



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN ENZIMÁTICA DE L-GLUTAMATO
MONOSÓDICO POR FIA**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SALMA DANIELA GONZÁLEZ MORALES

MÉXICO, D.F., AÑO 2015





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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Humberto Ramón Gómez Ruíz

VOCAL: Hugo Rubén Carreño Ortíz

SECRETARIO: Rodolfo Fonseca Larios

1° SUPLENTE: Silvia Citlalli Gama González

2° SUPLENTE: Lucía Hernández Garciadiego

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química, UNAM.
Departamento de Química Analítica, DEPg, Laboratorio 108.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruíz

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Lucía Hernández Garciadiego

SUSTENTANTE:

Salma Daniela González Morales

INTRODUCCIÓN

El análisis por inyección en flujo (FIA: Flow Injection Analysis) es una técnica de análisis que consiste en la inyección de un volumen de muestra establecido a un flujo portador; el analito podrá ser cuantificado directa o indirectamente de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas o bien mediante una reacción para obtener derivados detectables en el sistema de detección acoplado. El sistema permite el análisis de numerosas muestras sin riesgo de contaminación entre una y otra, debido a un flujo intermedio del portador que las separará y permitirá su análisis individual ^[11].

El L-glutamato monosódico (GMS) es la sal sódica del ácido glutámico, aislado por primera vez en 1907 por Kikunae Ikeda a partir del alga *Luminariaceae*. Esta sal es responsable del sabor umami (característico de las notas cárnicas, vegetales y saladas) cuando se encuentra libre y en su forma de L-glutamato; es decir, sin unión a proteínas, y que se puede encontrar en forma natural en numerosos productos alimenticios como algunos vegetales, carnes y productos marinos, en los que se incrementa su liberación mediante un proceso de cocción y/o fermentación ^[25]. Está clasificado por el Codex Alimentarius como potenciador de sabor; se trata de un aditivo no nutritivo utilizado regularmente en concentraciones de 0.1 a 0.8%, concentración aproximada a como es encontrado en forma natural en los alimentos. Hay referencia de su uso simultáneamente con los nucleótidos-5', en concreto con el 5'-monoguanilato disódico (GMP) y el 5'-monoinosinato disódico (IMP) debido al efecto sinérgico que presentan al potenciar el sabor umami e incrementar la aceptabilidad del alimento ^[44].

En algunos medios de comunicación no especializados, al consumo de GMS se le atribuye **desórdenes de la salud como el "síndrome del**

restaurante chino" y posible daño neuronal, pero sin evidencia probatoria.

No existen métodos para la determinación de GMS en alimentos en la Normatividad Mexicana y difícilmente se encuentran en registros internacionales, por lo que el objetivo de la presente investigación es proponer un sistema para la determinación de GMS mediante el método FIA, con la incorporación de un reactor enzimático en el que la enzima L-glutamato oxidasa oxidará al GMS para obtener amoníaco, permitiendo determinar indirectamente su concentración en una amplia gama de muestras de alimentos.

OBJETIVO GENERAL

Proponer un método analítico preciso, confiable, reproducible y que permita determinar la concentración de L-Glutamato monosódico (GMS) en muestras de alimentos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo esta determinación.
- Identificar posibles interferencias presentes en las muestras de alimentos seleccionadas.
- Determinar la concentración de GMS en diferentes muestras de alimentos, en cuya etiqueta se declara la presencia de GMS como aditivo alimentario.

ABREVIATURAS

- **AOAC:** Association of Official Analytical Chemists.
- **BPF:** Buenas Prácticas de Fabricación.
- **CDG:** Celda de Difusión de Gases.
- **COFEPRIS:** Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.
- **CPG:** Controlled Pore Glass (Vidrio de Poro Controlado).
- **FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).
- **FIA:** Flow Injection Analysis (Análisis por Inyección en Flujo).
- **GMS:** L-Glutamato monosódico.
- **IDA:** Ingesta Diaria Admisible.
- **JECFA:** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.
- **OMS/WHO:** Organización Mundial de la Salud/ World Health Organization.
- **RE:** Reactor Enzimático.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Análisis por inyección en flujo (FIA) ^[11, 38]	1
1.1.1 Métodos de flujo continuo	1
1.1.2 Esquema general	2
1.1.4 Componentes básicos en FIA	5
1.1.5 Dispersión	7
1.1.5.1 Tipos de dispersión	7
1.1.5.2 Factores que afectan la dispersión	8
1.2 L-Glutamato monosódico (GMS) (ANEXO I)	9
1.2.1 Historia ^[39]	9
1.2.2 Métodos de obtención de GMS ^[39]	10
1.2.3 Identidad y pureza ^[18, 23]	13
1.2.4 Importancia y aplicaciones	14
1.2.5 Estudios toxicológicos ^[20, 22, 44]	15
1.2.6 Legislación	17
1.3 Enzimas ^[9]	19
1.3.1 Tipos de enzimas	19
1.3.1.1 L-Glutamato oxidasa ^[10]	20
1.3.2 Inmovilización de enzimas ^[4, 27]	21
1.3.2.1 Unión a soportes ^[4]	21
1.3.2.2 Unión covalente ^[4]	21
1.3.2.3 Etapas para la inmovilización de una enzima ^[27]	23
1.4 Método oficial para la determinación de GMS en alimentos ^[1, 34]	24
1.5 Determinación de GMS por FIA.....	25
1.5.1 Principio del método ^[5]	25
1.5.2.1 Celda de difusión de gases ^[7, 38]	27
1.5.2.2 Reactor enzimático ^[43]	28

1.5.3 Validación del método ^[42]	29
1.5.3.1 Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal ^[32]	29
1.5.3.2 Eficiencia de la enzima	30
1.5.3.3 Precisión y exactitud ^[36]	31
1.5.3.4 Robustez ^[37]	33
1.5.4 Gráficas de control ^[32]	33

CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....35

2.1 Equipo y material	35
2.2 Reactivos y disoluciones.	36
2.2.1 Inmovilización de la enzima.....	36
2.2.2 Determinación enzimática de GMS.	36
2.3 Tratamiento de muestras	37
2.4 Desarrollo de la metodología FIA utilizada para la determinación de GMS.....	38
2.4.1 Optimización del método.....	38
2.4.2.1 Eficiencia de la enzima	39
2.4.2.2 Precisión y exactitud	39
2.4.2.3 Robustez	40
2.4.3 Análisis de muestras.....	41
2.4.3.1 Gráficas de control.....	44

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS ..45

3.1 Inmovilización de la enzima	45
3.2 Desarrollo de la metodología FIA utilizada para la determinación de GMS.....	45
3.2.2 Validación del método.....	46
3.2.2.1 Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal.....	46
3.2.2.2 Eficiencia de la enzima	50

3.2.2.3 Precisión y exactitud	52
3.2.2.4 Robustez	59
3.2.3 Análisis de muestras.....	61
3.2.3.1 Gráficas de control.....	67
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS.....	79

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 Análisis por inyección en flujo (FIA) [11, 38]

FIA (Flow Injection Analysis) es una forma versátil, flexible y de bajo costo para realizar múltiples operaciones analíticas con un alto grado de precisión y exactitud, aunado al ahorro de tiempo. Su uso se ha extendido en ramos como farmacia y alimentos y ofrece ventajas por encima de los análisis discontinuos en discreto. Es compatible con detectores diversos, lo que lo convierte en una técnica altamente versátil e idónea para la automatización de determinaciones analíticas.

1.1.1 Métodos de flujo continuo

Este tipo de métodos son aplicados a procedimientos analíticos en los que la concentración del analito es medida sin detener el flujo. Las muestras se inyectan sucesivamente, en intervalos regulares, a un canal a través del cual fluye el portador; el flujo pasa a través de canales auxiliares que confluyen con el flujo principal. El flujo resultante circula a través de la unidad de detección y después al desecho. Las características de la señal resultante dependen del analito y son proporcionales a su concentración. Hay dos tipos de métodos de flujo continuo (Fig. 1.1.1):

- 1) Flujo segmentado (SFA: Segmented Flow Analysis): las muestras se aspiran secuencialmente y el flujo es segmentado por burbujas de aire que son succionadas del flujo antes de llegar al detector.
- 2) Flujo no segmentado (FIA: Flow Injection Analysis): la muestra se inyecta en lugar de ser aspirada y no se alcanza el equilibrio físico ni químico en el tiempo en que se produce la señal.

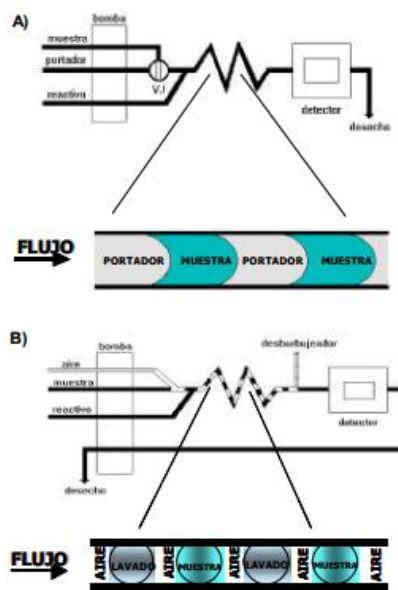


Fig. 1.1.1 A) FIA; B) SFA

1.1.2 Esquema general

El término FIA fue acuñado por Ruzicka y Hansen en 1975. Su diseño permite el análisis de muestras inyectadas manual o automáticamente. Las principales características de FIA son las siguientes:

- 1) El flujo no se segmenta por burbujas de aire.
- 2) La muestra se inyecta directamente en el flujo.
- 3) Mientras la muestra es transportada a lo largo del sistema, puede ocurrir adicionalmente algún proceso fisicoquímico adicional (reacción química, por ejemplo).
- 4) La dispersión parcial del analito puede ser manipulada mediante el control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- 5) No se alcanza el equilibrio físico (que involucra la homogeneización de una parte del flujo) ni químico (reacción completa) mientras se registra la señal.

- 6) El tiempo de operación debe ser altamente reproducible debido a que las mediciones se hacen en condiciones de no-estabilidad y cualquier variación puede alterar los resultados.

1.1.3 Fiagrama

A las señales producidas a partir de la inyección de una muestra y el producto de la reacción, en su conjunto, se denomina **fiagrama** (Fig. 1.1.3) y son registradas en función del tiempo. Las propiedades medidas en cada señal son las siguientes (Fig. 1.1.2):

- 1) **Altura máxima (h)**: es proporcional a la concentración del analito en la muestra inyectada.
- 2) **Tiempo de residencia (T)**: se define como el periodo de tiempo transcurrido desde la inyección hasta que se obtiene la altura máxima de la señal. El **tiempo de viaje** (t_a) es el periodo de tiempo transcurrido desde la inyección hasta el inicio de la señal, es decir, hasta que se observa un incremento en la línea base.
- 3) **Tiempo de retorno (T')**: periodo de tiempo entre la aparición del máximo de señal y el regreso a la línea base.
- 4) **Ancho de pico (ΔT)**: intervalo entre el inicio de la señal y su retorno a la línea base. Es la medida de la dispersión del analito.

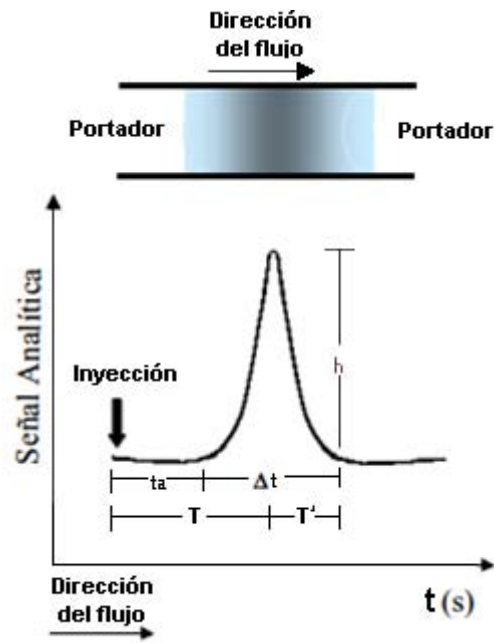


Fig. 1.1.3 Esquema de una señal FIA

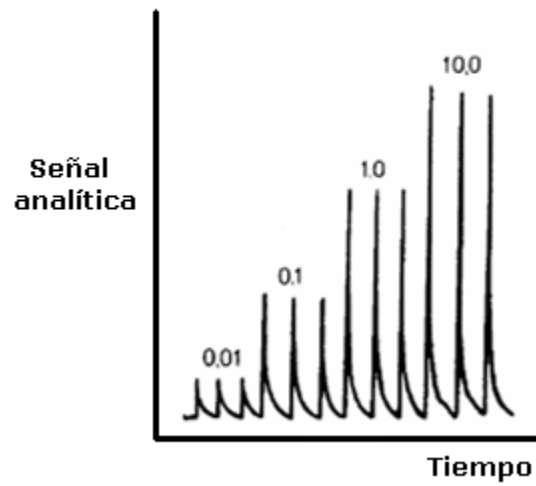


Fig. 1.1.3 Diagrama

1.1.4 Componentes básicos en FIA

Un sistema FIA elemental se compone de cuatro partes:

- 1) **Sistema propulsor:** su función es conducir al portador a través de las distintas unidades del sistema; debe permitir que el análisis sea perfectamente reproducible y se mantenga el flujo constante y regular.
 - **Bomba peristáltica:** consiste en una serie de cilindros rotatorios que presionan simultáneamente tuberías flexibles, produciendo un flujo uniforme y constante. Permite el control eficaz de la operación.
- 2) **Sistema de inyección:** Para introducir a la corriente del portador múltiples volúmenes de muestra de forma reproducible.
 - **Válvula de inyección:** la más común es la válvula giratoria de cuatro vías (Fig. 1.1.4). Cuando se encuentra en posición de llenado, la muestra entra por el puerto 2, llena el **loop** (gaza de muestra) entre 1 y 4 y sale al desecho por 3; el portador entra al sistema por 6 y sale por 5. En la posición de inyección, el puerto 6 (a través del que circula el portador) se conecta con 1, arrastrando la muestra al sistema a través de 4 y 5, mientras la muestra continúa entrando por 2 y saliendo al desecho por 3. Este tipo de válvula permite alta reproducibilidad en el volumen inyectado, un amplio intervalo de volúmenes de muestra, rapidez y facilidad de operación.

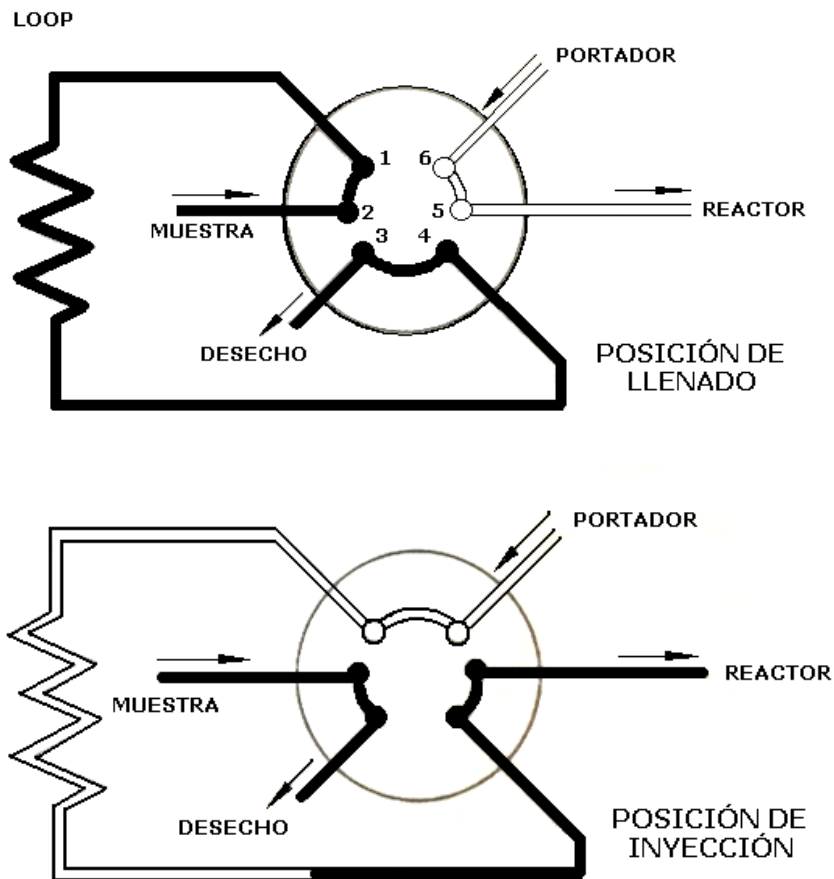


Fig. 1.1.4 Válvula giratoria de cuatro vías

- **Sistema de transporte:** Su función es interconectar los distintos elementos y lograr el grado deseado de dispersión. *Tuberías:* El diámetro interno más común es de 0.3, 0.5 y 0.7 mm para dispersión limitada, media o amplia. Los tubos están fabricados de materiales químicamente inertes y resistentes a altas temperaturas: por ejemplo, teflón, polietileno, polipropileno. La longitud de los tubos se selecciona con base en los requerimientos experimentales.
- 3) Sistema de detección:** para el registro continuo de la corriente del portador que genera una señal en este último caso.
- *Detectores espectrofotométricos:* son los más utilizados en FIA debido al gran número de especies que pueden ser registradas,

por las propiedades intrínsecas del analito o por los cambios producidos por la reacción llevada a cabo en el sistema. Particularmente, la fotometría es la técnica más aplicada en FIA por la amplia variedad de reacciones selectivas disponibles para cualquier compuesto o elemento, en que se produce un compuesto colorido. La sensibilidad de los instrumentos fotométricos se expresa como el menor coeficiente de absorción que pueden detectar (mUA). El ruido y la inestabilidad de la fuente de luz son los factores limitantes en estos métodos.

1.1.5 Dispersión

El término *dispersión* se refiere a la dilución del bolo de muestra en la disolución portadora o reactivo, ocasionada por las condiciones inherentes de la técnica. Debido a que el flujo a que el tipo de flujo a lo largo del sistema es de tipo laminar, el bolo de muestra no se mezcla con el portador.

1.1.5.1 Tipos de dispersión

Los sistemas FIA pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de dispersión, en tres grupos:

- 1) **Sistemas FIA de dispersión limitada:** se usan para medir parámetros del analito directamente, en ausencia de otros fenómenos además del transporte. Requieren un flujo mayor a 2 mL/min, volumen de muestra grande y diámetro y longitud pequeños de reactor.
- 2) **Sistemas FIA de dispersión media:** para procesos que involucran otros fenómenos además del transporte: reacciones químicas, por ejemplo. Se requiere el uso de tubos largos, flujos menores, múltiples canales y puntos de mezclado, entre otros. Usan normalmente detección fotométrica o fluorimétrica.

3) *Sistemas FIA de dispersión alta*: alto grado de mezclado entre portador y muestra. El tiempo de residencia es mayor y en algunos casos se alcanza el equilibrio.

1.1.5.2 Factores que afectan la dispersión

La dispersión en el sistema FIA es la suma de la dispersión de tres de sus componentes:

$$D = D_{Inyección} + D_{Transporte} + D_{Detector}$$

Donde (Fig. 1.1.5):

$D_{Inyección}$ = Dispersión debida al volumen de muestra y geometría del sistema (a).

$D_{Transporte}$ = Contribución de la geometría del reactor y el flujo (b).

$D_{Detector}$ = Contribución de la geometría de la celda de flujo a la dilución (c).

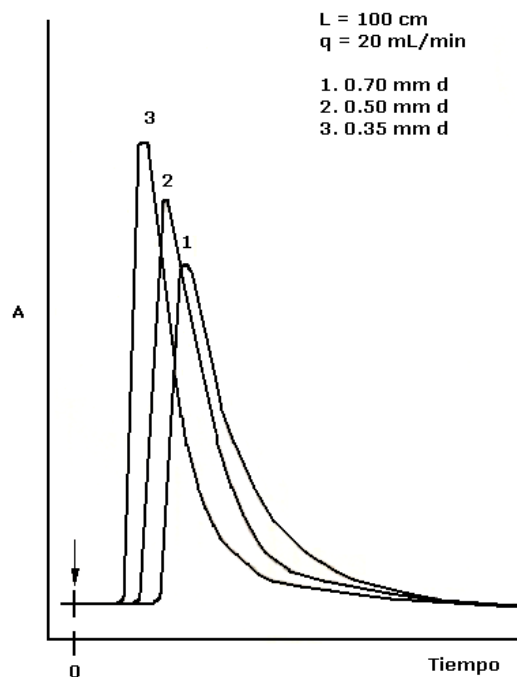


Fig. 1.1.5 Ejemplo de la dispersión producida por el cambio en el diámetro interno del reactor, donde: L=longitud del reactor, q=flujo.

Respecto a los reactores empacados, su comportamiento (τ) e influencia sobre la dispersión en el sistema FIA depende de su radio:

$$\tau = \frac{\text{Diámetro del tubo}}{\text{Diámetro de partícula}}$$

Para τ entre 5-50, la dispersión es proporcional al tamaño de partícula.

1.2 L-Glutamato monosódico (GMS) (ANEXO I)

El glutamato monosódico (GMS) (Fig. 1.2.1) es la sal sódica del ácido glutámico, aditivo utilizado ampliamente en la industria alimentaria como potenciador de sabor. Es el agente responsable del sabor *umami*, referido a las notas cárnicas y saladas percibidas en los alimentos ^[12].

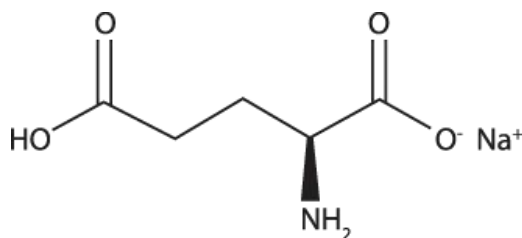


Fig. 1.2.1: Estructura química del L- glutamato monosódico (GMS)

1.2.1 Historia ^[39]

El GMS fue aislado por primera vez en 1907 por Kikunae Ikeda, profesor de la Tokyo Imperial University, a partir del alga *Luminariacea* y obteniendo la patente del mismo. Su investigación se basó en la existencia de un sabor que no podía ser clasificado dentro de los cuatro grupos básicos (dulce, salado, ácido y amargo), al que

llamó "umami" ("sabroso", en japonés); el componente o componentes responsables del sabor "umami" podía encontrarse y aislarse a partir de algas. En 1909, asociado con Saburosuke Susuki, comenzó a producir GMS de manera industrial para su comercialización y uso como sazonador, producto registrado con el nombre AJI-NO-MOTO®.

Para satisfacer la creciente demanda de GMS, comenzaron a utilizarse fuentes como gluten de trigo y frijoles de soya para su aislamiento, y conforme se popularizó su uso en la industria, se implementaron técnicas cada vez más eficientes para su producción.

1.2.2 Métodos de obtención de GMS [39]

Existen tres métodos principales para la obtención de GMS, y se describen a continuación:

- 1) **Extracción:** consiste en hidrólisis ácida de gluten. Debido a su poca rentabilidad y lo abrasivo y contaminante del método, se discontinuó su uso, además de que la demanda de GMS aumentó drásticamente después de la Segunda Guerra Mundial, con lo que este método era incapaz de producir las grandes cantidades de GMS que el mercado requería. El método consta de tres etapas: hidrólisis, aislamiento y purificación.
- **Hidrólisis:** como materia prima se utilizaba gluten de trigo, que era separado para transferirlo a contenedores de cerámica Domyoji-gane, altamente resistente a ácido y altas temperaturas. Después de la adición de ácido clorhídrico concentrado, se mezclaba y calentaba durante 20 horas para promover la hidrólisis del gluten. La proteína hidrolizada era **filtrada para eliminar el "humus"** (material residual oscuro) derivado de la reacción de Maillard, y se concentraba durante 24 horas. El concentrado obtenido era almacenado por un

periodo de un mes para permitir la cristalización del clorhidrato del ácido L-glutámico, que es poco soluble en ácido clorhídrico concentrado, lo que favorece su separación de la matriz del concentrado.

- **Aislamiento:** Los cristales de clorhidrato del ácido L-glutámico eran filtrados y disueltos en agua. El pH era ajustado con hidróxido de sodio o potasio a 3.2, punto isoeléctrico del ácido glutámico, para favorecer la precipitación del mismo; la mezcla se dejaba en reposo aproximadamente una semana para **permitir la cristalización del ácido glutámico en su forma α** . Existen dos polimorfismos en los cristales de ácido L-glutámico: **α y β , siendo la forma α más abundante y estable en disoluciones con otros aminoácidos presentes.**

- **Purificación:** Se disolvían los cristales de ácido L-glutámico en agua dentro de contenedores de acero. El pH se ajustaba a 7 con bicarbonato de sodio para promover la formación de la sal sódica del ácido L-glutámico. La mezcla resultante se decoloraba con carbón activado y se filtraba. El filtrado era concentrado para promover la cristalización del GMS, para después filtrarlo, secarlo y empacarlo, obteniendo cristales con una pureza del 85%.

2) **Síntesis química:** surgió por la necesidad de producir GMS a mayor escala. A partir de un proceso de oxigenación de acrilonitrilo (líquido utilizado para la fabricación de materiales plásticos y fibras textiles) con una mezcla de H_2-CO_2 (2:1) se obtiene 4-oxobutil-nitrilo, a partir del cual, por reacción de Strecker, se obtiene 2-amino pentano-dinitrilo. El 2-amino pentano-dinitrilo se hidrolizaba con hidróxido de sodio para sintetizar DL-glutamato disódico; el pH de la mezcla era

ajustado a 7 con ácido sulfúrico para producir ácido glutámico. Siendo indispensable la separación de los isómeros, se establecieron las condiciones individuales para las que los isómeros produjeran cristales de mayor tamaño, con el fin de cristalizarlos y centrifugarlos por separado. Mediante procedimientos ópticos de separación de isómeros, los cristales de ácido L-glutámico eran utilizados para la síntesis de GMS, y los cristales D eran sometidos a calentamiento para producir una mezcla racémica y poder obtener más isómero L. Se detuvo su utilización en 1973.

- 3) **Fermentación:** es el método utilizado actualmente para la producción de GMS. Consiste en un cultivo enriquecido en carbohidratos y amoníaco de bacterias capaces de producir la forma L del ácido glutámico y liberarlo al medio. Es posible utilizar bacterias como *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium flavum*. En general, las bacterias utilizadas son corineformes, gram positivas, no esporuladas, no móviles y requieren biotina para su crecimiento. La acumulación de glutamato ocurre en ambientes de biotina limitante, lo que dificulta el uso de componentes crudos en el medio, como azúcar, por contener biotina. Debido a esto, se implementó el uso de agentes surfactantes o penicilina para facilitar la liberación del GMS producido por la bacteria al medio. Se presume que el gen YggB en bacterias corineformes está involucrado en el reconocimiento del glutamato y su transporte activo al medio, mediante la alteración y modulación de la tensión membranal y la liberación de osmoprotectores. En la figura 1.2.2 se esquematiza el proceso de producción de glutamato intracelular y el mecanismo de liberación:

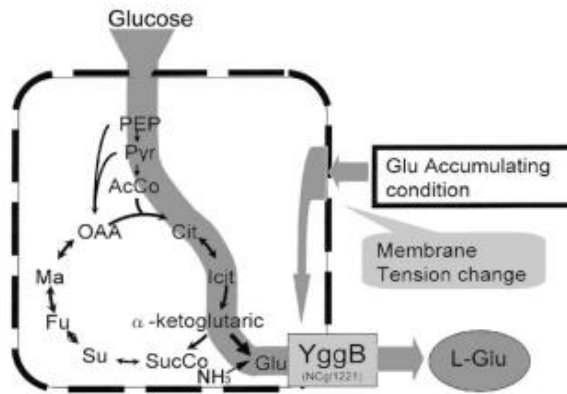


Fig. 1.2.2 ^[39]: Glutamato exportado por YggB en células bacterianas. La línea punteada representa la membrana celular. La glucosa es metabolizada a través del ciclo de Krebs para producir ácido 2-oxoglutarico, a partir del cual se obtiene glutamato y amoniaco por acción de glutamato deshidrogenasa. Las condiciones para la acumulación de glutamato en el medio, como *biotina limitante* (biotina a una concentración tal que se agote primero que el resto de los nutrimentos en el medio), modifican la tensión membranal de la célula, desencadenando la expresión del gen yggB y permite el transporte activo de glutamato de la célula al medio. (L-Glu: ácido glutámico; PEP: fosfoenol piruvato; Pyr: piruvato; AcCo: acetil coenzima A; OAA: oxaloacetato; Cit: citrato; Icit: isocitrato; Ma: malato; Fu: fumarato; SucCo: succinil coenzima A).

1.2.3 Identidad y pureza ^[18, 23]

El método de ensayo señalado en el Foods Chemicals Codex (U. S. Pharmacopeia) para L-glutamato monosódico indica que, la muestra analizada debe tener entre 98.5% y 101.5% de L-GMS, calculado en base seca.

El análisis para evaluar la pureza del L-GMS, tal como está indicado en la monografía publicada por JECFA ^[18], se lleva a cabo de la manera siguiente: se disuelve aproximadamente 250 mg de muestra

en 100 mL de ácido acético glacial. Se añaden algunas gotas de agua para acelerar la disolución de la muestra. Por último, se titula la disolución con ácido perclórico 0.1 N en ácido acético glacial, determinando el punto final potenciométricamente. Cada mililitro de disolución 0.1 N de ácido perclórico es equivalente a 9.356 mg de GMS.

Para la identificación del GMS, se debe obtener el espectro infrarrojo del mismo. La muestra debe prepararse en aceite mineral y como criterio de aceptación, la muestra analizada deberá producir máximos relativos al mismo número de onda del espectro mostrado en la Fig. 1.2.3 ^[33].

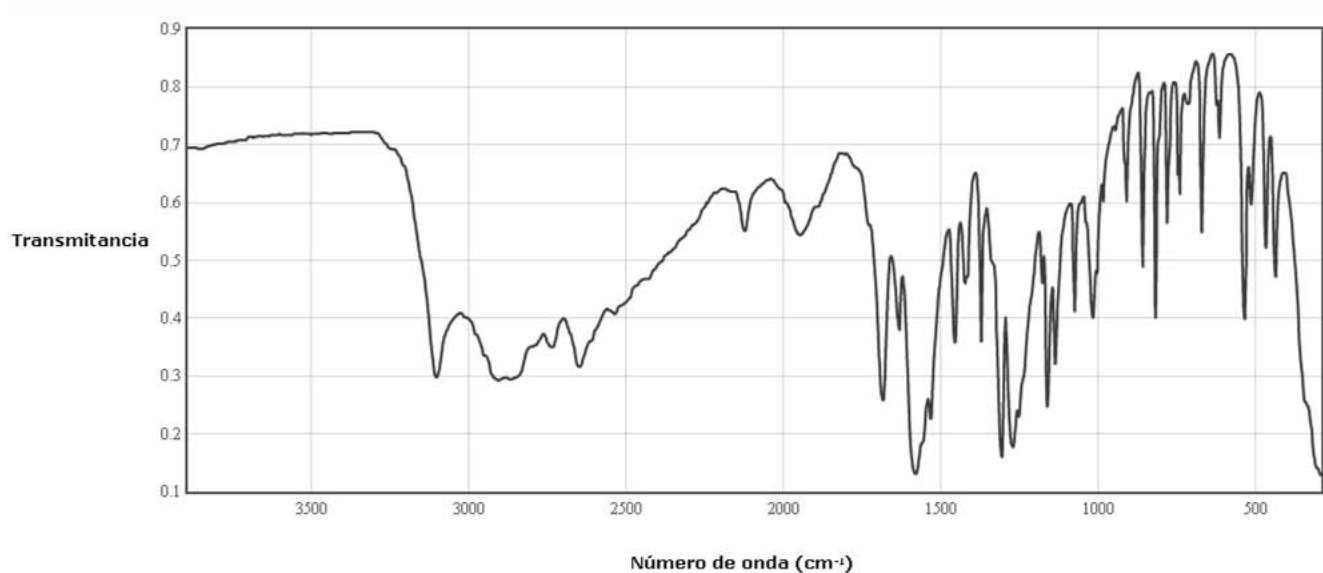


Fig. 1.2.3: Espectro de infrarrojo del GMS (en aceite mineral).

1.2.4 Importancia y aplicaciones

El GMS está clasificado por el Codex Alimentarius como potenciador de sabor; un potenciador de sabor es una sustancia de origen natural o sintético para su uso en alimentos; actúa en bajas concentraciones para incrementar el sabor de los alimentos, aumentando la sensibilidad de las papilas gustativas, incrementando la salivación y la percepción de los sabores ^[12]. Las sustancias utilizadas como potenciador de sabor se utilizan en concentraciones tan bajas que por

sí solos no contribuyen en el sabor del alimento. El L-glutamato libre, es decir, sin unión a proteínas, y se encuentra en forma natural en numerosos productos alimenticios como vegetales, carnes y productos marinos, en los que se incrementa su liberación mediante el proceso de cocción y fermentación ^[24]. El GMS es un aditivo no nutritivo utilizado en concentraciones de 0.1-0.8%, similar a como es encontrado en forma natural en los alimentos. Es utilizado simultáneamente por nucleótidos-5' como 5'-monoguanilato disódico (GMP) y 5'-monoinosinato disódico (IMP) y cloruro de sodio, en concentraciones que dependen del tipo de producto, debido al efecto sinérgico que presentan al potenciar el sabor umami e incrementar la aceptabilidad del alimento. Es un ingrediente ampliamente utilizado en la industria de alimentos siendo aplicado con mayor frecuencia en botanas fritas y extruidas, condimentos, sazonadores y aderezos, pastas, sopas, productos cárnicos, platillos RTE (Ready to Eat) y saborizantes artificiales ^[13].

1.2.5 Estudios toxicológicos ^[20, 22, 44]

Se ha evaluado al ácido L-glutámico y sus sales monosódicas por la JECFA para obtener información sobre su inocuidad (ANEXO II). En estudios de toxicidad crónica se comprobó que se requiere una cantidad aproximada de 30 mg/kg peso corporal para producir elevaciones significativas de GMS en sangre, y la misma dosis administrada por medio de alimentos produce un incremento menor que el aditivo en solución acuosa (en ensayos con roedores). En pruebas con humanos, en adultos se detectó un ligero aumento de GMS en plasma con dosis superiores a 150 mg/kg peso corporal, y al administrar dosis semejantes a niños mediante fórmula infantil, se comprobó que son capaces de metabolizar la misma cantidad que los adultos ^[31, 44]. De la misma manera, el comité de expertos FAO/OMS

llegó a la conclusión de que las máximas concentraciones plasmáticas de GMS dependen del vehículo alimenticio en que se incorpore el compuesto y que los lactantes lo metabolizan en una forma similar a **la de los adultos, por lo que se le asignó un IDA "sin especificar"** cuando se incorpora a los alimentos: esto significa que la ingesta dietética total derivada de su uso en las concentraciones necesarias para lograr el efecto tecnológico deseado y de su contenido aceptable en los alimentos no representa un peligro para la salud, en opinión del Comité. Por esa razón, no se consideró necesario establecer una IDA expresada en forma numérica ^[20].

El metabolismo del L-glutamato en el cuerpo humano consiste en su descarboxilación mediante la enzima glutamato descarboxilasa **(GAD), presente en riñón, hígado y páncreas, para producir ácido γ -aminobutírico (GABA) y CO₂**: el GABA (inhibidor de neurotransmisión) se degrada al semialdehído succínico y se incorpora al ciclo de Krebs ^[35].

A pesar de la función del L-glutamato como precursor de arginina y prolina y promotor de la activación de vías gástricas y pancreáticas que facilitan la digestión ^[28, 30], el GMS se ha visto involucrado en **desórdenes de la salud como el "síndrome del restaurante chino"** y daño neuronal. En torno al consumo periódico de glutamato monosódico, se encuentra la hipótesis de posible daño neuronal. Un mecanismo propuesto para la teoría del daño cerebral que produce el GMS es que, niveles elevados de GMS producen la excitación descontrolada de las neuronas glutaminérgicas, agotando el ATP y provocando muerte celular; sin embargo, estudios destinados para comprobarlo ^[31] demuestran que, debido a la ingesta cotidiana de GMS, es muy poco probable que ocurra el daño cerebral antes mencionado.

El "síndrome del restaurante chino" (SRC) está relacionado con el uso frecuente de GMS en la cocina china y en general en la cocina oriental, y sugiere que algunos individuos pudiesen llegar a presentar intolerancia a éste. Los síntomas reportados son náusea, mareo, aumento de la temperatura corporal, cefalea y broncoconstricción, en general ^[22]. Después de llevar a cabo estudios con voluntarios, no se logró establecer una relación entre el SRC y la ingestión de GMS. JECFA declaró: "las pruebas controladas doble ciego fallaron en demostrar una relación inequívoca entre el SRC y el consumo de GMS. El GMS no es responsable de **provocar broncoconstricción**".

1.2.6 Legislación

Un *aditivo alimentario* se define como cualquier sustancia, con o sin valor nutritivo, añadida a un producto alimenticio con fines tecnológicos en cualquier fase de su producción, con el fin de modificar sus características ^[14].

La Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es un organismo mexicano que tiene atribuciones de regulación, control y fomento sanitario. En el ramo de alimentos, ejerce sus atribuciones en lo relativo al control sanitario de productos y su importación y exportación, prevención y control de los efectos nocivos de los factores ambientales en la salud del hombre. Es supervisada por la Secretaría de Salud. En su acuerdo sobre aditivos y coadyuvantes en alimentos ^[14], se define la función tecnológica del GMS como saborizante, acentuador de sabor y agente secuestrante, y se ha restringido su uso en alimentos para lactantes y niños de corta edad. El mismo acuerdo define las clases funcionales del GMS como sigue:

- Agente potenciador de sabor: sustancia o mezcla de sustancias destinadas a realzar los aromas o sabores de los productos, excepto el cloruro de sodio o sacarosa.
- Agente secuestrante: sustancia que forma complejos químicos con iones metálicos.
- Saborizante (aromatizante): sustancia o mezcla de sustancias con o sin otros aditivos que se utiliza para proporcionar o intensificar el sabor o aroma de los productos. **Saborizante idéntico al natural**: sustancia químicamente aislada a partir de materias primas aromáticas u obtenidas sintéticamente, químicamente idénticas a las sustancias presentes en productos naturales (procesados o no) y que son aptas para consumo humano.

Respecto al límite máximo permitido de GMS en alimentos, de acuerdo con la Normatividad Mexicana, está permitido su uso como potenciador de sabor sin que se establezca un valor específico, sino únicamente de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), definidas para aditivos alimentarios como la cantidad mínima indispensable de los mismos para lograr el efecto deseado, a razón de que no se altere la inocuidad o naturaleza del producto ^[14].

En el caso de la NOM-030-SSA1-1993 ^[40] y NOM-130-SSA1-1995 ^[41], se especifica para productos de la pesca y alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico, respectivamente, un contenido máximo de GMS de 0.5 g/kg de producto terminado, o en NMX-F-341-S-1979 para aderezos con mayonesa, un contenido máximo de 0.2%, por mencionar algunos productos en que sí se ha establecido un contenido máximo de GMS. Sin embargo, no existe ningún método disponible en la Normatividad Mexicana para la determinación de GMS en alimentos; existen dos métodos oficiales establecidos por la AOAC: uno de ellos consiste en cromatografía en capa fina, y el segundo, en intercambio iónico ^[1].

1.3 Enzimas ^[9]

Las enzimas son proteínas cuyas propiedades dependen en gran medida de la secuencia de residuos de aminoácidos en la molécula enzimática. La cadena de aminoácidos de que está constituida adquiere una estructura tridimensional definida (estructura nativa): los enlaces disulfuro de los residuos de cisteína contribuyen en la estabilidad de la estructura, actuando entre diferentes regiones de una cadena polipeptídica o de dos cadenas distintas. La conformación que adquieran determinará su sitio activo, que es donde se llevará a cabo la catálisis del sustrato. Debido a su naturaleza proteica, las enzimas son sensibles a condiciones drásticas de pH, temperatura, fuerza iónica y acción de agentes químicos, que podrían provocar la pérdida de la estructura tridimensional de la enzima (desnaturalización de la enzima) y, por tanto de su sitio activo y actividad, por lo que para cada una existen condiciones específicas para su óptimo funcionamiento.

1.3.1 Tipos de enzimas

Las enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan, y se resumen en la Tabla 1.3.1 ^[3]:

Clasificación	Mecanismo de acción
Oxido-reductasas	Sustracción o adición de hidrógeno u oxígeno (oxigenasas, deshidrogenasas).
Transferasas	Transporte de grupos funcionales de un sustrato a otro.
Hidrolasas	Ruptura de enlaces mediante la incorporación de una molécula de

	agua.
Liasas	Ruptura de enlaces por mecanismos no hidrolíticos
Isomerasas	Catálisis de distintos tipos de isomerizaciones (cis-trans, ceto-enol, interconversión de azúcares).
Ligasas	Formación de enlaces, reacciones de síntesis (cinasas).

Tabla 1.3.1 Clasificación de enzimas.

1.3.1.1 L-Glutamato oxidasa ^[10]

La enzima L-Glutamato oxidasa cataliza la reacción de oxidación del L-Glutamato monosódico, produciendo 2-oxoglutarato, y peróxido de hidrógeno (Fig. 13.31). Se obtiene con mayor frecuencia a partir de *Streptomyces sp.*, que la produce de forma extracelular en medio de cultivo de salvado de trigo o como enzima recombinante a partir de *Escherichia coli*. Sus condiciones óptimas de operación se resumen en el **Anexo III**.

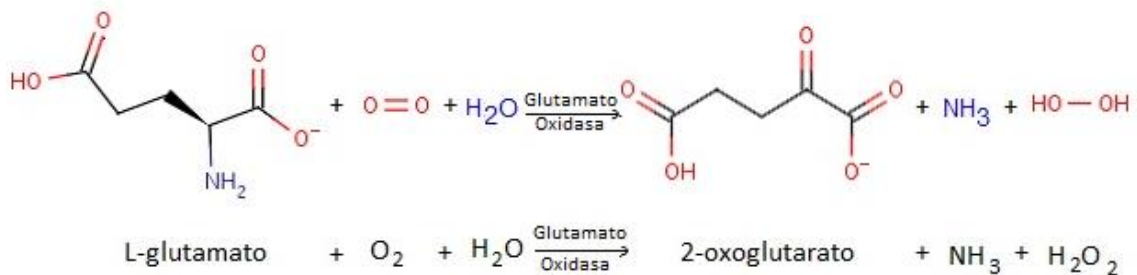


Fig. 1.3.1 Oxidación del GMS por L-Glutamato oxidasa.

1.3.2 Inmovilización de enzimas [4, 27]

La inmovilización de una enzima consiste en la retención de la misma en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa.

1.3.2.1 Unión a soportes [4]

La elección del soporte y tipo de enlace son factores primordiales en el comportamiento posterior del reactor enzimático. El soporte debe tener resistencia mecánica a las condiciones de operación del sistema y ser fácilmente separable del medio líquido para poder ser almacenado y reutilizado.

Los materiales de que están hechos los soportes pueden clasificarse en dos grupos:

1) *Soportes inorgánicos*: naturales (arcilla, piedra pómez, sílice) o materiales manufacturados (óxidos de metales y vidrio de tamaño de poro controlado (CPG), vidrio no poroso, alúmina, cerámicas, gel de sílice, etc.)

2) *Soportes orgánicos*:

- Polímeros naturales: polisacáridos (celulosa, almidón, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina), proteínas fibrosas (colágeno, queratina).

- Polímeros sintéticos: poliolefinas (poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliácridamidas, polimetacrilatos), y otros tales como alcohol polivinílico y poliamidas.

1.3.2.2 Unión covalente [4]

Se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con nucleófilos de las proteínas. Los aminoácidos con

carácter hidrófilo son los más empleados para la formación de enlaces, el resto de los aminoácidos, por su carácter hidrófobo, no se encuentran expuestos hacia la superficie protéica y no pueden intervenir en la unión covalente.

Este método presenta las siguientes ventajas e inconvenientes (Tabla 1.3.2):

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> -La manipulación de los derivados inmovilizados es sencilla. - La carga de enzima permanece constante después de la inmovilización. - Los derivados pueden usarse en reactores en continuo, empaquetados, de lecho fluidizado o tanque agitado. -Representa una mayor resistencia a la desactivación por efecto de temperatura, disolventes orgánicos o pH al tener estabilizada su estructura terciaria. 	<ul style="list-style-type: none"> -Es necesario conocer la densidad de los grupos activos por unidad de superficie, ya que condiciona el número de uniones enzima-soporte y su geometría puede ser distorsionante y conducir a derivados inactivos. - El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del sitio activo. Para evitarlo, puede realizarse la inmovilización en presencia de un inhibidor que bloquee el sitio activo. - La unión covalente no es aconsejable para enzimas muy sensibles a cambios de pH, fuerza iónica, etc.

Tabla 1.3.2 Ventajas y desventajas de la inmovilización de enzimas.

1.3.2.3 Etapas para la inmovilización de una enzima [27]

Para ser incorporada al sistema FIA, la L-Glutamato oxidasa es inmovilizada en vidrio de poro controlado (CPG). El proceso se divide en tres etapas:

1) *Preparación del aminopropil derivado por tratamiento del CPG con 3-aminopropil-trietoxi-silano.* El CPG tiene expuestos grupos hidroxilos de los silanos y reacciona con el silicio del 3-aminopropil-trietoxi-silano (Fig. 1.3.2)

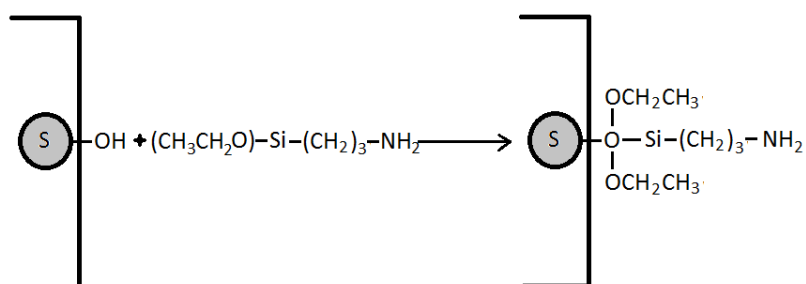


Fig. 1.3.2 Donde S= soporte (CPG).

3) *Acoplamiento con glutaraldehído.* El glutaraldehído es un dicarbonilo: el carbono de uno de ellos reacciona con el grupo amino terminal del 3-aminopropil-trietoxi-silano unido al CPG, como ocurre en una reacción de Maillard, dejando un grupo carbonilo libre para reaccionar con el grupo funcional de algún aminoácido expuesto de la enzima (Fig. 1.3.3).

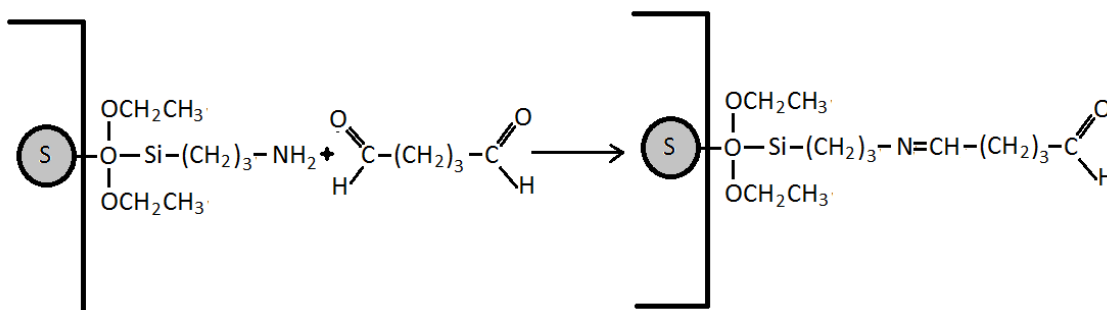


Fig. 1.3.3 Acoplamiento con glutaraldehído

3) **Inmovilización de la enzima.** Finalmente, el grupo amino de alguno de los aminoácidos de la enzima se une al grupo carbonilo expuesto del glutaraldehído (Fig. 1.3.4)

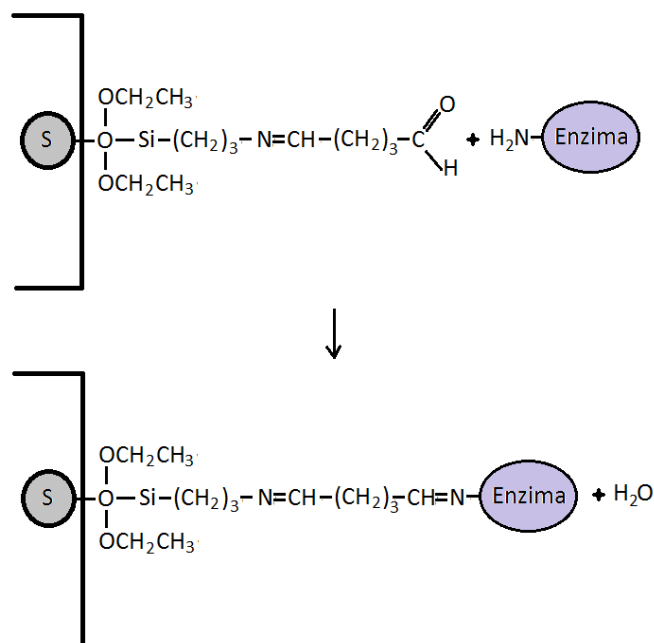


Fig. 1.3.4 Inmovilización de la enzima

1.4 Método oficial para la determinación de GMS en alimentos

[1, 34]

AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) establece un método para la determinación de GMS, en el que se utiliza una columna cromatográfica con resina catiónica Dowex 50W-X8, aplicable para todo tipo de muestras de alimentos. El cálculo de la concentración de GMS en alimentos se hace en comparación con una disolución blanco a pH=8.9 de formaldehído/ácido clorhídrico. La concentración de GMS se expresa en porcentaje.

Basados en el método oficial de la AOAC, la norma venezolana Covenin 2133-84 establece dos métodos, aplicables en alimentos

cuyo contenido de GMS sea mayor de 0.5%. El primer método descrito consiste en cromatografía en capa fina, en el que un microlitro de dilución de muestra se aplica en una placa cromatográfica al mismo tiempo y en la misma placa se aplican por triplicado el mismo volumen de una disolución patrón de GMS entre 400 a 800 mg/L; se deja correr el eluyente, se seca la placa y posteriormente se revela con agente cromogénico, con el fin de hacer una comparación entre las señales producidas por la muestra y las producidas por la disolución patrón. La concentración de GMS se expresa en miligramos de GMS por kilogramo de muestra.

En el segundo método por cromatografía de iones, se utiliza una columna cromatográfica catiónica y un detector conductimétrico, y la concentración de GMS en la muestra se expresa en porcentaje relativo.

1.5 Determinación de GMS por FIA

El presente trabajo propone un método por FIA para la determinación de GMS, que resulta eficaz, rápido y económico, y que puede llevarse a cabo fácilmente de forma manual o automatizada.

1.5.1 Principio del método ^[5]

A una configuración FIA se acopla un reactor enzimático y una celda de difusión de gases.

La enzima L-glutamato oxidasa, empacada en el reactor, cataliza la reacción de oxidación del GMS, produciendo peróxido de hidrógeno, 2-oxoglutarato y amoníaco. Al pH del portador (pH=7.0), el amoníaco está en su forma de amonio; el amonio producido confluye con una disolución a pH=12.0 para llevarlo de vuelta a la especie amoníaco,

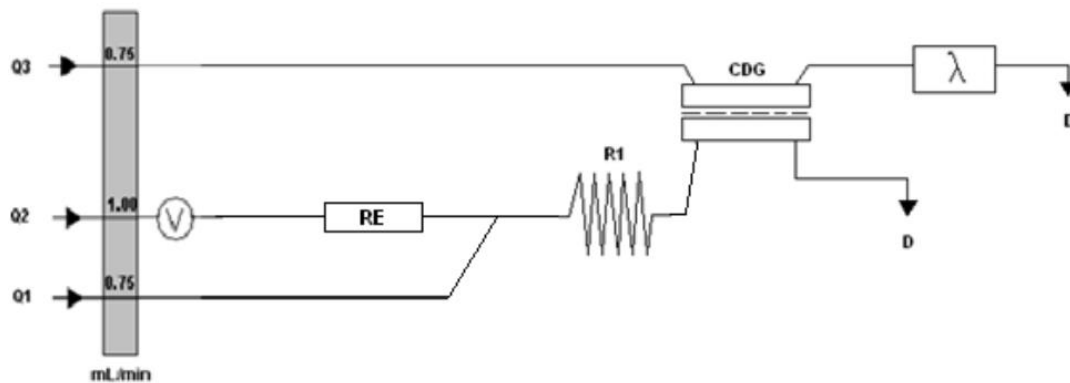


Fig. 1.5.2: configuración FIA para determinación indirecta de GMS, donde: Q1 = donador; Q2 = portador a pH óptimo para L-glutamato oxidasa; Q3 = aceptor; V = válvula de inyección; RE = reactor enzimático a temperatura ambiente; R1 = reactor no enzimático de 120 cm; CDG = celda de difusión de gases; D = desecho.

A la corriente del portador se inyectarán 200 μL de muestra, que será transportada hacia el reactor enzimático donde se llevará a cabo la conversión del GMS a amonio. Confluirá posteriormente con la disolución donadora para que el amonio formado pueda pasar a su forma de amoniaco y permee la membrana de la CDG hacia la disolución aceptora, cuyo aumento en la forma básica del indicador será proporcional a la concentración de GMS en la muestra.

1.5.2.1 Celda de difusión de gases [7, 38]

En el fenómeno de difusión de gases en FIA, el analito pasa a través de una membrana, previo a la detección. La característica de hidrofobicidad de la membrana permite que únicamente las sustancias gaseosas puedan pasar a través de ella, quedando el resto del material no gaseoso en la corriente donadora.

Las separaciones por difusión de gases se basan en la permeabilidad de la membrana a los gases. El mecanismo de difusión de la especie gaseosa dependerá del tipo de membrana. Existen dos tipos:

- **No porosas:** comúnmente de silicón; el gas permea dependiendo de la solubilidad del mismo entre la disolución aceptora y la donadora.
- **Porosas:** de teflón, polipropileno, etc. El gas difunde a través de una capa gaseosa, cuyo espesor depende del espesor de la membrana y el tamaño de poro.

Las membranas del tipo poroso deben estar soportadas en una celda, siendo las más comunes aquellas consistentes en dos bloques en cuya pared interior existen canales de flujo. La membrana se coloca en medio de ambos bloques y es sujeta a presión (Fig. 1.5.3).

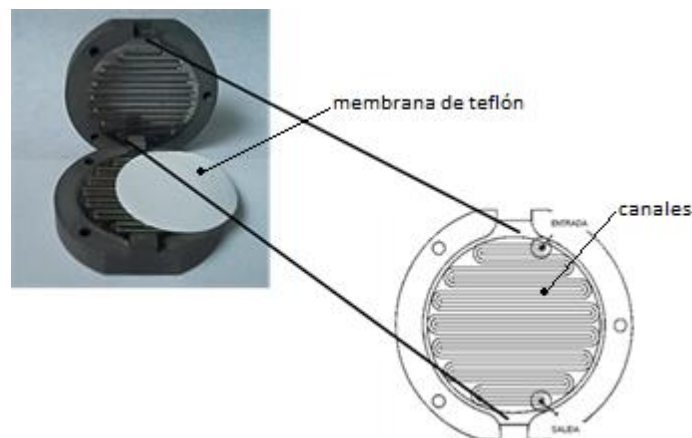


Fig. 1.5.3 Esquema de la celda de difusión de gases

1.5.2.2 Reactor enzimático ^[43]

El propósito de un reactor enzimático es permitir que la enzima y el sustrato hagan contacto por el tiempo suficiente para que ocurra la conversión y, posteriormente, sean separados fácilmente los productos y la enzima. Consiste en un tubo de longitud variable empacado con vidrio o CPG en el que se ha inmovilizado la enzima seleccionada de acuerdo al analito de interés.

El reactor enzimático a utilizar en el método propuesto consiste en un tubo de teflón de 2 mm de diámetro interno empacado con CPG activo con L-Glutamato oxidasa inmovilizada.

1.5.3 Validación del método [42]

La validación de un método se define como el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método, satisfacen los requisitos para su aplicación analítica. Consiste en la evaluación de parámetros como límite de detección, límite de cuantificación, intervalo lineal, precisión, exactitud y robustez.

1.5.3.1 Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal [32]

El intervalo lineal representa la zona de una recta de calibración en la que se asegura que la concentración del analito será proporcional a las señales producidas por los estándares.

Para determinar el intervalo lineal, se hace un análisis de mínimos cuadrados de las rectas de calibración en intervalos de cinco valores de concentración para obtener un buen estimador de la ordenada al origen.

El *límite de detección* se define como la concentración del analito que produce una señal significativamente diferente de la señal del blanco o señal de fondo. Para evitar errores en la interpretación de la definición anterior, es común definirlo mediante la siguiente ecuación:

$$LD = Y_B + 3S_B$$

Dónde:

Y_B = Señal del blanco

S_B = Desviación estándar del blanco

Es decir, la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco.

El *límite de cuantificación* se define como el límite más bajo para hacer mediciones cuantitativamente precisas. El valor utilizado se expresa en la ecuación siguiente:

$$LC = Y_B + 10S_B$$

1.5.3.2 Eficiencia de la enzima

La eficiencia de la enzima se refiere a la relación entre la concentración del producto obtenido y la concentración del sustrato. Para calcular la eficiencia, se debe construir una recta de calibración con estándares del producto de la reacción enzimática, y a partir del valor de altura de pico (en unidades de absorbancia) de las disoluciones de sustrato inyectadas se calcula la concentración obtenida de producto. Para la metodología aplicada, la función que describe la relación producto-sustrato es la siguiente:

$$|NH_4^+| = f|GMS|$$

El valor de la pendiente de esta recta corresponde a la eficiencia del reactor enzimático, de acuerdo a la ecuación:

$$\eta = \frac{|P|}{|S|}$$

Dónde:

η = eficiencia de la enzima

P = Producto de la reacción enzimática (amonio)

S = Sustrato (GMS)

1.5.3.3 Precisión y exactitud ^[36]

El objetivo de todo análisis cuantitativo es que los resultados experimentales se aproximen tanto como sea posible a la composición real de una muestra, aunque la certidumbre no sea del cien por ciento.

La **exactitud** se expresa como la probabilidad de que un resultado quede comprendido entre ciertos límites. **Food Agriculture Organization** (FAO) define la exactitud como la cercanía del valor analítico al "valor verdadero" de concentración del compuesto de interés en el material bajo examen; es la concordancia entre la mejor estimación de una cantidad y su valor real ^[17].

Se utiliza para su cálculo la siguiente ecuación:

$$\%Exactitud = \pm 100 \left(\frac{\text{valor verdadero} - \text{media experimental}}{\text{valor verdadero}} \right)$$

Para la determinación de la exactitud de un procedimiento se debe contar con una muestra patrón de pureza conocida o un material de referencia certificado.

Precisión es la dispersión de resultados observada cuando se analiza una muestra de manera cotidiana.

La **precisión** representa la probabilidad de que los resultados sucesivos caigan dentro de un intervalo determinado de valores (tomando como referencia la desviación estándar), centrado alrededor de un valor medio, cuyo coeficiente de variación debe ser menor de 20% para considerarse aceptable, según la Comisión Europea ^[15]. Este valor medio puede diferir del valor verdadero, es decir, puede existir un error constante en el método.

La precisión de un método analítico debe estudiarse sobre ^[17]:

- a. El sistema, evaluando la dispersión de al menos 6 inyecciones del estándar.
- b. El método, evaluando la dispersión de varias preparaciones de la muestra final homogénea. La evaluación corresponde a todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito.

La precisión se puede medir en condiciones repetitivas (mismo analista, mismo día, mismo instrumento) y en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día, diferente instrumento).

Cuando el número de muestras es pequeño (menos de 30), las medidas independientes y la distribución normal se calculan de acuerdo a la distribución t-Student, a un intervalo de confianza del 95%.

Un método aceptable de análisis debe poseer a la vez exactitud y precisión razonables. Un alto grado de precisión no indica que el método sea exacto.

1.5.3.4 Robustez [37]

El término *robustez* se define como la resistencia de un método al cambio de respuesta cuando ocurren pequeñas variaciones en el mismo. La evaluación de la robustez de un método es importante en aquellos que se llevan a cabo de rutina y que serán aplicados durante largos periodos de tiempo, para asegurar la fiabilidad en términos de exactitud y precisión. También es importante en métodos en los que las muestras deben ser sometidas a distintas etapas de tratamiento, lo que tiende a romper la cadena de trazabilidad.

1.5.4 Gráficas de control [32]

Una gráfica de control es una representación en la que se grafican consecutivamente los valores de las medias muestrales de manera que se pueda tomar cualquier acción correctiva de manera oportuna.

El diagrama de control más utilizado es el *diagrama de Shewhart* (Fig. 1.5.4); en él se representa la media muestral, \bar{x} (calculada a partir de un número de muestras durante cierto periodo) en función del tiempo: cuando el proceso se encuentra en control, los valores de \bar{x} se distribuyen uniformemente cercanos a μ_0 , que es el valor objetivo.

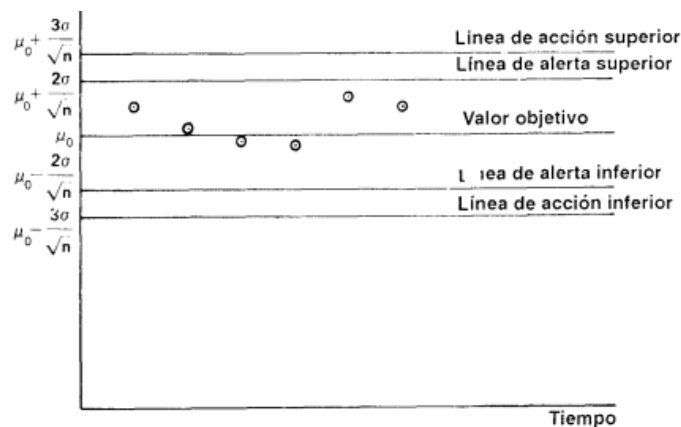


Fig. 1.5.4 Diagrama de Shewhart

La probabilidad de que alguno de los puntos monitoreados caiga en la zona entre la línea de alerta y la línea de acción es de 0.025%: si dos puntos caen en ésta zona, es necesario detener el proceso y corregir los factores que estén provocando un desajuste en el método. Lo mismo debe hacerse si un punto rebasa las líneas de acción.

A intervalos de tiempo fijos sobre una muestra estándar, se toma un número de muestras repetidas, y la media e intervalo de las mediciones se representan sobre los gráficos de control. De esta manera es posible controlar también la precisión y la exactitud de los análisis.

CAPÍTULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental presentado se divide en tres etapas:

- 1) Optimización del método.
- 2) Validación del método.
- 3) Determinación de la concentración de GMS en muestras de alimentos mediante la implementación de un reactor enzimático.

2.1 Equipo y material

1) Instrumentación: Automuestreador del equipo FIA automatizado ALPKEM OI, Flow Solution 3000 (FS3000), con capacidad para 120 muestras y analizador, con bomba peristáltica y válvula de inyección. Configuración FIA utilizando bombas peristálticas Gilson® Minipuls 2 y 3, válvulas de inyección manual Rheodyne® de 6 puertos, espectrofotómetro UV-Visible Perkin Elmer® Lambda 25, equipado con celda de flujo de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 0.08 ml de volumen interno; CDG con membrana de teflón de diámetro de poro de 0.45 μm .

2) Tubería y confluencias: tubería de teflón de 0.7 mm de diámetro interno.

3) Balanza analítica OHAUS® con precisión de 0.1 mg y balanza granataria OHAUS® con capacidad de 2 kg.

4) Potenciómetro (pHmetro) Cole-Parmer®.

5) Material volumétrico: matraces volumétricos de 100.0, 500.0, 50.0 y 25.0 mL; micropipetas de 5-50, 50-200, 100-1000 μL , 1-5 y 2-10 mL.

6) Parrilla de agitación Agitateur® de 10 velocidades.

7) Sonicator Sper Scientific® 100005, frecuencia de 43 KHz, ciclos automáticos de 3 minutos.

2.2 Reactivos y disoluciones.

2.2.1 Inmovilización de la enzima.

- Disolución de ácido nítrico al 5%
- 3-aminopropiltriethoxisilano 98% (Aldrich®).
- Glutaraldehído 25% p/v (Aldrich®).
- L-glutamato oxidasa (de *Streptomyces sp.*, EC 1.4.3.11, Aldrich®, G59 21-5UN, Lote #SLBK4852V, 5 unidades/mg sólido).
- Vidrio de poro controlado (CPG) (malla 120-200, 242 Å de diámetro de poro promedio, Sigma®, Lote: 11H0735).

2.2.2 Determinación enzimática de GMS.

- **Disolución portadora:** Buffer de fosfatos 7×10^{-3} M, pH=7.00. Pesar 0.6090 g de K_2HPO_4 y llevar al aforo a 500.0 mL con agua deionizada. Ajustar pH.
- **Disolución donadora:** Buffer de bórax-EDTA, pH=12.50. Disolver 15 g de EDTA y 15 g de bórax en 400 mL de agua deionizada. Ajustar pH. Llevar al aforo a 500.0 mL, reajustar pH si es necesario. Colocar en sonicator durante un ciclo.
- **Disolución aceptora:** Disolución de azul de bromotimol 0.02 g/100 mL. Disolver 0.1 g de azul de bromotimol en 500.0 mL de agua

deionizada. Adicionar 1.25 mL de NaOH 0.01 M y, posteriormente, adicionar HCl 0.1 M hasta el vire a amarillo. Colocar en sonicador durante un ciclo. Ajustar absorbancia de 0.45-0.65 uA a 590 nm justo antes de comenzar el análisis.

- **Disolución madre de GMS (500 mg GMS/L):** Pesar 0.05 g de GMS, disolver en aproximadamente 10 mL de agua deionizada y llevar al aforo a 100.0 mL.

- **Disolución madre de amonio (100 mg amonio/L):** Pesar 0.0297 g de NH₄Cl, disolver en aproximadamente 10 mL de agua deionizada y llevar al aforo en 100.0 mL.

2.3 Tratamiento de muestras

Se realizó una prueba presuntiva en los siguientes productos alimenticios:

- 1) *Sopa de fideos con camarón y chile, Knorr®*: Sopa preparada, lote: 4256BM3 15:55, Cont. Net.: 95 g.
- 2) *"Mi pollo al horno" ajo y cebolla, Knorr®*: sazonador en polvo a base de ajo y cebolla, lote: 40761 17:12 121952, Cont. Net.: 25 g.
- 3) *Caldo de res, Campbell's®*: caldo, lote: II R16 97153, Cont. Net.: 300 g.
- 4) *Ablandador de carne, Escosa®*: condimento, lote: L176W, Cont. Net.: 155 g.

La muestra 1) se tamizó para separar el condimento de los fideos, el resto de las muestras se utilizó íntegramente. Se tomaron 5 g de muestra y se disolvieron en 100 mL de agua deionizada, dejándose en agitación por 3 minutos. Las muestras 1 y 2 se filtraron.

2.4 Desarrollo de la metodología FIA utilizada para la determinación de GMS

Para la determinación enzimática de GMS se utilizó la configuración mostrada en la figura 1.5.2.

Se inyectan 200 μL de disolución estándar o muestra sobre la disolución portadora (disolución amortiguadora de fosfatos 7×10^{-3} M pH 7). Si la disolución inyectada contiene L-glutamato, éste se oxida en el reactor enzimático dando como productos 2-oxoglutarato, amonio y peróxido de hidrógeno, que confluyen con la disolución donadora básica. El amoniaco resultante permea a través de la membrana de la celda de difusión de gases y se disuelve en la disolución aceptora que contiene el indicador azul de bromotimol. El aumento en la absorbancia en la disolución aceptora es registrado a 590 nm.

2.4.1 Optimización del método

Debido a la utilización de la enzima L-glutamato oxidasa en la configuración FIA, es importante optimizar las variables que intervienen en su funcionamiento, siendo la más importante el pH de la disolución portadora, por estar en contacto en todo momento con la enzima y mantenerla en condiciones propicias para llevar a cabo la catálisis del GMS. En todo momento, los análisis se efectúan a temperatura ambiente (20-22 °C).

Una vez integrado el reactor enzimático a la configuración FIA se optimizó el pH de la disolución portadora. Se prepararon e inyectaron por triplicado disoluciones estándar de GMS de concentraciones 500 a 60 mg/L en agua deionizada, utilizando como portador disolución amortiguadora de fosfatos 7×10^{-3} M pH=7.0 ^[2] y disolución amortiguadora de ftalatos 0.1 M pH=4.0 ^[10].

2.4.2 Validación del método

2.4.2.1 Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal

Para la determinación del límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal, se construyó una recta de calibración de GMS a concentraciones de 60-2 mg/L. Cada estándar se inyectó por triplicado y los datos de la altura de cada señal obtenida fueron empleados para el análisis estadístico. El cálculo de LD y LC se hizo por análisis de las curvas de dispersión de valores de la recta de calibración.

2.4.2.2 Eficiencia de la enzima

Para la evaluación de la *eficiencia de la enzima* se inyectaron por triplicado disoluciones equimoleculares de amonio y GMS en un intervalo de 0.3-0.05 mmol/L. Se construyó la recta de calibración de amonio, y a partir del valor de altura de pico de las disoluciones de GMS se calculó la concentración de amonio producido. Con estos resultados se graficó la concentración de amonio en función de la concentración de GMS, siendo la pendiente de ésta recta igual a la eficiencia de la enzima.

2.4.2.3 Precisión y exactitud

Para el cálculo de *precisión*, una vez establecido el intervalo lineal de concentraciones de GMS se prepararon disoluciones a una concentración 20% arriba del estándar más bajo de la recta de calibración (14.4 mg GMS/L) y 20% debajo de la concentración más alta de la misma (33.6 mg GMS/L). Estas disoluciones se inyectaron 7 veces cada una, se obtuvieron los valores de altura de pico

correspondientes (en unidades de absorbancia) y, a partir de ellos, se calcularon el promedio, desviación estándar y %CV.

Para el cálculo del valor de *exactitud*, se prepararon disoluciones estándar de GMS en un intervalo de 8 a 40 mg/L utilizando un estándar marca McCormick®. Estas disoluciones se inyectaron por triplicado, se midió la altura de cada señal (en unidades de absorbancia) y se construyó la recta de calibración. Se preparó una disolución de concentración 24 mg/L utilizando un estándar marca Sigma® (98% pureza) y se inyectó por quintuplicado. Con la recta de calibración y las barras de confianza de la misma se calculó la concentración media de la disolución de GMS Sigma®. Se calculó el porcentaje de error y se evaluó incertidumbre en la exactitud del método por medio del análisis de las curvas de dispersión de valores de la recta de calibración ^[32].

De igual manera, se prepararon estándares de concentraciones 8 a 40 mg/L del estándar de Sigma® (considerando la pureza del estándar) para la curva patrón y una disolución de 24 mg/L del estándar de McCormick®, que se inyectó por quintuplicado.

2.4.2.4 Robustez

Se inyectaron por triplicado los estándares de la recta de calibración de GMS y únicamente la dilución de ablandador de carne Escosa®. Las condiciones puestas a prueba fueron la velocidad de flujo del portador y el pH del portador, variando las condiciones en $\pm 10\%$ del valor establecido. Los cambios en las condiciones del análisis se efectuaron de la siguiente manera:

- 1) *Flujo de la disolución portadora*: para ajustar el flujo de la disolución portadora se utilizó la bomba peristáltica Gilson® Minipuls 2. Se inyectó la recta de calibración y la muestra con cada cambio de velocidad, sin detener el análisis. Las velocidades utilizadas fueron 0.9, 1.0 y 1.1 mL/min. Entre cada

cambio de velocidad se hicieron tres inyecciones de agua para enjuagar el reactor y dar tiempo a la estabilización del flujo.

- 2) ***pH de la disolución portadora***: Se realizaron inyecciones de estándares de GMS y muestra en la configuración FIA ajustando el pH de la disolución portadora a 6.3, 7.0 y 7.7.

Se calculó la altura de las señales obtenidas y, con base en la ecuación de la recta se calculó la concentración de GMS en el ablandador.

Se compararon los valores de concentración de la muestra y la pendiente de las rectas de calibración correspondientes a cada condición probada, además del promedio y la desviación estándar de las condiciones normales para efectuar los análisis contra el promedio y desviación estándar de las condiciones de prueba.

2.4.3 Análisis de muestras

Se trataron las muestras de acuerdo con lo descrito en la sección 2.3. A fin de determinar si las muestras contienen amonio, las disoluciones de las muestras se inyectaron por triplicado en la configuración FIA sin integrar el reactor enzimático. Se observó una señal muy intensa para las muestras de sopa y arroz, a diferencia de la disolución preparada del ablandador de carne en la que no se obtuvo señal. Por esta razón se modificó la configuración de la figura 1.5.2 integrando dos válvulas de selección como se muestra en la figura 2.1:

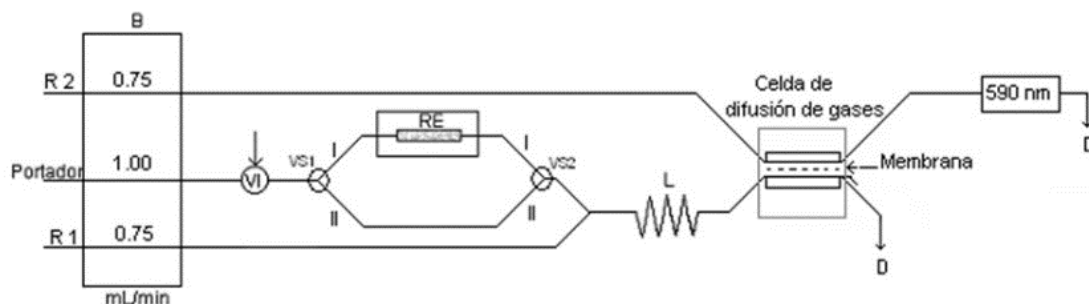


Figura 2.1: Configuración para la determinación de GMS y amonio.

Esta configuración permitirá cuantificar tanto amonio como GMS en las muestras. Cuando las válvulas de selección se colocan en la Ruta II se obtendrá la señal debida al amonio presente en la muestra, cuando se cambian a la Ruta I el bolo inyectado pasa a través del reactor enzimático en donde se oxida el GMS; la señal obtenida corresponde al contenido de amonio y GMS en la muestra.

Se preparó una recta de calibración de GMS en un intervalo entre 8 y 40 mg/L y se inyectó por triplicado

Las muestras elegidas se inyectaron efectuando las diluciones siguientes (Tabla 2.1):

Muestra	Volumen de muestra	Volumen de aforo
Sopa de fideos con camarón y chile, Knorr®	6.3, 12.5 y 18.8 mL	25.0 mL, con agua destilada.
"Mi pollo al horno" ajo y cebolla, Knorr®		
Caldo de res Campbells®	18.8 mL	

Tabla 2.1: Diluciones de muestras

Adicionalmente se inyectó el caldo de res y el ablandador de carne sin diluir.

De los resultados obtenidos en este primer análisis de muestras se estableció la siguiente metodología para la preparación de las mismas:

- **Determinación de amonio:** Pesar 5 g de muestra, agregar a 100 mL de agua destilada, agitar en el agitador magnético durante 3 minutos y filtrar. Tomar una alícuota de 1 mL y aforar a 25 mL en matraz volumétrico.
- **Determinación de GMS:** Pesar 0.5 g de muestra, agregar a 100 mL de agua destilada, agitar en el agitador magnético durante 3 minutos y filtrar. Realizar la dilución apropiada (~1.5-6/25).

Las disoluciones se inyectaron por triplicado junto con las correspondientes curvas de calibración de GMS y amonio.

Adicionalmente, se preparó una disolución de GMS de concentración 20 mg/L para utilizarse como **control** a lo largo del análisis, con el fin de monitorear si en el transcurso del mismo el GMS sufría algún cambio sustancial que impidiera su determinación. Se propone realizar el mismo procedimiento durante 14 días, preparando muestras nuevas cada día.

Con los datos de altura de las señales de los estándares de GMS se obtendrá la ecuación de la recta de calibración y, a partir de la altura de las señales de las muestras, se calcula la concentración de GMS por gramo de muestra.

Al final del análisis se debe dejar enjuagar el reactor enzimático con disolución portadora a 0.4 mL/min, por aproximadamente una hora, para evitar la retención de muestra o productos de reacción que puedan saturar la enzima e interferir en su funcionamiento. Una vez transcurrido el tiempo de enjuague, se retira el reactor de la configuración y se conecta una tubería de teflón en su lugar para proceder al lavado de las tuberías con agua deionizada y su posterior secado con aire.

El reactor enzimático se mantiene en refrigeración (4-8 °C) y se recomienda desempacarlo en buffer de fosfatos pH=7.0 y volverlo a

empacar para evitar el apelmazamiento del CPG, aproximadamente cada dos semanas.

2.4.3.1 Gráficas de control

Para elaborar las gráficas de control, se calculó para cada muestra el promedio y desviación estándar (en unidades de concentración de GMS). A partir de los datos obtenidos se graficaron las *líneas de alerta* ($\bar{x} \pm 2s$) y *las líneas de acción* ($\bar{x} \pm 3s$), así como el promedio (\bar{x}) y los valores de concentración individuales en función de los días, como se explica en la sección 1.5.4.1; donde: \bar{x} =promedio, s =desviación estándar.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Inmovilización de la enzima

La enzima L-Glutamato oxidasa inmovilizada en CPG se empacó en un tubo de teflón de 2 mm de diámetro interno y 8.5 cm de longitud, como se muestra en la figura 3.1.1. Se colocó a un extremo del reactor una válvula Check con el fin de evitar que, dado el caso, el flujo cambiara de dirección y pudiera desempacarse el reactor.



Fig. 3.1.1 Reactor enzimático

3.2 Desarrollo de la metodología FIA utilizada para la determinación de GMS

3.2.1 Optimización del método

En la figura 3.2.2 se muestran los fiagramas obtenidos utilizando como portador buffer de fosfatos pH=7 y buffer de ftalatos pH=4. A pH=7 las señales obtenidas son más altas y diferenciables entre sí, por lo que se eligió éste portador para realizar el análisis. También se aprecia que a concentraciones de GMS mayores de 60 mg/L, el aumento en la altura de las señales ya no es proporcional al aumento en la concentración, debido a la saturación de la enzima.

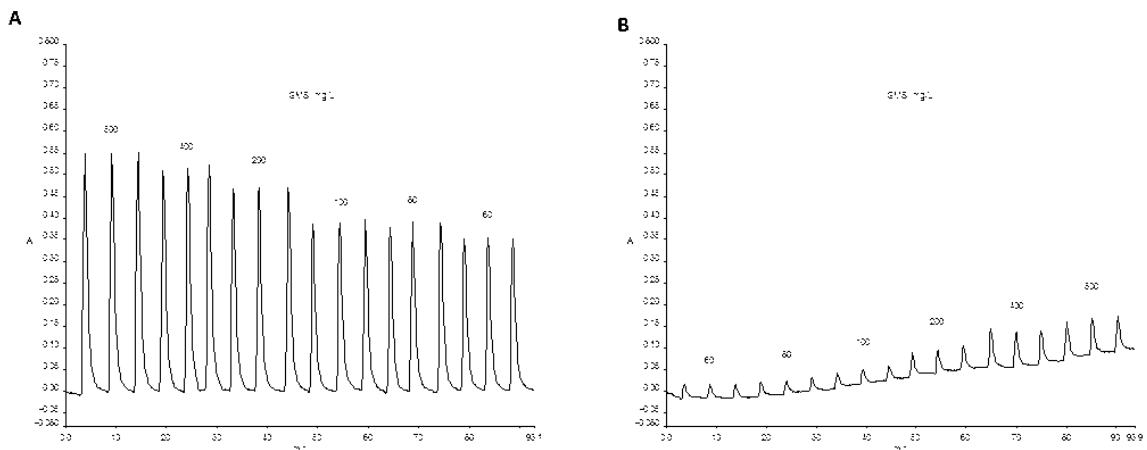


Fig. 3.2.2 A) portador buffer de fosfatos pH=7; B) portador buffer de ftalatos pH=4

3.2.2 Validación del método

3.2.2.1 Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) e intervalo lineal

A partir de la inyección de estándares de GMS de concentración de 60 a 2 mg/L por triplicado (Fig. 3.2.3), se realizó el análisis de la regresión lineal de la curva obtenida graficando intervalos de cinco concentraciones consecutivas, por separado, para tener un buen estimador de la ordenada al origen y calcular LC y LD por el análisis de las curvas de dispersión de valores de la recta de calibración [32]. En la tabla 3.2.1 se muestran los resultados obtenidos:

Intervalo de concentración (mg/L)	A (ordenada al origen)	B (pendiente)	R (regresión lineal)	Observaciones
60-20	0.0375	0.0051	0.9940	
50-10	0.0224	0.0055	0.9912	
40-8	0.0105	0.0061	0.9973	Intervalo lineal, para análisis de muestras (Fig. 3.2.4)
30-6	0.0064	0.0064	0.9978	
20-4	0.0002	0.0069	0.9985	Cálculo de LC y LD
10-2	-0.0018	0.0073	0.9965	

Tabla 3.2.1 Análisis de la recta de calibración de GMS por intervalos de concentración.

A partir de los resultados anteriores, se estableció el intervalo lineal de 8 a 40 mg GMS/L para efectuar la determinación de GMS en muestras y el intervalo de 4 a 20 mg/L para el cálculo de LD y LC.

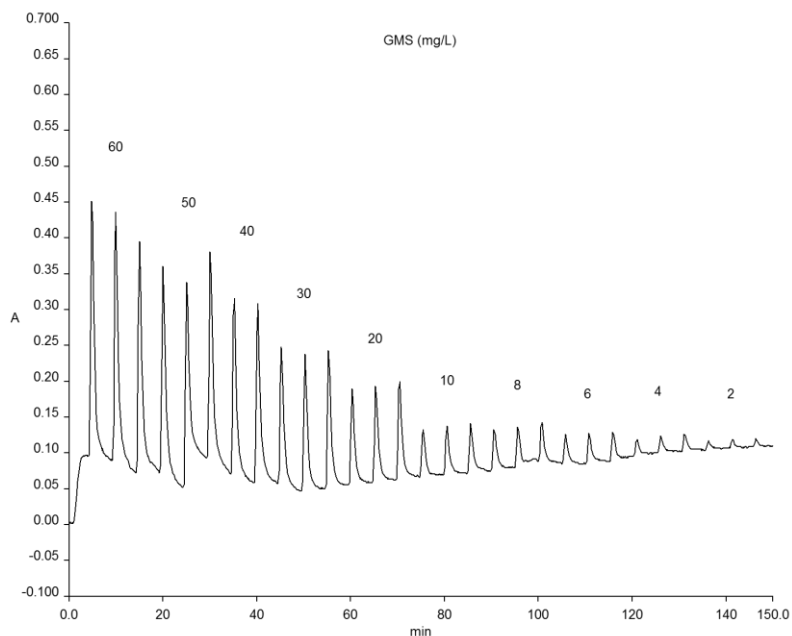


Fig. 3.2.3 Diagrama resultante de la inyección de estándares 2-60 mg de GMS/L.

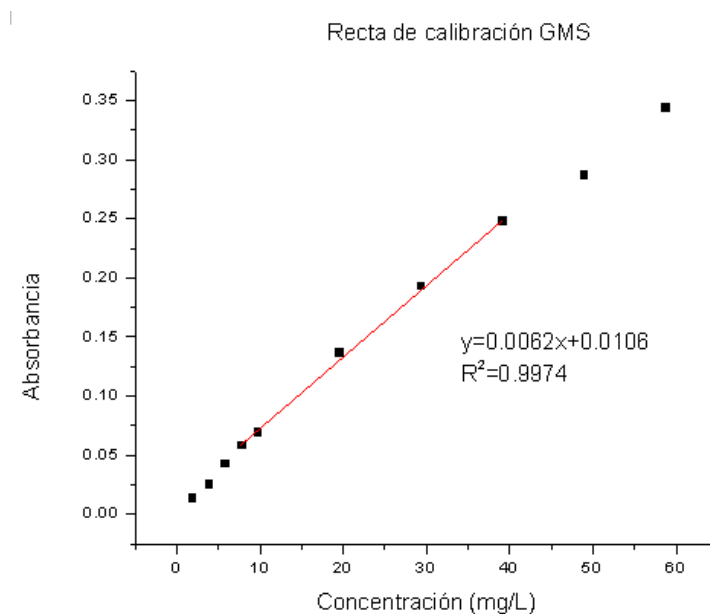


Fig. 3.2.4: Intervalo lineal para la determinación de GMS.

También es posible hacer una estimación gráfica del intervalo lineal [16] mediante la relación entre la sensibilidad del detector (el cálculo de la pendiente entre valores contiguos de la altura de las señales) y el logaritmo de la concentración del analito, como se muestra en la fig. 3.2.5: estableciendo una variación de dos veces la desviación

estándar a partir del promedio de las pendientes, se pueden determinar los límites máximo y mínimo. Así, los límites aproximados mediante este método son **8.41** y **47.31** mg/L.

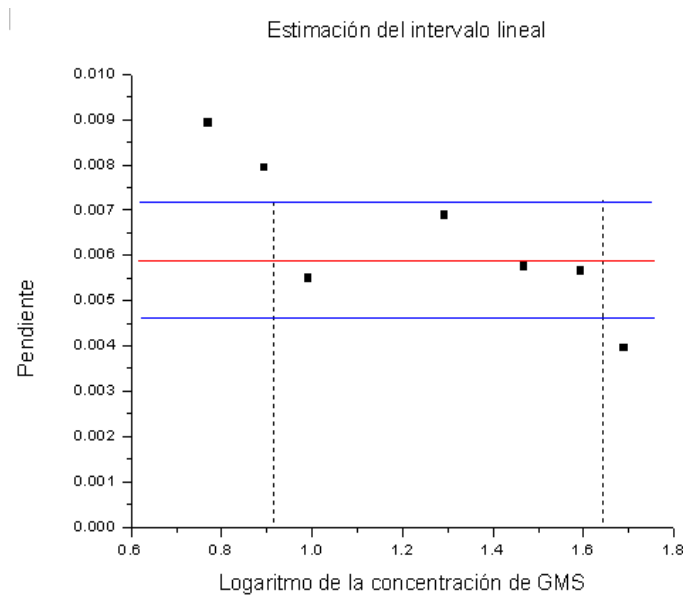


Fig. 3.2.5: Estimación gráfica del intervalo lineal de GMS.

El cálculo de LC y LD se hace con la distribución estadística t-student, para un intervalo de confianza de 95%, a dos colas y n-2 grados de libertad ^[32]. Los resultados indican que **LD=1.64 mg/L**, mientras que **LC=3.24 mg/L (Anexo V)**. Estos valores concuerdan con las señales obtenidas: en el fiagrama de la figura 3.2.3 se observa que las señales correspondientes al estándar de 2 mg/L resultan ya muy poco perceptibles. En la Figura 3.2.6 se esquematiza la determinación de LD y LC tomando en cuenta 3 y 10 veces la desviación estándar, respectivamente.

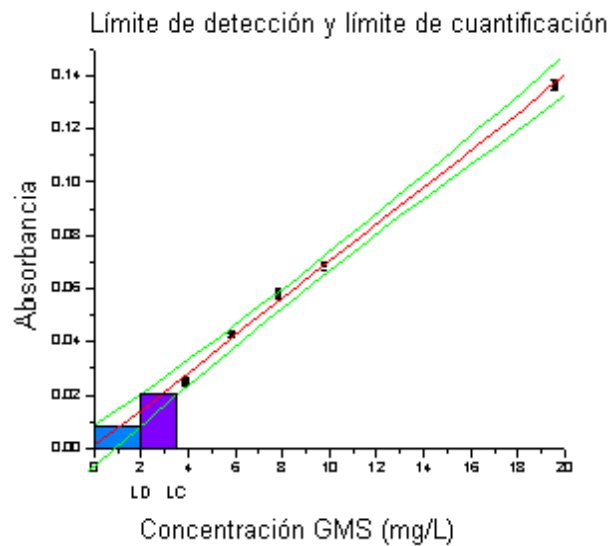


Fig. 3.2.6: LD (3 veces la desviación estándar) y LC (10 veces la desviación estándar) de GMS (mg/L)

3.2.2.2 Eficiencia de la enzima

Para la evaluación de la eficiencia de la enzima se inyectaron por triplicado disoluciones equimoleculares de amonio y GMS en un intervalo de 0.3 – 0.05 mmol/L (Fig. 3.2.7). Se construyó la recta de calibración de amonio, y a partir del valor de altura de pico (en unidades de absorbancia) de las disoluciones de GMS se calculó la concentración de amonio producido. En la figura 3.2.8 se muestra la recta de calibración de amonio.

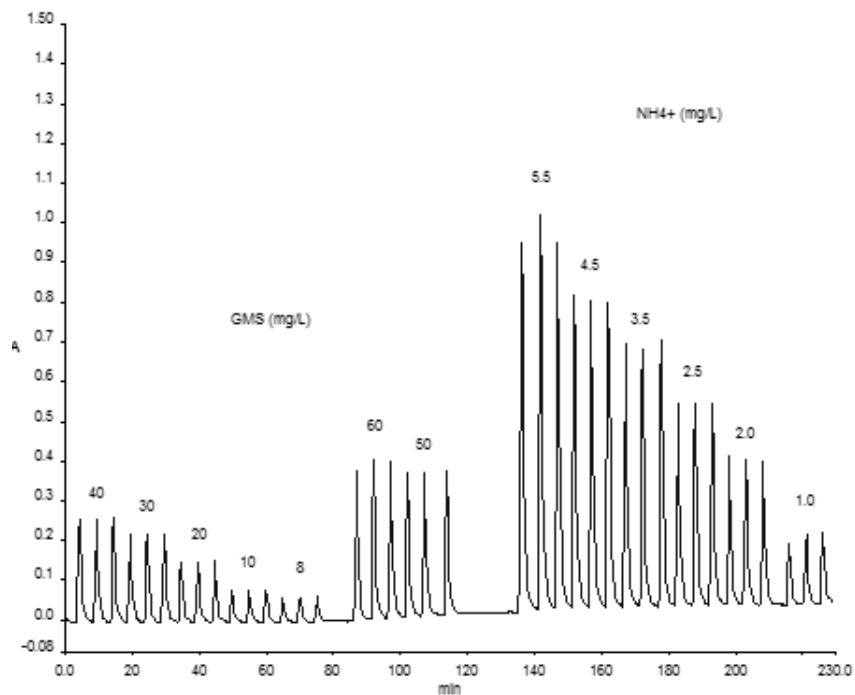


Fig. 3.2.7: Diagrama para cálculo de eficiencia de la enzima.

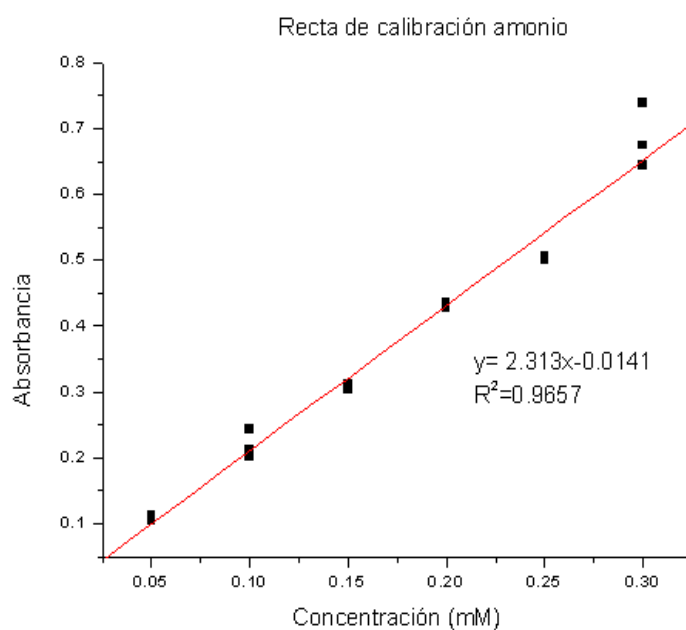


Fig. 3.2.8: Recta de calibración de amonio

A partir del valor de altura de señal de las disoluciones de GMS se calculó la concentración amonio producido (**Anexo VI**) y se graficó $[NH_4^+] = f[GMS]$; a partir de la pendiente de la recta de regresión es posible calcular la eficiencia del reactor enzimático. De ésta manera, se obtiene una eficiencia de 49.07% (Figura 3.2.9).

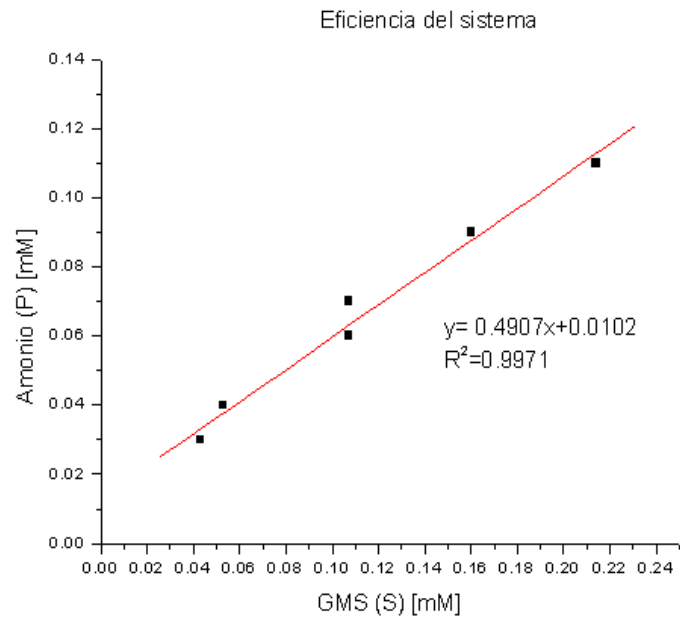


Fig. 3.2.9: Relación concentración de producto (amonio)-
concentración de sustrato (GMS).

3.2.2.3 Precisión y exactitud

Para el cálculo de la precisión del método se efectuaron las inyecciones de los estándares como se menciona en la sección 2.4.1.3, obteniéndose el diagrama de la Fig. 3.2.10:

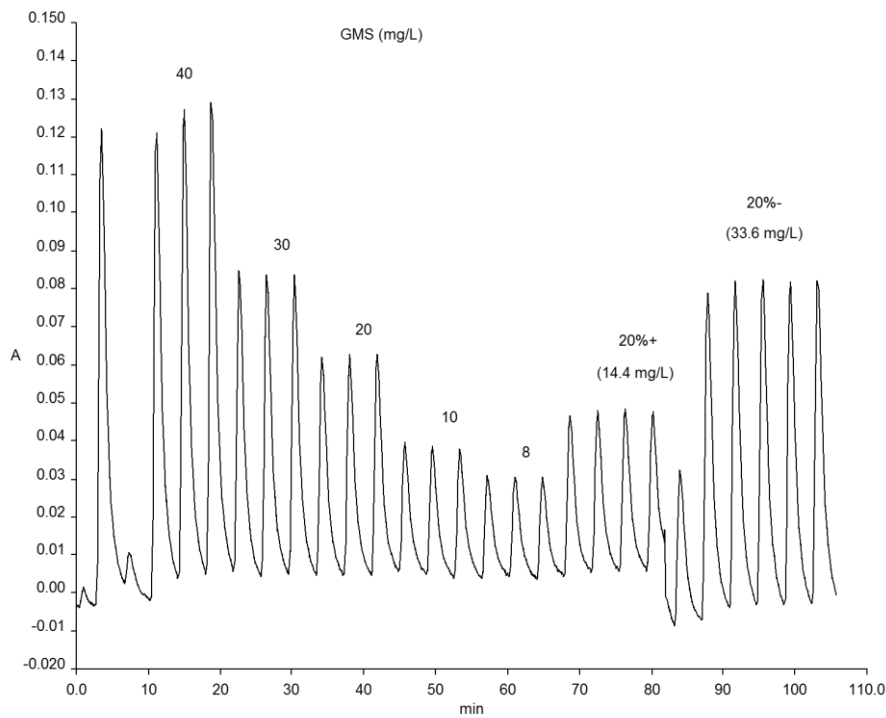


Fig. 3.2.10: Diagrama para el cálculo de precisión.

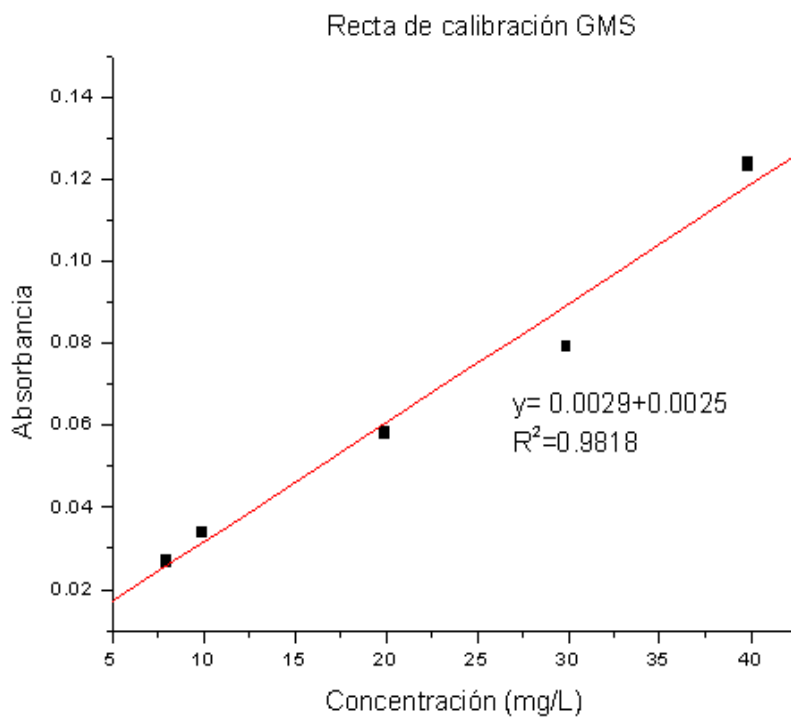


Fig. 3.2.11: Recta de calibración de GMS para el cálculo de precisión.

Tomando en consideración 60 mg/L como la concentración más alta y 10 mg/L la más baja, se calcula el 20% de la diferencia entre ambas concentraciones para preparar estándares de GMS de concentración 20% por encima del punto más bajo (extremo bajo, 14.4 mg/L) y 20% por debajo del punto más alto (extremo alto, 33.6 mg/L) e

inyectarlos por septuplicado. A partir del valor de altura de las señales obtenidas, se calculó el coeficiente de variación (%CV) ^[8] de la siguiente manera:

$$\%CV = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Promedio}} \times 100$$

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.2.1:

Disolución	Altura promedio	Desviación estándar	Precisión (%CV)
Extremo bajo (14.4 mg/L)	13.614	0.321	2.36
Extremo alto (33.6 mg/L)	28.517	0.218	0.76

Tabla 3.2.1: Resultados del cálculo de coeficiente de variación.

Debido a que, de acuerdo con lo estipulado por la Comisión Europea ^[15] es aceptable un máximo de %CV=20, los resultados obtenidos demuestran que el método es preciso.

Para el cálculo de *exactitud* del método, se inyectaron ambas curvas patrón (GMS marca Sigma® certificado y McCormick®) y ambas disoluciones de 24 mg/L como se explica en la sección 2.4.1.3.

La inyección de la curva de GMS McCormick® y la disolución de 24 mg/L de Sigma® se muestra en la Fig. 3.2.12.

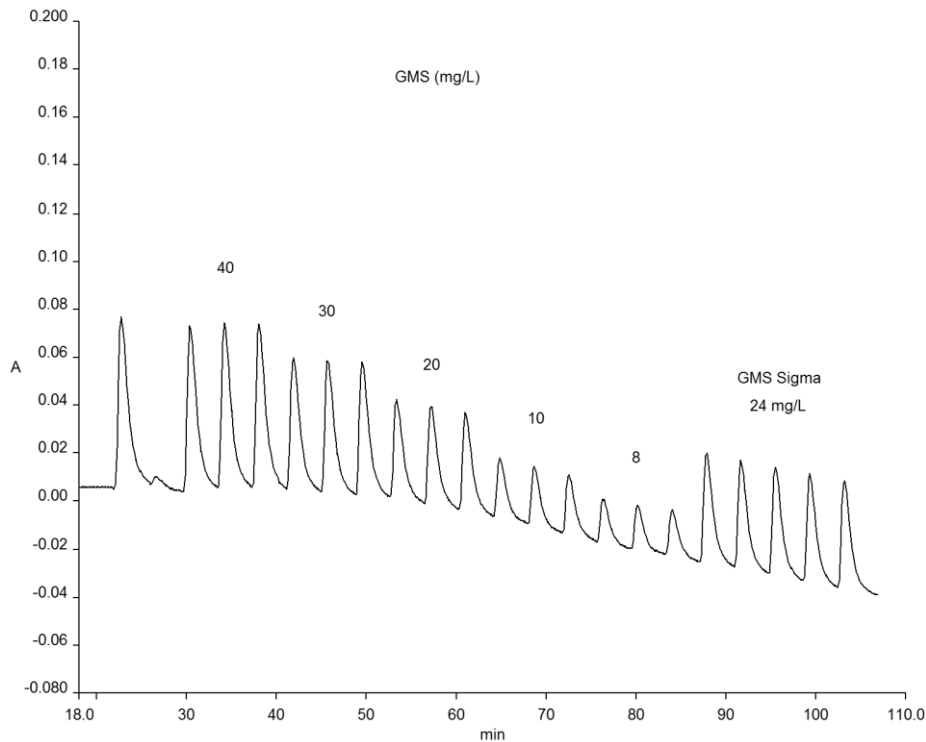


Fig. 3.2.12: Diagrama para la estimación de la exactitud del método, curva patrón de estándar de GMS McCormick® y quintuplicado de estándar de GMS Sigma®.

Con las curvas de dispersión de valores de la curva se hizo la estimación de la incertidumbre en el cálculo de exactitud. S_a y S_b (**Anexo VII**) son el valor del error respecto a la pendiente y la ordenada al origen, utilizando un intervalo de confianza de 95% y $n-2$ grados de libertad. Y_+ y Y_- son las barras de error, estimadas a partir de S_a y S_b ^[32]. De acuerdo con los resultados obtenidos, el intervalo de concentración en el que debe situarse la concentración experimental del estándar Sigma® es de $X_1=22.83$ mg/L y $X_2=24.33$ mg/L. La concentración calculada del estándar Sigma® por éste método es de 23.57 mg/L, concentración encontrada entre X_1 y X_2 (Fig. 3.2.13).

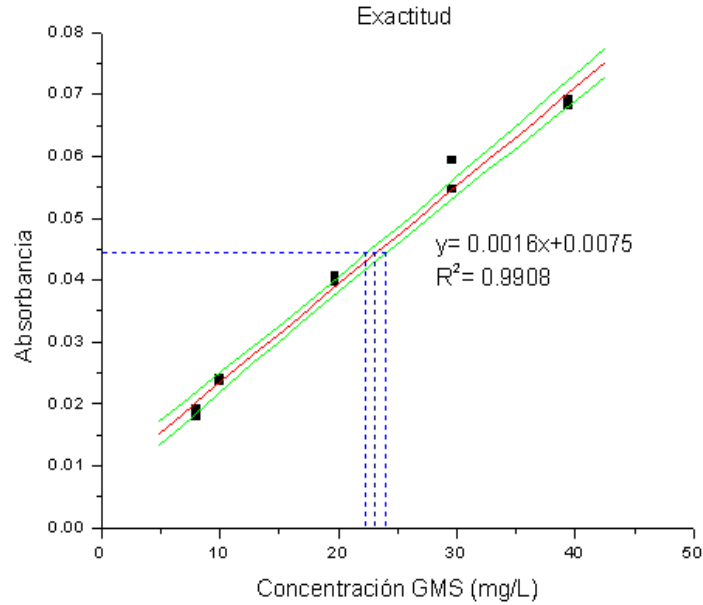


Fig. 3.2.13: Límites de confianza para la concentración de GMS Sigma® determinada utilizando una recta de regresión.

La concentración del estándar Sigma® calculada (valor medio) es de 23.57 mg/L y la concentración real de la disolución 24 mg/L (valor conocido) es de 23.70 mg/L. a partir de estos valores se calcula el porcentaje de error de la siguiente manera ^[8]:

$$\begin{aligned} \%error &= \pm \left(\frac{\text{valor medio} - \text{valor conocido}}{\text{valor conocido}} \right) \times 100 = \pm \left(\frac{23.57 - 23.70}{23.70} \right) \times 100 \\ &= \mathbf{0.55\%} \end{aligned}$$

Posteriormente, se realizó la inyección de la curva patrón de los estándares a partir de GMS Sigma® y cinco inyecciones de disolución 24 mg/L de GMS McCormick®, con el fin de corroborar que los resultados obtenidos al elaborar una recta de calibración con cualquiera de los dos estándares, son comparables. El fiagrama obtenido fue el siguiente (Fig.3.2.14):

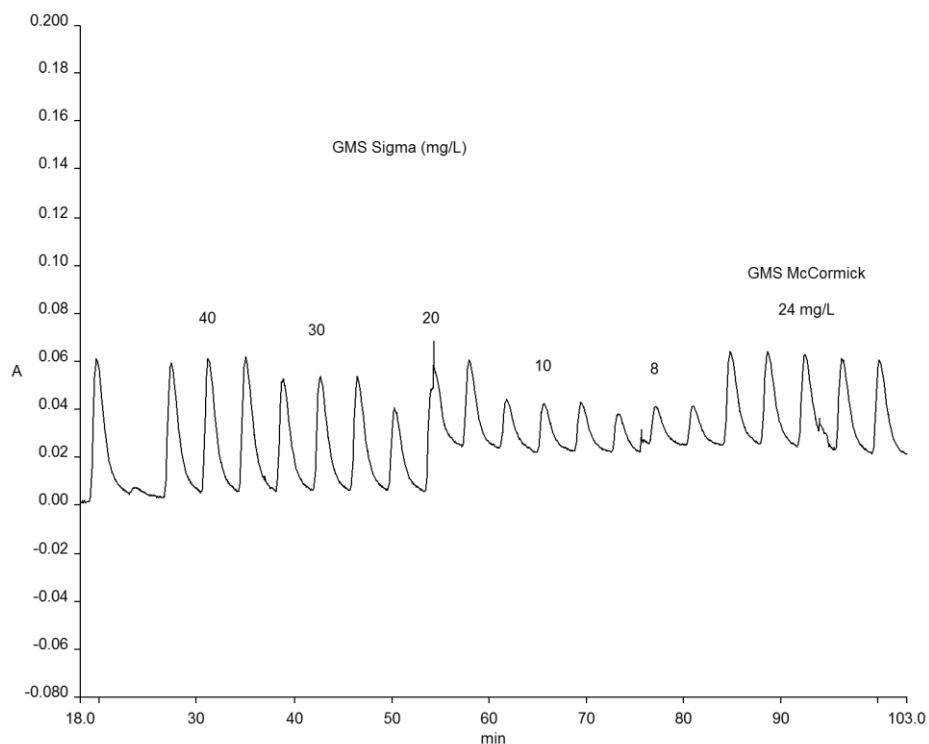


Fig. 3.2.14: Diagrama de recta de calibración con GMS Sigma® y quintuplicado de inyecciones de GMS McCormick® 24 mg/L.

Se procedió a graficar los límites de confianza y calcular la concentración de la disolución de GMS McCormick® a partir de los resultados mostrados en el **Anexo VIII**. Los límites en que la concentración debe estar comprendida son $X1=24.00$ mg/L y $X2=26.28$ mg/L, siendo la concentración calculada (valor medio) igual a 25.30mg/L (Fig. 3.2.15).

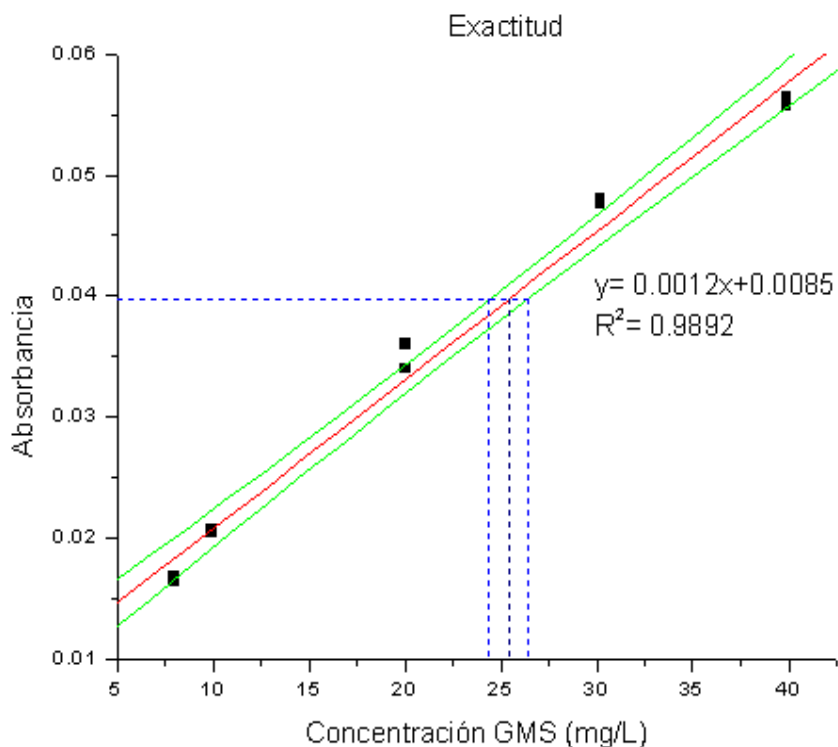


Fig. 3.2.15: Límites de confianza para la concentración de GMS McCormick® determinada utilizando una recta de regresión.

Siendo la concentración real de la disolución 24 mg/L (valor conocido) de 23.66 mg/L y el valor medio igual a 25.30 mg/L, se hizo el cálculo del porcentaje de error.

$$\begin{aligned} \%error &= \pm \left(\frac{\text{valor medio} - \text{valor conocido}}{\text{valor conocido}} \right) \times 100 = \pm \left(\frac{25.30 - 23.66}{23.66} \right) \times 100 \\ &= \mathbf{6.93\%} \end{aligned}$$

El error de 3.55% puede deberse, entre otras cosas, a que se desconoce el porcentaje de pureza del GMS McCormick®.

De acuerdo con los resultados obtenidos y debido a que en ambos experimentos la concentración de las disoluciones de 24 mg GMS/L se encuentra dentro de los límites de confianza, se puede asegurar que los resultados del análisis de muestras utilizando cualquiera de los

dos estándares de GMS serán comparables, es decir, los estándares son conmutables y el método es exacto.

3.2.2.4 Robustez

Se efectuó el procedimiento como se describe en la sección 2.4.1.5. y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 1) *Velocidad del flujo del portador.* El diagrama resultante de la inyección de la curva patrón de GMS y la dilución de la muestra de ablandador de carne Escosa® se muestra en la figura 3.2.16:

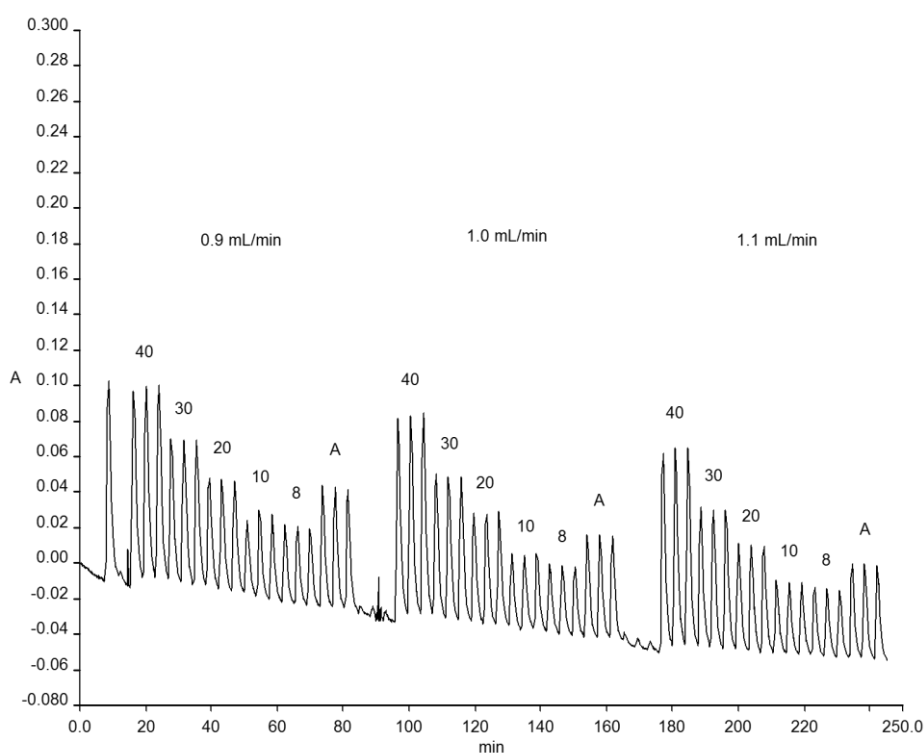


Fig. 3.2.16: Cambio de la velocidad del flujo del portador.

De acuerdo con la ecuación de la recta para cada curva a diferente velocidad de flujo se calculó la concentración de GMS en la muestra inyectada, sin tomar en cuenta el factor de dilución (**Anexo IX**). Se calculó también la desviación estándar y promedio de las concentraciones para cada velocidad. Puesto que en los análisis de

muestras el flujo estándar utilizado es 1.0 mL/min, se tomó el promedio de concentración a este flujo como *valor de referencia*. El promedio de las concentraciones a 0.9 y 1.1 mL/min se restaron del valor de referencia para obtener la *diferencia absoluta* y un valor de *porcentaje de diferencia* para poder estimar qué condición difiere en mayor grado de la condición estándar. Así, se tiene a 0.9 mL/min los resultados diferirán en mayor grado (28.53%) que si se trabaja a 1.0 o a 1.1 mL/min (3.18%); sin embargo, se espera este tipo de resultados debido a que al aumentar el tiempo de residencia del bolo de muestra en el reactor enzimático, aumenta la conversión de GMS a amoniaco

2) *pH del portador*. El diagrama obtenido fue el siguiente (Fig. 3.2.17):

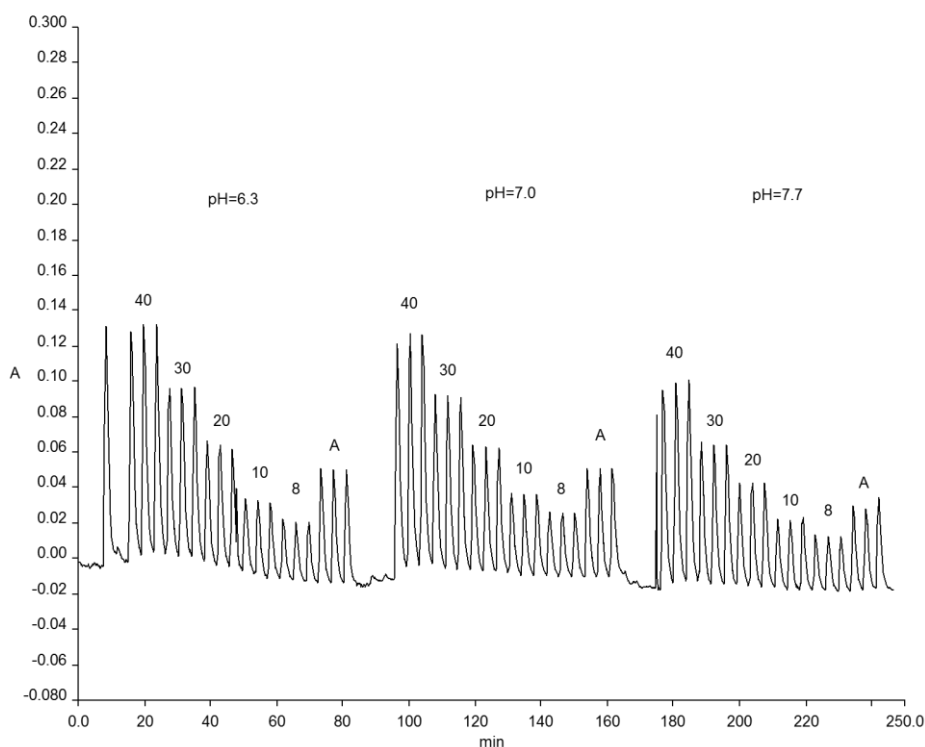


Fig. 3.2.17: Cambio en el pH del portador.

Se procedió de manera idéntica que en el inciso 1 (**Anexo X**), tomándose como valor de referencia el promedio de las concentraciones a pH=7.0, que es el pH del portador utilizado en los

análisis de muestras de acuerdo con los requerimientos de la enzima ^[10] y la optimización del método. A pesar de que la diferencia en los porcentajes no es notablemente grande, se puede concluir que los resultados obtenidos a pH=6.3 diferirán en mayor grado (11.40%) que si se utiliza un pH=7.0 o 7.7 (7.18%).

Si se utilizara como criterio de aceptación la comparación entre la *desviación estándar de referencia* (S_R) y la *desviación estándar de las diferencias* (S_{Di}) ^[42], donde si $S_{Di} < S_R$ se concluye que el factor evaluado no influye en el resultado, en ambos casos, por ser S_{Di} mayor que S_R se concluiría que deben utilizarse estrictamente las condiciones seleccionadas mediante la optimización del método para asegurar la uniformidad en los resultados obtenidos; sin embargo, el utilizar una enzima en la determinación, se esperaba este comportamiento y se puede concluir que el método es robusto en las condiciones establecidas mediante la optimización del método.

3.2.3 Análisis de muestras

Se inyectaron las diluciones mencionadas en la sección 2.4.2 (Fig. 3.2.18):

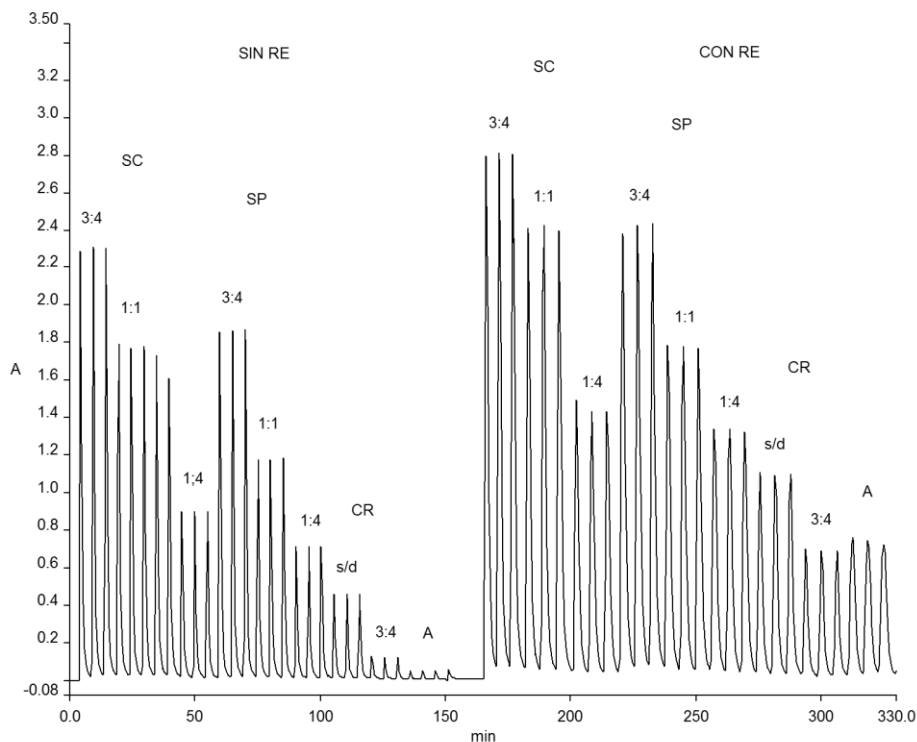


Fig. 3.2.18: Inyección de las diluciones de muestras preliminares, donde: 1/1=12.5 mL de muestra en 25 mL de aforo; 1/4= 6.3 mL de muestra en 25 mL de aforo; 3/4= 18.8 mL de muestra en 25 mL de aforo; SC= Sopa de fideos con camarón Knorr®; SP=“Mi pollo al horno” Knorr®; CR= Caldo de res Campbell’s®; A= Ablandador de carne Escosa®

Con el valor de altura de las muestras y la pendiente de la curva patrón, se calculó la concentración (mg de GMS/L) (**ANEXO IV**) y se observó que en todas las muestras, la concentración excedía del valor más alto de la curva patrón, lo que significa que las diluciones probadas estaban saturando la enzima. El cálculo de la concentración de GMS se calcula únicamente tomando en cuenta la pendiente de la recta y no la ordenada al origen porque al restar el valor de altura debida a la señal correspondiente de amonio ya se está corrigiendo el resultado respecto al blanco.

Se decidió elegir nuevas muestras con el fin de generalizar el tratamiento de las mismas; las muestras utilizadas fueron las siguientes:

- 1) **Sopa de municiones, Knorr®**: Sopa preparada. Contenido neto: 95 g. Lote: 4314BM3 20:35.
- 2) **Sopa de municiones, Great Value®**: Sopa de pasta de sémola de trigo preparada. Contenido neto: 95 g. Lote: BL-T-M-3916 li.
- 3) **Arroz a la mexicana, Knorr®**: Sopa preparada, arroz con zanahoria y chícharo. Contenido neto: 160 g. Lote: 4277B04.
- 4) **Arroz con tomate, Verde Valle®**: Arroz precocido. Contenido neto: 235 g. Lote: L4189G2
- 5) **Ablandador de carne, Escosa®**: condimento. Contenido neto: 155 g. Lote: L176W.

Las muestras 1) a 4), se tamizaron para separar el condimento del producto, la muestra 5) se utilizó íntegra. Se pesó 0.5 g de condimento y se disolvió en 100 mL de agua destilada en agitación por 3 minutos a velocidad 8. Las muestras 1) a 4) se filtraron. Se inyectaron a través del reactor enzimático diluciones de concentraciones distintas para elegir la dilución adecuada para cada muestra, para la determinación de GMS. Debido a que con las diluciones seleccionadas no es detectada la señal de amonio, se utilizaron diluciones de concentraciones distintas para la determinación de GMS y amonio (Tabla 2.3.1).

Muestra	Dilución	
	Para determinación de GMS	Para determinación de amonio
<i>Sopa de municiones, Knorr®</i>	2.0 mL de disolución de la muestra en 25.0 mL de agua destilada.	1.0 mL de disolución de muestra en 25.0 mL de agua destilada.
<i>Sopa de municiones, Great Value®</i>	3.0 mL de disolución de la muestra en 25.0 mL de agua destilada.	
<i>Arroz a la mexicana, Knorr®</i>	1.5 mL de disolución de la muestra en 25.0 mL de agua destilada.	
<i>Arroz con tomate, Verde Valle®</i>	3.0 mL de disolución de la muestra en 25.0 mL de agua destilada.	
<i>Ablandador de carne, Escosa®</i>	6.0 mL de disolución de la muestra en 25.0 mL de agua destilada.	

Tabla 2.3.1: Dilución de las muestras.

Se inyectó en primer lugar la recta de calibración de GMS, las muestras y la disolución control de GMS (CG) a través de la ruta I de la configuración (las disoluciones inyectadas pasan a través del reactor enzimático); posteriormente se hizo el cambio a la ruta II y se inyectó la recta de calibración de amonio y las muestras respectivas, sin la CG. Cada disolución se inyectó por triplicado y el cambio de la ruta I a la ruta II se efectuó después de hacer 2 inyecciones de agua para procurar enjuagar el reactor enzimático. Para preparar los estándares de amonio se tomó en consideración que en la catálisis enzimática se produce una molécula de amonio por

cada molécula de GMS, así que la concentración de los estándares de amonio es equivalente a la concentración de los estándares de GMS. Se realizaron diluciones de las nuevas muestras elegidas (Tabla 2.3.1, sección 3.2) y se inyectaron como se explica en la sección 3.2. (Fig. 3.2.19).

A partir de la recta de calibración de GMS y la altura de las señales de las muestras (expresada en unidades de absorbancia), se calculó la concentración de GMS (mg GMS/L) y se observó que, en efecto, no se llega al punto de saturación de la enzima con las diluciones seleccionadas. Asimismo, se calculó la concentración de amonio; bajo la premisa de que, debido a la selectividad del método, no debería obtenerse señales con la inyección de las muestras sin la presencia del reactor enzimático. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.2.2.

Muestra	GMS		Amonio
	mg/g muestra	mg/porción	mg/g muestra
Sopa de municiones Knorr®	66.9 (6.7%)	409.76	0.533
Sopa de municiones Great Value®	28.2 (2.8%)	188.94	0.363
Arroz a la mexicana Knorr®	74.0 (7.4%)	210.90	0.380
Arroz con tomate Verde Valle®	33.4 (3.3%)	209.86	0.572
Ablandador de carne Escosa®	13.2 (1.3%)	NA	ND

Tabla 3.2.2: Concentración de GMS y amonio en las muestras, donde: ND= no determinado, NA= no aplica.

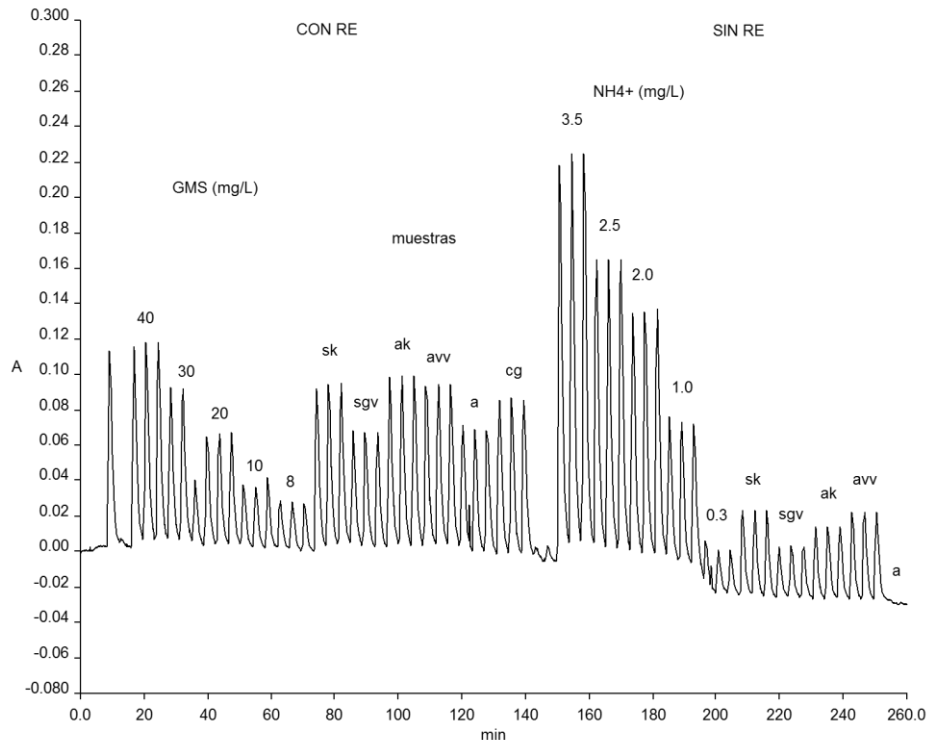


Fig. 3.2.19: Diagrama de la determinación de GMS y amonio, donde:
 sk= Sopa de municiones Knorr®; sgv= Sopa de municiones Great Value ®; ak= Arroz a la mexicana Knorr®; avv= Arroz con tomate Verde Valle®; a= Ablandador de carne Escosa®; cg= Control GMS 20 mg/L.

Se monitoreó el control de GMS con el fin de detectar si, con el paso del tiempo, el GMS en disolución acuosa sufre degradación o hidrólisis que impide que sea oxidado por la enzima, y se comprobó que, durante los 14 días en que se llevó a cabo el análisis, el GMS se mantuvo íntegro.

Respecto a las muestras del día 1, se inyectaron el segundo día y no se obtuvo señal, por lo que es indispensable preparar muestras nuevas cada vez que se haga la determinación. Se explica esta ausencia de señales con la variabilidad de la composición de las muestras: probablemente haya alguna otra enzima presente que degrade el GMS a una especie que no permea la membrana o no produce cambio en la absorbancia del aceptor.

3.2.3.1 Gráficas de control

Se realizó el análisis de las muestras como se explica en la sección 2.4.1.4 por un periodo de 14 días.

Tomando en cuenta la dilución de las muestras, se calculó la concentración de GMS expresada en mg de GMS/g de muestra, no así para el Control de GMS, en que la concentración se expresó en mg de GMS/L. Para cada muestra, se elaboró un diagrama de Shewhart, ubicando las líneas de alerta y de acción de acuerdo con el promedio y la desviación estándar de la concentración calculada de GMS en las muestras (**Anexo XI**).

Para tomar la decisión de descartar algún dato o serie de se elaboró la historia de cada punto de las gráficas con el fin de identificar anomalías que ameritaran no tomarlos en cuenta: en los días 11 y 12 hubo complicaciones con el reactor enzimático que provocaron la obtención de resultados aberrantes respecto al resto de las determinaciones.

Una vez integrado el resto de los días en la gráfica de control para cada muestra, es posible observar que hay valores muy próximos a las líneas de acción, lo que significaría detener el análisis y corregir aquellos factores que pudieran estar afectando la obtención de los resultados. Estos valores (marcados con rojo en los gráficos del **Anexo XI**) no deben descartarse arbitrariamente, por lo que, se procedió a aplicar una prueba de valores aberrantes o anómalos ^[32].

Suponiendo una población normal, una forma de estudiar una medida sospechosa es comparar la diferencia entre ésta y la medida más próxima en tamaño, entre las medidas más grande y más pequeña: a este cociente se le llama *Q de Dixon*.

$$Q = \frac{\text{valor sospechoso} - \text{valor más cercano}}{\text{valor más grande} - \text{valor más pequeño}}$$

Si Q calculada es mayor que Q crítica, se descarta el valor sospechoso.

Sin embargo, por no contar con el valor de Q crítica para 12 ensayos, se optará por usar la **prueba de Grubbs** ^[5].

La prueba de Grubbs se usa para identificar datos anómalos en distribuciones normales, al igual que Q de Dixon. Se basa en la diferencia entre la media de la muestra y el dato sospechoso, considerando la desviación estándar.

$$T = \frac{|X_0 - \bar{X}|}{s}$$

Dónde:

\bar{X} = media muestral

X_0 = valor atípico

s = desviación estándar de la muestra

Si T calculada es mayor que T crítica, se trata de un valor atípico y se puede descartar.

Después de efectuar la prueba de Grubbs a los valores sospechosos de cada muestra, se obtiene que ninguno de ellos es atípico.

Se puede explicar la existencia de estos valores tan próximos a las líneas de acción debido a la naturaleza inherente de las muestras y a que en su tratamiento únicamente se separó el condimento del resto del producto y no se procedió a homogenizarlo, provocando que el contenido de GMS de la porción de muestra analizada variara. En el caso del ablandador de carne Escosa®, la variación fue menor que en el resto de las muestras debido a que su composición es más sencilla y resulta más homogéneo.

Cuando el análisis se realiza de forma cotidiana, es importante integrar los nuevos resultados a la gráfica de control para observar si han ocurrido variaciones tales que reflejen pérdida de control en el proceso y poder tomar acciones correctivas antes de realizar un nuevo análisis.

CONCLUSIONES

Se propone un método para la determinación de GMS y amonio en muestras de alimentos. El método implementado es sencillo y permite el análisis de numerosas muestras de forma rápida, precisa y selectiva; su selectividad se logra con la integración del reactor enzimático y la celda de difusión de gases. De acuerdo con los resultados obtenidos, el método es preciso y exacto, debido a que el coeficiente de variación es menor a 20 y los patrones utilizados son conmutables.

La gran capacidad de análisis de muestras por unidad de tiempo de FIA permite su implementación en programas de aseguramiento y control de calidad. Por las características inherentes del FIA se logra una dispersión controlada de la muestra y sincronización reproducible.

Es necesario tomar consideraciones respecto al tratamiento de las muestras debido a que cada una requerirá una dilución distinta de acuerdo con sus características, con el fin de evitar la saturación de la enzima. Para disminuir las variaciones en los resultados en la concentración de GMS por día se recomienda obtener una mezcla homogénea de los condimentos una vez separados del producto. Como todas las muestras analizadas son condimentos, el tratamiento de las mismas fue muy similar, sin embargo, también se debe vigilar que ningún componente de las muestras interfiera con el funcionamiento de la enzima, por ejemplo: si una muestra contiene grasa, podría recubrir la enzima y provocar su pérdida de actividad.

La enzima L-glutamato oxidasa requiere condiciones específicas para llevar a cabo su actividad catalítica, por lo que es muy importante mantener el pH del portador en un valor de 7.0 y un flujo de 1.0 mL/min para obtener resultados comparables en cada análisis.

El reactor enzimático pudo utilizarse en análisis diarios durante seis meses consecutivos, teniendo que preparar un lote nuevo de L-glutamato oxidasa inmovilizada después de ese periodo de tiempo. Para la conservación del reactor enzimático, debe mantenerse en buffer a pH=7.0 y refrigeración.

La adición de L-GMS como potenciador de sabor depende del tipo de alimento, la fórmula total del mismo y el efecto potenciador buscado. Diversas empresas del ramo de alimentos sugieren para cada aplicación diferentes niveles de uso. Se sugiere su uso bajo las BPF debido a que la adición de un exceso de GMS no implica que aumente su efecto potenciador, sino que llega a rebasar el umbral de detección del consumidor, quien comienza a detectar el sabor propio del GMS y disminuye su agrado por el producto.

No existe una Norma Oficial Mexicana que regule el contenido de GMS permitido en condimentos, sin embargo, con la aplicación de la presente metodología a alimentos normados se puede verificar si se encuentran, o no, fuera de especificación. El motivo por el que no existe alguna regulación nacional para GMS es que no existe una cantidad establecida para ejercer el efecto potenciador; dicho efecto es determinado mediante pruebas de aceptación a consumidores.

Se sugiere preparar muestras nuevas por análisis, someter al sonicador las disoluciones aceptora y donadora para evitar su cambio de pH por presencia de aire, enjuagar la enzima con disolución portadora al finalizar el estudio por aproximadamente una hora y desempacar y reempacar el reactor enzimático periódicamente para evitar que se compacte el CPG. Es posible utilizar las mismas disoluciones estándar de GMS y amonio en determinaciones consecutivas debido a su buena estabilidad.

La determinación simultánea de amonio en las muestras es importante debido a que el análisis preliminar demostró que aquellas

que declaran contener proteína tienen una concentración proporcional de amonio. Bajo el supuesto de que al inyectar una muestra sin el reactor enzimático no debería producir señal alguna, se genera la hipótesis de que las muestras, efectivamente, contienen amonio, probablemente como cloruro de amonio, con el fin de generar un valor alto de proteína en un análisis bromatológico, sin embargo, habría que efectuar pruebas similares con algún otro componente del que se sospeche puedan obtenerse señales en las condiciones del análisis para obtener resultados concluyentes respecto al supuesto de una adulteración.

BIBLIOGRAFÍA

1. AOAC: Official Methods of Analysis, 1980. 13° Edición, 353 pp. [En línea] Disponible en:
http://archive.org/stream/gov.law.aoac.methods.1980/aoac.methods.1980_djvu.txt [Último acceso 05/04/15]
2. Araújo, A., Lins da Silva, V., Montenegro, M. C., Oliveira, M. I. P., Pimentel, M. C., Pimentel, M. F., 2001. L-Glutamate determination in food samples by flow-injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 448, 207-213.
3. Arroyo, A., Gómez, A., Peña, A., Tapia, R., 1981. *Bioquímica*, Vizcaya: Editorial Limusa.
4. Arroyo, M., 1998. *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*, Madrid: Ars Pharmaceutica.
5. ASTM International: Manejo de valores atípicos, 2014. [En línea] Disponible en:
http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND08/datapoints_spnd8.html [Último acceso 09/04/15]
6. Atanassov, G. T., Lima R. C., Mesquita, R. B. R., Rangel, A. O. S. S., Toth, I. V., 2000. Spectrophotometric determination of carbon dioxide and sulphur dioxide in wines by flow injection, *Analisis*, 28, 77-82.
7. Avendaño García, Jorge Juventino, 2004. *Desarrollo de un método automatizado (FIA) para la determinación simultánea de cianuros y sulfuros*. Tesis para obtener el título de Químico.
8. Barreiro, F. A., Guisande, G. C., Maneiro, E. I., Riveiro, A. I., Vaamonde, L. A., Vergara, C. A. 2006. *Tratamiento de datos*, España: Ediciones Díaz de Santos.
9. Bender, M. L., Brubacher, L. J., 1977. *Catálisis y acción enzimática*, 2° Edición, Barcelona: Editorial Reverté.

10. BRENDA Enzyme Database, 2014. **Information on EC 1.4.3.11 - L-glutamate oxidase** [En línea] (Actualizado a Julio, 2014). Disponible en:
<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=1.4.3.11>
[Último acceso 19/11/14].
11. Cañizares, M., Luque de Castro, M. D., 2002. Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46 (2), 167-174.
12. Codex Alimentarius, 1989. **Class names and the International numbering system for food additives** [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en:
http://www.codexalimentarius.org/download/standards/13341/CXG_036e.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=fC4HVJXILcKXgwSYxIHgDA&ved=0CBcQFjAA&usg=AFQjCNHR_q8C4I6DKB5s1AX8uPut4y9LkQ [Último acceso 03/09/14].
13. Codex Alimentarius, 2014. **37º Reunión de la Comisión del Codex Alimentarius**. [En línea]. Disponible en:
www.codexalimentarius.net/gsaonline/reference/table3.html?ad=27#ad276 [Último acceso 08/08/14]
14. COFEPRIS. **Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias**.
15. Comisión Europea, 2002. **Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados** [En línea]. Disponible en:
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32002D0657> [Último acceso 07/09/15]
16. Ettore, L. S., Hinshaw, J. V., 1993. **Basic Relationships of Gas Chromatography**, Cleveland: ADVANSTAR Communications.

17. FAO. *Calidad de métodos analíticos*, 2013. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm> [Último acceso 15/04/15]
18. FAO. *Monosodium L-Glutamate*, 1987. 31th JECFA. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-292.pdf> [Último acceso 05/04/15]
19. FAO Nutrition Meetings, Report Series No. 48A WHO/FOOD ADD/70.39. *Toxicological Evaluation of some extraction solvents and certain other substances*. [En línea]. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48aje09.htm> [Último acceso 03/11/14].
20. FAO: Reuniones sobre nutrición. *Evaluación toxicológica de ciertos aditivos alimentarios: colores alimentarios, enzimas, mejoradores del sabor, espesantes y otros*. 18° Informe del Comité de Expertos. N°54A 1975, WHO Food Additives Series, N°6 1975.
21. FAO, depósito de documentos. Métodos de análisis para la determinación de nitrógeno y constituyentes nitrogenados en alimentos. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s17.htm> [Último acceso 18/05/15]
22. FDA, U. S. Food and Drug Administration, 1980. *Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews* [En línea] (Actualizado al 31/10/2006). Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogslisting&id=217> [Último acceso 03/09/14]

23. Food Chemicals Codex, 2010-2011. **Monosodium L-glutamate**, Baltimore: U. S. Pharmacopeia. Séptima edición.
24. Hablemos claro, 2013. **Glutamato monosódico** [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en:
<http://www.hablemosclaro.org/ingrepedia/glutamato-monosodico.aspx#.VFKcGyKG8qN> [Último acceso 30/10/14].
25. Hajeb, P., Jinap, S., 2010. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. **Appetite**, 55, 1-10.
26. Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K., 1992. **Immobilized Affinity Ligand Techniques**, Londres: Academic Press, Inc.
27. Hernández Garcíadiego, L. 2000. **Incorporación de biosensors a sistemas de flujo continuo para determinaciones analíticas**. Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias Químicas.
28. Horio, T., Kawamura, Y., 1989. Salivary secretion induced by umami taste. **Shika Kiso Igakkai Zasshi**, 31, 107-111.
29. Johansson, G.; Ögren. L. Anal. Chim. Acta **84**, 23-29, (1976).
30. Lidemann, B., 2001. Receptors and transduction in taste. **Nature**, 413, 219-225.
31. Lupien, J., Walker, R., 2000. The safety evaluation of Monosodium Glutamate, **The Journal of Nutrition**, 130 (4), 10495-10525.
32. Miller, J. C., Miller, J. N., 1993. **Estadística para Química Analítica**, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana.
33. National Institute of Standards and Technology. Libro del web de Química, 2011. **L-Glutamic acid** [En línea] Disponible en:
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C56860&Units=SI&Mask=80> [Último acceso 18/06/15]

34. Norma Venezolana Covenin 2133-84, 1984. *Alimentos. Determinación de Glutamato Monosódico* [En línea] Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/2133-84.pdf> [Último acceso 04/09/14]
35. Pacheco, D., 2004. *Bioquímica médica*. Distrito Federal: Limusa.
36. Pickering, W. F., 1980. *Química analítica moderna*, Barcelona: Editorial Reverté.
37. Ríos, A., Valcárcel, M., 1992. *La calidad en los laboratorios (analíticos)*. Barcelona: Editorial Reverté.
38. Ruzicka, J., Hansen, E. H., Anal Chim Acta, 78 (1975) 145.
39. Sano, C., 2009. History of glutamate production. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (3), 7285-7325.
40. Secretaría de Salud, 1993. *NOM-030-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca. Crustáceos en conserva. Especificaciones sanitarias* [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/030ssa13.html> [Último acceso 01/09/15]
41. Secretaría de Salud, 1995. *NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias* [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/130ssa15.html> [Último acceso 01/09/14].
42. Secretaría de Salud, 2011. *Comisión de Control Analítico y ampliación de cobertura. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos* [En línea]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/cvfq032011.pdf> [Último acceso 23/09/15]
43. Trevan, M. D., 1980. *Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology*. Inglaterra: John Wiley & Sons.

44. Tung, T. C., Tung, T. S., 1980. Serum free amino acid levels after oral glutamate intake in infant and adult humans. *Nutr. Rep. Int.*, 22, 431–443.

ANEXOS

ANEXO I. Monografía del GMS ^[18]

Preparado en la 31° reunion JECFA (1987), publicado en FNP 38 (1988) y en FNP 52 (1992). Especificaciones para metals y arsenic revisadas en la 57° reunion JECFA (2001). El valor de IDA "sin especificar" para ácido glutámico y sus sales de amonio, Ca, K, Mg y Na, se estableció en la 31° reunión JECFA (1987).

SINÓNIMOS: Glutamato de sodio, GMS, INS No. 621

DEFINICIÓN

Nombres químicos: L-Glutamato monosódico monohidratado, sal sódica monohidratada del ácido glutámico

Número C.A.S.: 142-47-2

Fórmula química: $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$

Peso molecular: 187.13

Ensayo: No menos de 99.0% en base seca.

DESCRIPCIÓN: Cristales blancos, prácticamente inodoros o polvo cristalino.

USOS FUNCIONALES: Potenciador de sabor

CARACTERÍSTICAS

IDENTIFICACIÓN

Solubilidad (Vol. 4): Muy soluble en agua; poco soluble en etanol; prácticamente insoluble en éter.

Prueba para glutamato (Vol. 4): Pasa la prueba

Prueba para sodio (Vol. 4): Pasa la prueba

PUREZA

Pérdida por secado (Vol. 4): No más del 0.5% (98°, 5 h)

pH (Vol. 4): 6.7 - 7.2 (disolución 1 en 20)

Rotación específica (Vol. 4): $[\alpha]_{20, D}$: Entre +24.8 y +25.3° (disolución 10% (m/v) en HCl 2N)

Cloruros (Vol. 4): No más de 0.2%; Probar 0.07 g como se indica en la Prueba Límite, usando 0.4 mL de HCl 0.01 N como control

Ácido pirrolidón carboxílico (Vol. 4): Pasa la prueba

Plomo (Vol. 4): No más de 1 mg/kg; determinar usando una técnica apropiada de absorción atómica para el nivel especificado. La selección del tamaño de muestra y el método de preparación de la muestra puede basarse en los principios del método descrito en el **Volúmen 4, "Métodos instrumentales"**.

MÉTODO DE ENSAYO

Disolver aproximadamente 200 mg de la muestra, previamente secada y pesada, en 6 mL de ácido fórmico, y añadir 100 mL de ácido acético glacial. Titular con ácido perclórico 0.1 N, determinando el punto final potenciométricamente. Correr una determinación blanco de la misma manera y corregir con el blanco. Cada mL de ácido perclórico 0.1 N es equivalente a 9.356 mg de $C_5H_8NNaO_4 \cdot H_2O$

ANEXO II. Resultados de estudios toxicológicos [12, 13, 31].

Estudio*	Organismo de prueba	Conclusión
DL ₅₀	Ratas, ratones	15,000-18,000 mg/kg peso corporal, respectivamente.
Toxicidad subcrónica (dos años)	Ratas, ratones	No reveló ningún efecto adverso específico con niveles mayores a 4% de GMS en dieta.
Toxicidad subcrónica (dos años)	Perros	A niveles de 10%de GMS en dieta no se reveló ningún efecto en ganancia de peso, anormalidad en peso de órganos, mortalidad o conducta.

Reproducción y teratogénia	Ratas, ratones	Sin eventos manifestados, no se expone al feto a niveles tóxicos provenientes de la dieta materna por transferencia placentar.
Daño neuronal	Ratón	100-300 $\mu\text{mol/dL}$ en neonatos, más de 630 $\mu\text{mol/dL}$ en adultos provocan daño; 500 mg/kg peso corporal por administración forzada para producir lesiones en el hipotálamo en ratones neonatos.

*vía de administración oral.

ANEXO III. Características fisicoquímicas de la enzima L-Glutamato oxidasa ^[10].

Microorganismo	Condición	Máximo	Mínimo	Óptimo
<i>Streptomyces sp.</i>	pH	10	4	7
	Temperatura	No reportado		24

ANEXO IV. Cálculo de concentración de GMS en muestras preliminares (mg GMS/L).

	F. Dilución (mL aforo/mL muestra)	SIN REACTOR ENZIMÁTICO				CON REACTOR ENZIMÁTICO			Diferencia (altura con RE-prom.)	Conc. GMS (m=0.006)
		Pico	Base	Altura	Promedio alturas	Pico	Base	Altura		
Sopa de fideos con camarón y chile Knorr®	1.33	2.2863	0.0186	2.2677	2.2780	2.7956	0.0762	2.7194	0.4414	73.57
		2.3127	0.0243	2.2884		2.8154	0.0766	2.7388	0.4608	76.81
		2.3042	0.0264	2.2778		2.8065	0.065	2.7415	0.4635	77.26
	2.00	1.7947	0.0249	1.7698	1.7571	2.4109	0.0581	2.3528	0.5957	99.28
		1.7742	0.0248	1.7494		2.429	0.0599	2.3691	0.6120	101.99
		1.7776	0.0254	1.7522		2.395	0.0497	2.3453	0.5882	98.03
	3.97	0.9018	0.0164	0.8854	0.8856	1.492	0.0437	1.4483	0.5627	93.78
		0.8998	0.0143	0.8855		1.4287	0.0435	1.3852	0.4996	83.26
		0.8995	0.0135	0.886		1.4293	0.043	1.3863	0.5007	83.44
Sazonador "Mi pollo al horno" Knorr®	1.33	1.8532	0.0183	1.8349	1.8429	2.3862	0.0771	2.3091	0.4662	77.69
		1.8637	0.0193	1.8444		2.4254	0.0796	2.3458	0.5029	83.81
		1.8701	0.0206	1.8495		2.4368	0.0741	2.3627	0.5198	86.63
	2.00	1.1803	0.017	1.1633	1.1651	1.7904	0.0596	1.7308	0.5657	94.29
		1.1801	0.0161	1.164		1.7804	0.0579	1.7225	0.5574	92.91
		1.1843	0.0164	1.1679		1.7691	0.0569	1.7122	0.5471	91.19
	3.97	0.7126	0.0135	0.6991	0.7004	1.3362	0.0484	1.2878	0.5874	97.89
		0.7126	0.0122	0.7004		1.3398	0.047	1.2928	0.5924	98.73
		0.7146	0.0128	0.7018		1.3254	0.0454	1.28	0.5796	96.59
Caldo de res Campbell's®	1.00	0.4622	0.0098	0.4524	0.4524	1.1048	0.0357	1.0691	0.6167	102.78
		0.4607	0.0096	0.4511		1.0919	0.0353	1.0566	0.6042	100.70
		0.4638	0.0101	0.4537		1.1001	0.0319	1.0682	0.6158	102.63
	1.33	0.1253	0.0064	0.1189	0.1171	0.7021	0.0234	0.6787	0.5616	93.61
		0.121	0.0048	0.1162		0.6927	0.0244	0.6683	0.5512	91.87
		0.1217	0.0056	0.1161		0.6912	0.0252	0.666	0.5489	91.49
Ablandador de carnes Escosa®	1.00	0.0501	0.0073	0.0428	0.0441	0.7619	0.0381	0.7238	0.6797	113.28
		0.0504	0.0056	0.0448		0.7447	0.0426	0.7021	0.6580	109.66
		0.0504	0.0056	0.0448		0.7235	0.0405	0.683	0.6389	106.48

ANEXO V. Cálculo de LD y LC por el método de mínimos cuadrados [32].

ECUACIONES UTILIZADAS:

RECTA DE CALIBRACIÓN:

$$y = A + Bx$$

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

$$A = \bar{y} - B\bar{x}$$

LÍMITES DE PREDICCIÓN:

$$y_{\pm} = \bar{y} + B(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}}$$

En donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - y_{i\text{ calc}})^2}{n - 2}}$$

REGRESIÓN LINEAL POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS						
PARÁMETRO						
\bar{x}	9.408		y=A+Bx			
\bar{y}	0.066					
n	15		A	0.0005	S_A	0.0001
t(n-2)	2.12		B	0.0070	S_B	0.00125
$\sum(x_i - \bar{x})^2$	447.162					
$\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	3.117		S_{y/x}	0.0024		
$\sum(y_i - y_{calc})^2$	0.00008		R	0.9965		
$\sum(x_i)^2$	1774.812					
CÁLCULO DEL L.D.						
x	0.00					
Y⁺	0.0062		L.D.	1.637	mg/L	
CÁLCULO DEL L.C.						
x	1.636					
Y⁺	0.0175		L.C.	3.235	mg/L	

Dónde: n=total de ensayos; x= promedio de concentración; y= promedio de absorbancia; B= pendiente; A= ordenada al origen; Sb= incertidumbre respecto a la pendiente; Sa= incertidumbre respecto a la ordenada al origen; t(n-2)= t-student para 95% de confianza, n-2 grados de libertad, dos colas.

ANEXO VI. Resultados para el cálculo de eficiencia del reactor enzimático.

Curva patrón GMS							Std. Amonio				Oxidación GMS (conc. NH4+ obtenida)
Conc. GMS teórica (mg/L)	conc. exp (mg/L)	conc. (mM)	Pico	Base	Altura	conc GMS exp. (mg/L)	Conc. (mM)	Pico	Base	Altura	
60	58.8	0.321	0.4525	0.0925	0.36	60.293	0.30	0.8515	0.1131	0.7384	0.17
	58.8	0.321	0.4354	0.0889	0.3465	57.965		0.7675	0.1236	0.6439	0.16
	58.8	0.321	0.3954	0.0718	0.3236	54.017		0.7924	0.1175	0.6749	0.15
50	49.0	0.267	0.3595	0.0731	0.2864	47.603	0.25	0.6260	0.12	0.506	0.13
	49.0	0.267	0.3372	0.0512	0.286	47.534		0.6200	0.1186	0.5014	0.13
	49.0	0.267	0.3802	0.0927	0.2875	47.793		0.6218	0.1181	0.5037	0.13
40	39.2	0.214	0.316	0.0713	0.2447	40.413	0.20	0.5549	0.1192	0.4357	0.11
	39.2	0.214	0.3091	0.058	0.2511	41.517		0.5476	0.1212	0.4264	0.11
30	29.4	0.160	0.248	0.0565	0.1915	31.241	0.15	0.4283	0.1189	0.3094	0.08
	29.4	0.160	0.2387	0.0463	0.1924	31.396		0.4330	0.1206	0.3124	0.09
	29.4	0.160	0.243	0.0492	0.1938	31.637		0.4239	0.1192	0.3047	0.09
20	19.6	0.107	0.1894	0.0547	0.1347	21.448	0.10	0.3625	0.1193	0.2432	0.06
	19.6	0.107	0.1935	0.0581	0.1354	21.569		0.3228	0.1203	0.2025	0.06
	19.6	0.107	0.2007	0.062	0.1387	22.137		0.3334	0.1221	0.2113	0.06
10	9.8	0.053	0.1335	0.0661	0.0674	9.844	0.05	0.2350	0.1233	0.1117	0.03
	9.8	0.053	0.1378	0.0695	0.0683	10.000		0.2302	0.1221	0.1081	0.03
	9.8	0.053	0.1411	0.0707	0.0704	10.361		0.2288	0.1233	0.1055	0.03
8	7.84		0.1335	0.0744	0.0591	8.413	0.04				0.03
	7.84		0.1362	0.0795	0.0567	8.000					0.03
	7.84		0.1437	0.0877	0.056	7.879					0.03
6	5.88		0.1259	0.0841	0.0418						
	5.88		0.1272	0.0842	0.043						
	5.88		0.1294	0.0871	0.0423						
4	3.92		0.1193	0.0935	0.0258						
	3.92		0.124	0.099	0.025						
	3.92		0.1255	0.1017	0.0238						
2	1.96		0.1165	0.1033	0.0132						
	1.96		0.1192	0.1058	0.0134						
	1.96		0.1201	0.1074	0.0127						

ANEXO VII. Resultados para la estimación de la incertidumbre en el cálculo de la exactitud a partir del estándar de GMS Sigma® [32]

ECUACIONES UTILIZADAS:

RECTA DE CALIBRACIÓN:

$$y = A + Bx$$

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

$$A = \bar{y} - B\bar{x}$$

LÍMITES DE CONFIANZA:

$$y_{\pm} = \bar{y} + B(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}}$$

En donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - y_{i\text{ calc}})^2}{n - 2}}$$

REGRESIÓN LINEAL POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS						
PARÁMETRO			y=A+Bx			
\bar{x}	19.376					
\bar{y}	0.038					
n	15		A	0.0075	S_A	0.00098
t(n-2)	2.18		B	0.0016	S_B	0.00004
$\sum(x_i - \bar{x})^2$	2068.259					
$\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	3.291		S_{y/x}	0.0019		
$\sum(y_i - y_{\text{calc}})^2$	0.00005		R	0.9955		
$\sum(x_i)^2$	8075.129					
CÁLCULO DEL INTERVALO DE CONCENTRACIONES						
Promedio de alturas	0.0450	uA	Concentración Promedio	23.57	mg/L	
			Concentración Mínima	22.83	mg/L	
			Concentración Máxima	24.33	mg/L	
CONCENTRACIÓN PREPARADA: 24.0 mg/L						

Donde: x= promedio concentración; y= promedio absorbancia; n= total de inyecciones; m= inyecciones de estándar; t(n-2)= t-student para 95% confianza, n-2 grados de libertad, dos colas; B= pendiente; A= ordenada al origen; Sb= incertidumbre debida a la pendiente; Sa= incertidumbre debida a la ordenada al origen.

ANEXO VIII. Resultados para la estimación de la incertidumbre en el cálculo de la exactitud a partir del estándar de GMS McCormick® [32].

ECUACIONES UTILIZADAS:

RECTA DE CALIBRACIÓN:

$$y = A + Bx$$

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

$$A = \bar{y} - B\bar{x}$$

LÍMITES DE CONFIANZA:

$$y_{\pm} = \bar{y} + B(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i(x_i - \bar{x})^2}}$$

En donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i(y_i - y_{i\text{ calc}})^2}{n - 2}}$$

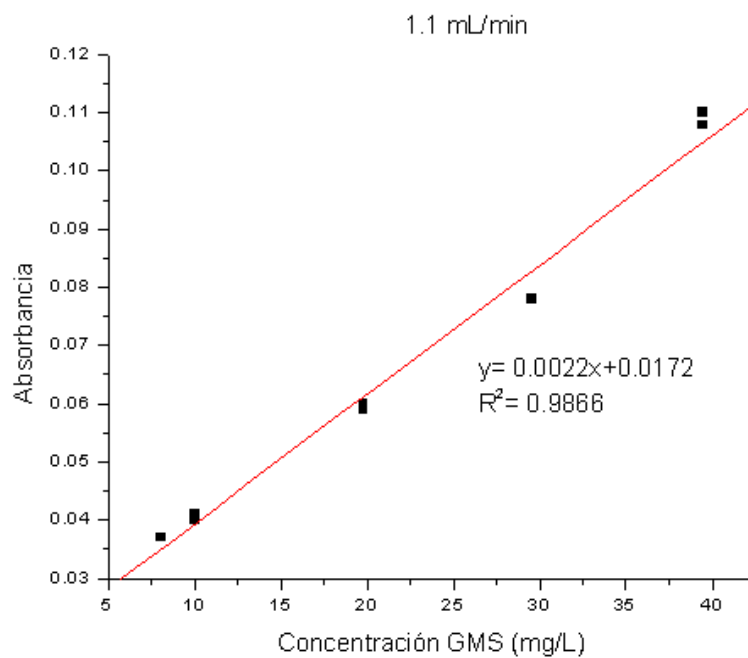
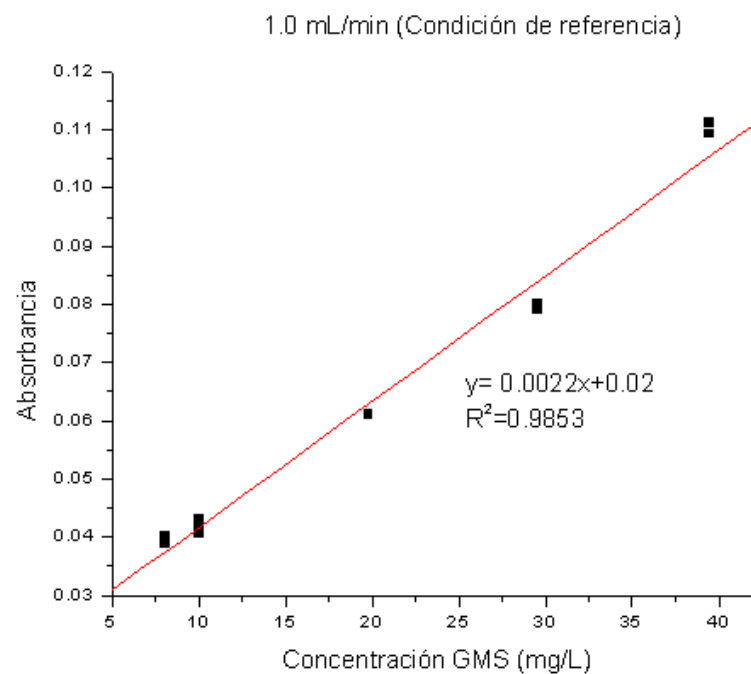
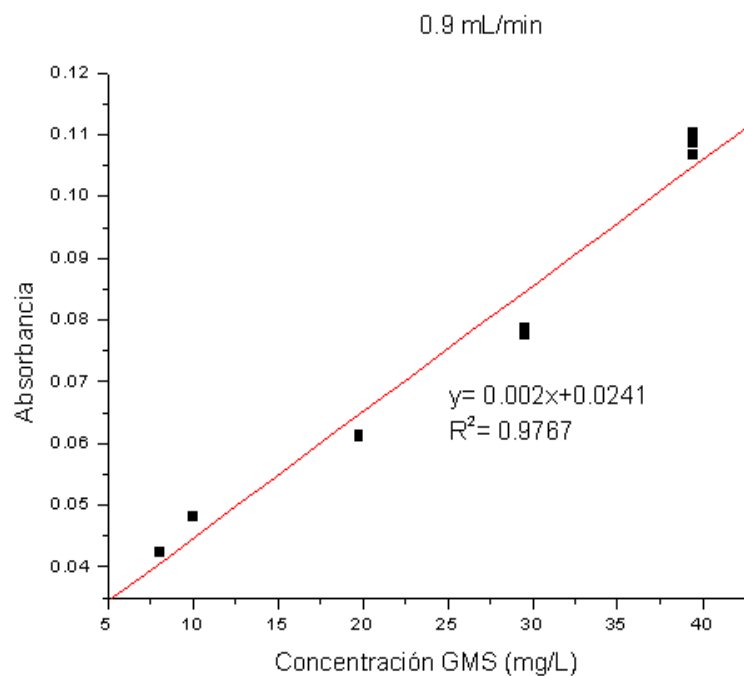
REGRESIÓN LINEAL POR EL MÉTODO DE MÍNIMOS CUADRADOS						
PARÁMETRO						
\bar{x}	22.153		y=A+Bx			
\bar{y}	0.036					
n	12		A	0.0085	S_A	0.00104
t(n-2)	2.23		B	0.0012	S_B	0.00004
$\sum(x_i - \bar{x})^2$	1932.212					
$\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	2.377		S_{y/x}	0.0018		
$\sum(y_i - y_{\text{calc}})^2$	0.00003		R	0.9946		
$\sum(x_i)^2$	7821.277					
CÁLCULO DEL INTERVALO DE CONCENTRACIONES						
Promedio de alturas	0.0386	uA	Concentración Promedio	25.30	mg/L	
			Concentración Mínima	24.02	mg/L	
			Concentración Máxima	26.28	mg/L	
CONCENTRACIÓN PREPARADA: 24.0 mg/L						

Donde: x= promedio concentración; y= promedio absorbancia; n= total de inyecciones; m= inyecciones de estándar; t(n-2)= t-student para 95% confianza, n-2 grados de libertad, dos colas; B= pendiente; A= ordenada al origen; S_b= incertidumbre debida a la pendiente; S_a= incertidumbre debida a la ordenada al origen.

Anexo IX. Resultados obtenidos con el cambio de flujo del portador.

- **Rectas de calibración:**

Conc. teo (mg/L)	conc. exp (mg/L)	0.9 mL/min			1.0 mL/min			1.1 mL/min		
		Pico	Base	Altura	Pico	Base	Altura	Pico	Base	Altura
40	39.44	0.0973	-0.013	0.1103	0.0813	-0.028	0.1093	0.0618	-0.046	0.1078
	39.44	0.0997	-0.007	0.1067	0.0832	-0.028	0.1112	0.0651	-0.045	0.1101
	39.44	0.1006	-0.008	0.1086	0.0843	-0.028		0.0653	-0.046	
30	29.58	0.0696	-0.008	0.0776	0.0502	-0.03	0.0802	0.0311	-0.047	0.0781
	29.58	0.0688	-0.01	0.0788	0.0482	-0.031	0.0792	0.0299	-0.048	0.0779
	29.58	0.0688	-0.011		0.0482	-0.032	0.0802	0.0294	-0.047	
20	19.78	0.0482	-0.012		0.0281	-0.033	0.0611	0.0106	-0.049	0.0596
	19.78	0.047	-0.014	0.0610	0.0271	-0.034	0.0611	0.01	-0.05	0.0600
	19.78	0.0464	-0.015	0.0614	0.0288	-0.035		0.0091	-0.05	0.0591
10	10.06	0.0236	-0.016		0.005	-0.037	0.0420	-0.009	-0.05	0.0410
	10.06	0.0301	-0.018	0.0481	0.0047	-0.036	0.0407	-0.011	-0.051	0.0400
	10.06	0.027	-0.02		0.0052	-0.038	0.0432	-0.011	-0.051	0.0400
8	8.09	0.0215	-0.021	0.0425	0	-0.039	0.0390	-0.014	-0.051	0.0370
	8.09	0.0204	-0.022	0.0424	-0.001	-0.04	0.0390	-0.015	-0.052	0.0370
	8.09	0.0193	-0.023	0.0423	-0.001	-0.041	0.0400	-0.015	-0.053	



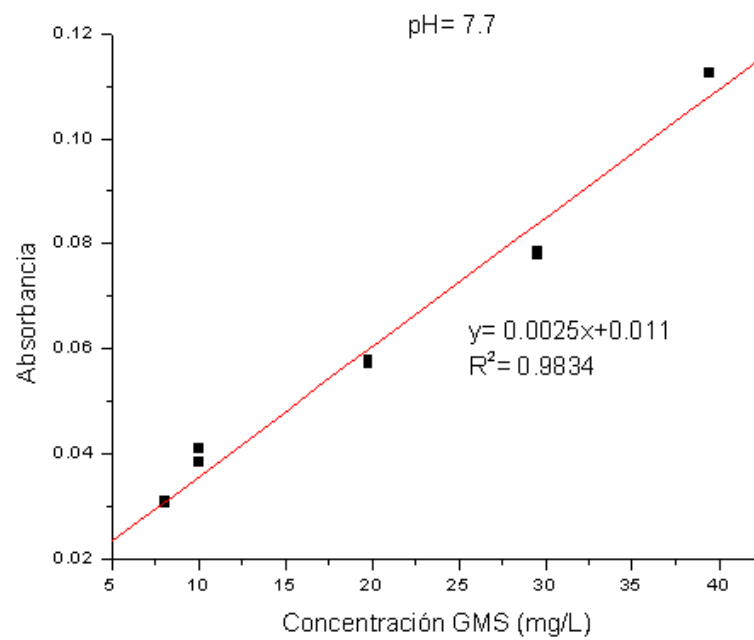
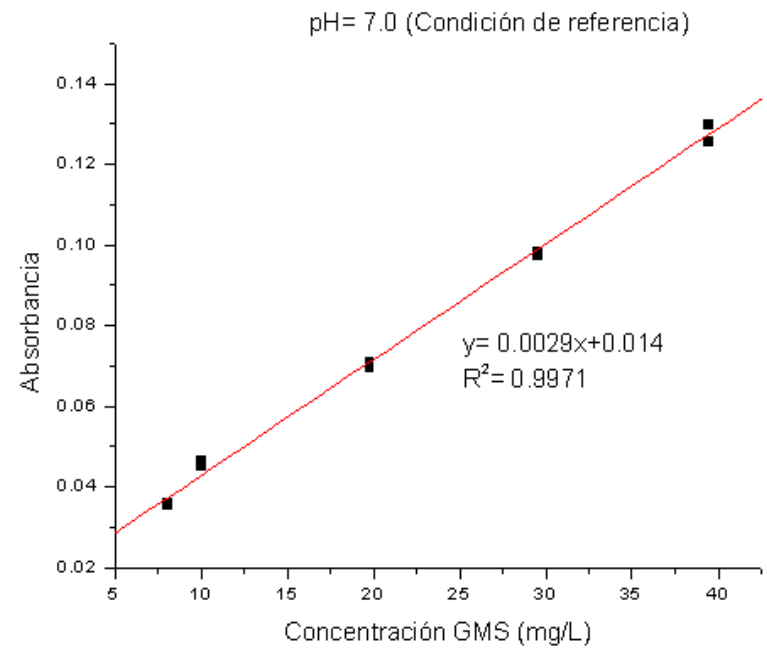
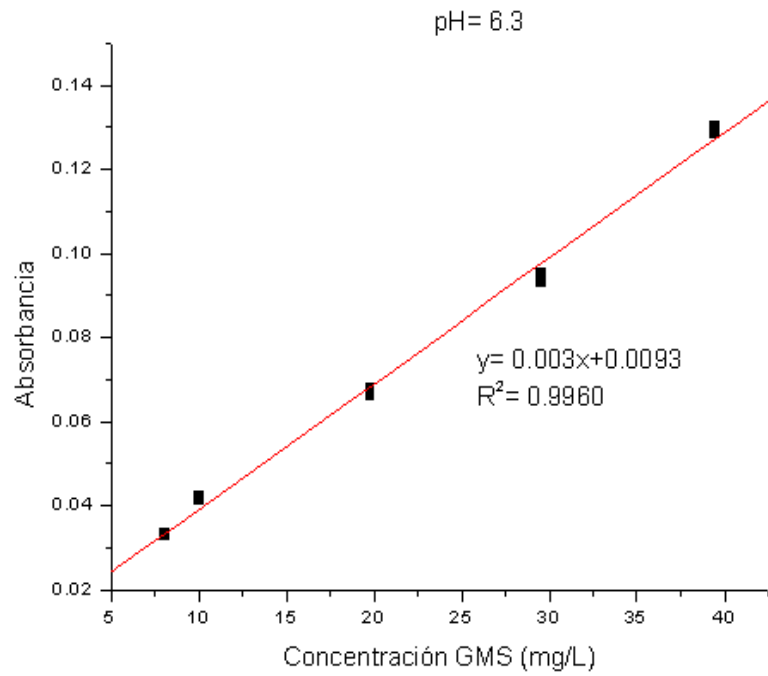
- **Análisis de muestra:**

	0.9 mL/min				1.0 mL/min				1.1 mL/min			
	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.002x+0.0241$)	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.0022x+0.02$)	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.0022x+0.0172$)
Ablandador de carne Escosa®	0.0438	-0.024	0.0678	21.85	0.0156	-0.041	0.0566	16.64	0	-0.053	0.053	16.27
	0.0426	-0.024	0.0666	21.25	0.0161	-0.041	0.0571	16.86	-0.001	-0.053	0.052	15.82
	0.0413	-0.025	0.0663	21.10	0.0152	-0.041	0.0562	16.45	-0.001	-0.054	0.053	16.27
	Desv. Std. (Sdi)		0.397		Sr		0.205					0.262
	Promedio		21.40		valor de referencia		16.65					16.12
	diferencia		4.75				0.00					0.53
	% de diferencia		28.53				0.00					3.18

Anexo X. Resultados obtenidos con el cambio de pH del portador.

- **Rectas de calibración:**

Conc. teo (mg/L)	Conc. exp (mg/L)	pH=6.3			pH=7.0			pH=7.7		
		Pico	Base	Altura	Pico	Base	Altura	Pico	Base	Altura
40	39.44	0.1279	-0.002	0.1299	0.1216	-0.004	0.1256	0.0955	-0.017	0.1125
	39.44	0.1321	0.0021	0.1300	0.1268	-0.003	0.1298	0.0994	-0.013	0.1124
	39.44	0.1322	0.0039	0.1283	0.1267	-0.003	0.1297	0.1006	-0.012	0.1126
30	29.58	0.0961	0.0033	0.0928	0.0932	-0.005	0.0982	0.0657	-0.012	0.0777
	29.58	0.0961	0.0008	0.0953	0.0917	-0.006	0.0977	0.0644	-0.014	0.0784
	29.58	0.0967	0.0014	0.0953	0.0912	-0.006	0.0972	0.0641	-0.014	0.0781
20	19.78	0.0668	-0.001	0.0678	0.064	-0.007	0.0710	0.043	-0.014	0.0570
	19.78	0.0644	-0.003	0.0674	0.0632	-0.007	0.0702	0.0427	-0.015	0.0577
	19.78	0.062	-0.004	0.0660	0.0625	-0.007	0.0695	0.0426	-0.015	0.0576
10	10.06	0.0342	-0.007	0.0412	0.0373	-0.009	0.0463	0.0225	-0.016	0.0385
	10.06	0.0331	-0.008	0.0411	0.036	-0.009	0.0450	0.0213	-0.017	0.0383
	10.06	0.0313	-0.011	0.0423	0.0362	-0.009	0.0452	0.023	-0.018	0.0410
8	8.09	0.0223	-0.011	0.0333	0.0264	-0.009	0.0354	0.013	-0.018	0.0310
	8.09	0.0206	-0.012	0.0326	0.0257	-0.01	0.0357	0.0128	-0.018	0.0308
	8.09	0.0204	-0.013	0.0334	0.0259	-0.01	0.0359	0.0126	-0.018	0.0306



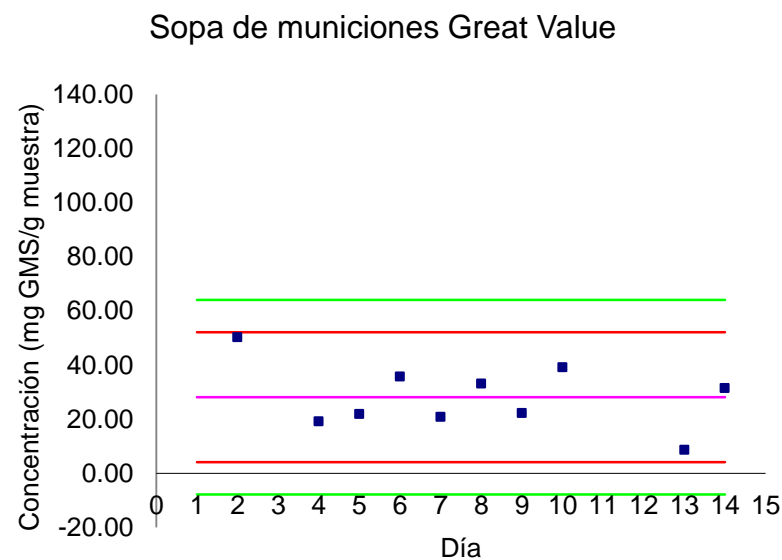
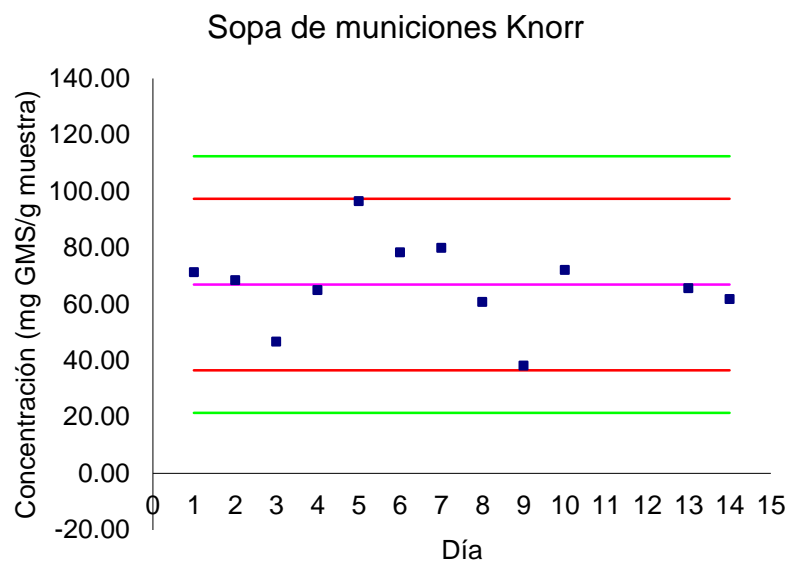
- **Análisis de muestra:**

	pH=6.3				pH=7.0				pH=7.7			
	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.003x+0.0093$)	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.0029x+0.014$)	Pico	Base	Altura	Conc. GMS ($y=0.0025x+0.011$)
Ablandador de carne Escosa®	0.051	-0.013	0.0640	18.23	0.051	-0.010	0.0610	16.21	0.0296	-0.018	0.0476	14.64
	0.0504	-0.013	0.0634	18.03	0.0512	-0.010	0.0612	16.28	0.0283	-0.018	0.0463	14.12
	0.0501	-0.013	0.0631	17.93	0.0509	-0.010	0.0609	16.17	0.035	-0.017	0.0520	16.40
	Desv. Std. (SDi)		0.153			Sr		0.053				1.195
	Promedio		18.07			Valor de referencia		16.22				15.05
	Diferencia		1.85					0.00				1.17
	% de diferencia		11.40					0.00				7.18

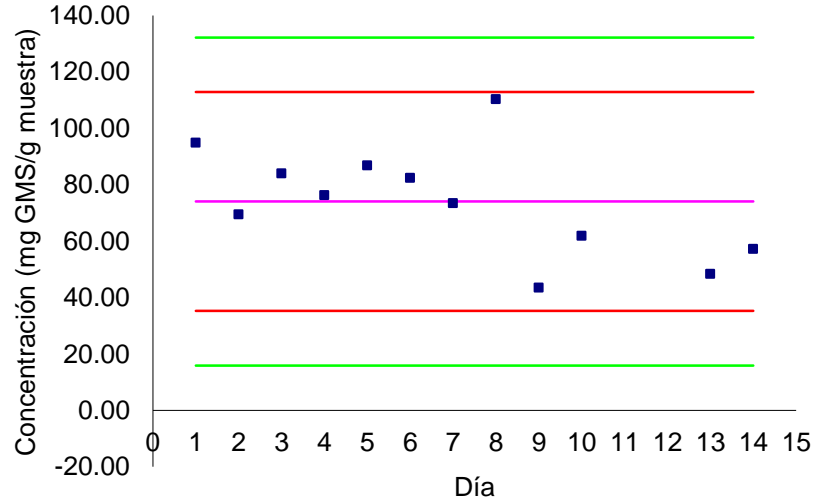
Anexo XI. Gráficas de control.

Muestra	valores promedio por día GMS (mg/g prod)												Promedio	Desv. Std.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14		
SK	71.207	68.373	46.528	64.863	96.370	78.210	79.851	60.646	38.030	72.007	65.533	61.627	66.937	15.173
SGV		50.240		19.137	21.778	35.638	20.714	33.046	22.172	39.091	8.622	31.376	28.181	11.983
AK	94.847	69.440	84.028	76.314	86.815	82.438	73.482	110.264	43.434	61.869	48.356	57.249	74.045	19.381
AVV	6.847	49.173	32.639	38.981	27.408	51.667	24.484	42.792	32.904	42.121	21.067	31.005	33.424	12.638
A	14.566	13.567	9.606	18.448	16.204	18.961	14.752	17.437	8.724	9.212	7.200	9.947	13.219	4.129
CG	19.694	16.547	18.195	18.902	17.222	29.522	27.916	27.258	16.833	25.364	5.173	19.729	20.196	6.664

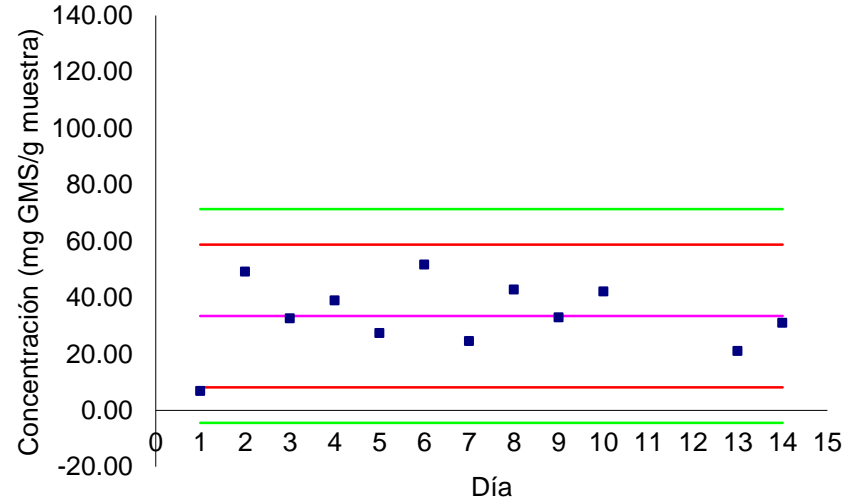
Donde: SK= Sopa de municiones Knorr®; SGV= Sopa de municiones Great Value®; AK= Arroz a la mexicana Knorr®; AVV= Arroz con tomate Verde Valle®; A= Ablandador de carne Escosa®; CG= Control GMS 20 mg/L.



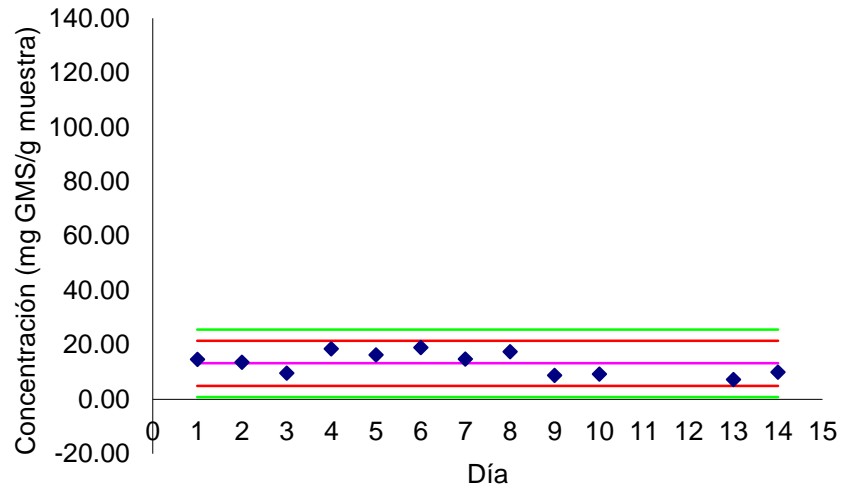
Arroz a la mexicana Knorr



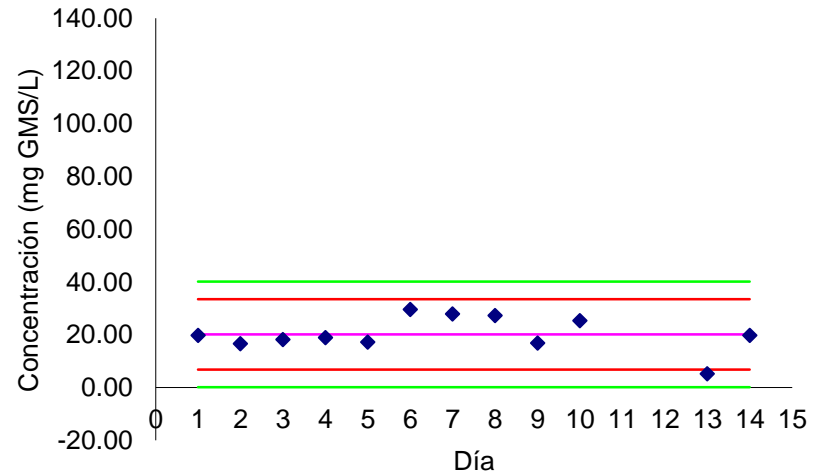
Arroz con tomate Verde Valle



Ablandador de carne Escosa



Control GMS



Donde: — líneas de alerta; — líneas de acción; — promedio