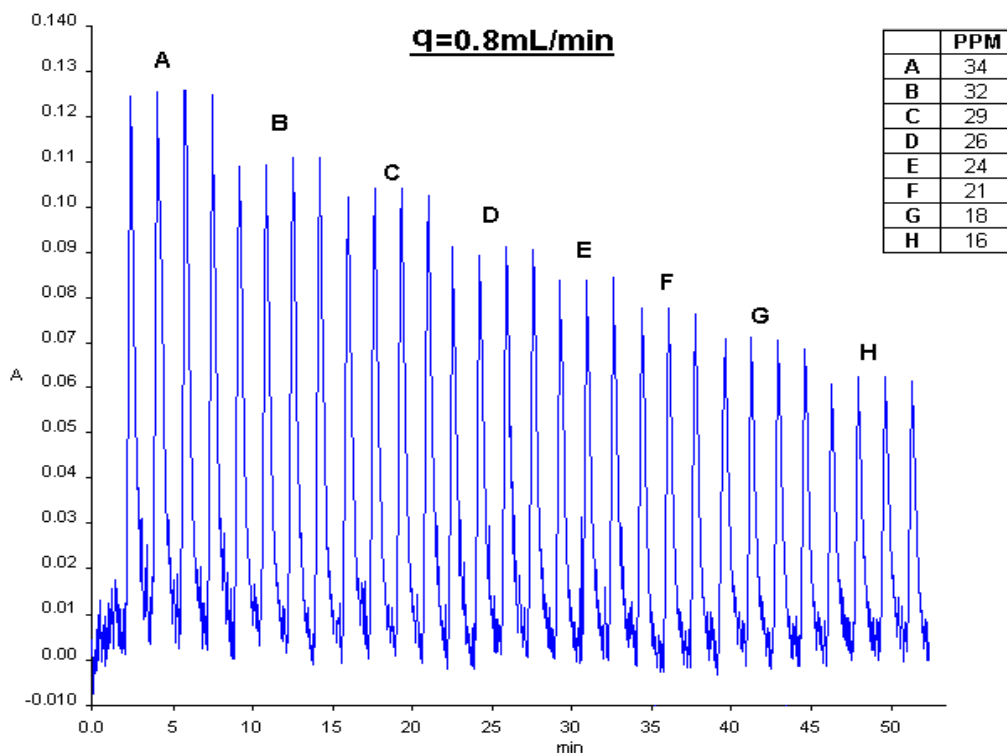


Figura 4. 17 Variación del flujo a 0.8mL/min. Cubre el intervalo de 34 a 16 ppm

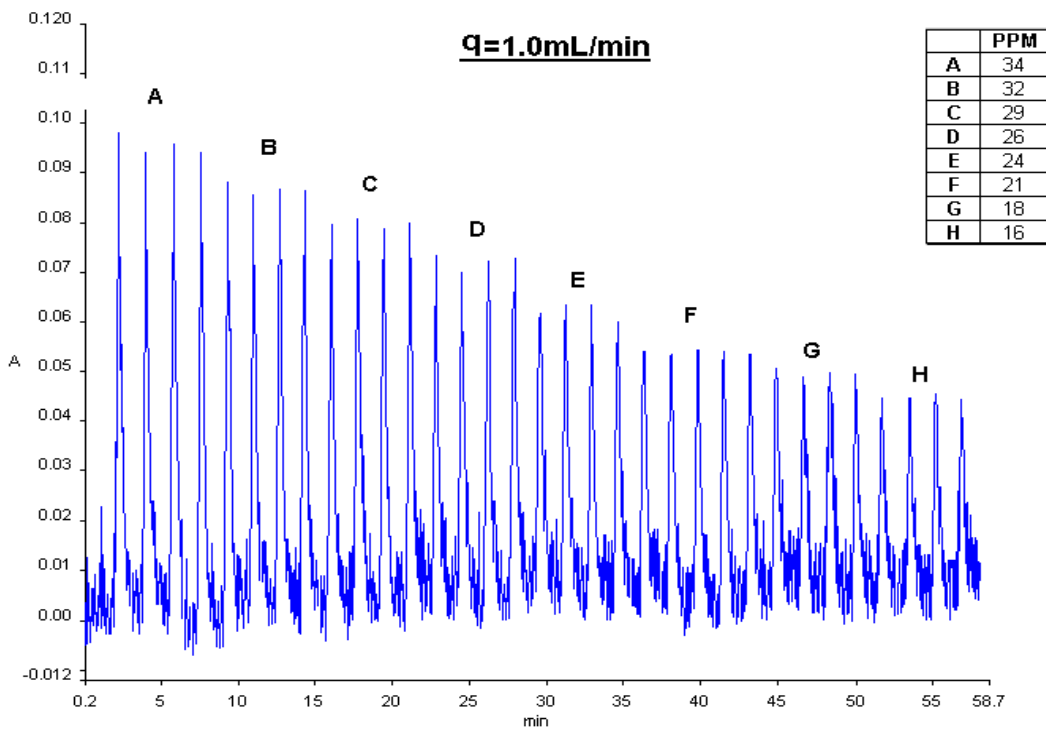


Figura 4. 18 Condición normal de operación 1.0mL/min. Cubre el intervalo de 34 a 16

ppm

En la figura 4.19 se muestran las correspondientes curvas de calibración y en la tabla 4.8, se resumen los resultados obtenidos.

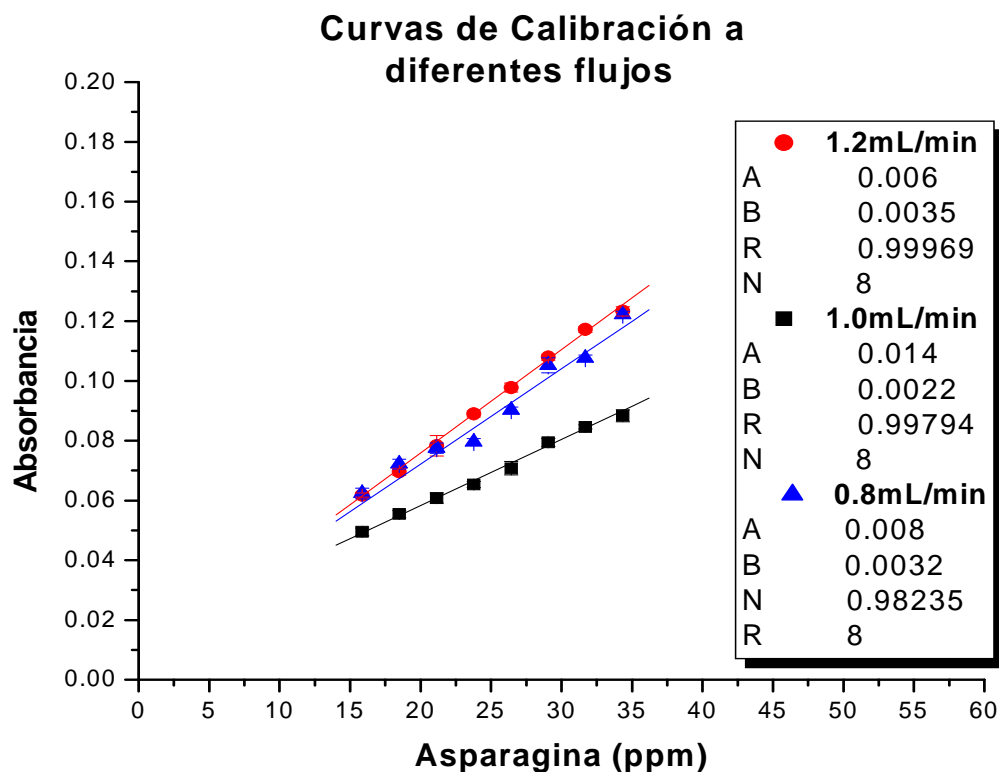


Figura 4. 19 Comparación de las curvas de regresión, obtenidas para cada flujo de reactivos analizado, en absorbancia contra concentración de asparagina. De 34 a 16 ppm

Tabla 4. 8 Comparación de los parámetros de regresión lineal obtenidos en cada modificación al flujo

Flujo (mL/min)	Ordenada (A)	Pendiente (B)	Factor de Correlación (R)
1.2	0.006	0.0035	0.99969
1.0	0.014	0.0022	0.99794
0.8	0.008	0.0032	0.98235

Resultados de la comparación de las medias muestrales a una concentración dada (26 ppm) y establecer si el método propuesto es robusto al variar el flujo.

En la tabla 4.9 se muestran los resultados de concentración calculada para una disolución de 26 ppm y su respectivo intervalo de confianza, para cada flujo de reactivos.

Tabla 4. 9 Resultados de robustez del método. Variación del flujo de reactivos.

Flujo (mL/min)	Concentración de la disolución (ppm)	Absorbancia Experimental*	Concentración calculada*	Intervalo de Confianza (p=0.05)
1.2	26	0.098	26.22	0.28
1.0**		0.071	25.88	0.33
0.8		0.090	25.64	0.76

*Valores promedio; **Condición normal de operación

Con estos valores se realizó la comparación de las medias entre la condición normal de operación (1.0mL/min) y las condiciones de operación diferentes (1.2 y 0.8mL/min). La hipótesis nula (Ho) planteada dice: “Las variaciones en el flujo de 1.0 ± 0.2mL/min, no afectan de manera significativa la cantidad de asparagina cuantificada en las muestras. Se calculó la t de student experimental como se describe en el anexo I. Si el valor absoluto de la $t_{calculada}$ es menor al valor de la t_{tablas} , entonces se acepta Ho.

Tabla 4. 10 Valores de concentración calculados para los tres flujos de reactivos

1.2mL/min		1.0mL/min		0.8mL/min	
Y medida	X calculada	Y medida	X calculada	Y medida	X calculada
0.09693	25.99	0.06975	25.24	0.08869	25.15
0.09680	25.95	0.06972	25.22	0.09120	25.94
0.09945	26.71	0.07407	27.19	0.09080	25.81
\bar{X}_1	26.22	\bar{X}_2	25.88	\bar{X}_3	25.64
S ₁	0.46	S ₂	1.13	S ₃	0.42

Tabla 4. 11 Parámetros para la comparación de medias.

Comparación de \bar{X}_1 y \bar{X}_2		Comparación de \bar{X}_2 y \bar{X}_3	
S ²	0.7336	S ²	0.7319
S	0.8565	S	0.8555
t calculada	0.476	t calculada	0.353
g.l.		4	
t tablas		2.776	
Se acepta Ho		Se acepta Ho	

Si $\bar{X}_1 = \bar{X}_2$ y $\bar{X}_2 = \bar{X}_3$, entonces $\bar{X}_1 = \bar{X}_3$, por lo tanto no hay diferencia significativa entre los tres flujos, por lo tanto el método es robusto.

Con el análisis efectuado, se dice que el método propuesto en la presente tesis es **ROBUSTO**, para las dos variables analizadas (longitud de onda y flujo), por lo tanto pequeñas variaciones en las condiciones establecidas como óptimas, no tienen repercusión en los resultados obtenidos.

4.6 Muestras

4.6.1 Características organolépticas de las papas

Tabla 4. 12 Características organolépticas de ambas variedades de papa, por periodo de análisis.

Proceso	Inicial		Optimizado	
	Alpha	Los Mochis	Alpha	Los Mochis
Variedad	Alpha	Los Mochis	Alpha	Los Mochis
Forma	oblonga	alargada-oblonga	oblonga	alargada-oblonga
Color	amarillo claro	ligeramente café	amarillo claro	ligeramente café
textura de la piel	lisa	rugosa	lisa	rugosa
Ojos	Superficiales y uniformemente distribuidos			
Firmeza	Todas estaban firmes, pero las papas alpha son mas suaves al corte			
Daños	No presentaban daños físicos, enverdecimientos, enmohecimientos, yemas o brotes por germinación.			

4.6.2 Separación por centrifugación

Se prepararon muestras de papa “alpha” y “Los Mochis” como se describe en la sección 3.8.2, con el objeto de verificar si existe algún cambio en la cantidad de asparagina en la papa en función del tiempo transcurrido, después de haber sido peladas y cortadas se pesaron muestras para ser procesadas y analizadas cada hora durante 6 horas y su análisis posterior a las 24 horas. Para este análisis el extracto de tejido de papa se centrifugó, siguiendo el procedimiento de la sección 3.8.2.1

Se prepararon disoluciones estándar de asparagina en un intervalo de 39.63 a 7.93 ppm y se inyectaron, obteniéndose el diagrama correspondiente (Figura 4.20). Las

inyecciones de las muestras se alternaron con inyecciones de estándares (E), para verificar que no hubiese variación en un intervalo grande de tiempo de análisis.

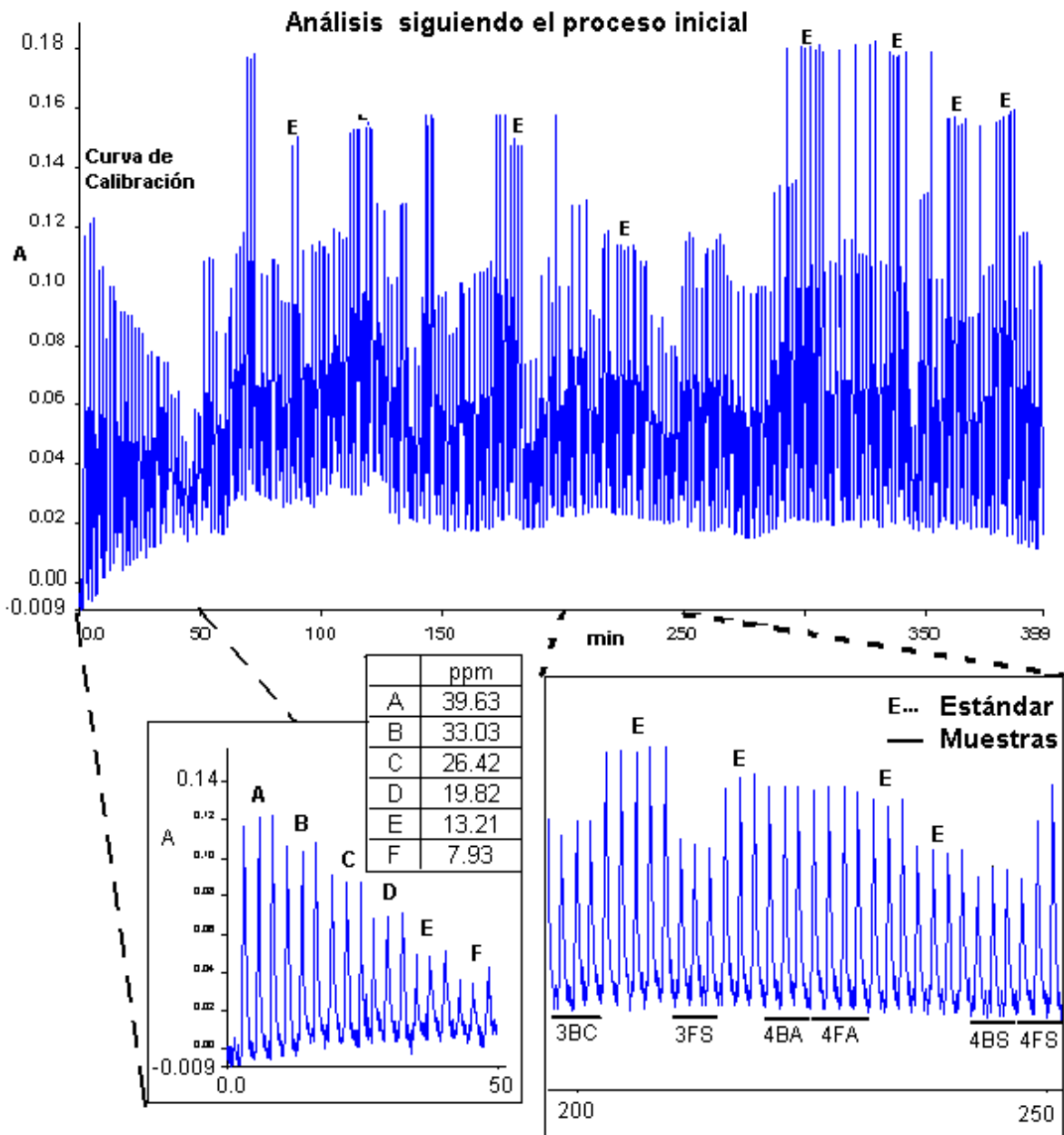


Figura 4. 20 Corrida correspondiente al análisis de las muestras e inyección de los estándares de asparagina. Detalle del fiagrama, por muestra inyectada en anexo II, sección 4.1.

A las 24 horas se realizó un nuevo análisis, inyectando nuevamente los estándares de la curva de calibración, correspondiente a este análisis. (ver fiagrama en anexo II, sección 4.1)

4.6.2.1 Asparagina cuantificada en las papas de la variedad Alpha y Los Mochis.

• **Asparagina en tejido**

Se calculó el contenido de asparagina en el tejido de papa como se describió es la sección 3.8.7.1. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 4.13.

Tabla 4. 13 Contenido de asparagina en tejido de papa para las dos variedades utilizadas. NA= No analizado.

Tiempo (h)	Papa “Alpha”		Papa “Los Mochis”	
	Sin agua	Con agua	Sin agua	Con agua
	mg asparagina/kg papa			
0	2255.45		2625.82	
1	2022.82	1853.00	2303.13	2868.43
2	2552.13	1932.23	2490.85	2023.28
3	2245.89	1777.36	2124.86	2278.01
4	2053.17	2307.27	2529.46	2402.78
5	2517.11	2338.83	2380.73	2228.73
6	1993.93	2315.00	2250.45	2437.83
24	1447.01	NA	1022.17	2081.54

La figura 4.21, representa las variaciones del contenido del aminoácido respecto al tiempo, para las cuatro diferentes muestras de papa blanca alpha con agua y sin agua, y los Mochis con y sin agua, en donde se puede observar que: El contenido de asparagina en tejido, se mantiene constante durante las primeras 6h de análisis, para las dos variedades de papas expuestas al aire (sin agua) como sumergidas en agua (con agua).

A las 24h, el contenido de asparagina en las muestras expuestas al aire disminuye. Cabe mencionar que para las dos variedades de papa estudiadas, las muestras expuestas al aire ya se veían negras en la superficie y deshidratadas.

El contenido de asparagina en las papa "Los Mochis", que se mantuvo en agua, permaneció dentro del intervalo de concentración de las otras 6h.

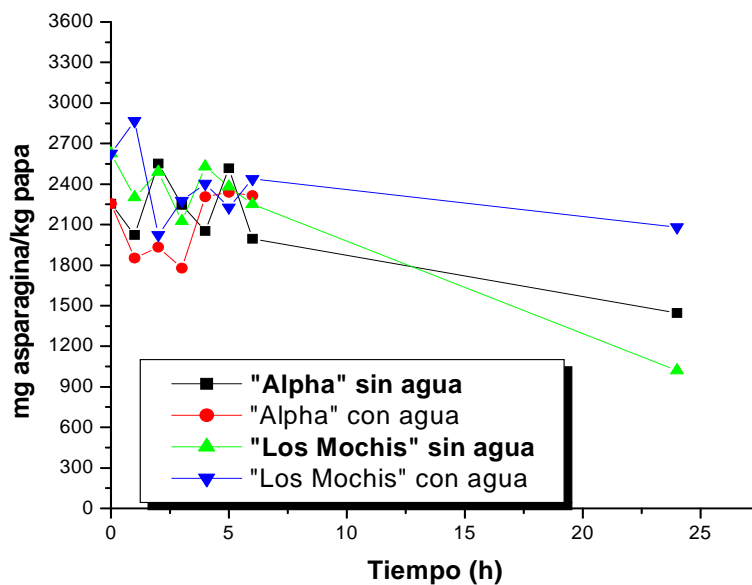


Figura 4. 21 Contenido de asparagina en tejido. Análisis de 24h, para papas Alpha y Los Mochis.

En la figura 4.22 se muestran los resultados de las primeras 6h de estudio, en donde se aprecia con mayor claridad que el contenido de asparagina en tejido se mantiene constante en un intervalo de $\bar{x} \pm 3s$

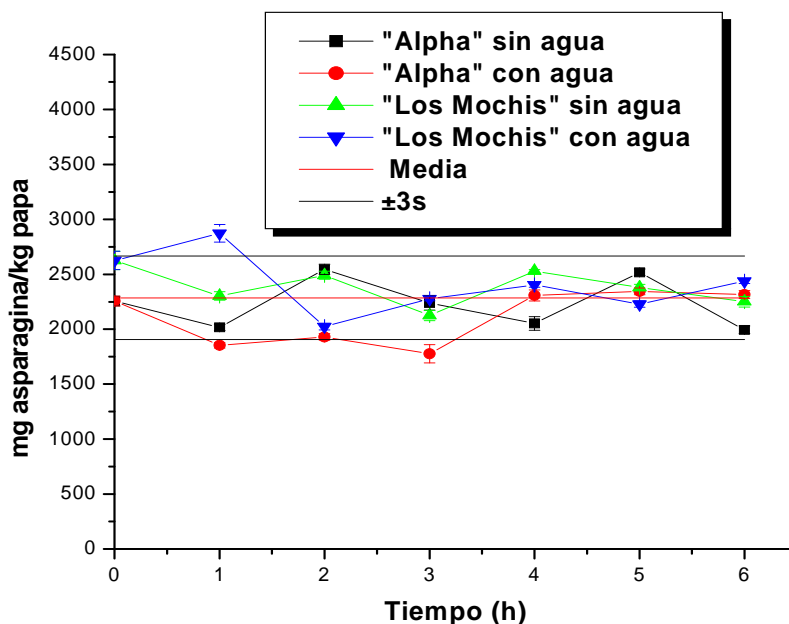


Figura 4. 22 Contenido de asparagina en tejido. Resultados de las primeras 6h de estudio.

- **Asparagina Superficial**

Como se discutió en la sección 3.8.7.2, el contenido de asparagina en la superficie de la papa cortada, se calculó a partir de la determinación de asparagina en el agua con la que se cubren los cubos de papa. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 4.14 y representados en la figura 4.23. Se puede observar que, al igual que en el tejido, el contenido de asparagina en la superficie de la papa se mantiene constante en un intervalo de $\bar{x} \pm 3s$ durante las primeras 6 horas (ver figura 4.24)

A las 24 horas de estar sumergida la papa en agua, se observa un aumento considerable de la concentración de asparagina en la disolución, debido a que los cubos de papa han absorbido una gran cantidad de agua, de tal forma que alguna de ellas ya se hincharon y abrieron (presentando pérdida de firmeza y adquiriendo una consistencia muy suave). El área superficial de la papa en estas condiciones ya no es 60cm^2 , por lo que los valores de contenido de asparagina a las 24 horas, deben tomarse con las debidas reservas. Cabe aclarar que las papas con dichas características, ya no son útiles para la producción de papas fritas.

Tabla 4. 14 Resultados obtenidos para el agua que cubría a las papas blancas “Alpha” y para freír “Los Mochis”, expresados como cantidad de asparagina por unidad de área.

Tiempo (h)	Papa “Alpha”	Papa “Los Mochis”
	mg asparagina/cm ² papa	
1	0.044	0.072
2	0.053	0.070
3	0.056	0.074
4	0.058	0.077
5	0.073	0.072
6	0.072	0.096
24	0.158	0.192

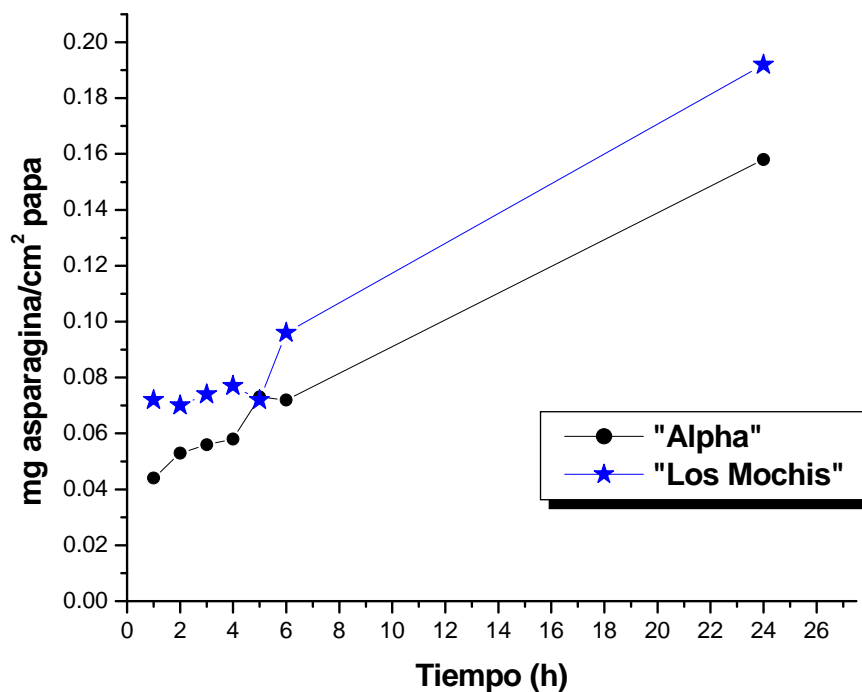


Figura 4. 23 Contenido de asparagina superficial de la papa. Estudio de 24 horas.

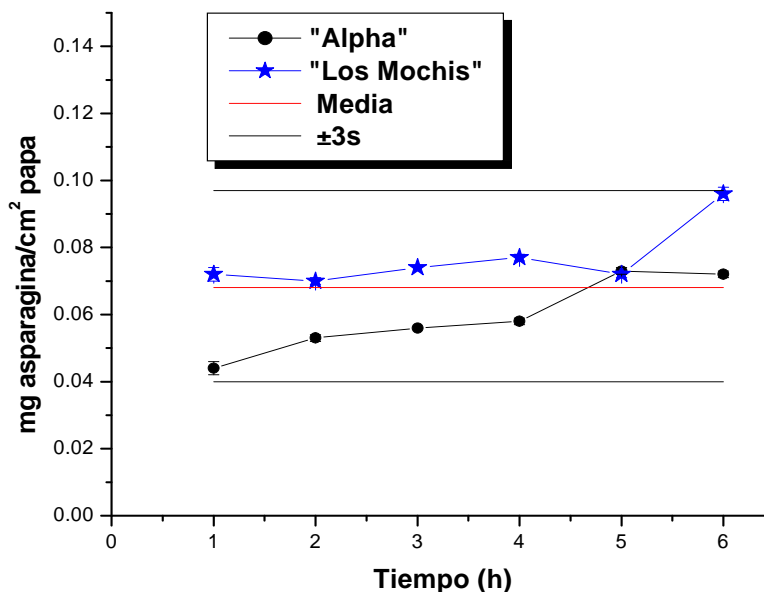


Figura 4. 24 Contenido de asparagina en la superficie de la papa. Resultados de las primeras 6 horas de estudio. Nótese que todos los puntos quedan dentro del intervalo $\pm 3s$.

4.6.3 Optimización del método, separación por filtrado

Como se discutió en la sección 3.8, la etapa más lenta y con mayor posibilidad de pérdida del extracto original es la etapa de centrifugación, por lo que se realizó nuevamente el estudio, filtrando el extracto de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 3.8.3, y aumentando el tiempo de estudio a 72 horas, es decir, el día en que se pelaron y cortaron las papas, se procesaron y analizaron las muestras cada hora (6 primeras horas de estudio) y posteriormente se procesaron y analizaron muestras los días siguientes (24, 48 y 72 horas)

El figura 4.25 muestras las inyecciones de las primeras seis horas del estudio. Cabe aclarar que, dado que el estudio duró 72h, se obtuvieron cuatro fiagramas, cada uno correspondiente a un día de análisis (Tabla 4.15).

Tabla 4. 15 Secuencia de fiagramas obtenidos durante el análisis, siguiendo el proceso optimizado de las muestras de papa.

Fiagrama	Análisis (horas)
1	0-6
2	24
3	48
4	72

En cada fiagrama se inyectaron tanto disoluciones estándar como muestras. Ver detalle en el anexo II, sección 4.2.

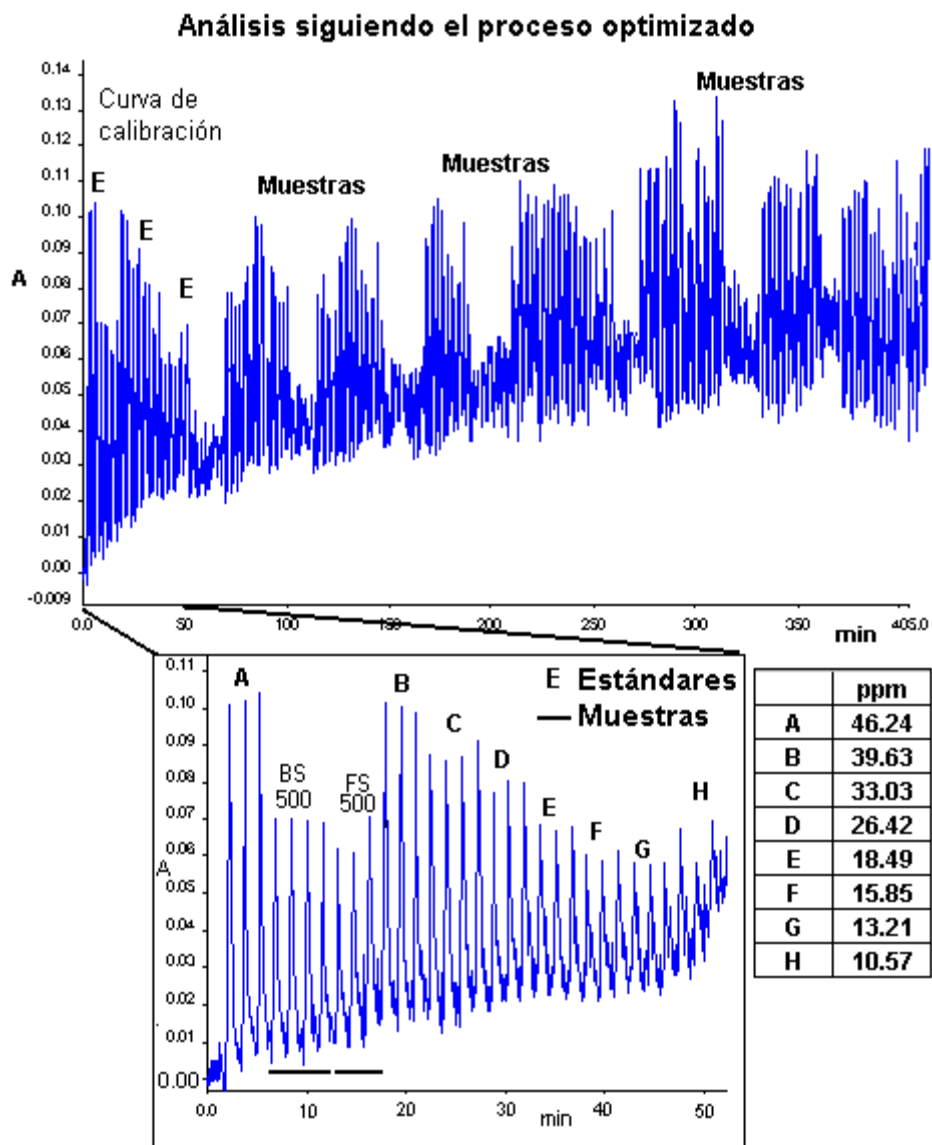


Figura 4. 25 Diagrama obtenido durante las primeras seis horas de análisis, donde se aprecia una gran inestabilidad de la línea base. El recuadro es la amplificación de los primeros 50 min de análisis, en el que se aprecia la inyección alternada de estándares y muestras. (detalle del diagrama en anexo II, sección 4.2)

4.6.3.1 Asparagina cuantificada en las papas de la variedad Alpha y Los Mochis.

- **Asparagina en tejido**

Se calculó el contenido de asparagina en el tejido de papa como se describió en la sección 3.8.7.1. Los resultados se encuentran resumidos en la tabla 4.16 y representado en la figura 4.26.

Tabla 4.16

Tabla 4. 16 Cantidad de asparagina de las dos variedades de papa, respecto al tiempo y “tipo de procesamiento”

Tiempo (h)	Papa “Alpha”		Papa “Los Mochis”	
	Sin agua	Con agua	Sin agua	Con agua
	mg asparagina /kg papa			
0	2421.71		1941.86	
1	1876.44	1835.69	2227.81	1761.62
2	1996.02	1169.10	2153.31	911.83
3	1883.61	1299.60	1396.86	960.78
4	2290.19	1911.02	1133.69	1603.90
5	1680.39	1543.13	1497.58	1494.53
6	1266.65	819.42	1109.29	1390.76
24	2197.45	1801.53	1299.94	1632.92
48	1354.00	1294.58	999.74	1240.12
72	1732.30	4217.33	1595.20	2514.02

En dicha gráfica se puede observar que a diferencia del estudio realizado centrifugando las muestras, en este estudio el contenido de asparagina en tejido se mantiene constante en un intervalo de $\bar{x} \pm 3s$ durante las 72 horas, para prácticamente todas las muestras, lo cual indica que hay menor pérdida de material filtrando los extractos, que en el proceso de decantación y filtración (metodología inicial).

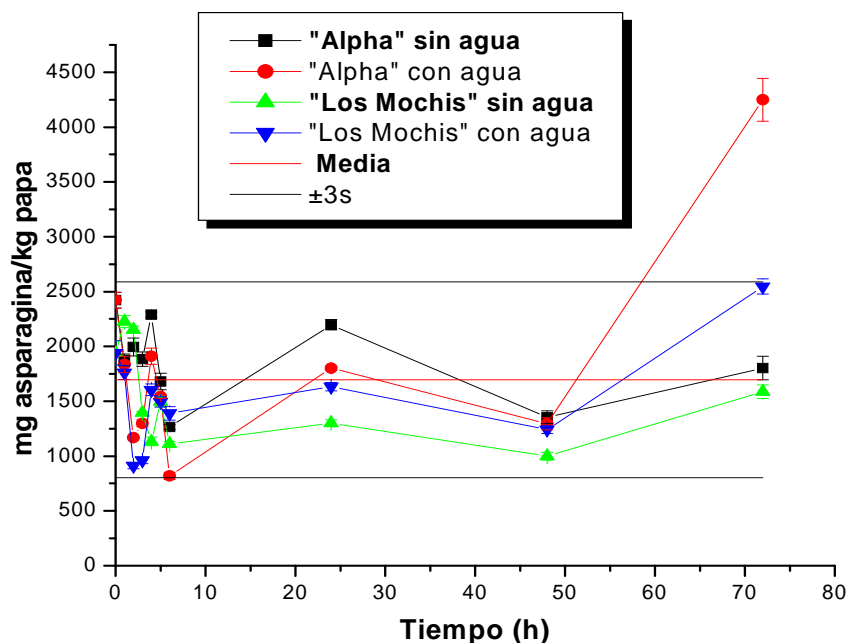


Figura 4. 26 Contenido de asparagina presente en el tejido. Estudio de 72 horas.

- **Asparagina superficial**

Los resultados obtenidos de asparagina en la superficie de las papas calculados de acuerdo a lo descrito en la sección 3.8.7.2 se encuentran resumidos en la tabla 4.17 y representados en las figuras 4.27 y 4.28.

Al igual que los resultados obtenidos en el estudio anterior, el contenido de asparagina en la superficie de la papa se mantienen constantes en un intervalo de $\bar{x} \pm 3s$ durante las primeras 6 horas del estudio, después de lo cual, el contenido aumenta de manera considerable. Sin embargo, las condiciones del tejido (cubos de papa) fueron disminuyendo conforme el tiempo de remojo, es decir la textura, olor, firmeza e incluso el color se vieron modificados, de tal forma que las papas remojadas más de 24 horas, no mantienen las características adecuadas para ser sometidas a un proceso de freído, aunque a mayor tiempo de remojo, mayor cantidad de asparagina se disuelve en el agua que las contiene.

Tabla 4. 17 Contenido de asparagina en la superficie de la papa.

Tiempo (h)	Papa "Alpha"	Papa "Los Mochis"
	mg asparagina/cm ² papa	
1	0.038	0.039
2	0.032	0.026
3	0.038	0.033
4	0.039	0.039
5	0.037	0.044
6	0.037	0.040
24	0.130	0.069
48	1.040	0.095
72	2.490	0.740

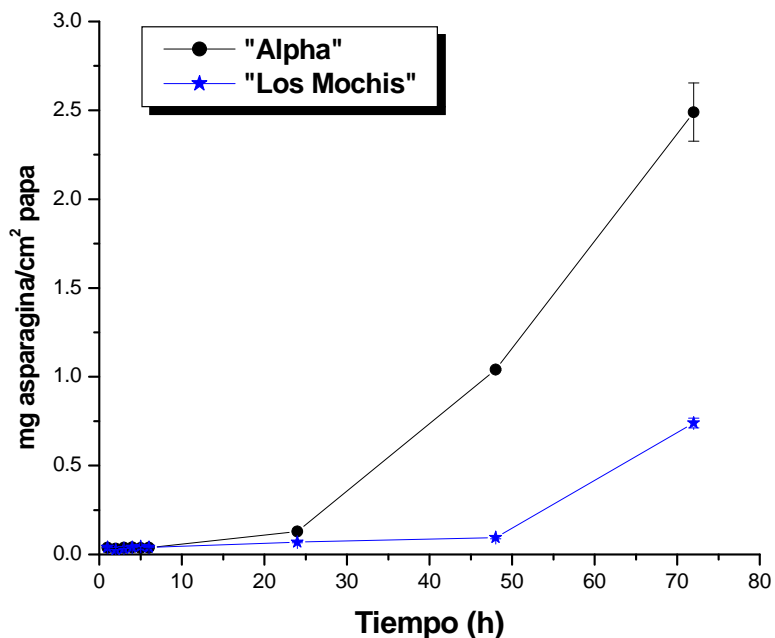


Figura 4. 27 Contenido de asparagina en la superficie de la papa. Estudio de 72 horas.

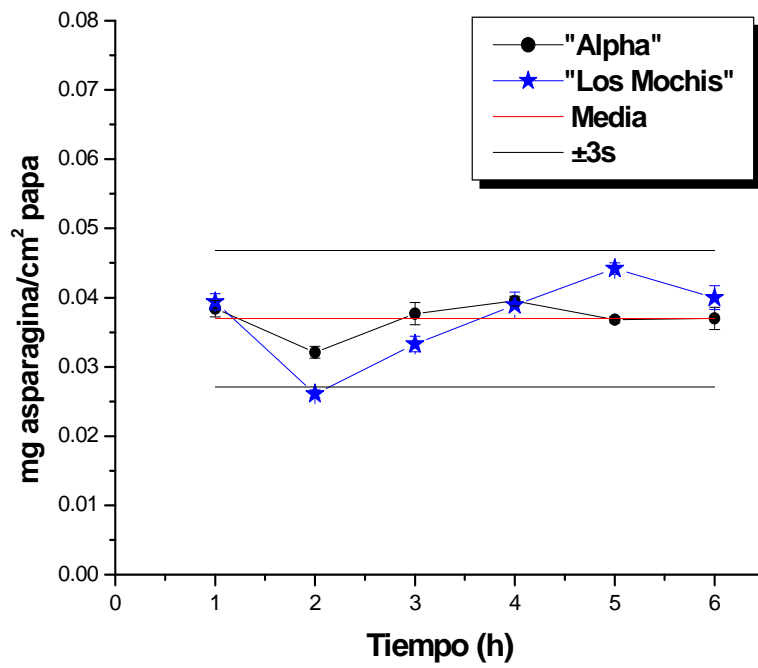


Figura 4. 28 Contenido de asparagina en la superficie de la papa. Resultados de las primeras 6 horas de estudio.

5 Conclusiones

- ❖ El método propuesto es rápido, preciso y selectivo para la determinación de asparagina en papas.
- ❖ El reactor de asparaginasa inmovilizado en vidrio de poro controlado (CPG), presentó una gran estabilidad térmica, mecánica y de uso.
- ❖ La eficiencia del reactor enzimático fue de $104.0 \pm 2.9\%$ lo que indica que el poder de conversión de la asparaginasa garantiza que todo el sustrato pase a producto, en las condiciones empleadas.
- ❖ El LD y LC confieren validez al método. El LD calculado es de 6 ppm y el límite de cuantificación (LC) es de 13 ppm.
- ❖ El método FIA-asparaginasa propuesto es robusto, en las variables de longitud de onda ($620 \pm 10\text{nm}$) y el flujo de los reactivos ($1.0 \pm 0.2\text{mL/min}$), por lo que pequeñas variaciones en las condiciones normales de operación, no tienen repercusiones significativas en la cantidad de asparagina cuantificada.
- ❖ El comportamiento en la cantidad de asparagina a lo largo del análisis es independiente de la variedad (Alpha y Los Mochis), ya que presenta las variaciones normales de un tejido vegetal.
- ❖ La cantidad de asparagina se encontró dentro del intervalo de 1900 a 2700 ppm utilizando el proceso inicial y de 1000 a 3000 ppm con el proceso optimizado. Estas diferencias se atribuyen a que durante el procesamiento de las muestras, siguiendo el proceso inicial, se tenían pérdidas de asparagina considerables.
- ❖ Al sumergir los cubos de papa en agua, se esperaba que los aminoácidos libres superficiales se disuelvan en ésta; sin embargo la concentración de asparagina no aumento de manera significativa.
- ❖ La permanencia de las papas en agua durante un tiempo mayor a las 24 horas, provoca la perdida de las características organolépticas, generando cambios en la textura y olor principalmente, ya que empieza el proceso de descomposición.
- ❖ El contenido de asparagina en tejido se mantiene prácticamente constante durante las primeras seis horas de estudio.
- ❖ En este mismo intervalo de tiempo (6 horas), las papas sumergidas en agua mantuvieron su apariencia, ya que el agua evita el oscurecimiento debido a la oxidación

5.1 Recomendaciones

Para establecer si efectivamente la cantidad de asparagina que pasa al agua durante el remojo es despreciable o es significativa, en cuando a los resultados generados sobre la formación final de acrilamida en el producto terminado, es necesario incluir un estudio donde se contemple el freído de las muestras bajo condiciones controladas, para recomendar un lavado o un remojo de las papas antes del freído, como medida preventiva, por ejemplo.

Y para tener un panorama global del comportamiento de las variables implicadas en la formación de acrilamida en los alimentos, llámese papas fritas o a la francesa específicamente, productos de gran demanda y consumo a nivel mundial, es necesario que se realicen otros y más extensos estudios respecto a los azúcares reductores, otros aminoácidos, temperaturas, otras variedades de papa, condiciones de pre-freído (es decir papa fresca, congelada natural, extruída, etc) etcétera.

6. Bibliografía

1. Tareke, E., Rydberg, P. et al. "Acrylamide: A Cooking Carcinogen?" *Chem Res. Toxicol.*, (13): 517-522, 2000.
2. Tareke, E. et al. "Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuff" *J. Agric. Food Chem.* (50): 4998-5006, 2002.
3. Amrein, T. M. et al. "Potential of acrylamide formation, sugar and free asparagine in potatoes: An comparison of cultivars and farming systems" *J. Agric. Food Chem.* 2003.
4. IPCS INCHEM www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim652.html
5. Mottram, D. et al. "Acrylamide is formed in the Maillard reaction" *Nature* (419): 448-449, 2002.
6. Rosen, J.D. "Acrylamide in food: is it a real threat to public health?" American Council on Science and Health. New York, 2002.
7. "Analytical methodology and survey result for acrylamide in food" by National Food Administration. NFA, April 26, 2002.
8. FDA-USA "Exploratory Data on Acrylamide in Food" Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2004. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html>
9. "High temperature cooking can increase the risk of cancer" Dec. 4, 2002. www.joyfulaging.com/HighTemperatureCancer.htm
10. "Acrylamide concentration in food" (A-5) March 2005, OEHHA. www.oehha.gov/prop65/acrylamideintakefdaappendix.pdf
11. Raloff, J. "Acrylamide—From Spuds to Gingerbread" *Science News*, Vol. 162, No. 24, Dec. 14, 2002. www.sciencenews.org/articles/20021214/food.asp
12. Pérez-Conesa D. "Non-protein nitrogen in infant cereals affected by industrial processing". *Food Chemistry* (90):513–521, 2005
13. Yaylayan, V.A., Wnorowki, A., and Pérez Locas, C. "Why asparagines need carbohydrates to generate acrylamide". *J. Agric. Food Chem.*(51): 1753-1757, 2003.
14. Zizak, D.V. et al. "Acrylamide formation mechanism in heated food" *J. Agric. Food Chem.* (51):4782-4787, 2003.
15. Meister, A. "Biochemistry of the amino acids". Academic Press. USA, 1957.
16. Standler, R. et al. "Acrylamide from Maillard reaction products". *Nature* (419)

- 2002.
17. Ruzicka, J. "Flow Injection Analysis" 2a Ed. Editorial John Wiley & Sons. Chemical Analysis (62), 1988.
 18. Johansson, G. et al. "Enzyme reactors in unsegmented flow injection analysis". Analytica Chimica Acta (145): 71-85, 1983.
 19. Kaplan, A and Lin-Narl, T. "Urea in serum, urease-Berthelot Method". Method Clinic Chem. (5), 1965.
 20. WHO. "Health Implications of Acrylamide in Food". Report of a Joint FAO/WHO Consultation, Geneva, 25-27 June 2002. ISBN: 02 4 156218 8. 2002. P.p 12. http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_full.pdf
 21. EUROPEAN COMMISSION "Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food " Scientific Committee on Food SCF/CS/CNTM/CONT/4 Final 3 July 2002.
 22. Granvogl, M. et al. "Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes- A minor but potent precursor in acrylamide formation". J. Agric. Food Chem. 52(15):4751-4757, 2004.
 23. "La papa"
<http://www.qro.itesm.mx/agronomia2/extensivos/CPapaIndicedecultivo.html#Papa>
 24. "Panorama Mundial de la papa"
<http://www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/Anpapa.html>
 25. Página de internet. www.cevipapa.org.co
 26. Salunkhe, D.K. et al. "Potato: Production, processing and products" CRC Press. USA, 1991.
 27. Pagina de internet:
<http://www.agrarias.uach.cl/webpapa/pag1.htmla>
 28. Hawthorn, John. "Fundamentos de ciencia de los alimentos". Ed. Acribia. España, 1983.
 29. Página de internet: www.cipotato.org
 30. Página de internet: www.FAOSTAT.org
 31. Santiago, M.J. y García, J.A "Situación actual de la agroindustria de la papa en México". Instituto de Socioeconomía, Estadística e Informática del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Cámpus Estado de México, Noviembre

- 2000.
32. "Siembra y cosecha de papa" estadística mensual en el ciclo primavera-verano y otoño-invierno. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
 33. Serrano, A. B. "Cuantificación de Glicoalcaloides en 12 variedades comerciales de papa mexicana (*Solanum tuberosum*) por HPLC" Tesis, F.Q. UNAM, 1999.
 34. Nelson, D.L, and Cox, M.M., "Lehninger Principles of Biochemistry" Third edition. USA, 2000.
 35. The Merck Index. 13th edition, Merck & Co., Inc. USA, 2001.
 36. Fennema, Owen R. "Química de los alimentos". Ed. Acribia. España, 1993.
 37. Wong, Dominic W.S. "Química de los Alimentos: mecanismos y teoría" Ed. Acribia. España, 1989.
 38. Badui, D. S. "Química de los Alimentos" 2^a ed. Editorial Alhambra. México, 1990. P.p. 72-84.
 39. Lee, S.W. et al. "Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*". *Analitica Chimica Acta* (480): 267-274, 2003.
 40. Marquez, G. and Añon, M.C. "influence of reducing sugar and amino acids in the color development of fried potatoes". *Journal of food science*. 51(1): 157-160, 1986.
 41. Brierley, E.R. et al. "Factors influencing the free amino acid content of potato (*Solanum tuberosum* L) Tubers during prolonged storage ". *J Sci Food Agric* (70):515-525, 1996
 42. Brierley, E. R. et al. "Aspects of amino acid metabolism in stored potato tuber" *Plant Science* (127): 17-24, 1997.
 43. Olsson, K. et al. "Tuber components affecting acrylamide formation and color in fried potato: variation by variety, year, storage temperature and storage time". *J. Sci. Food Agric.* (84):477-458, 2004.
 44. Pedreschi, F. "Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying". *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* (37):679-685, 2004
 45. Heens, D. et al. "Fully automated precolumn derivatization, on the line dialysis and HPLC analysis of amino acid in food, beverage and feedstuff". *J. Chromatogr. A.* (798):9-17, 1998.
 46. Sobolevsky, T.G. et al. "Simultaneous determination of fatty, dicarboxylic and amino acids based on derivatization with isobutyl chloroformate followed by gas

- chromatography—positive ion chemical ionization mass spectrometry”. J. Chromatogr. B. (800):101-107, 2004.
47. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. “Guía de Validación de Métodos Analíticos”
 48. Bergmeyer, Hans-Ulrich. “Methods of enzymatic analysis” Academic Press. Alemania, 1963. P.p. 381-383.
 49. Almendral, M.J., et al. “Spectrophotometric determination of L-asparagine by flow-injection analysis using L-asparaginasa immobilized on an epoxy resin” Analytica Chimica Acta (308):170-177, 1995.
 50. Hansen, E. H. “Flow-injection analysis: leaving its teen-years and maturing. A personal reminiscence of its conception and early development” Analytica Chimica Acta (308): 3-13, 1995.
 51. Valcarcel, M y Luque de Castro, M.D. “Flow Injection Analysis. Principles and Application”. John Wiley & Son. España, 1987
 52. Trevan, M.D. et al. “Biotecnología, principios biológicos”. Ed Acribia. España, 1990.
 53. Trevan, M.D. et al. “Immobilized Enzyme” An Introduction and Application in Biotechnology. John Wiley & Sons. USA, 1980.
 54. Arroyo, M. “Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones”. Ars Pharmaceutica, 39 (2):23-39, 1998.
 55. Carr and Bowers. “Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry “. Edited by Wiley Interscience Publication (56)
 56. ACS 487 “Biosensor and Chemical Sensor
 57. Muchandani, A. “Enzymes and microbial biosensor”. Humana Press, Inc. USA, 1998.
 58. Karube, I. And Susuki, M. “Microbiosensors for Food Analysis”. Chapter 2. American Chemical Society. USA, 1992.
 59. Valcarcel, M. & Luque de Castro, M.D. “Flow Injection Analysis (FIA) based on enzymes or antibodies”. GBF Monographs Vol 14, P.p. 255-265.
 60. Massoom, M., and Townshend, A. Analytica Chimica Acta (166): 111, 1984
 61. Hernández Garcíadiego, L. “Incorporación de biosensores a sistema de flujo continuo para determinaciones analíticas” Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Química Analítica), F.Q., UNAM, 2000.

62. Miller, J.C. and Miller, J.N. "Estadística para química analítica" 2ª ed. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. USA, 1993.
63. Zyzak, D. V.; et al. "Method for reducing acrylamide in foods, foods having reduced levels of acrylamide, and article of commerce" US Patent Appl 2004 0101607.
64. Food chemical Codex. 3th edition. National Academic Press. USA, 1981. P.p. 28. (Método químico para la determinación de asparagina, no incluido en los antecedentes)

1 Cálculos estadísticos

1.1 La media aritmética (\bar{x}),

En forma abreviada media, es la suma de todas las mediciones, dividida entre el número total de mediciones:

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \dots\dots\dots \text{ecuación 1}$$

1.2 Desviación estándar (s)

La medida más utilizada de la variabilidad es la desviación estándar (s), que esta definida por la fórmula siguiente:

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)} \dots\dots\dots \text{ecuación 2}$$

1.3 Coeficiente de variación (%CV)

También conocido como desviación estándar relativa, es un estimador del error dividido entre una estimación del valor absoluto de la cantidad medida y se calcula como:

$$\% CV = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) * 100 \dots\dots\dots \text{ecuación 3}$$

1.4 Altura del pico (x_i)

Es la dimensión utilizada en el presente trabajo para relacionarla con la respuesta del detector y por lo tanto con la concentración del analito.

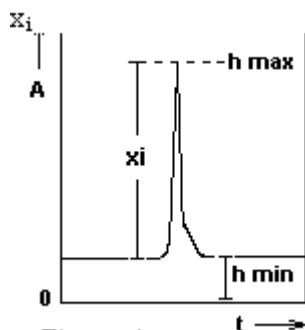


Figura 1

Siempre se toma en consideración los valores de altura máxima del pico (h max) y altura mínima (h min), que corresponde a la altura de la línea base, la cual no siempre se mantiene constante a lo largo de la corrida.

$$x_i = (h \text{ max} - h \text{ min}) \dots\dots\dots \text{ecuación 4}$$

2 Curva de Calibración

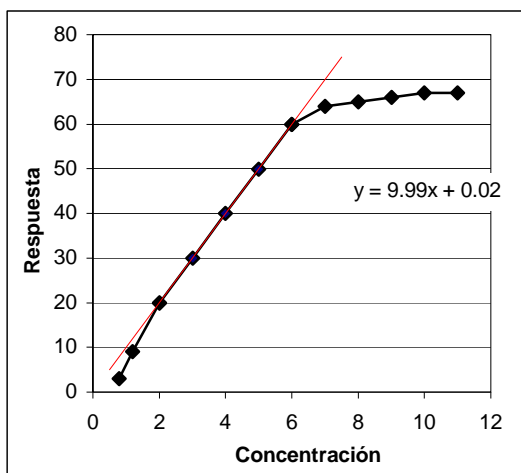


Figura 2. Curva de calibración

La mayoría de los métodos analíticos instrumentales se basan en la construcción de una curva de calibración, en la que una cantidad medida (y) se grafica en función de la concentración conocida (x) de una serie de estándares. Lo más habitual (y deseable) es que la grafica se aproxime a una línea recta, sin embargo, no todos los datos quedan exactamente sobre dicha línea, debido a los errores aleatorios del proceso de medida.

Para calcular la mejor línea recta debe buscarse la recta que minimice las desviaciones entre los puntos experimentales y la línea calculada. Ya que algunas de estas desviaciones (técnicamente conocidas como residuos de y) serán positivas y otra negativas, es razonable intentar minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, por lo que a este procedimiento se le conoce con el término de “método de mínimos cuadrados”. La línea recta buscada se calcula en base al siguiente principio: “La línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) ”. La ecuación de la línea recta se representa con la siguiente expresión algebraica:

$$y = Bx + A \dots\dots\dots \text{ecuación 5}$$

Donde

y= medida de la señal evaluada para el contenido X

x= contenido del analito en la disolución.

A= es la ordenada al origen o el intercepto sobre y, cuando x=0

B= es el declive (pendiente) de la regresión lineal (sensibilidad del método)

Estos parámetros (A y B) se calculan considerando puntos individuales de la forma $(x_1, y_1), (x_2, y_2) \dots (x_i, y_i) \dots (x_n, y_n)$, donde n es el número de puntos.

$$B = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \dots\dots\dots \text{ecuación 6}$$

$$A = \bar{y} - b\bar{x} \dots\dots\dots \text{ecuación 7}$$

Donde \bar{x} es la media de los valores de x; \bar{y} , la media de los valores y.

La pendiente y la ordenada al origen calculados tienen sus errores aleatorio respectivos. Para calcular dichos errores, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 8}$$

donde \hat{y}_i , son los valores de y, ajustados con la ecuación de regresión lineal calculada, para cada valor de x_i dado.

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (B), y sobre la ordenada (A), están dadas por:

$$S_B = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 9}$$

$$S_A = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 10}$$

Una vez calculada la curva de calibración experimental $y = A + Bx$ para estimar se calcula el coeficiente de correlación momento-producto (coeficiente de correlación, R), que esta dado por la siguiente expresión:

$$R = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \dots\dots\dots \text{ecuación 11}$$

2.1 Intervalo lineal

En las técnicas de análisis instrumental, se debe tener la capacidad de operar con un intervalo amplio de concentraciones del analito, en donde el comportamiento de los resultados al ser graficados sea lineal bajo las condiciones experimentales optimas.

2.2 Sensibilidad

La **sensibilidad de una técnica** se define correctamente como la pendiente de una línea de calibración y, siempre que la representación sea lineal, puede ser medida en cualquier punto de ella. Por el contrario, el límite de detección de un método se calcula con ayuda de la zona de la representación cercana al origen y utiliza tanto la pendiente como la ordenada al origen (62).

3 Eficiencia Enzimática

La eficiencia enzimática se define como la relación de concentración de sustrato que por acción de una enzima, se transforma a producto entre la concentración de sustrato.

$$\eta = \frac{[P]}{[S]} \dots\dots\dots \text{ecuación 12}$$

Considerando la ecuación 12 y la reacción enzimática utilizada (figura 3), se sabe que por cada mol de asparagina (sustrato), se obtiene una mol de amonio (producto), es decir la relación sustrato-producto es uno a uno

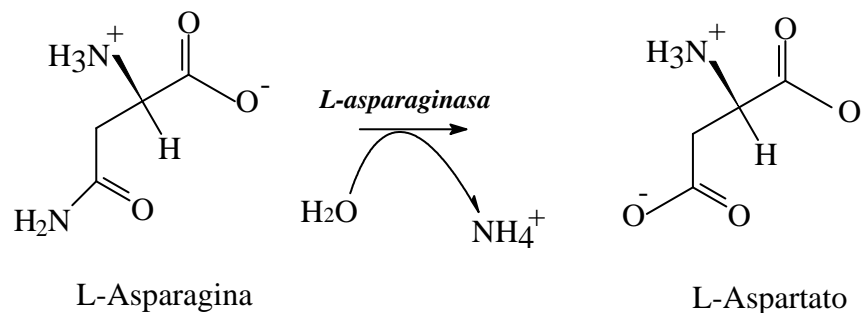


Figura 3. Reacción enzimática que se lleva a cabo por la acción de la asparaginasa sobre la asparagina.

La eficiencia η , puede ser evaluada de las siguientes formas:

3.1 Relación de pendientes

$$\eta = \frac{[P]}{[S]} = \frac{|NH_4^+|}{|Asn|} \dots\dots\dots \text{ecuación 13}$$

Sabemos que la concentración de asparagina y amonio están relacionadas con la pendiente de la curva de calibración correspondiente de la siguiente forma:

$$m_{NH_4^+} = \frac{\text{Absorbancia}}{|NH_4^+|} \dots\dots\dots \text{ecuación 14}$$

$$m_{Asn} = \frac{\text{Absorbancia}}{|Asn|} \dots\dots\dots \text{ecuación 15}$$

De las ecuaciones 14 y 15, la concentración de asparagina y amonio se despeja para obtener las ecuaciones 16 y 17.

$$|NH_4^+| = \frac{\text{Absorbancia}}{m_{NH_4^+}} \dots\dots\dots \text{ecuación 16}$$

$$|Asn| = \frac{\text{Absorbancia}}{m_{Asn}} \dots\dots\dots \text{ecuación 17}$$

Sustituyendo en la ecuación 13, se obtiene:

$$\eta = \frac{m_{Asn}}{m_{NH_4^+}} \dots\dots\dots \text{ecuación 18}$$

Por lo que la eficiencia puede calcularse por la relación de pendientes asparagina /amonio.

3.2 Punto por punto

A partir de los valores de absorbancia obtenidos para cada disolución de asparagina y la curva de calibración de amonio, puede calcularse la concentración de amonio obtenida en la reacción enzimática y evaluar la eficiencia por cada punto:

$$\eta_i = \frac{[P]_i}{[S]_i} = \frac{|NH_4^+|_i}{|Asn|_i} \dots\dots\dots \text{ecuación 19}$$

La eficiencia enzimática para todo el intervalo de concentraciones será el promedio de la eficiencia calculada para cada punto.

3.3 Gráfica de correlación

Los puntos calculados como se indicó en la sección anterior, puede representarse en una gráfica de concentración de amonio contra la concentración de asparagina. La pendiente de la recta obtenida representa la eficiencia enzimática.

4 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección está definido como la concentración de analito que proporciona una señal “significativamente diferente” de la señal del blanco o señal de fondo. Dado que esta definición es controvertida, algunos organismos sugieren que el criterio debería ser:

$$y - y_B = 3s_B \dots\dots\dots \text{ecuación 20}$$

Donde:

y= señal de la muestra

y_B= señal del blanco

s_B= desviación estándar del blanco

El límite de cuantificación se define como la menor concentración del analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones en las que se lleva a cabo el método. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Dicha definición se puede expresar de la siguiente forma:

$$LC = y_B + 10s_B \dots\dots\dots \text{ecuación 21}$$

Los valores de LD y LC calculados con las ecuaciones 20 y 21 respectivamente están dados en unidades de señal analítica (absorbancia, área de pico, intensidad de fluorescencia, etcétera). Cuando estos valores se interpolan en la curva de calibración se obtienen los valores de LD y LC con un error del 50%.

Lo que es deseable es disminuir la probabilidad de error en la detección y cuantificación del analito, y para ello es necesario fijar un nivel de confianza más alto (95%). La determinación del LD debe de considerar la recta de calibración y los intervalos de confianza de la misma, dichos intervalos están dados por:

$$Y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 22}$$

en donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza s para n-2 grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_- . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un término auxiliar:

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \dots\dots\dots \text{ecuación 23}$$

por lo que, para la recta y_+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 24}$$

y para la recta y_-

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 25}$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de y_+ para $x=0$ en la ecuación 25.

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y_+ para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y_- . Este valor corresponde al límite de cuantificación.

La figura 4, proporciona una representación gráfica de los límites de detección y cuantificación calculados:

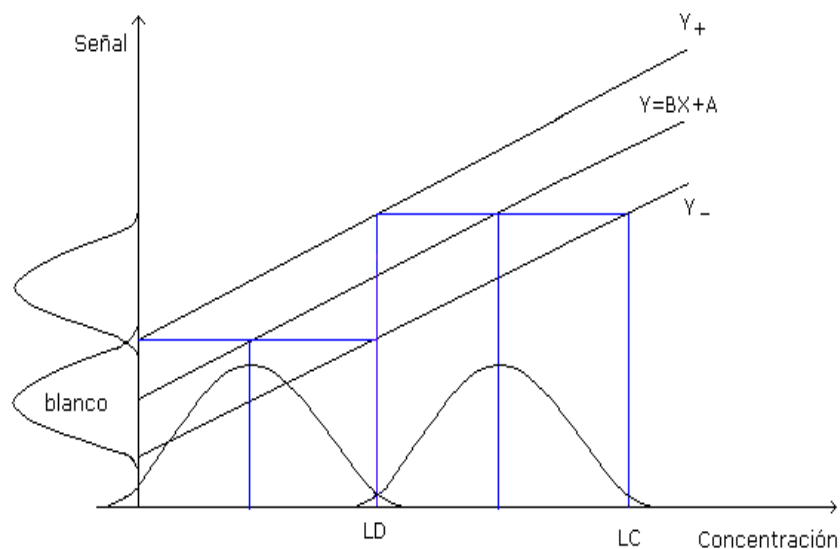


Figura 4 Representación del LD y LC.

5 Intervalo de Confianza (IC)

La media de la población (μ) o media verdadera de un conjunto de medias es una constante que siempre será desconocida. Sin embargo en ausencia de errores sistemáticos se puede fijar como límites dentro de los cuales cabe esperar que se encuentre la media de la población, con un grado de probabilidad dado. Los límites obtenidos de esta forma, se denominan límites de confianza, y el intervalo comprendido entre estos, se conocen como intervalos de confianza.

Los límites de confianza se calculan a partir del error estándar de la media (eem) calculado como:

$$eem = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots \text{ecuación 26}$$

en donde n, es el tamaño de la muestra. Para una probabilidad de 95%, el intervalo de confianza está dado por:

Es el intervalo dentro del cual se afirma con un grado de confianza, que se encuentra el valor verdadero y los valores extremos se llaman límites de confianza. El tamaño de dicho intervalo depende de la probabilidad de incluir el valor verdadero.

$$\bar{x} - 1.96 \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) < \mu < \bar{x} + 1.96 \left(\frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \dots\dots\dots \text{ecuación 27}$$

Para muestras grandes, s proporciona una estimación suficientemente exacta de σ y puede sustituirse por ésta. A medida que el tamaño de la muestra se hace más pequeño, la incertidumbre al utilizar s para estimar σ aumenta. Para tener en cuenta la posible variabilidad en s, se utiliza un parámetro estadístico t, que se define como:

$$t = \frac{(x - \mu)}{s} \dots\dots\dots \text{ecuación 28}$$

El valor de t depende del nivel de confianza deseado y del número de grados de libertad (n-1). Los límites de confianza para la media \bar{x} de n medidas ($n \geq 50$) se obtiene mediante el cálculo a partir de t, con la siguiente relación:

$$\mu = \bar{x} \pm t \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \dots\dots\dots \text{ecuación 29}$$

6 Comparación de medias de dos muestras

Es un método de comparación de resultados analíticos, en donde se tienen dos medias muestrales \bar{X}_1 y \bar{X}_2 . Si la hipótesis nula es que los dos métodos dan el mismo resultado, necesitamos comprobar si su diferencia es significativamente diferente. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no sean significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de las desviaciones, a partir de las dos desviaciones individuales S_1 y S_2 , utilizando la siguiente ecuación:

$$S^2 = \{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2\} / (n_1 + n_2 - 2) \dots \dots \dots \text{ecuación 30}$$

Se determina entonces "t calculada" con la siguiente relación:

$$t_{\text{calculada}} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \dots \dots \dots \text{ecuación 31}$$

donde:

\bar{X}_1 es la media de las muestras correspondiente al análisis, en la condición #1

\bar{X}_2 es la media muestral del análisis en la condición #2

n_1 = número de repeticiones para una misma muestra X_1 .

n_2 = número de repeticiones para una misma muestra X_2 .

$|t|_{\text{tablas}}$ tiene $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad, para una probabilidad $p = 0.05$

Si $|t|_{\text{calculada}} \leq |t|_{\text{tablas}}$ entonces se acepta la hipótesis nula, es decir los dos métodos dan el mismo resultado

En este anexo se muestran los resultados obtenidos en cada experimento realizado para la tesis.

1 Eficiencia enzimática

1.1 Resultados de Absorbancia

- **Asparagina**

Tabla 1 Resultados de absorbancia obtenidos de la inyección de los estándares de Asparagina, calculando la desviación estándar y el coeficiente de variación respectivo.

Asparagina (mM)	Absorbancia				S	%CV
	h máx	h mín	x_i	\bar{X}		
0.4	0.12545	-0.0044745	0.129925	0.13098	0.00487	3.71
0.36	0.11807	0.0023415	0.115729	0.11511	0.00091	0.79
0.32	0.10907	0.0053081	0.103762	0.10306	0.00093	0.90
0.16	0.062546	0.0089841	0.053562	0.05319	0.00084	1.57
0.12	0.05538	0.015916	0.039464	0.04032	0.00102	2.53
0.1	0.050987	0.015138	0.035849	0.03642	0.00077	2.11

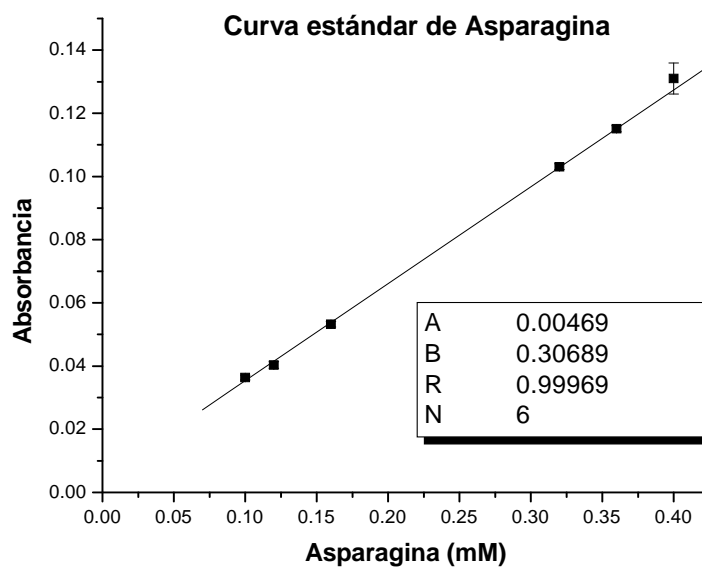
- **Amonio**

Tabla 2 Resultados obtenidos al inyectar estándares de amonio, que abarcan el intervalo de 0.40mM a 0.10mM amonio.

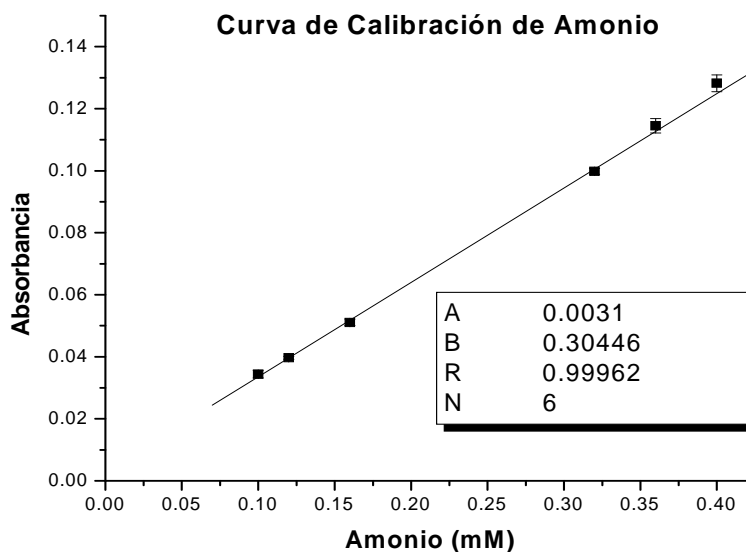
Amonio (mM)	Absorbancia				S	%CV
	h máx	h mín	x_i	\bar{X}		
0.4	0.14521	0.014599	0.130611	0.128214	0.002681	2.09
0.36	0.14346	0.030758	0.112702	0.1144723	0.002317	2.02
0.32	0.11755	0.017967	0.099583	0.0997697	0.000941	0.94
0.16	0.07193	0.022025	0.049905	0.05109	0.001062	2.08
0.12	0.064466	0.024759	0.039707	0.0396787	0.000503	1.27
0.1	0.059485	0.026097	0.033388	0.0343995	0.001247	3.6

1.2 Curvas de calibración

Con los valores promedio de cada uno de los estándares de asparagina (Gráfica 1) y amonio (Gráfica 2) preparados e inyectados, se graficó la curva correspondiente, incluyendo las barras de error para cada punto. Y se determinaron los parámetros de regresión lineal.



Gráfica 1 Curva de calibración de asparagina. Abarca 0.10mM-0.4mM de Asparagina.



Gráfica 2 Curva de calibración de amonio, obtenida para la determinación de la eficiencia enzimática del reactor utilizado. Cubre el intervalo de 0.10mM-0.40mM de amonio

1.3 Cálculos y Resultados de Eficiencia Enzimática

$$\% \eta = \frac{[P]}{[S]} * 100$$

[S] = sustrato... asparagina

[P] = producto... amonio

$$\text{concentración} = \frac{(\text{absorbancia} - \text{ordenada})}{\text{pendiente}}$$

Eficiencia

$$\% \eta = |P|/|S| * 100$$

|S| = asparagina (estándar)
(liberado

|P| = amonio (enzimáticamente)

Tabla 3 Parámetros de regresión lineal para las curvas de amonio y asparagina

amonio	
A	0.0031
B	0.3045
R	0.99962
asparagina	
A	0.0047
B	0.3068
R	0.99969

Tabla 4 Resultados obtenidos, para la eficiencia enzimática del reactor de asparaginasa utilizado.

Estándar de Asparagina (mM)	Asparagina			Eficiencia (% η)
	Absorbancia	s	Amonio liberado enzimáticamente (mM)	
0.40	0.1310	0.00487	0.42	105.0
0.36	0.1151	0.00091	0.37	102.2
0.32	0.1031	0.00093	0.33	102.6
0.16	0.0532	0.00084	0.16	102.8
0.12	0.0403	0.00102	0.12	101.8
0.10	0.0364	0.00077	0.11	109.4
				$\bar{X} = 104.0$
				s = 2.9

2 Limite de detección y Límite de Cuantificación

2.1 Datos requeridos

Tabla 5 Resultados requeridos para efectuar el cálculo del LD y LC.

	Xi	h max	h min	Yi	xi-x	(xi-x)²	yi-y	(yi-y)²	(xi-x)(yi-y)	y calc	yi-ycal	(yi-ycal)²	xi²	xi*yi	yi-(A+mx_i)	(yi-(A+mx_i))²
	26.42	0.08703	0.022002	0.06503	6.869	47.19	0.01	1.1E-04	0.0731561	6.76E-02	-2.52E-03	6.36E-06	698	1.72	-2.52E-03	6.36E-06
	26.42	0.08684	0.021541	0.065299	6.869	47.19	0.01	1.2E-04	0.0750039	6.76E-02	-2.25E-03	5.07E-06	698	1.73	-2.25E-03	5.07E-06
	26.42	0.08921	0.020649	0.068564	6.869	47.19	0.01	2.0E-04	0.0974318	6.76E-02	1.01E-03	1.02E-06	698	1.81	1.01E-03	1.02E-06
	23.78	0.08528	0.021509	0.063768	4.227	17.87	0.01	8.8E-05	0.0396844	6.23E-02	1.45E-03	2.10E-06	565.4	1.52	1.45E-03	2.10E-06
	23.78	0.08242	0.022029	0.060395	4.227	17.87	0.01	3.6E-05	0.025426	6.23E-02	-1.93E-03	3.71E-06	565.4	1.44	-1.93E-03	3.71E-06
	23.78	0.08626	0.025741	0.060518	4.227	17.87	0.01	3.8E-05	0.025946	6.23E-02	-1.80E-03	3.25E-06	565.4	1.44	-1.80E-03	3.25E-06
	18.49	0.08652	0.03343	0.053094	-1.057	1.12	0.00	1.7E-06	0.0013592	5.19E-02	1.24E-03	1.53E-06	342	0.98	1.24E-03	1.53E-06
	18.49	0.09458	0.03936	0.055221	-1.057	1.12	0.00	7.1E-07	-0.0008886	5.19E-02	3.36E-03	1.13E-05	342	1.02	3.36E-03	1.13E-05
	18.49	0.09701	0.04133	0.055684	-1.057	1.12	0.00	1.7E-06	-0.0013779	5.19E-02	3.83E-03	1.46E-05	342	1.03	3.83E-03	1.46E-05
	15.85	0.09175	0.043718	0.048027	-3.699	13.68	-0.01	4.0E-05	0.023499	4.66E-02	1.40E-03	1.96E-06	251.3	0.76	1.40E-03	1.96E-06
	15.85	0.0922	0.042574	0.049623	-3.699	13.68	0.00	2.3E-05	0.0175957	4.66E-02	3.00E-03	8.98E-06	251.3	0.79	3.00E-03	8.98E-06
	15.85	0.09516	0.047493	0.047665	-3.699	13.68	-0.01	4.5E-05	0.0248379	4.66E-02	1.04E-03	1.08E-06	251.3	0.76	1.04E-03	1.08E-06
	13.21	0.08423	0.043044	0.041183	-6.341	40.21	-0.01	1.7E-04	0.0836804	4.14E-02	-2.13E-04	4.53E-08	174.5	0.54	-2.13E-04	4.53E-08
	13.21	0.08265	0.042329	0.040325	-6.341	40.21	-0.01	2.0E-04	0.0891208	4.14E-02	-1.07E-03	1.15E-06	174.5	0.53	-1.07E-03	1.15E-06
	13.21	0.08333	0.042019	0.041306	-6.341	40.21	-0.01	1.7E-04	0.0829005	4.14E-02	-8.98E-05	8.06E-09	174.5	0.55	-8.98E-05	8.06E-09
Σ	293.26			0.81570	0.00	360.18			0.657375			6.22E-05	6094	16.61		6.22E-05
prom	19.55			0.05438												

Tabla 6 Resumen de los cálculos de determinación del LD y LC, para el intervalo de 26 a 13 ppm.

CÁLCULO DEL L.D.

X	19.55080				
Y	0.05438				
n	15	1+1/n	1.06667		
t(n-2)	2.16	α	0.05		
Suma(xi-X) ²	3.6E+02	b	0.00183	Sb	0.0001
Suma(xi-X)(yi-Y)	0.65738	a	0.01870	Sa	0.0023
Suma(yi-calc) ²	0.00006	Sy/x	0.00219		
Suma(xi) ²	6093.683				
Término aux. C	3.3E-06				
x	0				
Y+	2.6E-02	L.D.	7.0	ppm	

CÁLCULO DEL L.C.

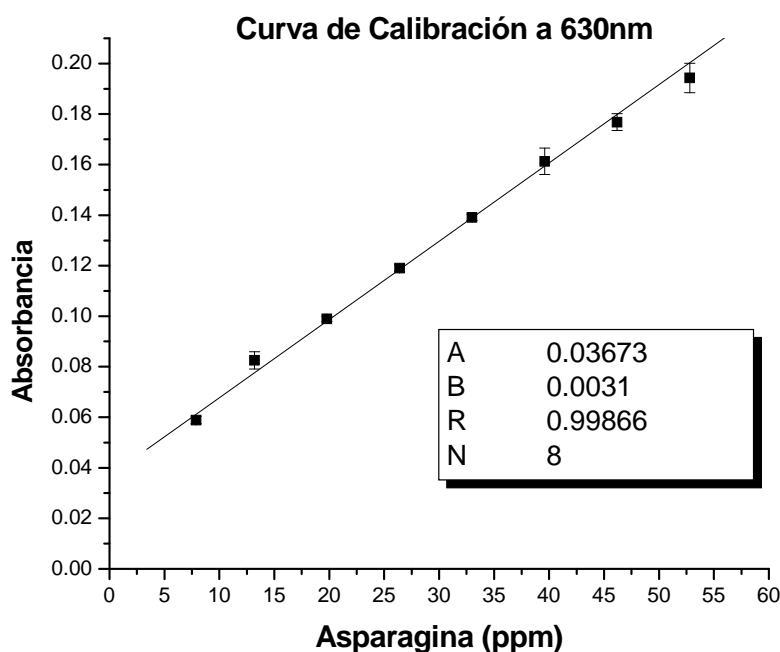
x	6.9552				
Y+	0.03719	L.C.	13.0	ppm	

3 Robustez

3.1 Datos obtenidos para 630nm

Tabla 7 Resultados de absorbancia obtenidos para los estándares de Asparagina, al cambiar la longitud de onda de detección del analito a 630nm.

Asn (ppm)	Asn (mM)	Absorbancia				S	%CV
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}		
53	0.40	0.1995	-0.0009	0.2004	0.1943	0.0058	2.96
46	0.35	0.1778	0.0016	0.1762	0.1768	0.0033	1.89
40	0.30	0.1650	0.0075	0.1575	0.1613	0.0052	3.20
33	0.25	0.1457	0.0061	0.1396	0.1391	0.0012	0.85
26	0.20	0.1272	0.0067	0.1205	0.1190	0.0013	1.09
20	0.15	0.1021	0.0039	0.0982	0.0989	0.0011	1.14
13	0.10	0.0893	0.0038	0.0855	0.0825	0.0034	4.06
8	0.06	0.0665	0.0092	0.0573	0.0589	0.0015	2.49

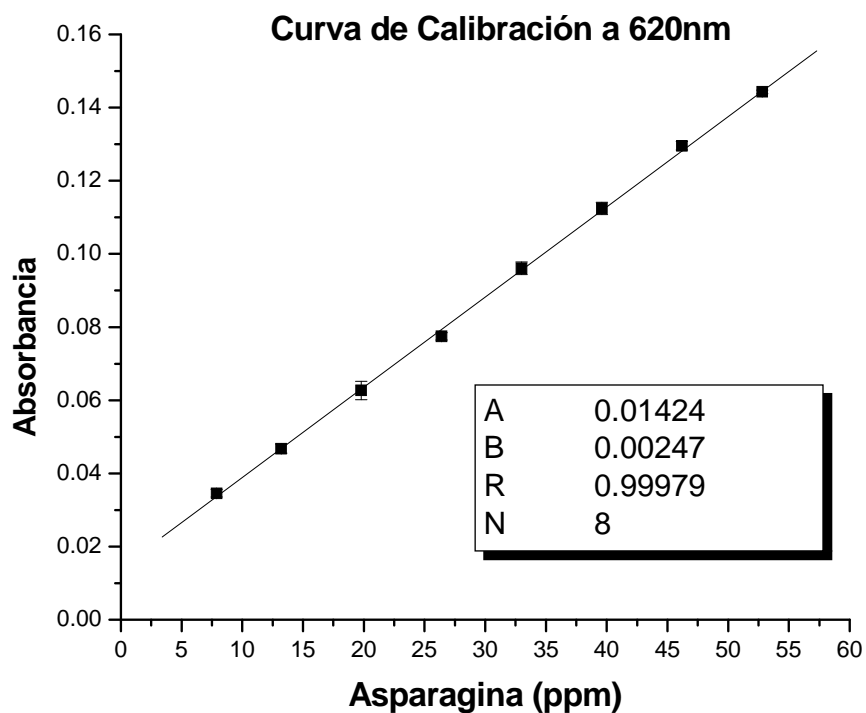


Gráfica 3 Curva de calibración de los estándares de asparagina, detectados a 630nm

3.2 Datos obtenidos a 620nm

Tabla 8 Resultados de absorbancia obtenidos para los estándares de Asn, al cambiar la longitud de onda de detección del analito a 620nm (considerada óptima en el presente trabajo).

Asn (ppm)	Asn (mM)	Absorbancia				S	%CV
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}		
53	0.4	0.1354	-0.009	0.1444	0.1443	0.00050	0.35
46	0.35	0.1219	-0.008	0.1299	0.1296	0.00112	0.87
40	0.3	0.1078	-0.003	0.1108	0.1125	0.00170	1.51
33	0.25	0.0918	-0.004	0.0958	0.0961	0.00177	1.84
26	0.2	0.076	-0.002	0.078	0.0775	0.00101	1.31
20	0.15	0.0576	-0.003	0.0606	0.0627	0.00251	4.01
13	0.1	0.0495	0.0027	0.0468	0.0468	0.00123	2.62
8	0.06	0.0397	0.0059	0.0338	0.0346	0.00106	3.07

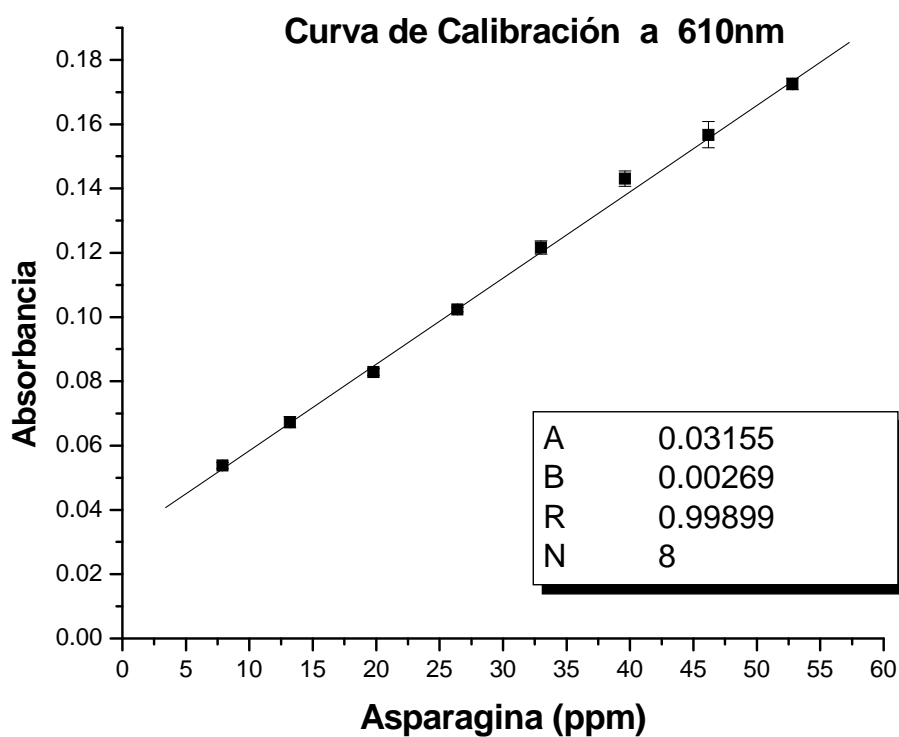


Grafica 4 Curva de calibración, obtenida utilizando una longitud de 620nm.

3.3 Datos obtenidos a 610nm

Tabla 9 Resultados de absorbancia obtenidos para los estándares de Asn, al cambiar la longitud de onda de detección del analito a 610nm.

Asn (ppm)	Asn (mM)	Absorbancia				S	%CV
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}		
53	0.4	0.1647	-0.0098	0.1745	0.1725	0.00182	1.05
46	0.35	0.1363	-0.018	0.1543	0.1567	0.00410	2.62
40	0.30	0.1248	-0.02	0.1448	0.1431	0.00240	1.68
33	0.25	0.102	-0.018	0.12	0.1216	0.00212	1.74
26	0.20	0.082	-0.021	0.103	0.1023	0.00065	0.64
20	0.15	0.0641	-0.018	0.0821	0.0829	0.00097	1.17
13	0.10	0.0452	-0.021	0.0662	0.0673	0.00171	2.54
8	0.06	0.0356	-0.018	0.0536	0.0538	0.00097	1.80



Gráfica 5 Curva de calibración de asparagina, con el detector a 610nm.

3.4 Datos obtenidos a 1.2mL/min

Tabla 10 Resultados de absorbancia obtenidos para los estándares de Asn, al cambiar el flujo a 1.2mL/min

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
34	0.26	0.12854	0.0051155	0.123425	0.1233	0.0015	1.26
32	0.24	0.11995	0.0037732	0.116177	0.1172	0.0010	0.85
29	0.22	0.11376	0.0060469	0.107713	0.1079	0.0010	0.92
26	0.20	0.10127	0.0043394	0.096931	0.0977	0.0015	1.53
24	0.18	0.096492	0.0072125	0.08928	0.0889	0.0011	1.18
21	0.16	0.08066	-0.0008589	0.081519	0.0783	0.0034	4.40
18	0.14	0.067737	0.0027895	0.064948	0.0696	0.0011	1.64
16	0.12	0.063549	0.0024998	0.061049	0.0618	0.0007	1.12

3.5 Datos obtenidos a 1.0 mL/min

Tabla 11 Resultados de absorbancia obtenidos al cambiar el flujo a 1.0mL/min

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
34	0.26	0.084429	-0.0026899	0.087119	0.0883	0.0020	2.31
32	0.24	0.091796	0.0067817	0.085014	0.0846	0.0007	0.85
29	0.22	0.098689	0.018553	0.080136	0.0794	0.0013	1.63
26	0.20	0.093507	0.023757	0.06975	0.0708	0.0022	3.12
24	0.18	0.091526	0.025436	0.06609	0.0653	0.0010	1.61
21	0.16	0.090268	0.027665	0.062603	0.0608	0.0016	2.73
18	0.14	0.08628	0.030608	0.055672	0.0555	0.0012	2.16
16	0.12	0.084136	0.033105	0.051031	0.0495	0.0013	2.68

3.6 Datos obtenidos a $q=0.8$ mL/min

Tabla 12 Resultados obtenidos para los estándares de asparagina (Asn).

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
34	0.2	0.12465	0.0013635	0.123287	0.1222	0.0011	0.93
32	0.24	0.10898	0.00028411	0.108696	0.1076	0.0010	0.93
29	0.22	0.10015	-0.002464	0.102614	0.10524	0.0025	2.37
26	0.20	0.086908	-0.0017839	0.088692	0.0902	0.0011	1.22
24	0.18	0.079083	0.0002797	0.078803	0.0795	0.0011	1.45
21	0.16	0.082081	0.0038244	0.078257	0.0775	0.0017	2.17
18	0.14	0.073579	-0.00032427	0.073903	0.0722	0.0017	2.32
16	0.12	0.061946	0.0017143	0.060232	0.0623	0.0018	2.84

4 Muestras de papa

4.1 Proceso inicial, separación por filtración

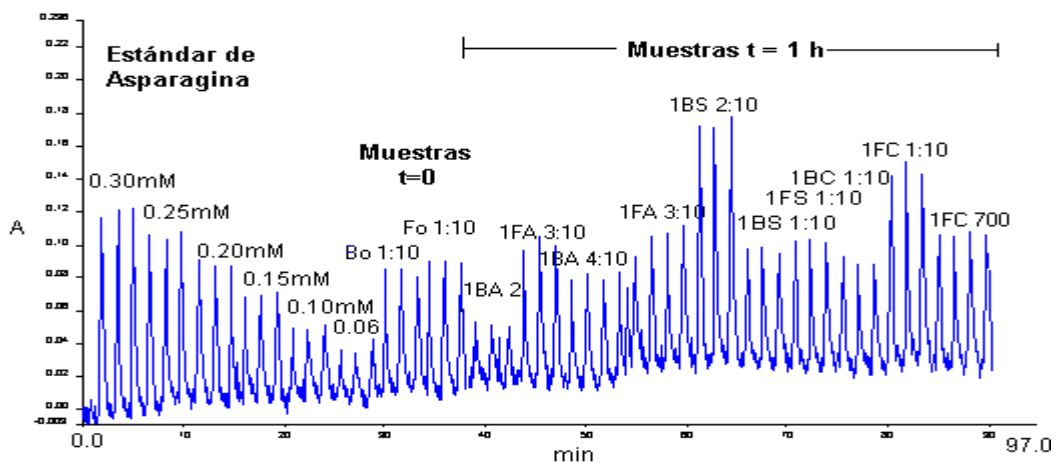
De acuerdo al tipo de condición, las muestras para su rápida identificación se etiquetaron y clasificaron de la siguiente forma (Tabla 13):

Tabla 13. Abreviaturas utilizadas para el etiquetado e identificación de las muestras analizadas.

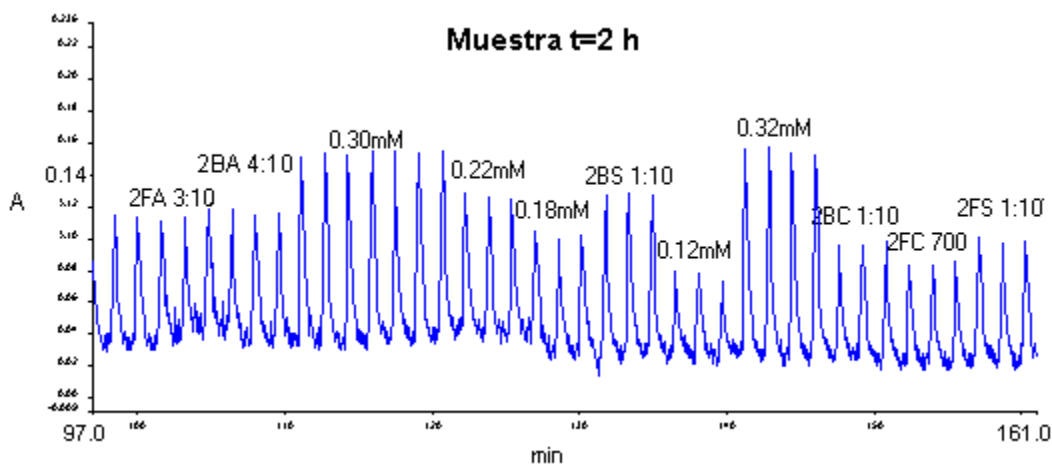
Variedad	“Condición”	Etiqueta
Alpha (papa blanca)	Papa Sin agua	BS
	Papa Con agua	BC
	✓ Agua	BA
Los Mochis (papa para freír)	Papa Sin agua	FS
	Papa Con agua	FC
	✓ Agua	FA

- **Desglose del diagrama Global (Figura 4.13, capítulo IV, página 75)**

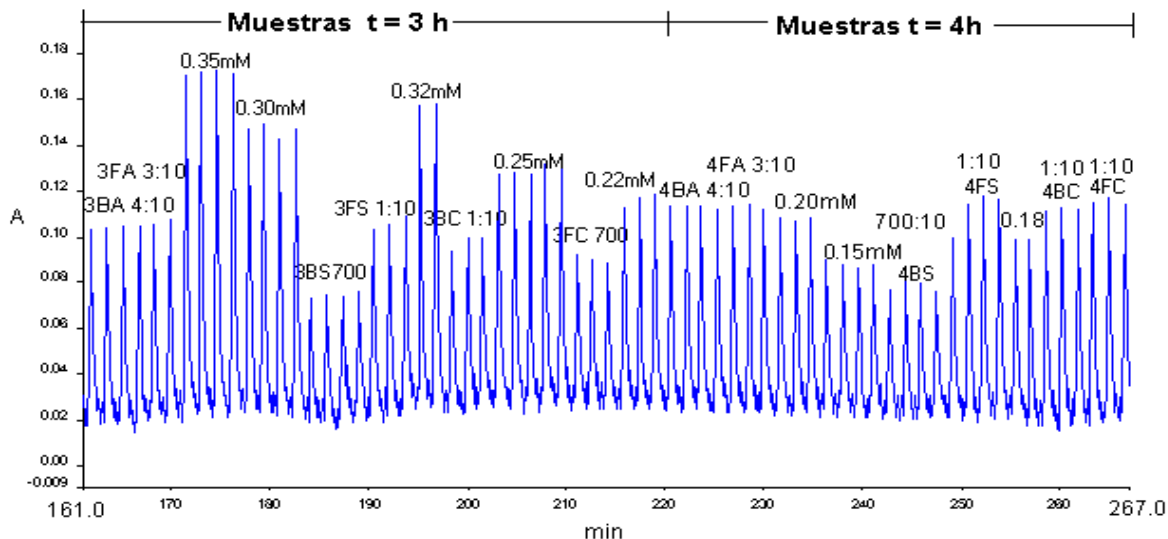
Obtenido siguiendo la metodología inicial, y amplificado para su observación y análisis por número de muestra inyectada, e incluye la etiqueta de identificación para cada variedad estudiada:



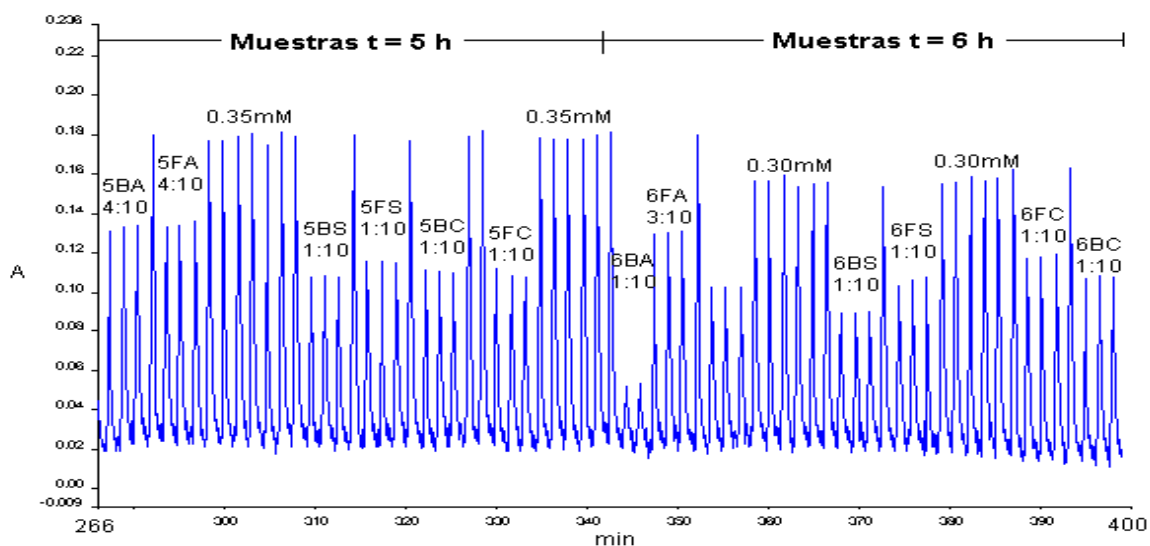
Figurama 1 Primera sección del figurama global, correspondiente a la inyección de los estándares y las muestras al tiempo cero y t=1 hora.



Figurama 2 Segunda sección del figurama global, correspondiente a la inyección de las muestras al t=2 horas.

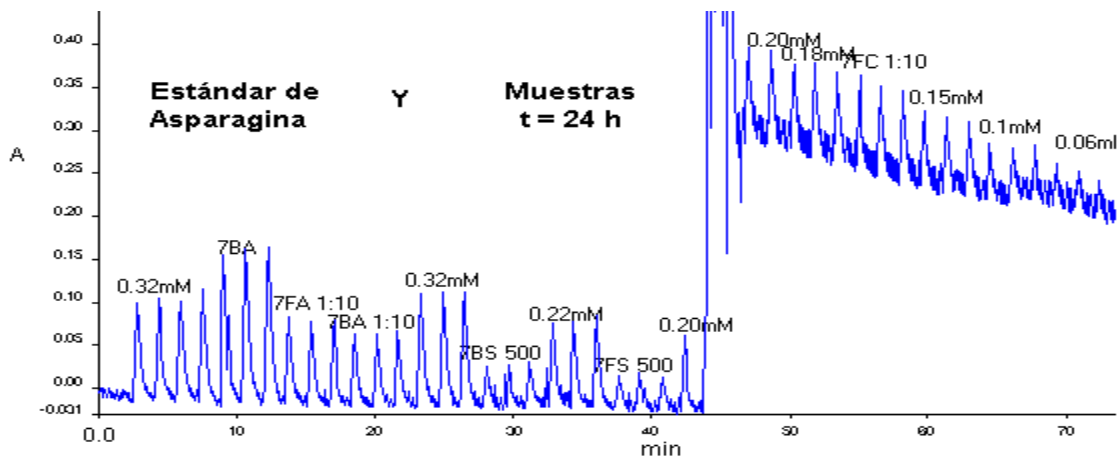


Figurama 3 Tercera sección del figurama global, correspondiente a la inyección de las muestrras al t=3 y 4 horas.



Figurama 4 Cuarta sección del figurama global correspondiente a la inyección de las muestrras al t=5 y 6 horas.

Como el análisis estuvo programado por un periodo de 24 horas, las muestrras correspondientes a este tiempo, se analizaron posteriormente y generaron un nuevo figurama (figurama 5), donde se observa la inyección de las diferentes disoluciones estándar y las muestrras de forma intercalada.



Figurama 5 Inyección de las muestras al t =24 horas, donde se observa una alteración drástica de la línea base a los 45min aproximadamente.

- **Resultados para la obtención de las curvas de calibración**

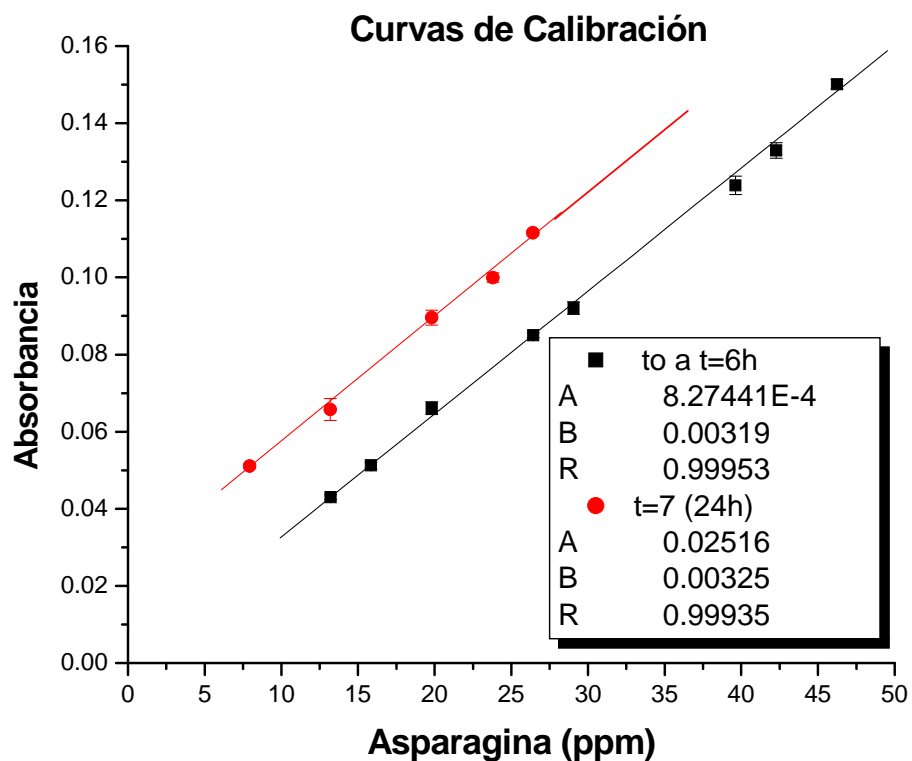
Tabla 14 Datos de los estándares inyectados de Asparagina, para la obtención de la curva de calibración útil para el t=0 a t=6 horas

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
46	0.35	0.17061	0.01919	0.15142	0.1501	0.0012	0.82
42	0.32	0.15685	0.02590	0.13095	0.1329	0.0020	1.53
40	0.30	0.14664	0.02291	0.12373	0.1239	0.0024	1.92
29	0.22	0.12930	0.03737	0.09193	0.0921	0.0016	1.76
26	0.20	0.10807	0.02236	0.08571	0.0850	0.0006	0.76
20	0.15	0.07658	0.00934	0.06724	0.0661	0.0016	2.44
16	0.12	0.07984	0.02864	0.05119	0.0512	0.0008	1.65
13	0.10	0.06291	0.01988	0.04303	0.0430	0.0006	1.41

Tabla 15 Resultados de la inyección de los estándares de Asparagina, para la obtención de la curva de calibración útil para el t=24 horas (muestra #7)

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
29	0.22	0.075727	-0.022034	0.097761	0.1016	0.0048	4.69
0.26	0.20	0.060686	-0.031152	0.091838	0.1115	0.0007	0.62
0.24	0.18	0.377	0.27561	0.10139	0.1000	0.0012	1.25
0.20	0.15	0.32341	0.23232	0.09109	0.0896	0.0019	2.14
0.13	0.10	0.28456	0.21842	0.06614	0.0657	0.0028	4.32
8	0.06	0.26156	0.21094	0.05062	0.0511	0.0007	1.30

• Curvas de calibración



Gráfica 6 ■ Curva de calibración, correspondiente a las primeras seis horas (muestra 0-6);
● Curva de calibración de Asparagina, correspondiente a t=24h

• **Asparagina en Tejido**

Tablas 16 Resultados de absorbancia y su conversión a unidades de concentración (ppm) correspondiente al análisis global, siguiendo el proceso inicial.

Papa Alpha "sin agua" (BS)									
Muestra (g)	Etiqueta/ Dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{X}
		h máx	h mín	x_i	\bar{X}				
11.9009	Bo 1:10	0.095146	0.0071897	0.0879563	0.08645	0.00167	1.94	2295.06	2255.45
		0.091248	0.0065999	0.0846481				2207.92	
		0.091264	0.0045102	0.0867538				2263.38	
11.1851	1BS 2:10	0.17751	0.027839	0.149671	0.14821	0.00280	1.89	2085.79	2065.29
		0.17696	0.03073	0.14623				2037.57	
		0.18346	0.033274	0.150186				2093.01	
11.1851	1BS 1:10	0.10294	0.030597	0.072343	0.07300	0.00128	1.75	2004.35	2022.82
		0.10401	0.030105	0.073905				2048.12	
		0.10057	0.028471	0.072099				1997.51	
12.2473	2BS 1:10	0.12719	0.027484	0.099706	0.10054	0.00251	2.50	2530.89	2552.13
		0.12892	0.030162	0.098758				2506.62	
		0.12777	0.025456	0.102314				2597.64	
10.9929	3BS 700:10	0.073251	0.018776	0.054475	0.05596	0.00134	2.39	2185.51	2245.89
		0.07467	0.019344	0.055326				2220.18	
		0.073891	0.016368	0.057523				2309.68	
		0.075912	0.019407	0.056505				2268.21	
12.6597	4BS 700:10	0.077264	0.02036	0.056904	0.05887	0.00175	2.98	1983.68	2053.17
		0.080062	0.019789	0.060273				2102.86	
		0.079953	0.020525	0.059428				2072.97	
10.7213	5BS 1:10	0.1074	0.021096	0.086304	0.08691	0.00102	1.17	2499.26	2517.11
		0.10813	0.021778	0.086352				2500.66	
		0.10757	0.019482	0.088088				2551.42	
10.9249	6BS 1:10	0.089462	0.020512	0.06895	0.07032	0.00123	1.45	1954.72	1993.93
		0.08924	0.018572	0.070668				2004.02	
		0.090048	0.018717	0.071331				2023.05	
12.3439	7BS 500:10	0.02457	-0.024306	0.048876	0.05147	0.00284	5.51	1182.32	1311.51
		0.02776	-0.023267	0.051027				1289.56	
		0.029711	-0.024788	0.054499				1462.65	

Tablas 17 Resultados de absorbancia y su conversión a unidades de concentración (ppm) correspondiente al análisis global siguiendo el proceso inicial.

Papa Alpha "con agua" (BC)									
Muestra (g)	Etiqueta/ dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{X}
		h máx	h mín	x_i	\bar{X}				
11.5291	1BC 1:10	0.098383	0.028599	0.069784	1874.96	1853.00	1.30	1874.96	1853.00
		0.093809	0.02467	0.069139	1857.42			1857.42	
		0.094625	0.026619	0.068006	1826.62			1826.62	
11.8228	2BC 1:10	0.0965	0.023093	0.073407	1924.45	1932.23	2.10	1924.45	1929.63
		0.09609	0.023485	0.072605	1903.18			1903.18	
		0.096428	0.021632	0.074796	1961.28			1961.28	
12.8774	3BC 1:10	0.093582	0.023363	0.070219	1689.24	1777.36	4.60	1689.24	1777.36
		0.099855	0.02289	0.076965	1853.46			1853.46	
		0.099731	0.025398	0.074333	1789.39			1789.39	
12.7285	4BC 1:10	0.11078	0.01789	0.09289	2267.34	2307.27	2.17	2267.34	2307.26
		0.11239	0.015567	0.096823	2364.21			2364.21	
		0.11186	0.01804	0.09382	2290.25			2290.25	
11.884	5BC 1:10	0.11097	0.020787	0.090183	2357.06	2338.83	1.71	2357.06	2344.91
		0.11014	0.019565	0.090575	2367.40			2367.40	
		0.10987	0.021461	0.088409	2310.26			2310.26	
12.6195	6BC 1:10	0.10682	0.01421	0.09261	2279.97	2315.00	1.56	2279.97	2315.00
		0.10809	0.012545	0.095545	2352.88			2352.88	
		0.10729	0.013385	0.093905	2312.14			2312.14	

Tablas 18 Resultados de absorbancia y su conversión a unidades de concentración (ppm) correspondiente al análisis global, siguiendo el proceso inicial.

Papa Los Mochis "sin agua" (FS)									
Muestra (g)	Etiqueta	Absorbancia				S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{X}
		h máx	h mín	x_i	\bar{X}				
9.7518	Fo 1:10	0.098427	0.015334	0.083093	0.08251	0.00259	3.14	2644.51	2625.82
		0.098461	0.013699	0.084762				2698.16	
		0.096946	0.017266	0.07968				2534.79	
10.7485	1FS 1:10	0.10776	0.028676	0.079084	0.07980	0.00136	1.70	2282.36	2303.13
		0.10888	0.027516	0.081364				2348.86	
		0.10742	0.02848	0.07894				2278.16	
10.0045	2FS 1:10	0.10076	0.019368	0.081392	0.08032	0.00116	1.44	2524.41	2490.85
		0.098339	0.019246	0.079093				2452.38	
		0.098887	0.018409	0.080478				2495.77	
12.5473	3FS 1:10	0.10369	0.019922	0.083768	0.08588	0.00190	2.22	2072.18	2124.86
		0.10566	0.01927	0.08639				2137.69	
		0.10942	0.021949	0.087471				2164.70	
11.6393	4FS 1:10	0.11436	0.020156	0.094204	0.09474	0.00054	0.57	2514.91	2529.46
		0.11772	0.022969	0.094751				2529.64	
		0.11596	0.020682	0.095278				2543.84	
12.3192	5FS 1:10	0.11584	0.020518	0.095322	0.09439	0.00110	1.17	2404.56	2380.734
		0.11589	0.021222	0.094668				2387.92	
		0.115	0.021833	0.093167				2349.72	
11.9704	6FS 1:10	0.10359	0.018882	0.084708	0.08676	0.00180	2.07	2196.67	2250.448
		0.10638	0.01886	0.08752				2270.31	
		0.10722	0.019163	0.088057				2284.37	
11.5177	7FS 500	0.013209	-0.025911	0.03912	0.04078	0.00155	3.81	745.88	834.66
		0.015106	-0.02709	0.042196				910.22	
		0.012311	-0.028718	0.041029				847.87	

Tablas 19 Resultados de absorbancia y su conversión a unidades de concentración (ppm) correspondiente al análisis global.

Papa Los Mochis "con agua" (FC)									
Muestra (g)	Etiqueta/dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{X}
		h máx	h mín	x_i	\bar{X}				
12.7309	1FC 1:10	0.14742	0.026748	0.120672	0.11846	0.00296	2.50	2951.01	2872.19
		0.14908	0.028526	0.120554				2948.10	
		0.14876	0.032393	0.116367				2845.00	
12.7309	1FC 700:10	0.11174	0.02824	0.0835	0.08157	0.00243	2.97	2908.14	
		0.11101	0.029269	0.081741				2846.27	
		0.11387	0.030929	0.082941				2888.48	
		0.11204	0.033936	0.078104				2718.33	
13.4957	2FC 700:10	0.082872	0.02131	0.061562	0.06180	0.00087	1.41	2015.37	2023.28
		0.084183	0.023111	0.061072				1999.11	
		0.086328	0.023561	0.062767				2055.36	
12.4823	3FC 700:10	0.09237	0.028268	0.064102	0.06432	0.00052	0.80	2270.12	2278.01
		0.090012	0.025099	0.064913				2299.22	
		0.088782	0.024831	0.063951				2264.70	
12.2692	4FC 1:10	0.11313	0.017873	0.095257	0.09487	0.00079	0.84	2412.70	2402.78
		0.1151	0.019707	0.095393				2416.17	
		0.11407	0.020114	0.093956				2379.46	
12.3907	5FC 1:10	0.11212	0.021949	0.090171	0.08892	0.00119	1.34	2260.37	2228.73
		0.1085	0.019709	0.088791				2225.45	
		0.10707	0.019271	0.087799				2200.36	
13.215	6FC 1:10	0.1165	0.013892	0.102608	0.10360	0.00089	0.86	2414.40	2437.835
		0.11761	0.013773	0.103837				2443.55	
		0.11911	0.014767	0.104343				2455.55	
11.9104	7FC 1:10	0.35628	0.25138	0.1049	0.10714	0.00295	2.75	2060.00	2117.87
		0.35109	0.24505	0.10604				2089.45	
		0.34714	0.23666	0.11048				2204.15	

• **Asparagina superficial**

Tablas 20 Resultados para el agua de inmersión de las papas etiquetadas como BC.

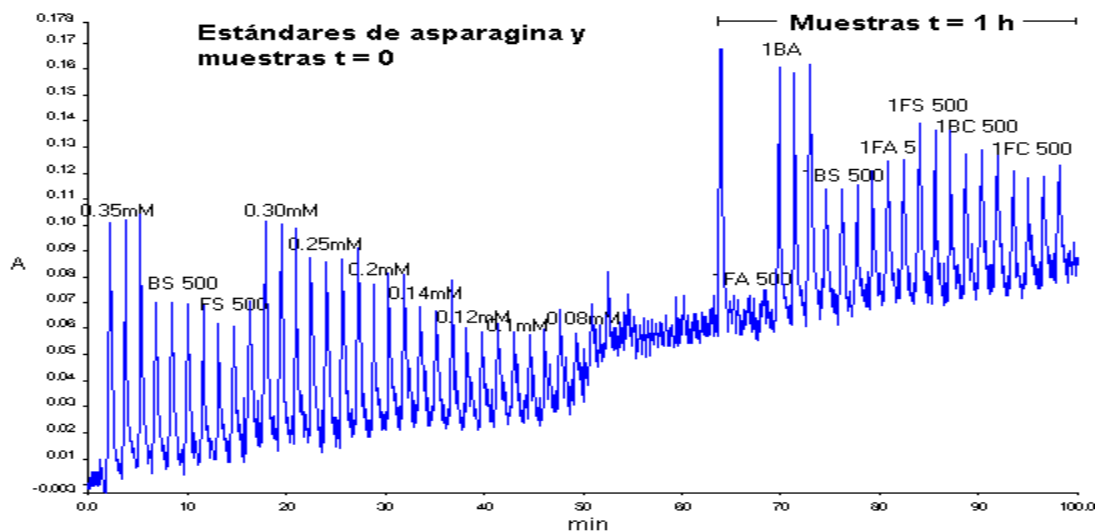
Papa Alpha "Agua" (BA)								
Etiqueta/ dilución	Absorbancia			\bar{x}	S	%CV	Asn mg/cm ²	\bar{x}
	h máx	h mín	x_i					
1BA 4:10	0.084294	0.018539	0.065755	0.06788	0.00236	3.4793	0.042	0.044
	0.0879	0.017479	0.070421				0.045	
	0.084153	0.0167	0.067453				0.044	
2BA 4:10	0.11938	0.036808	0.082572	0.08261	0.00151	1.8263	0.053	0.053
	0.11813	0.037591	0.080539				0.052	
	0.11542	0.032126	0.083294				0.054	
	0.11634	0.032291	0.084049				0.054	
3BA 4:10	0.10374	0.0179	0.08584	0.08624	0.00065	0.7527	0.056	0.056
	0.10417	0.018392	0.085778				0.055	
	0.10476	0.018064	0.086696				0.056	
4BA 4:10	0.11341	0.02412	0.08929	0.08960	0.00087	0.9663	0.058	0.058
	0.11407	0.023487	0.090583				0.059	
	0.11418	0.025241	0.088939				0.058	
5BA 4:10	0.13093	0.01885	0.11208	0.11300	0.00155	1.3692	0.073	0.073
	0.13286	0.01877	0.11409				0.074	
	0.13431	0.022408	0.111902				0.073	
6BA 3:10	0.10233	0.017302	0.085028	0.08332	0.00167	2.0001	0.073	0.072
	0.10275	0.019526	0.083224				0.072	
	0.10223	0.020531	0.081699				0.070	
7BA 1:10	0.063318	-0.021499	0.084817	0.08656	0.00269	3.1126	0.153	0.157
	0.062382	-0.022826	0.085208				0.154	
	0.066354	-0.023313	0.089667				0.165	

Tablas 21 Resultados de absorbancia y su conversión a unidades de concentración (mg/cm²) correspondiente al análisis FA.

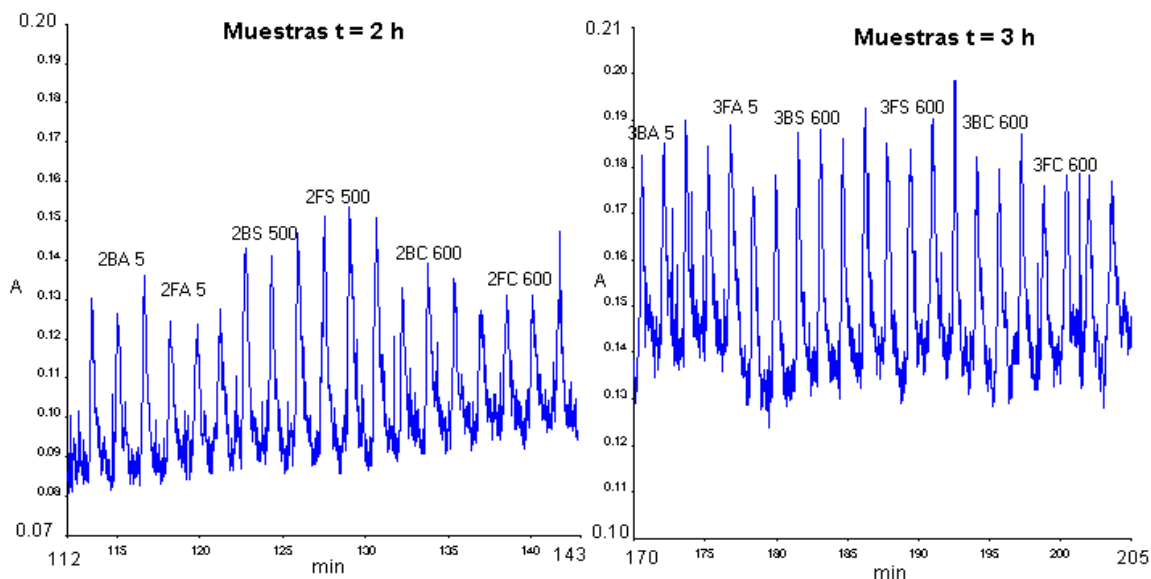
Papa Los Mochis "Agua" (FA)								
Etiqueta/ dilución	Absorbancia			\bar{x}	S	%CV	Asparagina	
	h máx	h mín	x_i				mg/cm ²	\bar{x}
1FA 3:10	0.10177	0.021029	0.080741	0.08345	0.00153	1.8304	0.070	0.072
	0.10347	0.018945	0.084525				0.073	
	0.10497	0.022605	0.082365				0.071	
2FA 3:10	0.11373	0.030774	0.082956	0.08130	0.00150	1.8399	0.072	0.070
	0.11069	0.029808	0.080882				0.070	
	0.11335	0.033298	0.080052				0.069	
3FA 3:10	0.10432	0.017685	0.086635	0.08606	0.00030	0.3443	0.075	0.074
	0.10568	0.019827	0.085853				0.074	
	0.10818	0.021908	0.086272				0.074	
4FA 3:10	0.11199	0.023688	0.088302	0.08933	0.00090	1.0077	0.076	0.077
	0.11346	0.023243	0.090217				0.078	
	0.11392	0.023984	0.089936				0.078	
	0.11207	0.023209	0.088861				0.077	
5FA 4:10	0.133	0.024024	0.108976	0.11073	0.00158	1.4287	0.071	0.072
	0.13434	0.022294	0.112046				0.073	
	0.13594	0.024766	0.111174				0.072	
6FA 3:10	0.12913	0.015835	0.113295	0.11104	0.00278	2.5010	0.098	0.096
	0.13034	0.0224	0.10794				0.093	
	0.13097	0.019075	0.111895				0.097	
7FA 1:10	0.083181	-0.019071	0.102252	0.10089	0.00129	1.2776	0.198	0.194
	0.078361	-0.02133	0.099691				0.191	
	0.079178	-0.021538	0.100716				0.194	

4.2 Proceso optimizado, separación por filtración

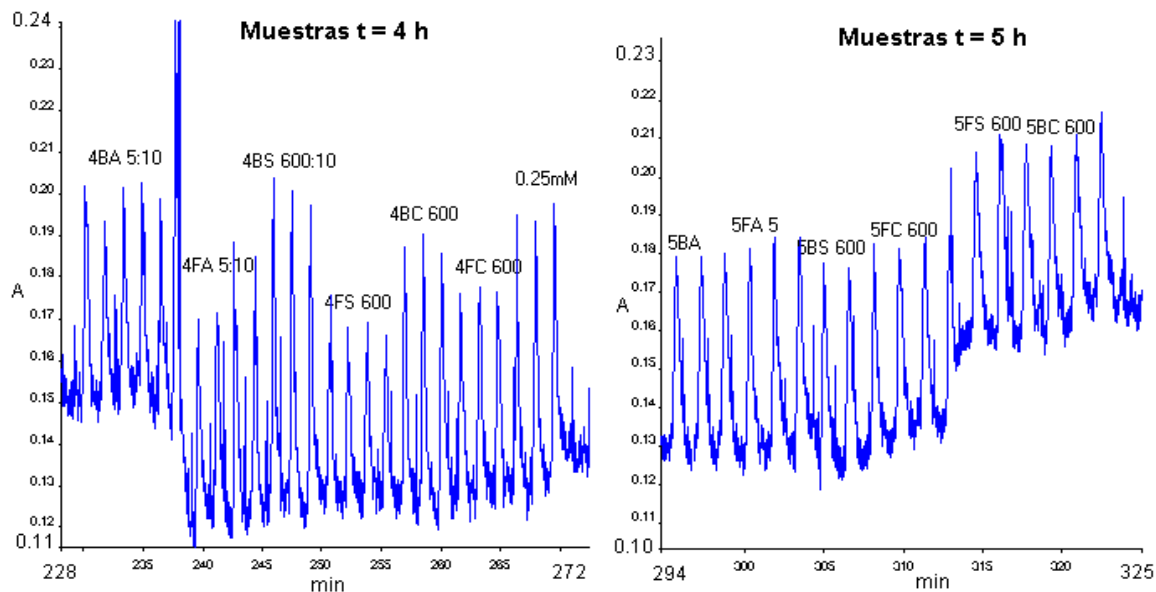
- Desglose del diagrama global (figura 4.14, Capítulo IV, página 81)



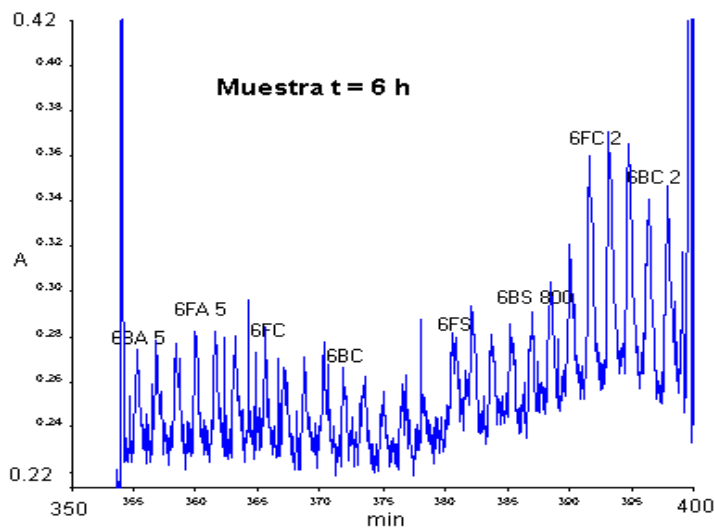
Figurama 6 Primera sección del figurama global, correspondiente a la inyección de los estándares, muestras al $t = 0$ de forma intercalada y posteriormente las muestras al $t = 1$ h.



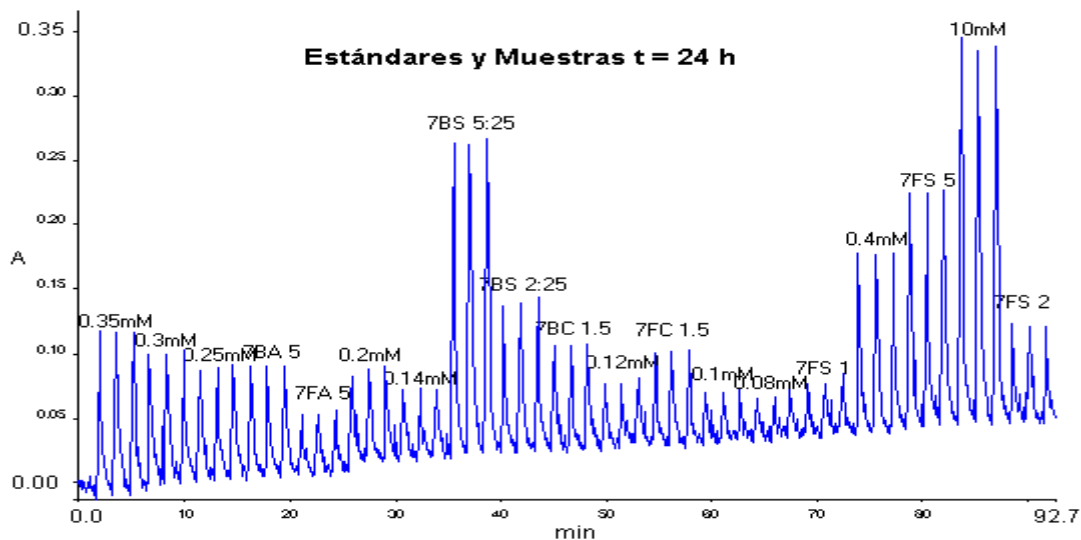
Figurama 7 Segunda sección del figurama global, correspondiente a la inyección de las muestras al $t = 2$ h y al $t = 3$ h, eliminando el tiempo en que no se inyectaron muestras.



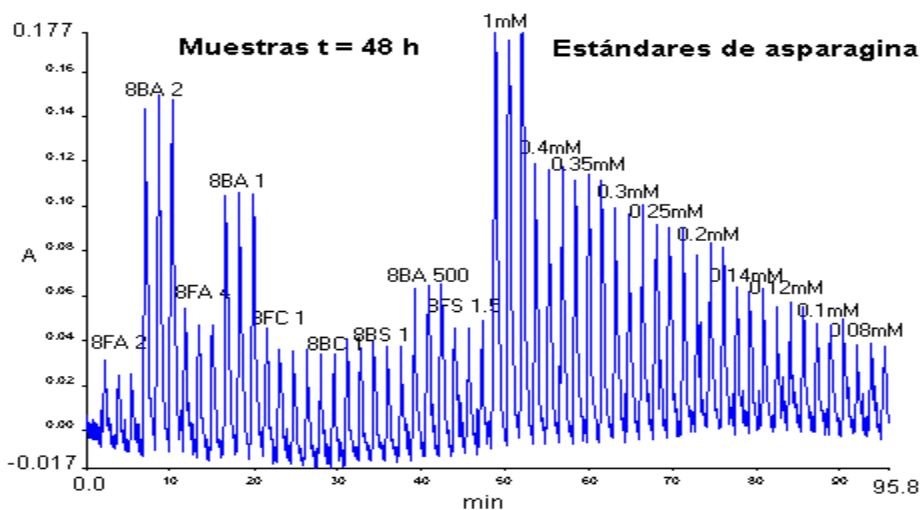
Figurama 8 Tercera sección del figurama global, correspondiente a la inyección de las muestras al t = 4 h y al t = 5 h, eliminando el tiempo en que no se inyectaron muestras.



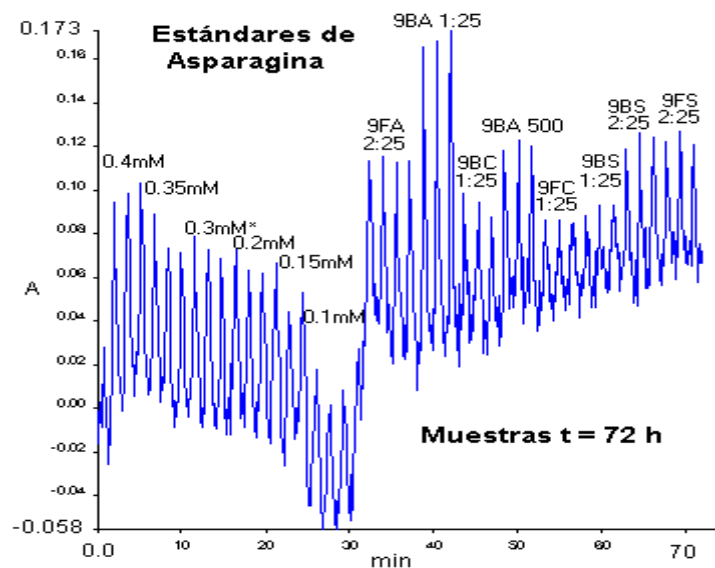
Figurama 8 Cuarta sección del figurama global, correspondiente a la inyección de las muestras al t = 6 h.



Figurama 9 Inyección de las muestras y estándares, de manera alternada al t = 24 h. Donde se observa que algunas muestras (7BS y 7FS), sobrepasan la señal obtenida para el estándar de concentración más alta, por lo que se tuvo que realizar una mayor dilución de dicho extracto de papa.



Figurama 10 Correspondiente a la inyección de las muestras y posteriormente los estándares, al t = 48 h. Donde se observa que algunas muestras (8BA 2 y 8BA 1), sobrepasan la señal obtenida para el estándar de concentración más alta, por lo que se tuvo que realizar una mayor dilución de dicho extracto de papa.

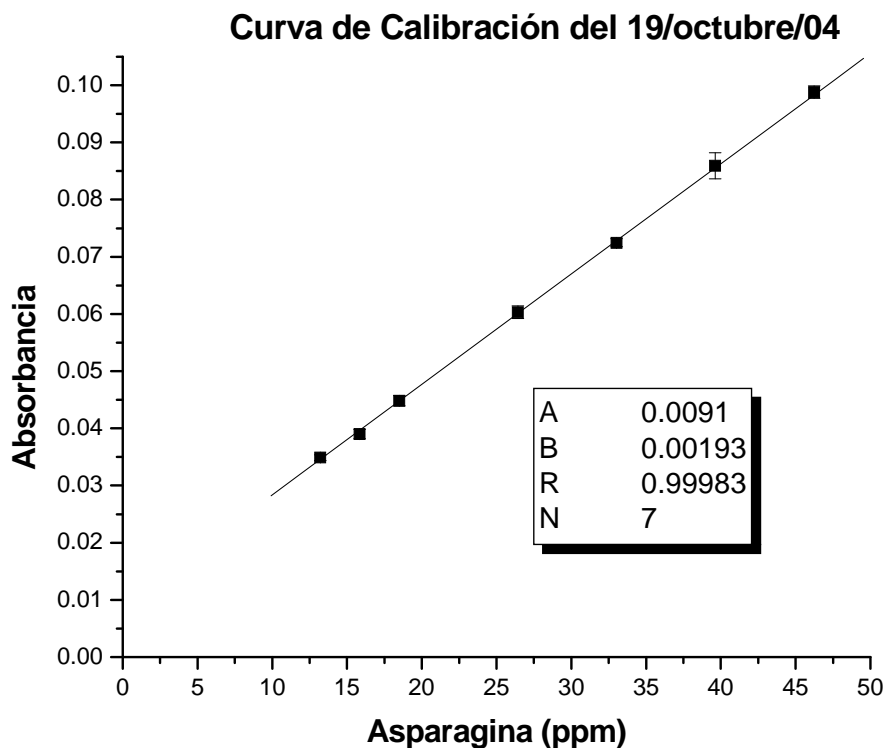


Figurama 11 Corresponiente a la inyección de los estándares y posteriormente las muestras, al t = 72 h. Donde se observa que la muestra 9BA 1:25, sobrepasa la señal obtenida para el estándar de concentración más alta, por lo que se tuvo que realizar una mayor dilución de dicho extracto de papa.

• **Curvas de calibración**

Tablas 22 Resultados de absorbancia al inyectar los estándares de Asparagina y la construcción de la curva de calibración para $t=0$ y $t=1$ a $t=6$ horas

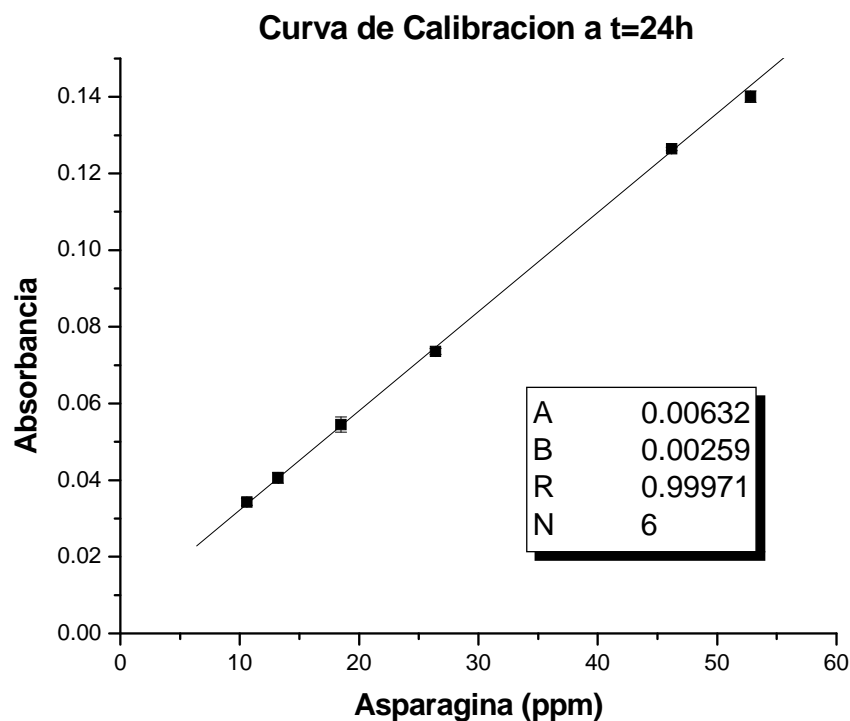
Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
46	0.35	0.10103	0.0022584	0.098772	0.0988	0.0011	1.10
40	0.30	0.1016	0.014526	0.087074	0.0859	0.0023	2.66
33	0.25	0.087661	0.015986	0.071675	0.0725	0.0007	0.94
26	0.20	0.077296	0.018255	0.059041	0.0603	0.0011	1.86
18	0.14	0.068208	0.02276	0.045448	0.0448	0.00090	2.02
16	0.12	0.06014	0.020936	0.039204	0.0390	0.0008	2.10
13	0.10	0.05852	0.023143	0.035377	0.0349	0.0005	1.43



Gráfica 7 Curva de calibración correspondiente al tiempo cero y las primeras seis horas de análisis, que abarca la muestra 0 al 6.

Tablas 23 Resultados de absorbancia al inyectar los estándares de Asparagina y la construcción de la curva de calibración para t=24 horas (muestra #7)

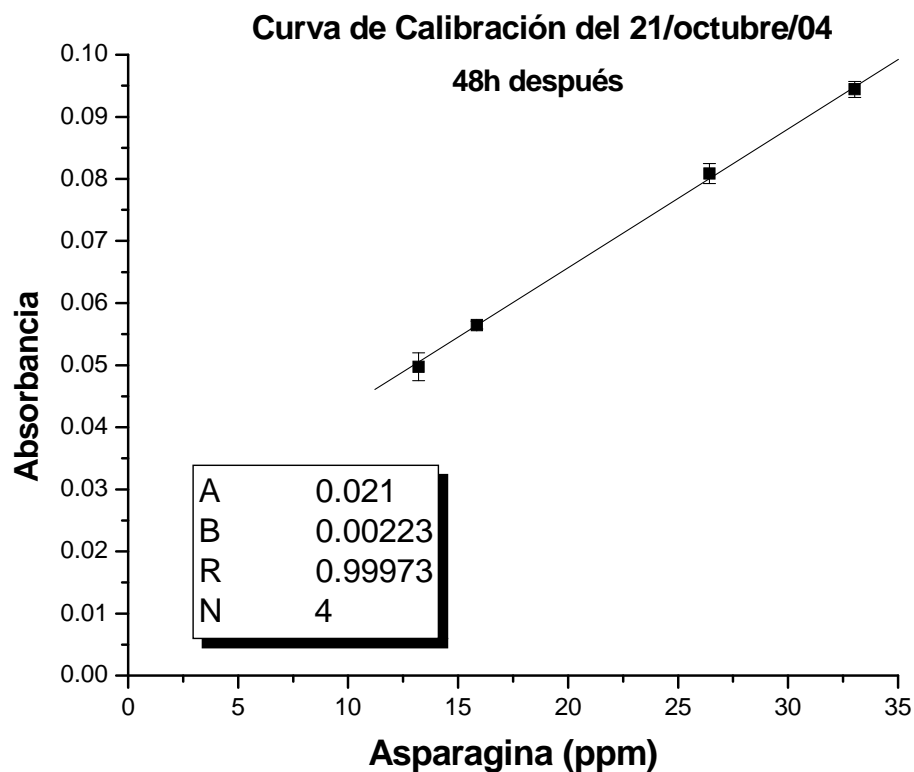
Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
53	0.4	0.17794	0.03688	0.14106	0.1401	0.0015	1.07
46	0.35	0.11716	-0.0097357	0.126896	0.1264	0.0005	0.37
40	0.30	0.10033	-0.0030849	0.103415	0.1025	0.0016	1.55
33	0.25	0.087098	0.00031878	0.086779	0.0877	0.0008	0.94
26	0.20	0.082296	0.0086568	0.073639	0.0736	0.0008	1.03
18	0.15	0.07204	0.017052	0.054988	0.0544763	0.0020	3.63
13	0.10	0.069942	0.02797	0.041972	0.0406	0.0014	3.52
11	0.08	0.065288	0.03183	0.033458	0.0343	0.0009	2.68



Gráfica 8 Curva de calibración correspondiente a los datos obtenidos para las muestras No.7, correspondientes al t =24 horas.

Tablas 24 Resultados de absorbancia al inyectar los estándares de Asparagina y la construcción de la curva de calibración para t=48 horas (muestra #8)

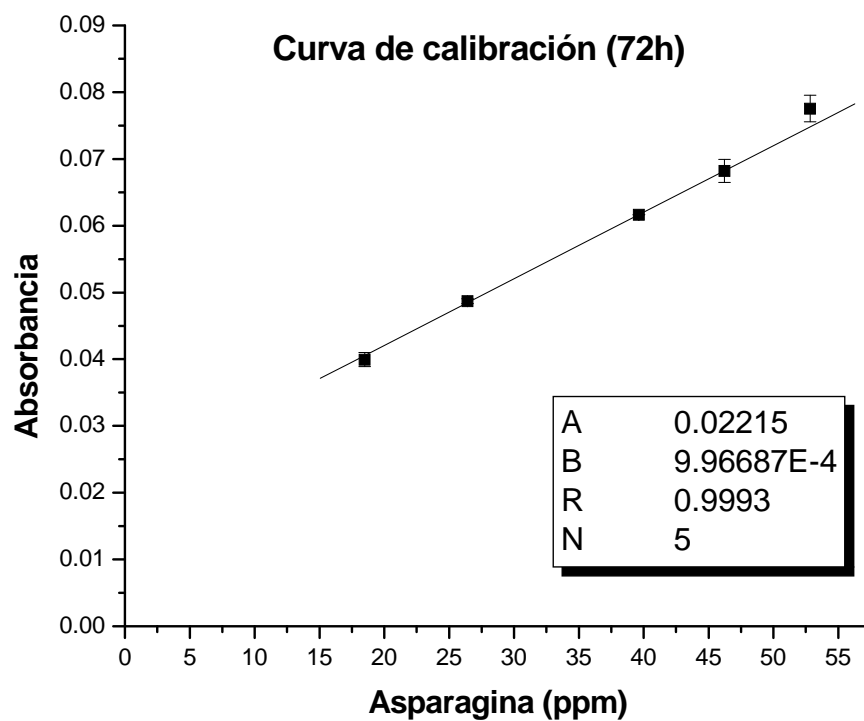
Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
33	0.25	0.091794	-0.004106	0.0959	0.0944	0.0013	1.36
26	0.20	0.078264	-0.00089211	0.079156	0.0808	0.0016	1.99
16	0.12	0.055024	-0.0013151	0.056339	0.0564	0.0006	1.14
13	0.10	0.04745	-0.00064286	0.048093	0.0497	0.0022	4.51
11	0.08	0.038593	-0.0014027	0.039996	0.0411	0.0010	2.52



Gráfica 9 Curva de calibración correspondiente a los datos obtenidos al t =48 horas, es decir para las muestras No. 8.

Tablas 25 Resultados de absorbancia al inyectar los estándares de Asparagina y la construcción de la curva de calibración para t=72 horas (muestra #8)

Asn (ppm)	Asn (mM)	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV
53	0.40	0.14895	0.07283	0.07612	0.0775	0.0020	2.6
46	0.35	0.14947	0.08249	0.06698	0.0682	0.0017	2.5
40	0.30	0.14871	0.08707	0.06165	0.0616	0.00000	0.0
33	0.25	0.13089	0.08145	0.04944	0.05083	0.00197	3.9
26	0.20	0.12844	0.07951	0.04893	0.04868	0.00035	0.7
18	0.14	0.11636	0.07583	0.04053	0.03993	0.00105	2.6
13	0.10	0.11615	0.07523	0.04092	0.04228	0.00124	2.9



Gráfica 10 Curva de calibración correspondiente a los datos obtenidos al t =72 horas (muestras No. 9)

• **Asparagina en tejido**

Tabla 26 Resultados obtenidos para la papa Alpha BS, durante el experimento de 72 horas.

Papa Alpha "sin agua"										
Muestra (g)	Etiqueta/dilución	Absorbancia					S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{x}
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}					
11.765	Bo 500:10	0.0683	0.0043098	0.0639902	0.06409	0.00165	2.57	2417.38	2421.71	
		0.070442	0.0059532	0.0644888				2439.34		
		0.069582	0.0036537	0.0659283				2502.74		
		0.069243	0.0072967	0.0619463				2327.37		
11.6069	1BS 500:10	0.11374	0.063717	0.050023	0.05113	0.00120	2.36	1826.81	1876.44	
		0.11384	0.061426	0.052414				1933.55		
		0.11535	0.064383	0.050967				1868.95		
12.0551	2BS 500:10	0.16792	0.11105	0.05687	0.05554	0.00189	3.40	2053.18	1996.02	
		0.16614	0.11276	0.05338				1903.18		
		0.17174	0.11537	0.05637				2031.69		
11.2529	3BS 600	0.18722	0.12851	0.05871	0.05819	0.00172	2.95	1903.56	1883.61	
		0.18799	0.1307	0.05729				1849.07		
		0.18612	0.1297	0.05642				1815.69		
		0.19283	0.13249	0.06034				1966.10		
13.0849	4BS 600	0.19936	0.12001	0.07935	0.07850	0.00075	0.96	2318.13	2290.19	
		0.20071	0.12246	0.07825				2281.83		
		0.19762	0.11971	0.07791				2270.61		
12.5598	5BS 100:10	0.17778	0.11861	0.05917	0.05798	0.00219	3.78	1721.30	1680.39	
		0.17653	0.12108	0.05545				1593.41		
		0.18284	0.12352	0.05932				1726.46		
12.3809	6BS 800:10	0.291	0.23449	0.05651	0.05753	0.00088	1.53	1240.05	1266.65	
		0.30393	0.24586	0.05807				1280.86		
		0.3155	0.2575	0.058				1279.03		
12.1443	7BS 2:25	0.13697	0.022718	0.114252	0.11691	0.00243	2.08	2144.66	2197.45	
		0.1397	0.022236	0.117464				2208.48		
		0.14345	0.024439	0.119011				2239.22		
12.6449	8BS 1:25	0.036521	-0.013623	0.050144	0.05154	0.00130	2.52	1291.93	1354.00	
		0.039377	-0.013817	0.053194				1427.13		
		0.037008	-0.01399	0.050998				1329.79		
		0.037291	-0.01455	0.051841				1367.16		
13.1651	9BS 1:25	0.080909	0.041774	0.039135	0.04034	0.00120	2.97	1617.54	1732.30	
		0.092113	0.050579	0.041534				1846.01		
		0.09361	0.053259	0.040351				1733.35		

Tabla 27 Resultados obtenidos en unidades de concentración para la papa Alpha BC, durante el experimento de 72h

Papa Alpha "con agua"									
Muestra (g)	Etiqueta/dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn mg/cm ²	\bar{x}
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}				
12.6237	1BC 500:10	0.12747	0.071783	0.055687	0.05382	0.00182	3.39	1912.14	1835.69
		0.12305	0.071004	0.052046				1762.70	
		0.12715	0.07341	0.05374				1832.23	
13.0286	2BC 600:10	0.15795	0.11368	0.04427	0.04438	0.00031	0.71	1165.56	1169.10
		0.1593	0.11517	0.04413				1160.92	
		0.16016	0.11543	0.04473				1180.81	
13.8677	3BC 600:10	0.1822	0.13084	0.05136	0.05084	0.00099	1.94	1315.79	1299.60
		0.17996	0.1285	0.05146				1318.90	
		0.18701	0.13731	0.0497				1264.10	
13.1445	4BC 600:10	0.18766	0.12223	0.06543	0.06728	0.00226	3.36	1850.36	1911.02
		0.19033	0.12053	0.0698				1993.91	
		0.18586	0.11926	0.0666				1888.80	
12.7797	5BC 600:10	0.20835	0.15388	0.05447	0.05477	0.00055	1.01	1532.88	1543.13
		0.21105	0.15564	0.05541				1564.64	
		0.21677	0.16233	0.05444				1531.87	
12.1224	6BC 2:10	0.34089	0.25727	0.08362	0.08579	0.00306	3.57	796.28	819.42
		0.34676	0.25881	0.08795				842.55	
13.5746	7BC 1.5:25	0.10609	0.02447	0.08162	0.08233	0.00073	0.89	1784.79	1801.53
		0.10603	0.022948	0.083082				1819.44	
		0.10711	0.024833	0.082277				1800.36	
13.3607	8BC 1:25	0.034167	-0.016842	0.051009	0.05186	0.00134	2.58	1259.01	1294.58
		0.034118	-0.017047	0.051165				1265.55	
		0.040661	-0.012736	0.053397				1359.19	
12.5243	9BC 1:25	0.09441	0.029576	0.064834	0.06428	0.00079	1.22	4272.94	4217.33
		0.08808	0.024357	0.063723				4161.72	

Tabla 28 Resultados obtenidos en unidades de concentración para la papa Los Mochis FS, durante el experimento de 72h.

Papa Los Mochis "Sin agua"									
Muestra (g)	Etiqueta/dilución	Absorbancia						Asn (mg/kg)	\bar{x}
		h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV		
12.101	Fo 500:10	0.062405	0.0091739	0.0532311	0.05445	0.00259	4.76	1889.58	1941.86
		0.061089	0.008395	0.052694				1866.59	
		0.070771	0.01334	0.057431				2069.41	
13.6732	1FS 500:10	0.13892	0.069486	0.069434	0.06789	0.00137	2.03	2286.31	2227.81
		0.1361	0.069303	0.066797				2186.38	
		0.13663	0.06919	0.06744				2210.75	
13.1131	2FS 500:10	0.17628	0.11221	0.06407	0.06360	0.00082	1.29	2172.02	2153.31
		0.17881	0.11616	0.06265				2115.91	
		0.17554	0.11147	0.06407				2172.02	
12.8836	3FS 600:10	0.18507	0.13401	0.05106	0.05078	0.00033	0.66	1406.24	1396.86
		0.18399	0.13312	0.05087				1399.87	
		0.19045	0.14004	0.05041				1384.46	
12.6763	4FS 600:10	0.16428	0.12323	0.04105	0.04238	0.00116	2.74	1088.28	1133.69
		0.16796	0.12479	0.04317				1160.49	
		0.16905	0.12612	0.04293				1152.31	
12.4995	5FS 600:10	0.20641	0.15503	0.05138	0.05245	0.00143	2.73	1460.51	1497.58
		0.20694	0.15504	0.0519				1478.47	
		0.20871	0.15463	0.05408				1553.78	
13.7606	6FS 600:10	0.28154	0.23765	0.04389	0.04445	0.00077	1.74	1091.64	1109.29
		0.29384	0.25006	0.04378				1088.19	
		0.28101	0.23558	0.04543				1139.96	
		0.28583	0.24112	0.04471				1117.37	
12.9749	7FS 5:25	0.22407	0.041645	0.182425	0.18194	0.00047	0.26	1310.11	1299.94
		0.22479	0.04287	0.18192				1306.35	
		0.22664	0.04516	0.18148				1303.08	
	7FS 2:25	0.12321	0.045097	0.078113	0.07586	0.00254	3.35	1335.24	
		0.12058	0.047479	0.073101				1242.02	
13.6328	8FS 1.5:25	0.045911	-0.011621	0.057532	0.05747	0.00129	2.24	1001.39	999.74
		0.045741	-0.010413	0.056154				963.62	
		0.04889	-0.0098394	0.0587294				1034.21	
12.7921	9FS 2:25	0.12199	0.068604	0.053386	0.05470	0.00134	2.45	1530.73	1595.20
		0.12813	0.073481	0.054649				1592.62	
		0.12129	0.06522	0.05607				1662.26	

Tabla 29 Resultados obtenidos en unidades de concentración para la papa “Los Mochis” FC, durante el experimento de 72h.

Papa Los Mochis “Con agua										
”		Absorbancia								
Muestra (g)	Etiqueta/dilución	h máx	h mín	x_i	\bar{x}	S	%CV	Asn (mg/kg)	\bar{x}	
11.0207	1FC 500:10	0.12092	0.072976	0.047944	0.04657	0.00132	2.84	1826.24	1761.62	
		0.11837	0.071916	0.046454				1756.19		
		0.12289	0.077579	0.045311				1702.45		
12.9274	2FC 600:10	0.15191	0.1164	0.03551	0.03640	0.00079	2.17	882.10	911.83	
		0.15564	0.11896	0.03668				921.18		
		0.15581	0.1188	0.03701				932.20		
13.5214	3FC 600	0.17598	0.13562	0.04036	0.03919	0.00091	2.32	998.23	960.78	
		0.17812	0.13891	0.03921				961.50		
		0.17816	0.14001	0.03815				927.65		
		0.17712	0.13809	0.03903				955.75		
12.0407	4FC 600:10	0.17609	0.12208	0.05401	0.05383	0.00149	2.77	1610.47	1603.90	
		0.17767	0.12245	0.05522				1653.86		
		0.17675	0.1245	0.05225				1547.36		
13.4744	5FC 600:10	0.18145	0.12676	0.05469	0.05449	0.00077	1.41	1460.90	1494.53	
		0.18416	0.12902	0.05514				1475.32		
		0.18463	0.13099	0.05364				1427.26		
12.1091	6FC 600:10	0.27213	0.22581	0.04632	0.04810	0.00172	3.57	1327.17	1390.76	
		0.27085	0.2211	0.04975				1449.47		
		0.27772	0.22948	0.04824				1395.63		
13.3544	7FC 1.5:25	0.10122	0.028339	0.072881	0.07410	0.00159	2.14	1603.67	1632.92	
		0.10208	0.028567	0.073513				1618.89		
		0.10246	0.026569	0.075891				1676.19		
13.4852	8FC 1:25	0.035505	-0.014897	0.050402	0.05083	0.00084	1.64	1222.15	1240.12	
		0.035212	-0.015092	0.050304				1218.08		
		0.036221	-0.015576	0.051797				1280.14		
12.4444	9FC 1:25	0.086236	0.038294	0.047942	0.04710	0.00073	1.56	2598.52	2514.02	
		0.08621	0.039628	0.046582				2461.50		
		0.08632	0.039534	0.046786				2482.05		

• **Asparagina superficial**

Tabla 30 Resultados obtenidos para el agua que cubría las papas BC.

Agua de la papa Alpha (BA)								
Etiqueta/ dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn (mg/cm ²)	\bar{x}
	Máximo	Mínimo	x_i	\bar{x}				
1BA	0.16083	0.064857	0.095973	0.09809	0.00268	2.7280	0.038	0.0384
	0.15903	0.06182	0.09721				0.038	
	0.1619	0.060799	0.101101				0.040	
2BA 5:10	0.13031	0.083472	0.046838	0.04630	0.00099	2.1346	0.033	0.0321
	0.1266	0.081445	0.045155				0.031	
	0.13355	0.086656	0.046894				0.033	
3BA 5:10	0.18255	0.12897	0.05358	0.05272	0.00186	3.5316	0.038	0.0377
	0.18515	0.13457	0.05058				0.036	
	0.19021	0.13622	0.05399				0.039	
4BA 5:10	0.20193	0.14615	0.05578	0.05485	0.00082	1.4920	0.040	0.0395
	0.20169	0.14716	0.05453				0.039	
	0.20267	0.14843	0.05424				0.039	
5BA 5:10	0.1761	0.1238	0.0523	0.05170	0.00052	1.0006	0.037	0.0368
	0.17752	0.12609	0.05143				0.037	
	0.17748	0.1261	0.05138				0.037	
6BA 5:10	0.27474	0.22342	0.05132	0.05191	0.00185	3.5582	0.036	0.0370
	0.27822	0.22779	0.05043				0.036	
	0.27691	0.22293	0.05398				0.039	
7BA 5:25	0.089792	0.0021098	0.0876822	0.08686	0.00084	0.9617	0.131	0.1296
	0.090462	0.00445	0.086012				0.128	
	0.090108	0.0032261	0.0868819				0.130	
8BA 500:25	0.062832	-0.013931	0.076763	0.07668	0.00027	0.3549	1.042	1.0404
	0.064732	-0.011644	0.076376				1.035	
	0.065021	-0.01188	0.076901				1.044	
9BA 500:25	0.11825	0.032703	0.085547	0.08173	0.00393	4.8119	2.649	2.4901
	0.12302	0.045329	0.077691				2.321	
	0.12049	0.03853	0.08196				2.500	

Tabla 31 Resultados obtenidos para el agua que cubría las papa FC.

Agua de la papa Los Mochis (FA)								
Etiqueta/ Dilución	Absorbancia				S	%CV	Asn mg/cm ²	\bar{x}
	Máximo	Mínimo	x_i	\bar{x}				
1FA 5:10	0.12047	0.067226	0.053244	0.05474	0.00137	2.4977	0.038	0.039
	0.12487	0.068942	0.055928				0.040	
	0.12528	0.070242	0.055038				0.040	
2FA 5:10	0.12456	0.084898	0.039662	0.03934	0.00067	1.6968	0.026	0.026
	0.12367	0.083889	0.039781				0.026	
	0.15234	0.11377	0.03857				0.025	
3FA 5:10	0.18445	0.1382	0.04625	0.04770	0.00129	2.7047	0.032	0.033
	0.18911	0.14019	0.04892				0.034	
	0.17568	0.1287	0.04698				0.033	
	0.17826	0.12962	0.04864				0.034	
4FA 5:10	0.17011	0.11423	0.05588	0.05414	0.00220	4.0625	0.040	0.0389
	0.17155	0.11988	0.05167				0.037	
	0.17214	0.11726	0.05488				0.040	
5FA 5:10	0.18172	0.1225	0.05922	0.06034	0.00097	1.6088	0.043	0.044
	0.18454	0.1236	0.06094				0.045	
	0.18435	0.12349	0.06086				0.045	
6FA 5:10	0.2828	0.22752	0.05528	0.05543	0.00199	3.5979	0.040	0.040
	0.28198	0.22448	0.0575				0.042	
	0.27956	0.22604	0.05352				0.038	
7FA 5:25	0.053098	0.006142	0.046956	0.04916	0.00216	4.4014	0.065	0.0689
	0.053321	0.0040822	0.0492388				0.069	
	0.05663	0.0053489	0.0512811				0.072	
8FA 4:25	0.054492	-0.010079	0.064571	0.06158	0.00270	4.3914	0.102	0.0948
	0.046927	-0.012384	0.059311				0.089	
	0.046752	-0.0141	0.060852				0.093	
9FA 2:25	0.13426	0.038396	0.095864	0.09295	0.00261	2.8061	0.770	0.740
	0.11285	0.02068	0.09217				0.732	
	0.11334	0.022513	0.090827				0.718	