

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



**Movilización y reciclaje de nitrógeno durante la senescencia de espárragos verdes frescos (*Asparagus officinalis*) en condiciones de anaquel.**

**Tesis para obtener el título profesional de licenciado en química**

**AUTOR**

Jorge Esteban Ramos Chang

**ASESOR**

Eric Gabriel Cosio Caravasi

Lima, julio del 2024

### Informe de Similitud

Yo, Eric Gabriel Cosio Caravasi, docente de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado *Movilización y reciclaje de nitrógeno durante la senescencia de espárragos verdes frescos (Asparagus officinalis) en condiciones de anaquel*

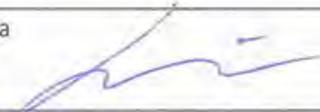
del autor

Jorge Esteban Ramos Chang

dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 15 %. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 05/07/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: Lima 05 de julio del 2024

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: Cosio Caravasi Eric Gabriel	
DNI: 06416780	Firma 
ORCID: 0000-0001-6993-5654	

## Resumen

El Perú es uno de los mayores exportadores de espárragos a nivel mundial. Esta hortaliza genera anualmente más de 300 millones de dólares al país y, a diferencia de otros países exportadores, su producción se puede dar durante todo el año debido a nuestras condiciones climáticas. Los turiones (la parte comestible del espárrago), luego de ser cosechados, experimentan procesos bioquímicos que afectan su calidad y, en consecuencia, su aceptación en el mercado local e internacional.

El estrés generado por la cosecha del turión pone en marcha un proceso de senescencia. Esta se caracteriza por un daño celular progresivo, la degradación de reservas nutritivas, la movilización de nutrientes y otros cambios bioquímicos. Uno de los objetivos principales de este proceso es la conservación y movilización de nitrógeno en forma de especies fácilmente transportables en tejidos vegetales. A pesar de que el turión se encuentra cosechado, la senescencia es parte de un programa metabólico automático en tejidos vegetales que han sufrido daño.

El nitrógeno presente en las proteínas y los ácidos nucleicos es reciclado y se acumula inicialmente en forma de aminoácidos libres. Sin embargo, durante las etapas posteriores de este proceso también se libera amoníaco (compuesto tóxico para los tejidos). La acumulación de amoníaco y de ciertos aminoácidos indican un periodo de senescencia tardío y se ve reflejado en la apariencia del turión. Por lo tanto, la variación del contenido de estos compuestos en la zona de crecimiento del turión (punta) durante un periodo de tiempo nos puede ayudar a establecer bioindicadores del proceso de senescencia y comprender distintos cambios bioquímicos que el vegetal está experimentando.

Este trabajo tuvo como objetivo el análisis de la variación del contenido de los aminoácidos involucrados directamente en el almacenamiento transitorio de nitrógeno para su translocación a otros órganos y en la generación de amoníaco como indicador de senescencia tardío en turiones cosechados. La evaluación se realizó durante 7 días a temperatura ambiente (21 °C) con el fin de recrear las condiciones usuales existentes en los puntos de venta. Para el análisis de aminoácidos y amoníaco se adaptó un método de separación por cromatografía líquida de alta resolución. Asimismo, se analizaron otros parámetros relacionados con la variación del contenido de los metabolitos mencionados, tales como la relación de carbono:nitrógeno y el contenido de agua y de proteínas.

## **Agradecimiento**

Después de un largo periodo de muchas experiencias, entre bajos y altos, se logró completar este trabajo de investigación.

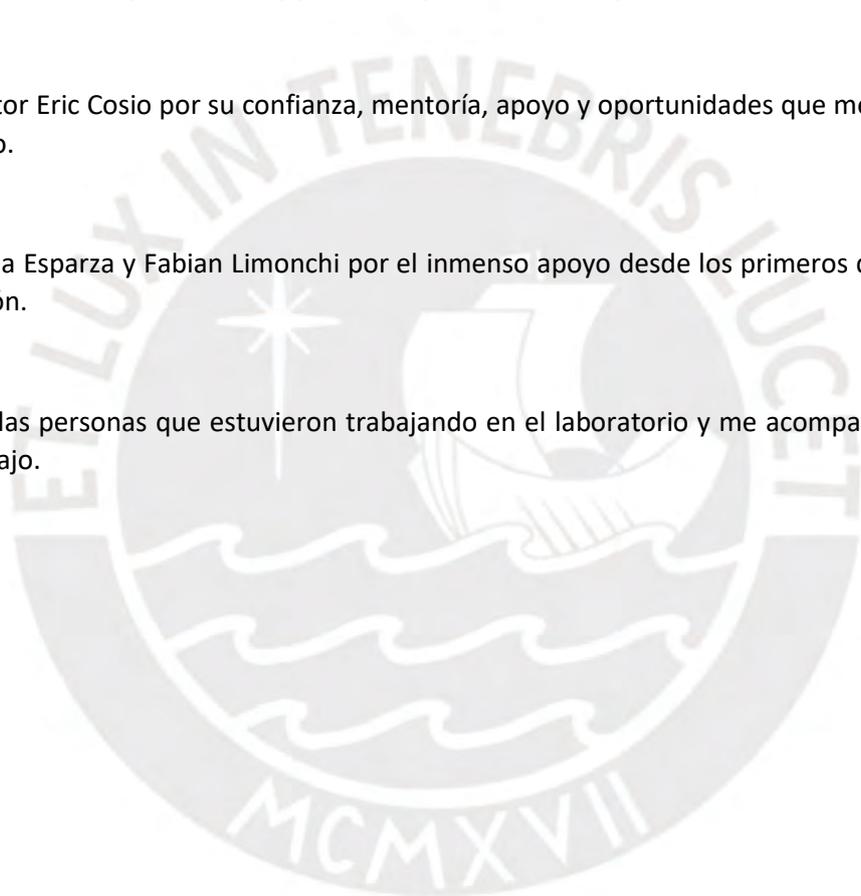
Gracias a mis familiares que pudieron solventar esta carrera y de este modo permitirme completar este trabajo de investigación.

Gracias a dios por el camino y la salud para poder recorrerlo. Gracias por todas esas cosas que se podrían llamar suerte u oportunidad, y por otras que no tienen explicación.

Gracias al doctor Eric Cosio por su confianza, mentoría, apoyo y oportunidades que me dio a lo largo de este trabajo.

Gracias a Eliana Esparza y Fabian Limonchi por el inmenso apoyo desde los primeros días de trabajo de investigación.

Gracias todas las personas que estuvieron trabajando en el laboratorio y me acompañaron durante todo este trabajo.



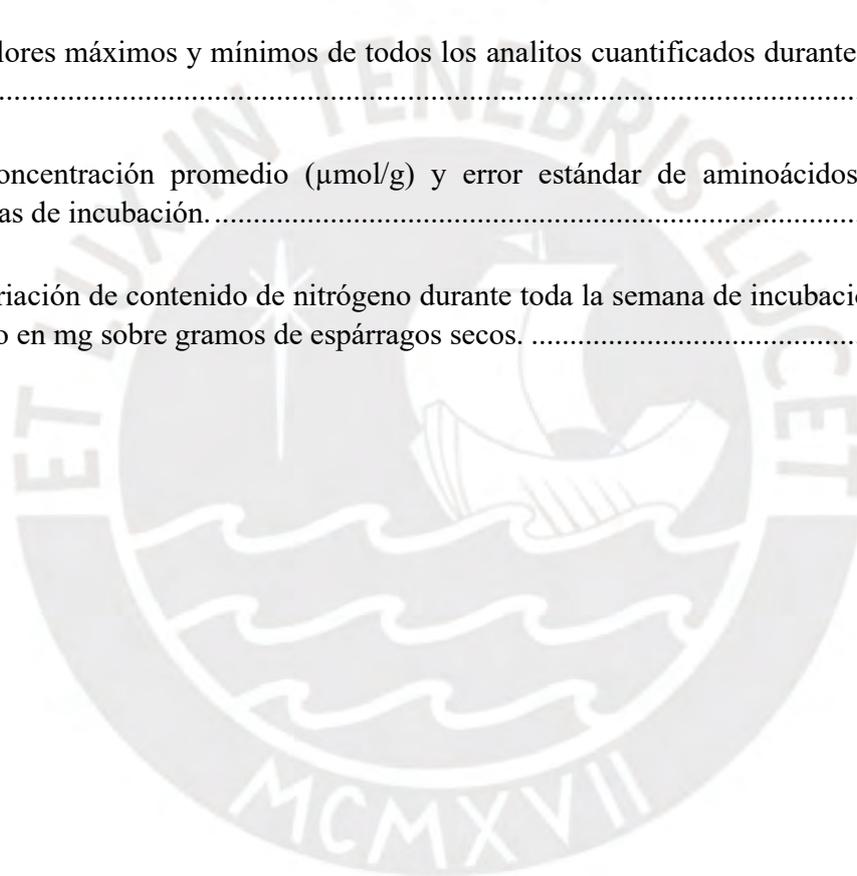
## Tabla de contenido

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades .....	1
1.2. El cultivo del espárrago en el Perú .....	2
1.2.1. Producción y exportación de espárragos en el Perú. ....	2
1.2.2. Cultivo, cosecha y postcosecha .....	3
1.3. Composición química de los espárragos.....	5
1.3.1. Compuestos bioactivos .....	5
1.3.2. Contenido nutricional .....	6
1.4. Senescencia.....	12
1.4.1 Senescencia en los espárragos .....	13
1.5. Análisis del contenido de aminoácidos.....	14
1.6. Objetivos.....	16
2. Materiales y métodos .....	16
2.1. Materiales .....	16
2.1.1. Instrumentos .....	16
2.1.2. Materiales cromatográficos y de laboratorio .....	18
2.1.3 Reactivos y solventes.....	18
2.2. Método de incubación y extracción de analitos de los turiones. ....	19
2.2.1. Incubación de turiones y recolección de muestras .....	19
2.2.2. Método de extracción de aminoácidos y amoniaco. ....	21
2.2.3. Derivatización de compuestos nitrogenados utilizando DEEMM.....	21
2.2.4. Análisis por cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	22

2.3. Variación de peso seco de espárragos durante la semana de incubación .....	23
2.4. Cuantificación de analitos.....	24
2.5. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno .....	24
2.6. Determinación de proteínas .....	25
2.6.1. Contenido de proteínas totales.....	25
2.6.2. Contenido de proteínas solubles .....	26
2.7. Variación de algunas propiedades organolépticas .....	26
3. Resultados .....	27
3.1. Variación de temperatura y humedad durante la incubación.....	27
3.2. Curva de calibración, límites de detección y límites de cuantificación para análisis por HPLC. ....	29
3.3. Variación de peso seco de puntas de espárragos .....	30
3.4. Identificación y variación de aminoácidos y amoniaco .....	31
3.5. Contenido de proteína totales y solubles .....	38
3.6. Propiedades organolépticas en los turiones .....	39
3.7. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno .....	41
4. Discusión de resultados .....	43
4.1. Incubación de turiones .....	43
4.2. Separación e identificación de analitos.....	44
4.3. Cambios físicos y variación de analitos.....	45
5. Conclusiones .....	51
6. Bibliografía.....	53

## Índice de tablas

Tabla 1. Algunos compuestos bioactivos presentes en espárragos y sus beneficios para la salud humana.....	6
Tabla 2. Composición nutricional de turiones según la presentación comercial en la que se encuentra.....	7
Tabla 3: Gradientes de solventes de la fase móvil para la separación de analitos por HPLC.....	23
Tabla 4. Variables de las curvas de calibración (rango lineal y coeficiente de determinación lineal), límites de detección y cuantificación de cada analito.....	29
Tabla 5. Valores máximos y mínimos de todos los analitos cuantificados durante la semana de incubación.....	34
Tabla 6. Concentración promedio ( $\mu\text{mol/g}$ ) y error estándar de aminoácidos y amoníaco durante 7 días de incubación.....	38
Tabla 7. Variación de contenido de nitrógeno durante toda la semana de incubación. Este valor es expresado en mg sobre gramos de espárragos secos.....	43



## Índice de figuras

Figura 1: Comparación de la cantidad de espárragos exportados (en toneladas) por el Perú con otros países.....	3
Figura 2. Ruta de síntesis de los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados a partir de amoníaco.....	8
Figura 3. Vías de síntesis de la glutamina y la asparagina.....	9
Figura 4. Estructura molecular de la asparagina (A) y la glutamina (B).....	10
Figura 5. Contenido de asparagina, glutamina y otros aminoácidos en el xilema de seis diferentes especies de plantas.....	11
Figura 6. Esquema de reacción de un compuesto aminado derivatizado con DEEMM.....	15
Figura 7. Vista del interior de la incubadora con turiones.....	20
Figura 8. Variación promedio de la humedad relativa dentro de la incubadora.....	28
Figura 9. Variación promedio de la temperatura dentro de la incubadora.....	28
Figura 10. Variación porcentual de peso seco en puntas de espárragos.....	31
Figura 11. Parte del cromatograma de la separación de los analitos por HPLC.....	32
Figura 12. Superposición de señales de absorbancia de la metilamina en dos muestras de espárragos.....	33
Figura 13. Variación de la concentración ( $\mu\text{mol/g}$ ) de aminoácidos en puntas de espárragos.....	36
Figura 14. Variación de la concentración de amoníaco en puntas de espárragos.....	37
Figura 15. Variación del contenido de proteínas totales (A) y proteínas solubles (B) en puntas de espárragos.....	39
Figura 16. Fotografía de la parte superior de un turión a lo largo de 1 semana.....	40
Figura 17. Variación del contenido de carbono (A), nitrógeno (B) y relación C/N (C) durante una semana de incubación.....	42
Figura 18. Variación porcentual del contenido de agua en puntas de espárragos.....	45

Figura 19. Esquema propuesto de interconversión de aminoácidos y asimilación de amoniaco.49



## Siglas o abreviaturas

Ala	Alanina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
DEEMM	Dietil etoximetilenmalonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
MeOH	Metanol
Mn	Metilamina
PS	Peso seco
RP-18	Fase reversa con cadenas de octadecilo ligados
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta
Val	Valina

## 1. Introducción

### 1.1. generalidades

El espárrago (*Asparagus officinalis*), perteneciente a la familia Asparagaceae, es una planta nativa de la región mediterránea: norte de África, Asia occidental y Europa (GRIN, 2012). A diferencia de otras hortalizas, los espárragos poseen un gran valor comercial debido a su sabor y a que presentan un gran contenido de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. La parte comestible y comercial de esta planta son los turiones. Estos son los primeros brotes de la planta que surgen de la tierra. Es decir, los turiones son la parte aérea de la planta en sus primeros días de crecimiento.

El cultivo de espárrago se propaga con muy poca frecuencia por semillas. Es más común utilizar el rizoma, denominado corona. La corona es un tallo subterráneo el cual se encarga de almacenar nutrientes (principalmente carbohidratos) que van a servir para el crecimiento de los primeros turiones cuando las condiciones climáticas sean favorables. Generalmente, en los países occidentales, las coronas son plantadas en invierno o a comienzos de la primavera, cuando la temperatura del suelo se encuentra entre 6 y 10°C. Luego, cuando la temperatura del suelo supera los 10°C, se da el crecimiento de las primeras yemas. La temperatura óptima para el crecimiento de los turiones es hasta los 28°C (CIREN, 1987).

Después de plantar la corona, los primeros turiones en crecer no son cosechados y llegan a formar pequeñas plantas, los cuales producen un fruto rojo que no es comestible para los humanos. Luego de un año aproximadamente (dependiendo de la ubicación geográfica), las plantas maduras con frutos son cortadas al ras del suelo sin alterar la corona, permitiendo así que surjan nuevos turiones de ella, los cuales son destinados para el consumo humano (Feller y col, 2012). Este procesamiento inicial se da para que la corona pueda almacenar más nutrientes y pueda desarrollar mejores turiones. Después de ser cosechados, los turiones son almacenados a bajas temperaturas (3-5°C) para reducir la tasa de respiración del tejido y retrasar la senescencia.

Las condiciones de almacenamiento de los turiones tienen que ser muy controladas para evitar que se acelere su madurez y en consecuencia afecte su calidad. El almacenamiento a muy bajas temperaturas (<0°C) ocasiona que los turiones se vuelvan flácidos y se descoloren. A una temperatura cercana a 0°C pueden llegar hasta 10 días almacenados, aunque se pueden

presentar daños en las puntas. A altas temperaturas, se acelera la madurez del turión, ocasionando así, que sus puntas (brácteas) se abran parcialmente. Por otro lado, los turiones se pueden almacenar hasta dos semanas controlando la humedad de la cámara entre 90-95%, para así minimizar la desecación (Siddiq and Uebersax, 2018). Asimismo, la concentración de CO<sub>2</sub> en el ambiente donde se almacenan puede causar cambios en su apariencia (Huyskens-Keil and Herppich, 2013).

Los turiones que más se comercializan son los verdes y los blancos. Esta variación se debe al método de cultivo: el espárrago blanco crece en la oscuridad, generalmente bajo tierra, mientras que el espárrago verde crece en presencia de luz solar. Además, el sabor del turión también varía, por ejemplo, los turiones blancos son menos amargos que los verdes y morados. En América se prefiere el consumo de espárragos verdes mientras que en los países de Europa occidental se prefiere el espárrago blanco (Siddiq and Uebersax, 2018). Sin embargo, los turiones verdes son los más comercializados en el mercado global.

Los espárragos, además de ser comercializados como alimento, han sido empleados también como planta medicinal debido a la amplia variedad de compuestos bioactivos como polisacáridos, polifenoles, antocianinas y saponinas, los cuales pueden presentar efectos anticancerígenos, antioxidantes, diuréticos, entre otros (Guo y col, 2020). Asimismo, las partes no comestibles del espárrago, como las raíces o la parte inferior del tallo que se separa del turión, presentan propiedades farmacológicas antidepresivas y antiepilépticas, entre otras (Zhang and Bekhit, 2019). En la medicina tradicional china se utilizan para tratar inflamaciones, cáncer, infecciones y problemas respiratorios (Fan y col, 2015).

## **1.2. El cultivo del espárrago en el Perú**

### **1.2.1. Producción y exportación de espárragos en el Perú.**

Debido a la gran demanda de este vegetal en el mercado mundial, la producción de espárrago ha aumentado considerablemente en los últimos años. Los países con mayor producción son China (87.5%), Perú (5 %), México (2.3%) y Alemania (1.5 %) (Azimi y col, 2012; Siddiq and Uebersax, 2018). Sin embargo, a pesar de que China posee la mayor producción; los dos países con mayor exportación son México y Perú, como se puede ver en la figura 1 (FAOSTAT, 2022). En Perú la producción de espárragos se da a lo largo de todo el año

debido a sus condiciones climáticas favorables, lo que convierte al espárrago en una gran fuente de ingresos que proporciona anualmente más de 300 millones de dólares al país (FAOSTAT, 2022).

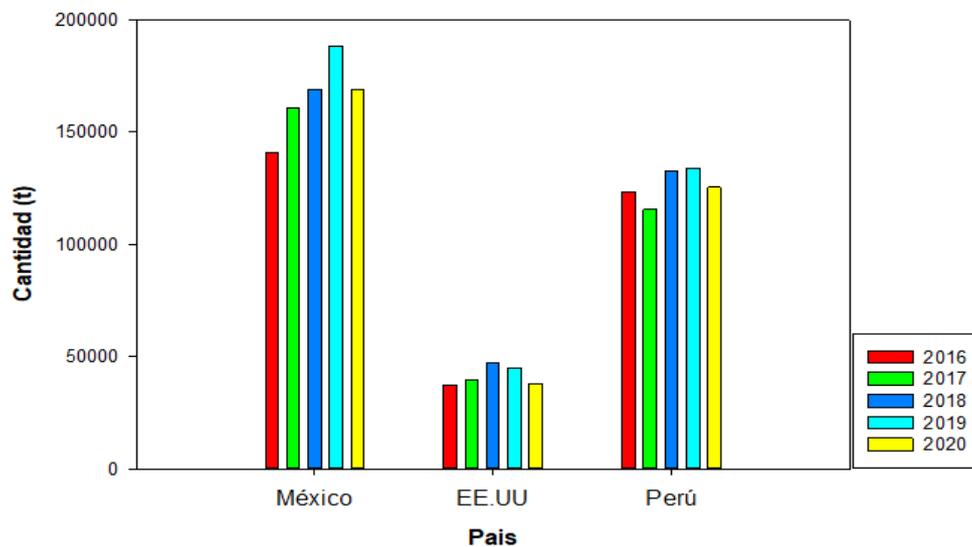


Figura 1: Comparación de la cantidad de espárragos exportados (en toneladas) por el Perú con otros países. Exportaciones en el lapso de 2016 a 2020 de los tres países con mayor exportación a nivel mundial (FAOSTAT, 2022).

Los espárragos exportados desde el Perú tienen como principales destinos a la Unión Europea, los Estados Unidos y algunos países asiáticos, siendo Japón uno de ellos. Según su destino los turiones se venden como frescos, en conservas, congelados y deshidratados (IPEH, 2014). El 52 % de las exportaciones de espárragos que realiza el Perú corresponde a espárragos frescos (Azimi y col, 2012).

### 1.2.2. Cultivo, cosecha y postcosecha

Las principales regiones de cultivo de espárrago en el Perú son Lambayeque, La Libertad, Áncash, Lima, Ica y Arequipa. En Ica y La Libertad se genera un 83% de la producción nacional, siendo favorable el crecimiento del espárrago verde y blanco en cada región, respectivamente (Azimi y col, 2012). A diferencia de otras regiones mediterráneas que presentan temperaturas muy marcadas en sus estaciones, la temperatura en la costa peruana oscila entre 12-28 °C durante todo el año, haciendo favorable y constante el crecimiento del vegetal. Asimismo, la primera cosecha se puede realizar entre los 12-14 meses luego del

brote de las primeras yemas, mientras que en otros países esperan hasta dos años (IPEH, 2014).

En la mayoría de los casos, la cosecha del turión se realiza de manera manual para evitar daños en el vegetal. Para el espárrago blanco, la cosecha se realiza ni bien el turión se asoma en la superficie del camellón (montículo de tierra donde se cultiva), evitando así la síntesis de pigmentos generados por la luz solar. Por otro lado, el espárrago verde es más sencillo de cosechar debido a que este se encuentra sobre la tierra y se puede estandarizar una medida determinada donde hacer el corte. Para ambos tipos de espárragos, se prefiere hacer la cosecha lo más temprano posible en el día, cuando las temperaturas son bajas y hay un alto porcentaje de humedad en el ambiente, para evitar la deshidratación del turión.

Los turiones cosechados son colocados en cajas con un recubrimiento especial interior para evitar los daños físicos y son trasladados rápidamente al almacén para su distribución. Este traslado debe ser lo más rápido posible para evitar que el turión se seque y se caliente. Dentro de estos almacenes, los turiones son lavados por inmersión y aspersión con agua que contiene un tensoactivo neutro y entre 100-200 ppm de cloro para remover contaminantes del campo y desinfectar los productos. Asimismo, se cortan para uniformizar el tamaño y eliminar alguna irregularidad de la parte basal. (IPEH, 2014)

El agua utilizada en el lavado de los turiones está por debajo de los 5°C y se establece un límite máximo de 10 días en los que el turión puede permanecer a 2°C. Un retraso en este proceso de enfriamiento puede afectar directamente la calidad cuando estos ya se encuentren en los puntos de venta (G. King y col, 1988). Del mismo modo, un exceso de días a estas temperaturas provoca que se marchiten o se vuelvan más flácidos.

Debido a que los turiones son un órgano en crecimiento activo, presentan una tasa de respiración elevada ( $>60 \text{ mg CO}_2 / \text{kg}\cdot\text{h}$ ) que alcanza su mayor valor 24 horas después de que el turión es cortado (Brash y col, 1995). Esto los hace muy sensibles a cambios en la temperatura, la humedad y la atmósfera (concentración de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) donde se encuentran. Estos factores pueden cambiar las propiedades químicas del turión, ocasionando así un descenso en su calidad.

Para minimizar cualquier factor que pueda dañar al turión durante su almacenamiento, se establecen condiciones muy controladas. La humedad en el ambiente se ajusta entre 95-98% para evitar que los turiones se deshidraten. Por otro lado, los niveles de  $\text{CO}_2$  son variados dependiendo de la temperatura en la que se encuentre el ambiente (12 % para temperaturas

entre 0 y 3 °C). Estas condiciones deben ser mantenidas tanto en el almacén como en las unidades de transporte hacia los puntos de venta o exportación.

### **1.3. Composición química de los espárragos**

#### **1.3.1. Compuestos bioactivos**

Los compuestos bioactivos provenientes de las plantas son metabolitos secundarios que cumplen distintas funciones: características de la planta (color y sabor), agentes de defensa (ataques de animales o radiación UV) o procesos reproductivos, entre otros. El espárrago presenta una gran cantidad de compuestos bioactivos los cuales incrementan sus características como alimento saludable. Chitrakar y colaboradores (2019) reportan diversos fitoquímicos como carotenoides, compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos), saponinas, esteroides, oligosacáridos y antocianinas en los turiones. Asimismo, Jiménez-Sánchez y colaboradores (2016) reportan un perfil más extenso de los distintos compuestos presentes en los espárragos.

El contenido de estos fitoquímicos se ve afectado por factores como la variedad de espárrago, la parte del turión que se analiza, el método de cultivo y los procesos postcosecha como el almacenamiento, el empaquetado, entre otros (Guo y col, 2020). Según la distribución de estos compuestos en todo el turión, se podría dar valor comercial a las partes no comestibles del mismo. En un estudio realizado por Zhang y Bekhit (2019) se reporta el contenido de estos compuestos en las partes no comestibles como los tallos cortados (subproductos) y las raíces de la planta. En la tabla 1 se muestra algunos fitoquímicos presentes en los espárragos y su función beneficiosa para la salud humana. A pesar de todos los compuestos mencionados, los principales responsables de la bioactividad del espárrago son los compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos hidroxicinámicos) y las saponinas (Fuentes-Alventosa y col, 2013).

Tabla 1. Algunos compuestos bioactivos presentes en los espárragos y sus beneficios para la salud humana.  
(Chitrakar y col, 2019)

Compuesto bioactivo	Beneficio para la salud
Flavonoides totales	Antioxidante
Protodioscina	Anticancerígeno
Polifenoles totales, rutina, vitamina C y carotenoides	Antioxidante
Algunos compuestos fenólicos: <i>asparoffin C</i> , <i>asparoffin D</i> , <i>asparenol</i> , <i>gobicusin B</i> y <i>asparanin</i> .	Antitumoral
Saponinas	Antipatógeno, anticancerígeno y antioxidante

### 1.3.2. Contenido nutricional

El contenido nutricional del turión puede variar dependiendo de la calidad de la tierra en la que este ha crecido y la edad que la planta tiene. Generalmente, los turiones frescos están conformados por un 92% de agua, 3.9% de carbohidratos, 2 % de proteínas, 2 % de fibra y 0.1 % de lípidos. Este contenido, como se muestra en la tabla 2, presenta ligeras variaciones de acuerdo con la presentación en la que se encuentra en el mercado (Siddiq and Uebersax 2018). Asimismo, Shou y colaboradores (2007) mostraron que, modificando el método de cultivo, se pueden obtener variaciones dependiendo de la estación en la que este se cosecha.

El contenido de nutrientes puede variar a lo largo del turión. Por ejemplo, Slatnar y colaboradores (2018) reportan que el contenido total de azúcares en la base es mayor (23 g/kg espárrago seco) respecto al contenido en la punta del turión (16.2 g/kg espárrago seco). Del mismo modo, las puntas presentan un mayor contenido de proteínas y aminoácidos libres (Lill y col, 1990). Sin embargo, este contenido no es estable ya que conforme vaya madurando el turión se pueden presentar variaciones.

Tabla 2. Composición nutricional de los turiones según la presentación comercial en la que se encuentran (Siddiq and Uebersax 2018)

Nutriente (porción 100 g)	Turiones frescos	Turiones congelados	Turiones enlatados
Agua (%)	93.22	91.82	94.32
Proteínas (g)	2.20	3.23	1.80
Grasas (g)	0.12	0.23	0.18
Carbohidratos (g)	3.88	4.10	2.47
Fibras (g)	2.10	1.9	1.0
Azúcares (g)	1.88	NA	NA
Vitaminas y minerales (g)	0.280	0.318	0.487

### 1.3.2.1 Proteínas y aminoácidos

Los aminoácidos se pueden encontrar en las plantas de forma libre o formando proteínas. En ambas formas cumplen roles importantes en diferentes procesos. Las plantas, utilizando aminoácidos libres, sintetizan proteínas para cumplir diversas funciones vitales. Además, en su forma libre, participan en diferentes procesos metabólicos (Baqir y col, 2019). En el caso de los turiones cosechados, algunos aminoácidos libres pueden cumplir funciones de almacenamiento, transporte, detoxificación, entre otras. En todos estos procesos mencionados se refleja la utilización del nitrógeno.

El nitrógeno cumple un rol muy importante en el desarrollo vegetal. Este elemento puede ser obtenido del entorno de distintas maneras según el tipo de planta y el hábitat donde esta se encuentre. Sin embargo, el proceso por el cual se obtiene la mayor cantidad de nitrógeno es la absorción por parte de las raíces. En general, durante este proceso, el nitrógeno es absorbido como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) proveniente del suelo. Luego, el nitrato es transformado en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y se transporta a los cloroplastos donde se transforma en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ).

El amoníaco, en forma de ion amonio, en determinados niveles resulta tóxico para la planta debido a que disipa gradientes de protones del transporte electrónico mitocondrial y cloroplástico que genera energía para la incorporación de metabolitos. Debido a esto, es rápidamente convertido en aminoácidos, siendo el ácido glutámico y la glutamina los

primeros en formarse. A diferencia del ácido glutámico, la glutamina puede ser utilizada en una amplia variedad de reacciones metabólicas, como se muestra en la figura 2, las cuales permiten el transporte y la distribución del nitrógeno para producir otros compuestos según sea el requerimiento (Joy, 1988).

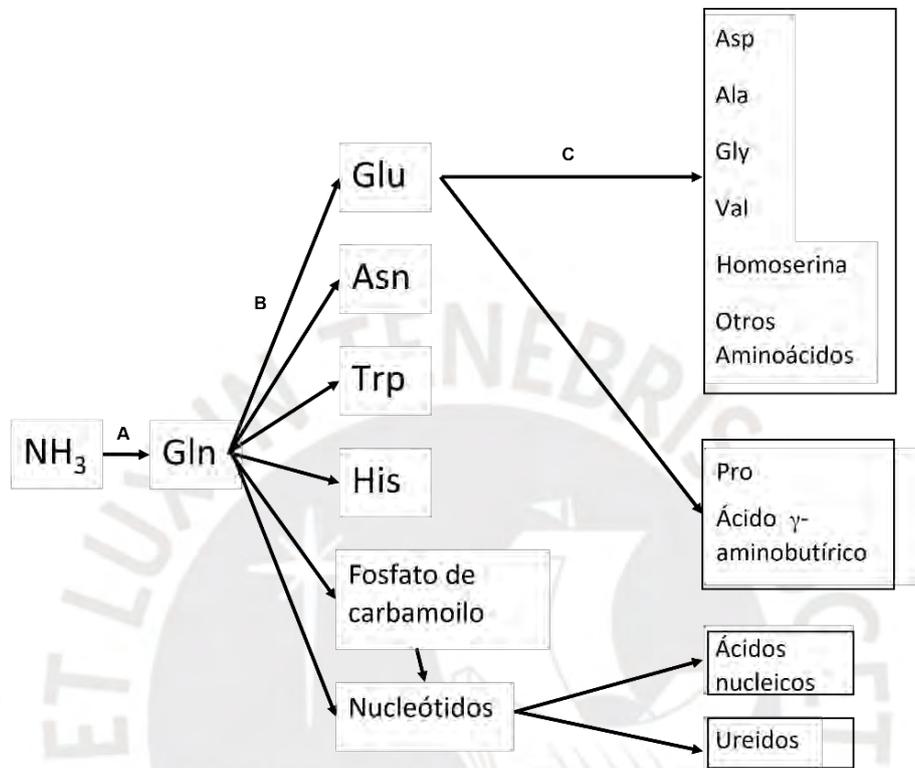


Figura 2. Ruta de síntesis de los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados a partir de amoníaco. A partir del amoníaco se sintetiza glutamina (Gln). La enzima que cataliza esta reacción es la glutamina sintetasa (A). Luego, con la ayuda de la glutamato sintasa, se produce el glutamato (Glu,B), que luego se convierte en ácido glutámico. Asimismo, la glutamina puede seguir otras rutas en las que puede formar otros compuestos nitrogenados y otros aminoácidos. De igual manera, el glutamato puede utilizarse para formar otros aminoácidos con ayuda de enzimas aminotransferasas (C) y otros productos. Imagen modificada de Joy (1988).

En condiciones óptimas de energía, existe un equilibrio entre la formación de glutamina y de ácido glutámico (Taiz and Zeiger 2002). Por otro lado, en condiciones limitadas de energía, la síntesis de ácido glutámico a partir de glutamina y otros posibles usos de este aminoácido se suprimen (Reitzer, 2014). Así, al estar limitada de procesos, la glutamina cumple la función de compuesto almacenador de nitrógeno. Sin embargo, otro aminoácido que también se utiliza para la misma función es la asparagina y este se sintetiza a partir de la glutamina.

La asimilación del amoníaco para formar ácido glutámico y glutamina, y la posterior síntesis de asparagina se pueden observar en la figura 3.

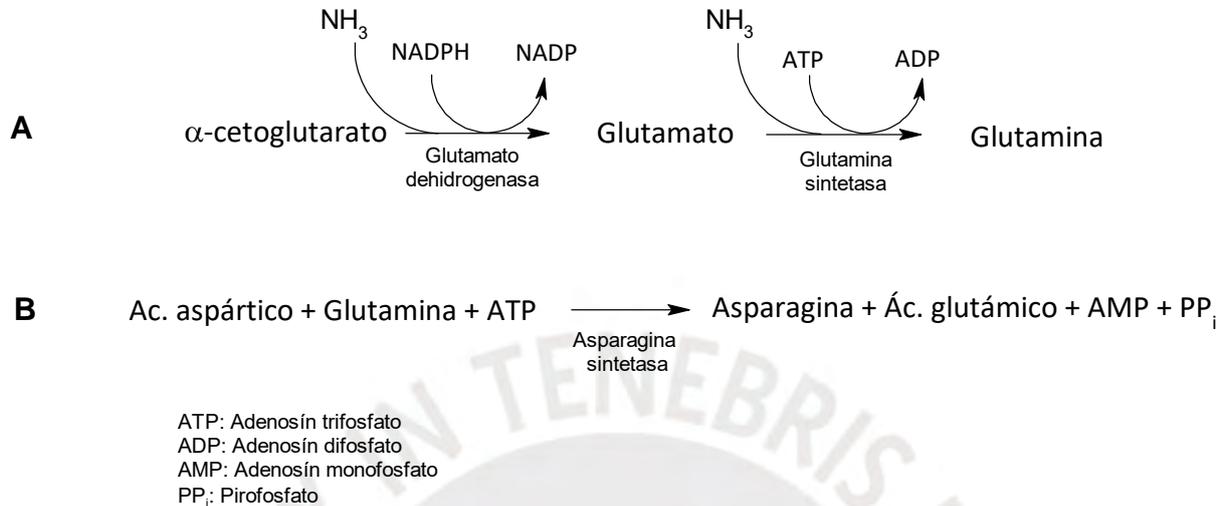


Figura 3. Vías de síntesis de la glutamina y la asparagina. En la vía A se puede ver el uso de amoníaco para formar glutamato (forma iónica del ácido glutámico) y, posteriormente, glutamina, para lo cual utiliza otra molécula de amoníaco. En la vía B se muestra la síntesis de la asparagina (compuesto almacenador de nitrógeno) utilizando el ácido aspártico y glutamina. En ambas vías se muestran las enzimas que participan.

En el caso de los turiones, la asparagina es el aminoácido más abundante y, por ello, el mayor sumidero de nitrógeno, proporcionando así un depósito móvil de nitrógeno hacia los sitios de crecimiento (Hurst y Clark 1993). Esto se puede dar particularmente cuando las plantas se encuentran en un periodo de estrés y la cantidad de carbono es limitada (Sieciechowicz y col, 1988). Una de las razones por la cual se utiliza asparagina en lugar de glutamina como compuesto de almacenamiento es la relación carbono:nitrógeno. Como se puede ver en la figura 4, la relación en la asparagina es 4:2 mientras que en la glutamina es 5:2, lo cual convierte a la glutamina en una mejor opción para ser usada como sustrato respiratorio. Adicionalmente, la asparagina posee una gran estabilidad y es el sustrato de muy pocas reacciones enzimáticas (Lea y col, 2007).



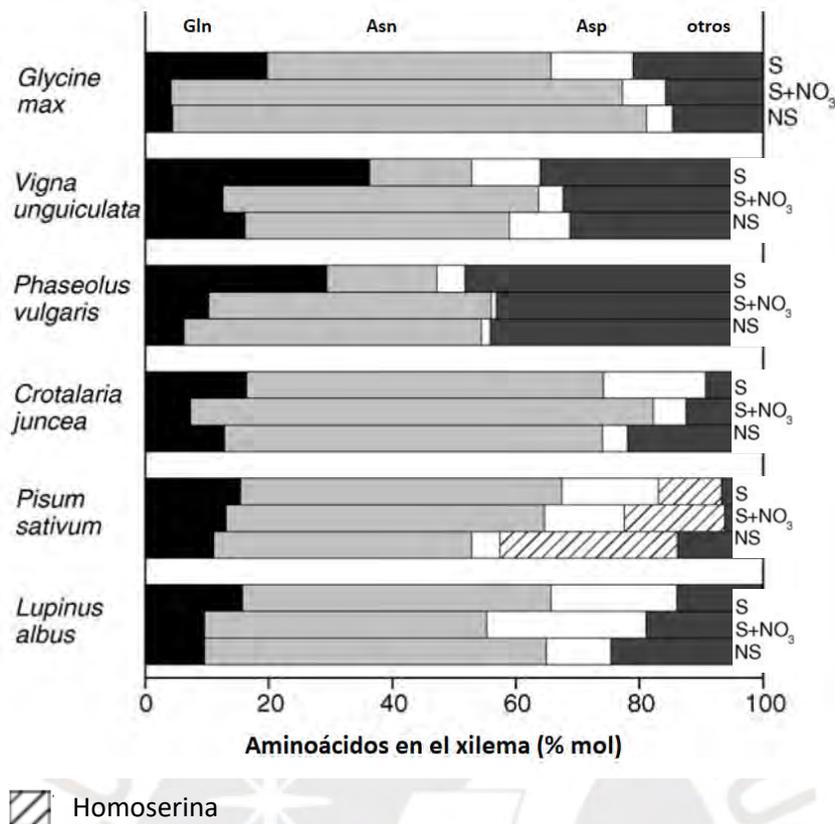


Figura 5. Contenido de asparagina, glutamina y otros aminoácidos en el xilema de seis diferentes especies de plantas. Estas plantas fueron cultivadas bajo medio simbiótico (S), medio simbiótico más adición de nitrato (S+NO<sub>3</sub>) y medio no simbiótico (NS). Además, en una especie se detectó una cantidad considerable de homoserina, como se muestra en los recuadros que están marcados con líneas diagonales. Se puede observar que en todos los casos de NS (dependencia de asimilación de nitrato), la Asn es el aminoácido que más se utiliza como medio de transporte en condiciones de estrés. Imagen tomada de Amarante y colaboradores (2006)

En los turiones cosechados, la principal fuente de aminoácidos son las proteínas. Los espárragos verdes poseen una mayor concentración de proteínas que los espárragos blancos, tal como ocurre con el contenido de otros nutrientes (Hamdi y col, 2020). Estas conforman aproximadamente un 20 % del espárrago (peso seco) y cumplen distintas funciones dentro del vegetal. La concentración de estos compuestos varía conforme pasa el tiempo desde su cosecha y, en consecuencia, durante la senescencia. Hurst y Clark (1993) reportan que, durante los cinco primeros días de cosecha, el contenido total de proteína en la punta de espárragos frescos tiende a decaer en un 34 %.

## 1.4. Senescencia

A diferencia de la necrosis, que es la muerte celular ocasionada por algún daño físico o envenenamiento, la senescencia es un proceso degenerativo controlado genéticamente por la misma planta. Esta se caracteriza por generar un daño progresivo celular, degradación de reservas nutritivas, movilización de nutrientes y otros cambios bioquímicos (Buchanan-Wollaston, 1997). Generalmente, este proceso es inducido por algún factor externo como el cambio en la temperatura ambiental o el corte de la fuente de nutrientes. Un ejemplo de un tipo de senescencia se aprecia en las hojas de algunos árboles cuando la degradación de la clorofila hace cambiar el verde por un color rojizo durante el otoño. Sin embargo, existen varios tipos de senescencia que pueden manifestarse en toda planta: hojas, frutos, tallos (primeros brotes en plantas perennes) y otros órganos (Bala y col, 2018).

Durante la senescencia, la planta recupera una fracción de nutrientes del órgano senescente. Estos se obtienen a partir de la degradación de macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los nutrientes que se obtienen son reutilizados para el crecimiento de los siguientes brotes u otros procesos bioquímicos. Uno de los principales nutrientes reciclados es el nitrógeno. Este es almacenado y transportado en forma de aminoácidos libres provenientes de la degradación de proteínas. Todos estos procesos se logran debido a una variedad de reacciones controladas por modulación transcripcional (Buchanan-Wollaston, 1997).

Dentro de los genes asociados al proceso de senescencia (SAG) se encuentran los que codifican enzimas que participan en procesos catabólicos: proteasas, ribonucleasas y lipasas. Los diferentes tipos de enzimas (hormonales, catalizadoras, entre otras) que aparecen pueden ser utilizados como biomarcadores del proceso de senescencia (Bala y col, 2018). Algunos de estos genes también pueden ser expresados durante el crecimiento del turión pero aumentan su contenido durante la senescencia (King y col, 1995). Por ejemplo, se codifica la síntesis de la glutamina sintetasa, enzima que participa en la conversión del amonio en glutamina para poder reutilizar el nitrógeno (Hörtensteiner and Feller 2002). Asimismo, Pageau y colaboradores (2006) analizaron la actividad de dos enzimas involucradas en la regulación del nitrógeno en las hojas de tabaco bajo condiciones de estrés.

Los cambios químicos que ocurren durante la senescencia pueden ser analizados monitoreando la aparición de compuestos característicos del periodo. Por ejemplo, el etileno es un compuesto característico en la madurez y senescencia de las plantas (Burg, 1968). Así,

el análisis de los biomarcadores de senescencia en los vegetales comestibles puede mejorar el rendimiento del cultivo y las condiciones de almacenamiento (Sade y col, 2018; Woo y col, 2018). En un estudio realizado por Yang y Udvardi (2018) se discute sobre la movilización del nitrógeno durante la senescencia en las hojas de pastos perennes y como alterando este fenómeno se puede incrementar su producción y mejorar la resistencia al estrés. Asimismo, en un estudio elaborado por Rabines (2012) se presenta la identificación de compuestos volátiles en espárragos para ser utilizados como biomarcadores de calidad.

#### **1.4.1 Senescencia en los espárragos**

Desde el momento en que se cosechan los turiones, se produce un estrés en el turión debido al corte de nutrientes provenientes de la corona. Debido a la gran tasa de respiración y la alta actividad metabólica, se producen cambios químicos y físicos durante su manipulación y almacenamiento (King y col, 1988). Uno de los primeros cambios que se pueden observar en el turión es la lignificación de la zona de corte. Este proceso está relacionado con la biosíntesis de lignina y consiste en el endurecimiento de la zona afectada para evitar pérdidas de agua (Liu y Jiang, 2006). Algunos precursores de la lignina son el ácido p-cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico, y estos varían su contenido durante la madurez del turión y según la sección que se analiza (Rodríguez y col, 2005). La variación en el contenido de algunos ácidos fenólicos puede ocasionar alteraciones en la textura del turión (Rodríguez-Arcos y col, 2002).

Durante su almacenamiento, los turiones aún requieren algún sustrato metabólico para proporcionar energía y así mantener la integridad de sus tejidos. En busca de estos sustratos en las condiciones limitadas de nutrientes, se desencadenan procesos catabólicos característicos de la senescencia. En consecuencia, se altera el contenido de azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, entre otros (Bhowmik y col, 2000; Hurst y Clark, 1993; King y col, 1990). Asimismo, los algunos procesos catabólicos que se producen durante la senescencia pueden generar compuestos dañinos para el vegetal, como el amoníaco.

El amoníaco, generado a partir de la degradación de proteínas, es asimilado y transformado en glutamina o ácido glutámico. Las enzimas activadas durante la senescencia catalizan este proceso para evitar así la intoxicación del turión. Sin embargo, conforme avanza la madurez del turión (senescencia tardía), se pueden suprimir ciertas rutas ocasionando que el amoníaco

no pueda ser asimilado. Así, un nivel elevado de amoniaco indica un periodo de senescencia tardío en el turión y conlleva a la muerte de éste.

Del mismo modo, la acumulación de glutamina o asparagina como aminoácidos almacenadores de nitrógeno en las puntas (zona de crecimiento) de los turiones es característico de la senescencia. Esta acumulación se puede dar de manera similar en otras hortalizas como el brócoli (King y Morris, 1994). Por otro lado, otros aminoácidos y proteínas en esta zona también varían en contenido debido a los diferentes procesos que se desatan en este periodo (Hurst y Clark 1993; King y col, 1993).

### **1.5. Análisis del contenido de aminoácidos**

Existen diversas técnicas para analizar aminoácidos en distintos tipos de muestra. Las ventajas y limitaciones de cada una de estas técnicas dependen del tipo de muestra, la facilidad de manipulación, el tiempo de análisis, entre otros factores. Una de estas técnicas es la cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC por sus siglas en inglés.

En muchos casos, el uso de la cromatografía líquida requiere la modificación de los analitos por medio de un agente derivatizante. La función de este agente es modificar los analitos, en este caso los aminoácidos, con el fin de que puedan ser detectados o incluso mejorar la separación entre ellos. Este agente se utiliza debido a que la mayoría de los aminoácidos carecen de absorbancia de luz UV (detector común en HPLC).

Existen numerosos agentes de derivatización para aminoácidos u otros compuestos nitrogenados. Entre ellos se pueden encontrar el o-ftadialdehído, el fenil isotiocianato, el cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo, etc. (Li y col, 2012). Cada uno de ellos posee ventajas y limitaciones durante su aplicación. Uno de los agentes de derivatización que se utiliza es el dietil etoximetilenmalonato (DEEMM). Una de las ventajas de derivatizar con DEEMM es que el compuesto puede mantenerse estable por varios días a temperatura ambiente y puede ser analizado por medio de un detector UV. Asimismo, el proceso de derivatización con este agente es fácil de llevar a cabo y los reactivos utilizados no son tóxicos a comparación de otros. En un análisis de L-canavanina y aminoácidos libres en las semillas de *Vicia disperma* realizado por Megías y colaboradores (2015) se muestra lo práctico y rápido que es utilizar DEEMM como agente derivatizante. Del mismo modo, otros estudios muestran la estabilidad

de aminoácidos derivatizados con DEEMM por un periodo largo de tiempo (Rebane and Herodes 2010;Gómez-Alonso y col, 2007).

La derivatización con DEEMM puede ser utilizada para aminas primarias, aminas secundarias y amoniaco. Sin embargo, el producto de la reacción con aminas secundarias presenta menos estabilidad que el que se obtiene con aminas primarias (Gómez-Alonso y col, 2007). En la figura 6 se muestra la reacción completa entre un compuesto aminado y el DEEMM (a). Si la amina que se derivatiza es una amina primaria ( $R$  o  $R' = H$ ), el producto que se obtiene es particularmente estable debido al puente de hidrógeno que se forma entre el H de la amina y el O del carbonilo del DEEMM. Además, al formarse el puente de hidrógeno, la molécula adopta un arreglo planar facilitando las formas tautoméricas amino-imino, ocasionando así un incremento de fuerza en el enlace C-N (b). Por otro lado, cuando la amina que se derivatiza es secundaria, no se forma el puente de hidrógeno lo que permite al compuesto rotar y no tener tanta fuerza en los enlaces C-N y C-C marcados por una flecha, c). Un ejemplo de este caso es en la derivatización de la prolina y la hidroxiprolina, y se refleja en la intensidad de la señal que se obtiene al momento de su detección y su poca estabilidad a comparación de otros aminoácidos.

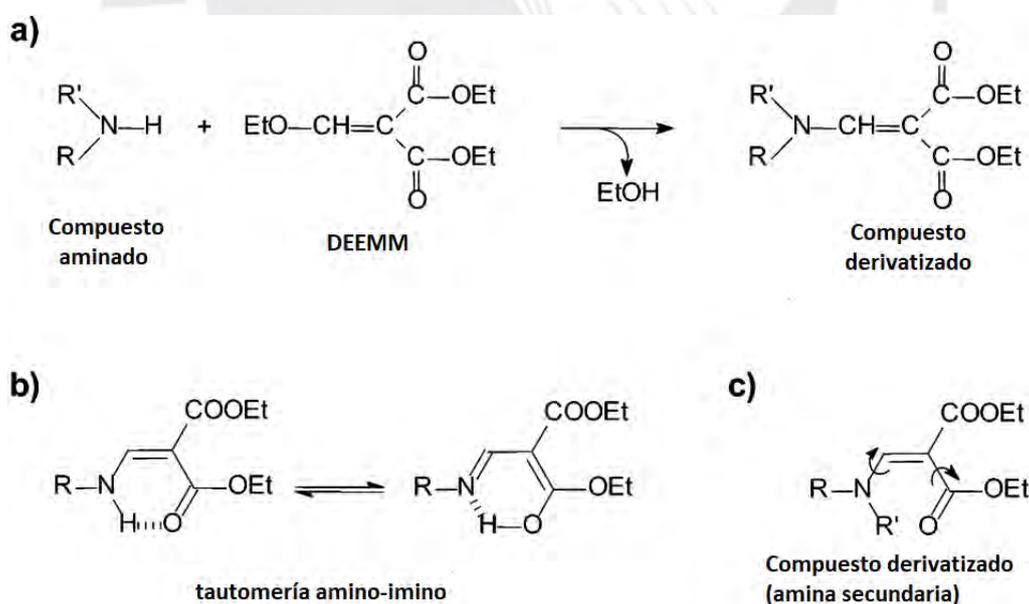


Figura 6. Esquema de reacción de un compuesto aminado derivatizado con DEEMM. a) reactivos y producto de la reacción de un compuesto aminado (primario o secundario) con DEEMM. b) Tautomería amino-imino que se da en el compuesto derivatizado cuando se parte de una amina primaria. c) Esquemización de la rotación de enlaces que se da cuando se derivatiza una amina secundaria. Imagen tomada de Gómez-Alonso y colaboradores (2007)

## **1.6. Objetivos**

El objetivo del presente estudio fue analizar la variación del contenido de un grupo de aminoácidos involucrados directamente en el almacenamiento y transporte de nitrógeno durante la senescencia de espárragos verdes frescos. También, como es parte del proceso de reciclaje de nitrógeno, se determinó la variación del contenido de proteínas y amoniaco. Los aminoácidos que se analizaron fueron la glutamina, la asparagina, la alanina, la fenilalanina, el ácido glutámico y el ácido aspártico. Con este análisis se buscó establecer una relación entre la variación del contenido de los aminoácidos mencionados, el amoniaco y las proteínas. De este modo, se pudo determinar y entender los cambios bioquímicos que ocurren en el proceso de conservación y reciclaje del nitrógeno durante la senescencia del turión.

Los objetivos específicos de este estudio fueron:

- Adaptar y establecer el método de extracción y análisis de aminoácidos y amoniaco de los turiones por cromatografía líquida de alta eficiencia con una previa derivatización con DEEMM de los analitos.
- Analizar la variación del contenido de carbono, nitrógeno, agua y proteínas como parámetros complementarios para entender la variación de los aminoácidos.
- Analizar y correlacionar las variaciones del contenido de los diferentes analitos durante el periodo de incubación y establecer una posible relación entre el contenido de estos con alguna propiedad organoléptica del turión.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Materiales**

#### **2.1.1. Instrumentos**

Agilent Technologies (California, Estados Unidos de América)

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1260 Infinity II

Avantor (Pensilvania, Estados Unidos de América)

- Plancha calentadora/agitadora VWR modelo standard 625
- Mezclador vórtex analógico VWR mini

Bachofer (Reutlingen, Alemania)

- Centrífuga modelo D-7410

Emerson (Misuri, Estados Unidos de América)

- Baño de ultrasonido termostático modelo Branson 5800

Eppendorf (Hamburgo, Alemania)

- Centrífuga modelo 5417C

Hanna Instruments (Rhode Island, Estados Unidos de América)

- Termómetro electrónico modelo EITH WP

IKA (Staufen, Alemania)

- Agitador modelo KS 130 basic

Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin, Alemania)

- pH-Metro modelo Calimatic 766 con cable de alimentación y electrodo de pH/Pt 1000 SE 100(vidrio,165 mm)

LABCONCO (Misuri, Estados Unidos de América)

- Liofilizador LYPH LOCK 4.5

LECO corporation (Michigan, Estados Unidos de América)

- Analizador de carbono/ nitrógeno TruMac CN modelo 630-300-400

Pace Scientific (Carolina del Norte, Estados Unidos de América)

- Registrador de datos XR5-SE-M
- Sensor de temperatura y humedad TRH-100

ThermoFisher Scientific (California, Estados Unidos de América)

- Bloque termostaticado digital modelo Stdrd 4blk

ThermoSpectronic (Rochester, Estados Unidos de América)

- Espectrofotómetro UV-VIS, Genesys 6.

Xylem Analytics (Nueva York, Estados Unidos de América)

- Incubadora clóset WTW modelo TS 606/2

### **2.1.2. Materiales cromatográficos y de laboratorio**

Corning (Arizona, Estados Unidos de América)

- Tubos de microcentrifuga de 15 mL

Eppendorf (Hamburgo, Alemania)

- Tubos de microcentrifuga de tapa rosca de 1.5 mL
- Tubos de microcentrifuga safe-lock de 2 mL

ISOLAB (Whertheim, Alemania)

- Cubetas de poliestireno de 2.5-4.5 mL

Merck (Darmstadt, Alemania)

- Columna de HPLC, LiChrospher 250mm x 4,0 mm (5  $\mu$ m), RP-18

### **2.1.3 Reactivos y solventes**

Los solventes utilizados fueron de grado analítico cromatográfico (HPLC).

Bio-Rad (California, Estados Unidos de América)

- Dodecilsulfato sódico

JT Baker (Nueva Jersey, Estados Unidos de América)

- Acetonitrilo (ACN)
- Metanol (MeOH)

ThermoFisher Scientific (California, Estados Unidos de América)

- Agua Purificada Tipo I, Barnstead Nanopure

Merck (Darmstadt, Alemania)

- Solución acuosa de metilamina 40%.
- Sulfato de amonio
- D-glucosa anhidra
- Antrona
- Azul brillante de Coomassie G 250

Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos de América)

- Asparagina
- Alanina
- Glutamina
- DEEMM
- Solución de sulfato de cobre (II) 4 % (w/v)
- Albumina bovina
- Solución de ácido bicinónico

## **2.2. Método de incubación y extracción de analitos de los turiones.**

### **2.2.1. Incubación de turiones y recolección de muestras**

Los turiones fueron comprados en un mercado local en el distrito de San Isidro, Lima. Se seleccionó a un vendedor que garantizaba un producto relativamente fresco con no más de 48 horas desde su cosecha. Los turiones son vendidos a temperatura ambiente durante el día (aproximadamente 21 °C) y vienen agrupados en atados de aproximadamente ocho a doce turiones y amarrados por ligas en los extremos. Estos presentaban un calibre variado entre 8 a 14 mm (medido a 10 cm de la punta). Para separar los turiones se cortaron las ligas que amarran las puntas y los extremos, evitando así daños que pueden ser ocasionados por la presión de la banda elástica.

Antes de introducir los turiones a la incubadora, fueron lavados y secados cuidadosamente para evitar daños en las puntas. Para el lavado se empleó una solución de 0.01 % de Tween 20 en la cual se sumergen los turiones. Luego, se les enjuagó con agua potable y agua

destilada. Finalmente, los turiones fueron secados utilizando papel toalla absorbente. Para esto se giró todo el turión sobre el papel y luego se pasó sobre la punta sin ejercer presión.

Una vez secos, los turiones se colocaron orientándolos de manera alternada en dos direcciones dentro una bandeja de vidrio. La bandeja fue introducida en una incubadora previamente acondicionada a 21 °C, con luz blanca constante de una lámpara LED (101  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), una esponja húmeda en una bandeja de plástico (>70% RH) y un flujo de aire constante de aproximadamente 900 mL/min generado por una bomba de acuario. La incubadora poseía un volumen de aproximadamente 180 L. Asimismo, se ubicó en la parte superior de la incubadora y justo por encima de los turiones un sensor de humedad y temperatura. La temperatura y la humedad de la incubadora fue registrada cada 5 segundos durante todo el periodo de incubación (figura 7).



Figura 7. Vista del interior de la incubadora con turiones. En la rejilla superior se encuentran los turiones depositados en una fuente de vidrio esterilizada. La rejilla inferior contiene una esponja en una fuente con agua. La entrada de la manguera de la bomba de aire se encuentra en la parte superior derecha. Esta se extiende hasta la parte inferior (base) de la incubadora donde inyecta el aire. El sensor, al igual que el foco, se encuentra pegado al techo de la incubadora y suspendido arriba de la fuente que contiene los turiones.

Los turiones fueron incubados durante siete días y de manera diaria se recolectaron nueve turiones de forma aleatoria. La recolección se realizó todos los días a la misma hora. El primer día de recolección es el día 0 (día en el que se introducen los turiones a la incubadora) y los siguientes días serán día 1, día 2, día 3... así hasta día 7. El día 6 no se recolectó muestra, por lo que en total se tienen siete días de recolección. Los turiones se agruparon en tres grupos de tres cada uno; si uno de ellos presentaba algún daño físico cerca a la punta, se le descartaba y se tomaba otro. Los daños físicos consisten en cortes provocados en la cosecha, cortes por el proceso de lavado o presentar cierto grado de oscurecimiento (crecimiento de hongos). Todo este proceso se repitió por cuatro semanas con diferentes lotes de espárragos de la misma procedencia.

### **2.2.2. Método de extracción de aminoácidos y amoniaco.**

Se seleccionó el solvente de extracción basado en el método realizado por Linares y colaboradores (2007). Se midió 25 mL de HCl 0.1 M y se vertió parte del contenido en un mortero. Se tomó un grupo de tres turiones y se cortaron las puntas de cada uno. La incisión se realizó a los 5 cm medidos desde la cabeza del turión. Las puntas cortadas fueron pesadas y trasladadas rápidamente al mortero con HCl. Se realizó la molienda hasta observar que no quedaron pedazos grandes del turión y la mezcla fuera lo más homogénea posible. El extracto fue vertido en un tubo de vidrio y se enjuagó el mortero con lo restante del HCl. Se añadió 350 $\mu$ L de una solución de cloruro de metilamonio 100 mM como estándar interno y se tapó. Este proceso se repitió con los otros dos grupos de turiones para el mismo día de recolección. La recolección y la extracción se realizaron el mismo día.

Los tubos de vidrio, que contenían los extractos, se colocaron sobre una plancha agitadora orbital de forma horizontal y se agitaron durante 30 minutos a una velocidad de 720 rpm a temperatura ambiente. Luego, parte de la fase acuosa del extracto se decantó en un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugó a 2000 x g durante 10 minutos. Se recolectó aproximadamente 2 mL de la fase acuosa en un microtubo de centrifuga y se guardó en ausencia de oxígeno a 4°C hasta el día de su análisis.

### **2.2.3. Derivatización de compuestos nitrogenados utilizando DEEMM**

Se realizó una adaptación al método utilizado por Redruello y colaboradores (2013). Se retiraron del refrigerador todos los extractos de los turiones recolectados durante la semana de extracción. Luego, se realizó una dilución 1:50 con los extractos, para lo que se tomó 10

$\mu\text{L}$  de la muestra y se agregó 490  $\mu\text{L}$  de HCl 0.1 M. Después, se mezcló 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra diluida con 175  $\mu\text{L}$  de buffer borato de sodio 1 M (pH 9), 75  $\mu\text{L}$  de metanol y 3  $\mu\text{L}$  de DEEMM en un tubo de microcentrífuga con tapa rosca de 1.5 mL. La mezcla se agitó por cinco segundos en un vortex y luego se colocó en un baño de ultrasonido a 30 °C por 45 minutos. Después, para eliminar el exceso de DEEMM, se calentó a 70 °C en un bloque termostático por dos horas. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 14000 x g y se trasladó parte del sobrenadante a un vial con inserto para posteriormente ser analizado por HPLC.

#### **2.2.4. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

Para el análisis de las muestras, se adaptó el método de análisis de Redruello y colaboradores (2013). Esta adaptación se realizó para poder determinar solo los compuestos de interés: asparagina, glutamina, fenilalanina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico y amoníaco. Para el análisis de ácido aspártico y ácido glutámico se ajustó el pH del buffer de la fase móvil a 6. Un día previo a cada análisis, se lavó la columna utilizada con un flujo de 0.2 mL/min de isopropanol por 24 horas.

Para el análisis, se utilizó un cromatógrafo Agilent 1260, infinity II. En este equipo se instaló una columna LiChrospher 100 RP-18 de 250 mm x 4,0 mm (5  $\mu\text{m}$ ) y se estableció la temperatura de separación a 40 °C. El volumen de inyección de la muestra fue de 10  $\mu\text{L}$  y se utilizó un flujo de separación de 1 mL/min. Asimismo, se analizó la muestra después de la separación a 280 nm. Los solventes utilizados en la fase móvil fueron buffer acetato de sodio 25 mM, pH 4.15 (solvente A), y una mezcla de acetonitrilo/metanol 4:1 (solvente B). El gradiente de separación utilizado se puede ver en la tabla 3.

Tabla 3: Gradientes de solventes de la fase móvil para la separación de analitos por HPLC.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
2	90	10
4	88	12
5	88	12
10	80	20
15	70	30
19	70	30
21	40	60
25	40	60
29	90	10
34	90	10

### 2.3. Variación de peso seco de espárragos durante la semana de incubación

Se determinó la pérdida de agua en las puntas de los turiones durante la semana de incubación. Para ello, se incubaron turiones siguiendo la sección 2.2.1 y se tomaron muestras solo los días 0, 4 y 7. Se cortó 5 cm de las puntas de los turiones recolectados y se colocaron en placas Petri, que luego fueron introducidas en un horno a 70 °C. Antes de esto, se registró el peso de las puntas (peso fresco). Luego de 24 horas, se retiraron las placas del horno, se enfriaron en un desecador por 10 minutos y se pesaron. Se determinó la diferencia de peso de las puntas antes y después del tratamiento térmico, con lo que se estableció el porcentaje de agua perdida y el porcentaje del peso seco de los espárragos para ciertos días de la incubación. Este proceso se realizó por triplicado con tres muestras de tres puntas cada una. Con la variación de peso seco, se realizó una curva con la que se corrigió el peso fresco de los turiones al momento de cuantificar los analitos durante toda la semana ( $\mu\text{mol/ g}$  espárrago seco).

## **2.4. Cuantificación de analitos**

Para el análisis de los compuestos de interés se preparó una solución madre a partir de soluciones estándar de asparagina, glutamina, amoniac, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico y alanina. Las soluciones estándar de aminoácidos y amoniac fueron preparadas en fioas de 10 mL con una concentración de 25 mM cada una. En el caso de los aminoácidos se emplearon estándares puros de cada uno y en el caso del amoniac se utilizó una sal de sulfato de amonio.

En un tubo de microcentrífuga de 2 mL se mezclaron las soluciones estándar preparadas previamente y se adicionó HCl 0.1M para obtener 1 mL de una solución cuya concentración era 1 mM para cada analito. A partir de esta solución se tomaron 500  $\mu$ L y se diluyeron con 500  $\mu$ L de HCl 0.1 M. Esta dilución se agitó en un vórtex por unos 10 segundos y se repitió el proceso hasta llegar a ocho diluciones. Desde la disolución 1 hasta la 7 se le añadió 2.5  $\mu$ L de la solución de cloruro de metilamonio 6.93 mM. Así, la cantidad de moles agregados de metilamonio a cada solución estándar fue la misma que se agregó a cada muestra antes de la extracción. Todo el proceso descrito se realizó por triplicado.

Todas las soluciones de estándares fueron derivatizadas y analizadas por el método descrito en la sección 2.2.3 y 2.2.4, y se obtuvo así una relación entre el área de las señales y la concentración de cada analito. Con estos datos se construyó una curva de calibración y se establecieron los límites de cuantificación y detección para el análisis. Los valores de las áreas de los analitos, obtenidos en los cromatogramas de los extractos, fueron procesados con dichas curvas para poder determinar su concentración. Asimismo, se reportó el contenido de cada analito al peso (g) de espárragos secos (peso corregido con la curva previamente obtenida).

## **2.5. Determinación del contenido de carbono y de nitrógeno**

Se determinó la variación del contenido (%) de carbono y de nitrógeno durante toda la semana de incubación. Para ello, se recolectaron puntas de espárragos cada día durante una semana siguiendo el método descrito en la sección 2.2.1. Las puntas fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas durante una semana. Luego, fueron molidas y guardadas en bolsas impermeables dentro de un desecador hasta el día de su análisis.

Para el análisis se utilizó un analizador de nitrógeno/carbono Leco TruMac CN el cual determinaba el contenido de estos analitos de manera automática con un método predeterminado. Se mezcló 0.1 g de muestra la muestra de espárrago molida y liofilizada con 0.2 g de EDTA en crisoles cerámicos. Estos crisoles se introdujeron en el analizador. Este proceso se realizó por triplicado para cada día de incubación.

## **2.6. Determinación de proteínas**

Para el análisis de proteínas totales y solubles se utilizaron las muestras liofilizadas en la sección 2.5. Se reportó la variación del contenido de ambos tipos de proteínas en relación con el peso liofilizado del espárrago para cada día del periodo de incubación.

### **2.6.1. Contenido de proteínas totales**

Para la extracción de proteínas totales se adaptó el método utilizado por Hurst y Clark (1993). En microtubos de centrifuga de 2 mL con tapa rosca se pesó 10 mg de espárragos liofilizados y molidos de cada día de incubación. A cada uno de los tubos se le añadió 1.5 mL de una solución de NaOH 0.1M que contenía 1 % de dodecilsulfato sódico. Luego, las mezclas se agitaron por 10 segundos en un vortex y se calentaron por 30 minutos a 80°C en un bloque termostatzado. Una vez terminada la extracción, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 3000 x g por 5 minutos. Se tomó 100 µL de cada sobrenadante y se diluyó con 500 µL del solvente de extracción. Este proceso se realizó por triplicado para cada día de incubación.

El contenido de proteínas totales de cada muestra diluida se determinó con un método colorimétrico el cual utiliza una solución de ácido bicinonínico (BCA) (Stoscheck, 1990). Para el análisis, primero se mezcló la solución de BCA con una solución de sulfato de cobre 4% hasta obtener una relación de 50:1 respectivamente. A 2 mL de esta nueva solución se le agregó 100 µL de muestra diluida y se agitó por 5 segundos en un vórtex. Luego, se incubó por 15 minutos a 60°C en un bloque termostatzado. Finalmente, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se traspasaron a cubetas de poliestireno. Las cubetas se introdujeron en un espectrofotómetro y se midió su absorbancia a 562 nm. Para la estimación del contenido de proteínas se utilizó un estándar de albumina sérica bovina.

Debido a que este método puede tener sobreestimaciones con azúcares reductores, se tuvo que hacer una corrección determinando el contenido de estas en el extracto. Para esto, se adaptó un método colorimétrico el cual utiliza una solución de antrona (Hansen y Møller,1975). Esta solución se preparó disolviendo 200 mg de antrona en 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72%. En un tubo de ensayo se mezcló 3 mL de solución de antrona fría (4°C aproximadamente) con 200 µL de la muestra del extracto sin diluir. Luego, esta mezcla se agitó por 15 segundos en un vórtex y se calentó por 10 minutos a 100°C en un bloque termostatzado. Finalmente, se transfirió el contenido a cubetas de poliestireno para luego medir su absorbancia en un espectrofotómetro a 630 nm. Para cuantificar se utilizó un estándar de D-glucosa anhidra.

### **2.6.2. Contenido de proteínas solubles**

En microtubos de centrifuga de 2 mL con tapa rosca se pesó 10 mg de espárragos liofilizados y molidos de cada día de incubación. A cada tubo se le añadió 1.5 mL de buffer Tris-HCl 25mM pH 8 que contenía 10 % de glicerina y 0.07% de β-mercaptoetanol adaptando un método de extracción realizado por Yadav y colaboradores (2020). Luego, la mezcla se agitó de manera orbital por 30 minutos a 4°C en una plancha agitadora que se colocó dentro de una incubadora. Finalmente, los tubos fueron centrifugados a 4°C por 5 minutos a 3000 x g y analizados por el método colorimétrico de Bradford (1976). Este proceso se realizó por triplicado para cada día de incubación.

Para el análisis de proteínas se mezcló 2 mL de reactivo Bradford previamente filtrado con 100µL del sobrenadante del extracto. La mezcla se agitó por 5 segundos en un vórtex y se transfirió a cubetas de poliestireno. Las cubetas con las muestras se depositaron en un espectrofotómetro y se midió la absorbancia a 595 nm. Para la estimación de la concentración se utilizó un estándar de albumina sérica bovina (BSA).

### **2.7. Variación de algunas propiedades organolépticas**

Se registraron algunos cambios en la apariencia de los turiones durante toda la semana de incubación. Como no todos los turiones presentaban cambios de manera homogénea, se utilizó un solo turión (el que mejor condición presentaba) para observar estos cambios. Se

registró una foto de la punta del turión por cada día de la semana. Además, se le midió el calibre a una distancia de 8 cm desde la punta utilizando un vernier. Factores como la flacidez y el olor también fueron registrados de manera manual y se compararon con otros turiones de la incubadora.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Variación de la temperatura y la humedad durante la incubación**

La cámara en la que se incubaron los turiones (figura 7) fue encendida dos días antes de introducir los turiones con las condiciones previamente establecidas. Debido a que los turiones son susceptibles a muchos factores del entorno donde se encuentran, se registró la temperatura y humedad durante la incubación. De esta manera, se aseguró que las condiciones dentro de la incubadora fueran similares a lo largo de todo el estudio.

Como se puede ver en la figura 8, la humedad relativa se mantuvo entre 75 y 80 % durante el periodo de incubación. El valor máximo se observó en el primer día y puede ser causado por el mayor porcentaje de agua que presentan los turiones debido al lavado previo. Este valor decreció conforme transcurrió la semana de incubación. Por otro lado, la temperatura no tuvo cambios significativos durante este periodo. En la figura 9 se muestra la variación de la temperatura de incubación durante los 7 días de experimento. Este valor se mantuvo sin cambios significativos entre 20.3 °C y 20.5 °C.

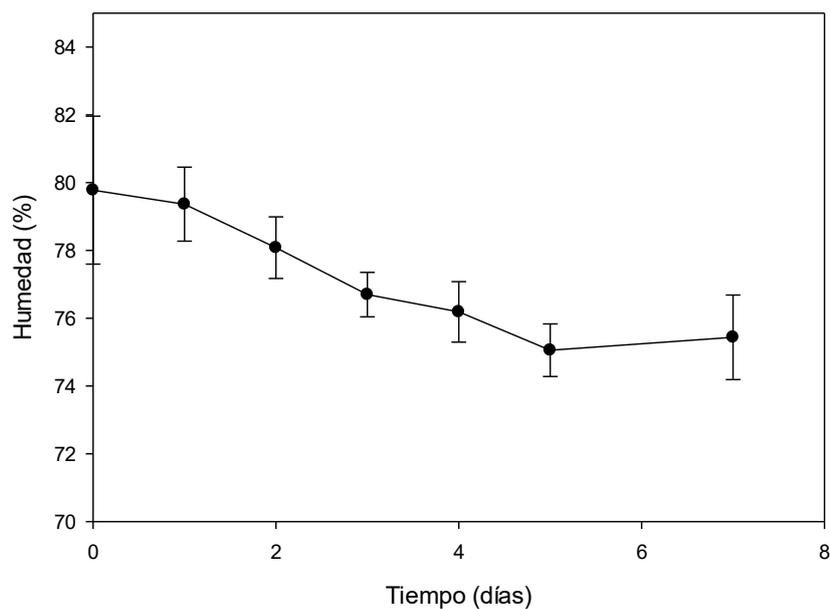


Figura 8. Variación promedio de la humedad relativa dentro de la incubadora. Para la medición de cada día, se registró la humedad cada 5 minutos por 24 horas. Asimismo, se gráfica el error estándar para cada punto (n=9).

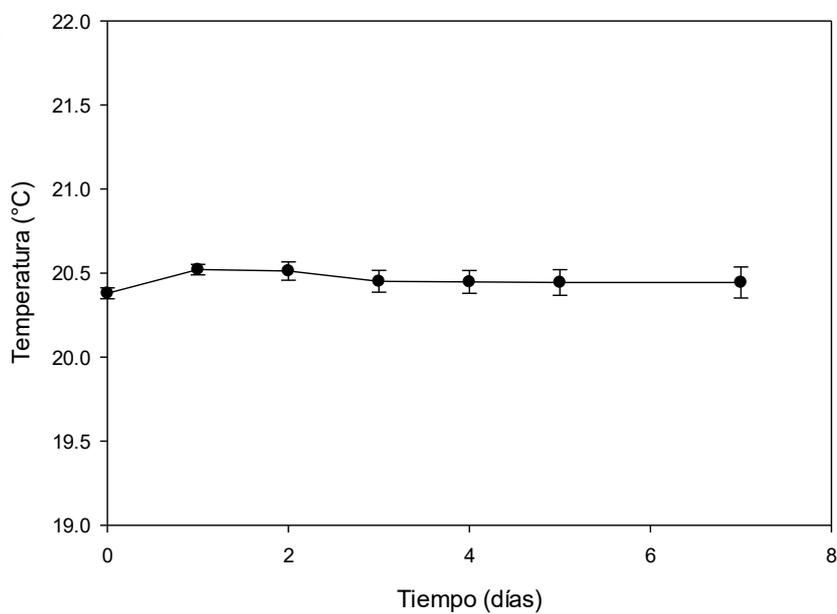


Figura 9. Variación promedio de la temperatura dentro de la incubadora. Para la medición de cada día, se registró la temperatura cada 5 minutos por 24 horas. Asimismo, se gráfica el error estándar para cada punto (n=9).

### 3.2. Curva de calibración, límites de detección y límites de cuantificación para el análisis por HPLC

Para obtener las curvas de calibración, primero se determinó la relación entre las áreas resultantes de cada analito y el área del estándar interno en cada solución estándar. De la misma manera, se relacionó la cantidad de moles inyectados de cada analito con la cantidad de moles inyectados del estándar interno. Finalmente, ambas relaciones se graficaron y así se logró construir la curva de calibración para cada analito. Este proceso se realizó por triplicado.

El coeficiente de determinación, el rango lineal de las curvas de calibración, el límite de detección y el límite de cuantificación se muestran en la tabla 4. Para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación se multiplicó por 3 y 10, respectivamente, la relación señal/ruido (S/N) del promedio de cinco blancos en cada tiempo de retención de los analitos. El rango lineal, en el cual se pudieron cuantificar los analitos, fue establecido por medio de diez diluciones que se realizaron para obtener las curvas de calibración de cada analito. En el caso del ácido aspártico y ácido glutámico fueron siete diluciones.

Tabla 4. Variables de las curvas de calibración (rango lineal y coeficiente de determinación lineal), límites de detección y cuantificación de cada analito.

	R <sup>2</sup>	Rango lineal (μmol/L)	Límite de detección (μmol /L)	Límite de cuantificación (μmol /L)
Asparagina	0.9995	0.93 – 948.70	0.0015	0.0050
Glutamina	0.9998	0.98 – 1004.50	0.0024	0.0079
Alanina	0.9997	0.39 – 792.00	0.0011	0.0037
Fenilalanina	0.9999	1.00 – 125.6	0.0012	0.0041
Ácido aspártico	0.9991	8.123-259.94	0.0035	0.0132
Ácido glutámico	0.9994	7.86-251.48	0.0031	0.0102
Amoniaco	0.9996	1.93 – 989.30	0.0027	0.0090

### **3.3. Variación de peso seco de las puntas de espárragos**

Con el fin de expresar los resultados en relación con el peso seco del turión, se determinó la cantidad de agua que pierden las puntas. Como el contenido de agua que estas poseen varía conforme transcurren los días, se realizaron secados de tres días dentro del periodo de incubación (día de inicio, día intermedio y día final). Así, se determinó la variación del contenido de agua que poseen las puntas.

Para establecer el tiempo óptimo de secado se analizó la variación de peso después de tiempos determinados de exposición a 70 °C. Luego de 24 horas de exposición y las siguientes 4 horas (28 horas) no se detectó variación del peso seco en ninguna de las repeticiones, por lo que se estableció 24 horas de tiempo de secado a 70°C.

Siguiendo las condiciones descritas, se determinó el porcentaje de peso seco para los tres días de la incubación descritos anteriormente. Con estos datos, se graficó una curva de variación del peso seco y se determinó su ecuación. Siguiendo la ecuación, se corrigieron los pesos húmedos de las puntas para cada día del periodo de incubación.

Se puede observar en la figura 10 que la variación del porcentaje de peso seco va desde 10.49% hasta 23.14 %. Esto quiere decir que el porcentaje de agua, que es el complemento del peso seco, que contienen las puntas durante el periodo de incubación disminuye en aproximadamente 13 %.

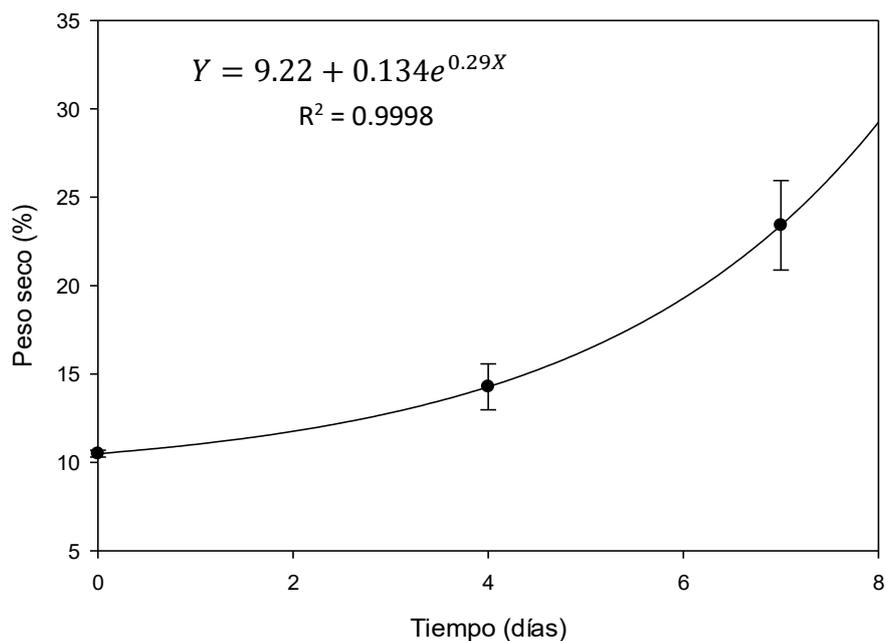


Figura 10. Variación porcentual de peso seco en puntas de espárragos. El análisis se realizó en tres días durante una semana. Se grafica el error estándar para cada punto (n= 9).

### 3.4. Identificación y variación de aminoácidos y amoniaco

Por medio de los tiempos de retención de los estándares analizados previamente, se pudo identificar los analitos en las muestras de espárragos. Como se puede ver en la figura 11, la asparagina posee un tiempo de retención de 7.2 min, la glutamina de 8.1 min, la alanina de 13.4min, la fenilalanina de 21.5 min y el amoniaco de 17.3 min. Asimismo, se muestra el estándar interno (metilamina) que eluyó a 21.1 min.

Por otro lado, para la determinación de ácido aspártico y ácido glutámico se modificó el pH del solvente A de la fase móvil. El pH se ajustó a 6 con hidróxido de sodio y fue el único cambio que se realizó. Los tiempos de retención para el ácido aspártico y ácido glutámico fueron de 2.85 y 3.44 minutos respectivamente.

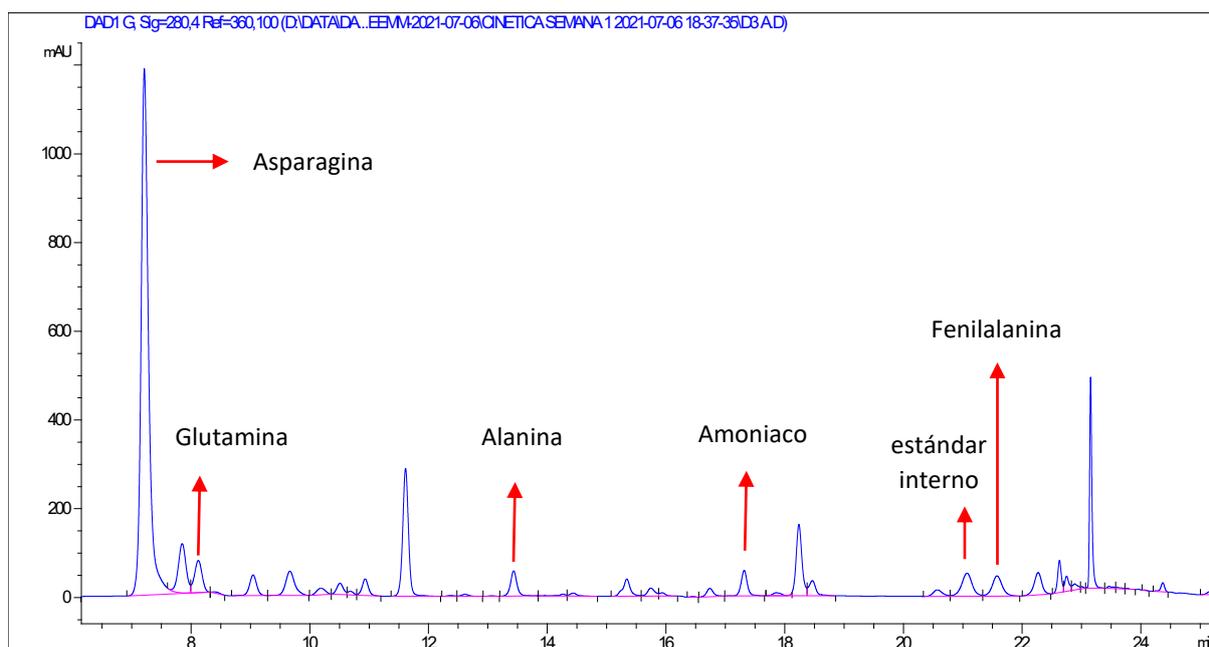


Figura 11. Parte del cromatograma de la separación de los analitos por HPLC. Las señales de los analitos: asparagina (7.2 min), glutamina (8,1 min), alanina (13.4 min) y amoniaco (17.3 min). También, se muestra la señal del estándar interno (21.1 min), que para este experimento fue la metilamina.

Se utilizó metilamina como estándar interno para poder cuantificar los analitos de interés. Para la selección de este compuesto se tuvo en cuenta que tenía que ser capaz de reaccionar con el DEEMM, separarse bien con el método de análisis y no estar presente en el espárrago. Para ello, se tuvieron que realizar pruebas cualitativas con distintos compuestos nitrogenados. Las pruebas que se realizaron consistieron en comparar una muestra de extracto de espárrago con una muestra de extracto a la que se añadió el compuesto nitrogenado. En la figura 12 se muestra la comparación de la muestra de extracto sin adición de metilamina (azul) con la misma muestra a la que se añadió metilamina (rojo). Así, se llegó a seleccionar la metilamina como estándar interno. Este compuesto no se superponía con ninguna señal en el método establecido de separación y no estaba presente en el extracto de espárrago.

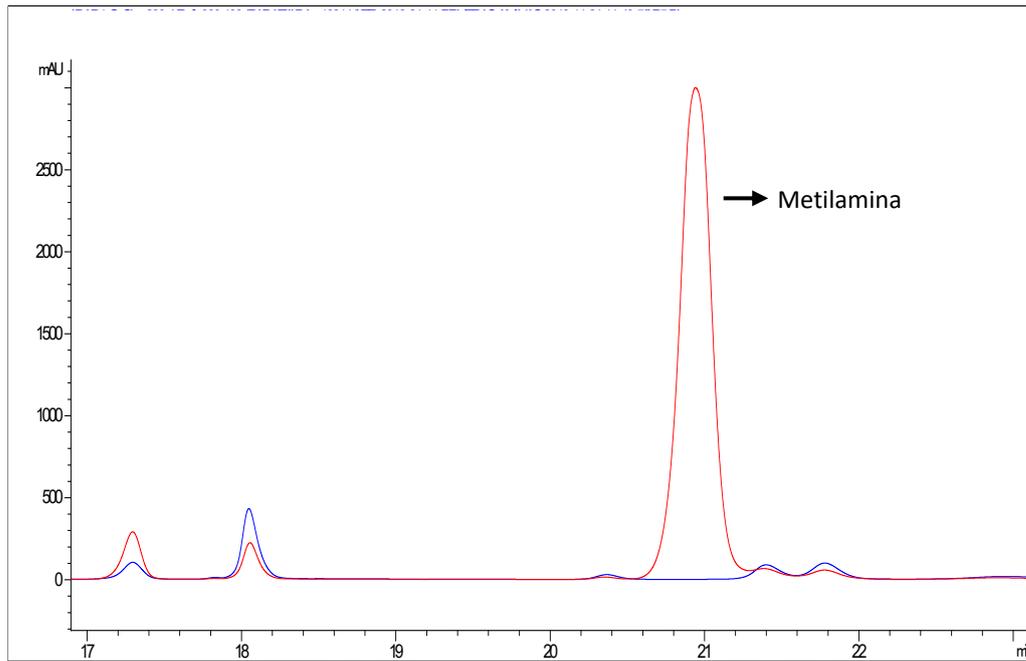


Figura 12. Superposición de señales de absorbancia de la metilamina en dos muestras de espárragos. Una muestra presenta adición de metilamina (línea roja) mientras que otra muestra no presenta modificación (línea azul). Se observa que la metilamina es detectable y no está presente en el espárrago, por lo que no se observa señal en la línea azul.

Con las áreas respectivas de cada analito y las curvas de calibración realizadas previamente, se determinó la concentración de los aminoácidos de interés para todos los días del periodo de incubación. El valor de concentración fue expresado como  $\mu\text{mol}$  de analito sobre gramo de espárrago seco ( $\mu\text{mol/g}$  espárrago). Como se realizaron cuatro semanas de incubaciones, se determinó y se graficó la variación del promedio diario obtenido por cada semana. Asimismo, se agregó el valor del error estándar para cada día.

Entre los analitos, el que presentó la mayor concentración fue la asparagina. En la tabla 5, se reportan los valores máximos y mínimos de todos los analitos cuantificados durante la incubación. Dentro de estos rangos de valores, la concentración de analitos puede variar dependiendo del día de incubación en que se tomó la muestra. Asimismo, todos los valores de concentración (valor mínimo y máximo) obtenidos de los cuatro analitos se encontraron dentro del rango lineal de su respectiva curva de calibración.

Tabla 5. Valores máximos y mínimos de todos los analitos cuantificados durante la semana de incubación.

Aminoácido	Valor mínimo ( $\mu\text{mol/g}$ )	Valor máximo ( $\mu\text{mol/g}$ )
Asparagina	$344.47 \pm 60.48$	$776.39 \pm 103.00$
Glutamina	$21.27 \pm 1.76$	$135.82 \pm 17.61$
Amoniaco	$15.53 \pm 2.99$	$76.70 \pm 24.27$
Fenilalanina	$13.29 \pm 2.22$	$25.49 \pm 3.32$
Alanina	$9.98 \pm 1.55$	$19.51 \pm 1.54$
Ácido aspártico	$27.39 \pm 1.60$	$42.14 \pm 2.93$
Ácido glutámico	$19.84 \pm 1.53$	$50.76 \pm 76$

En el caso de la asparagina, la concentración inicial que se obtuvo (día 0) fue de  $344.47 \mu\text{mol/g}$  de espárrago. Este valor, después de siete días de incubación, se incrementó hasta casi el doble, llegando a un valor de  $776.39 \mu\text{mol/g}$  de espárrago. A pesar de que tuvo tendencia a aumentar durante el periodo de incubación, el incremento de su contenido por día no fue constante. Se puede observar en la figura 13 que desde el día 0 hasta el día 3, la concentración de asparagina alcanzó un valor de aproximadamente  $600 \mu\text{mol/g}$  y luego no presentó cambios significativos hasta el día 5. Por último, en los dos últimos días se presentó el mayor incremento hasta alcanzar su valor máximo.

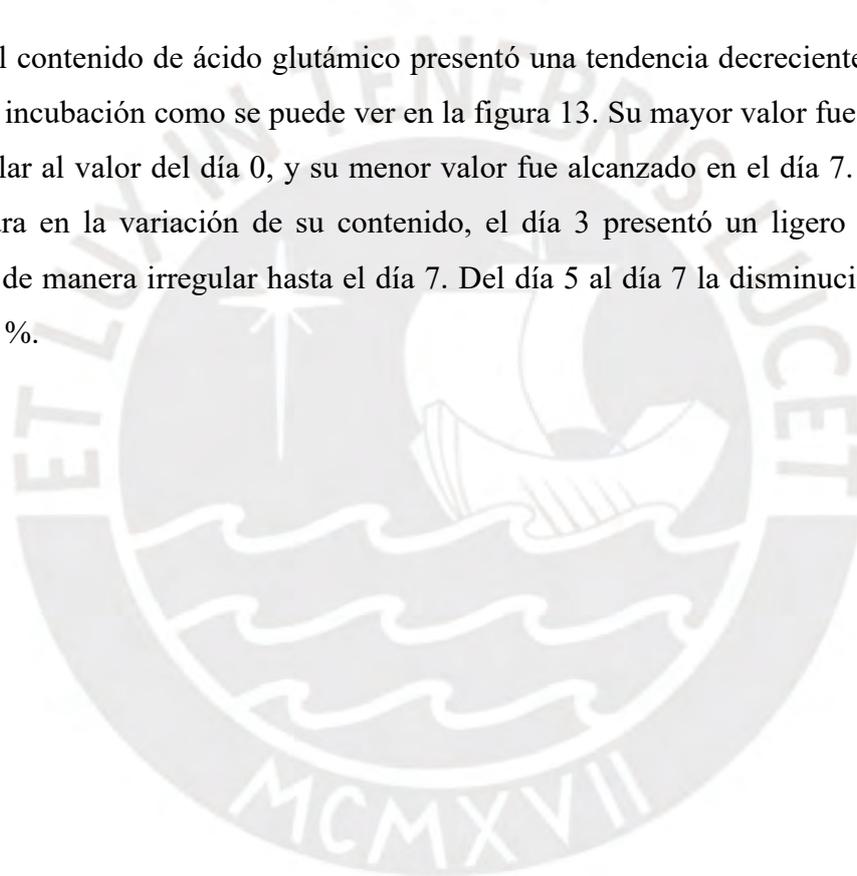
La glutamina, como se puede ver en la figura 13, presentó un aumento de concentración de casi el doble desde el día 0 hasta el día 4. La concentración entre estos días aumentó desde  $21.27$  hasta  $49.88 \mu\text{mol/g}$  de espárrago. Sin embargo, luego del día 4, la tasa de acumulación se hizo mayor y la glutamina alcanzó su valor máximo de  $135.82 \mu\text{mol/g}$  de espárrago en el día 7. Este analito fue el que presentó mayor tasa de incremento durante la semana de incubación. Así, el último día, el contenido inicial alcanzó hasta un poco más de seis veces su valor.

La alanina fue el analito que presentó el menor contenido y variación en comparación con los otros aminoácidos analizados. El contenido de alanina se mantuvo entre un rango de  $10$  a  $20 \mu\text{mol/g}$  de espárrago durante toda la semana de incubación. En la figura 13 se puede ver que en los primeros días, desde el día 0 hasta el día 2, tendió a acumularse hasta llegar a su valor máximo de  $19.51 \mu\text{mol/g}$  de espárrago. Luego, su contenido se redujo hasta llegar a su valor mínimo de  $9.98 \mu\text{mol/g}$  de espárrago, el cual fue menor que el contenido inicial ( $13.4827 \mu\text{mol/g}$  de espárrago).

El contenido de fenilalanina aumentó los dos primeros días de incubación y luego se mantuvo sin cambios significativos hasta el último día del periodo de incubación. Como se puede ver en la figura 13, la fenilalanina presentó su menor valor el día 0 (13.2908  $\mu\text{mol/g}$ ) y luego aumentó hasta aproximadamente 24  $\mu\text{mol/g}$ , en donde se mantuvo hasta el día 7.

El ácido aspártico se acumuló hasta el día 3 como se puede ver en la figura 13. El aumento del contenido hasta el día 3 fue de un 50 % aproximadamente con respecto a su valor inicial (27.39 $\pm$ 1.60). Luego, entre los días 3 y 5 el contenido no presentó cambios significativos. Finalmente, el contenido se redujo de manera rápida hasta el día 7, donde alcanzó un valor similar al inicial (día 0).

Por último, el contenido de ácido glutámico presentó una tendencia decreciente durante todo el periodo de incubación como se puede ver en la figura 13. Su mayor valor fue en el día 1, el cual fue similar al valor del día 0, y su menor valor fue alcanzado en el día 7. A pesar de la tendencia clara en la variación de su contenido, el día 3 presentó un ligero aumento para luego decaer de manera irregular hasta el día 7. Del día 5 al día 7 la disminución fue rápida, de casi un 50 %.



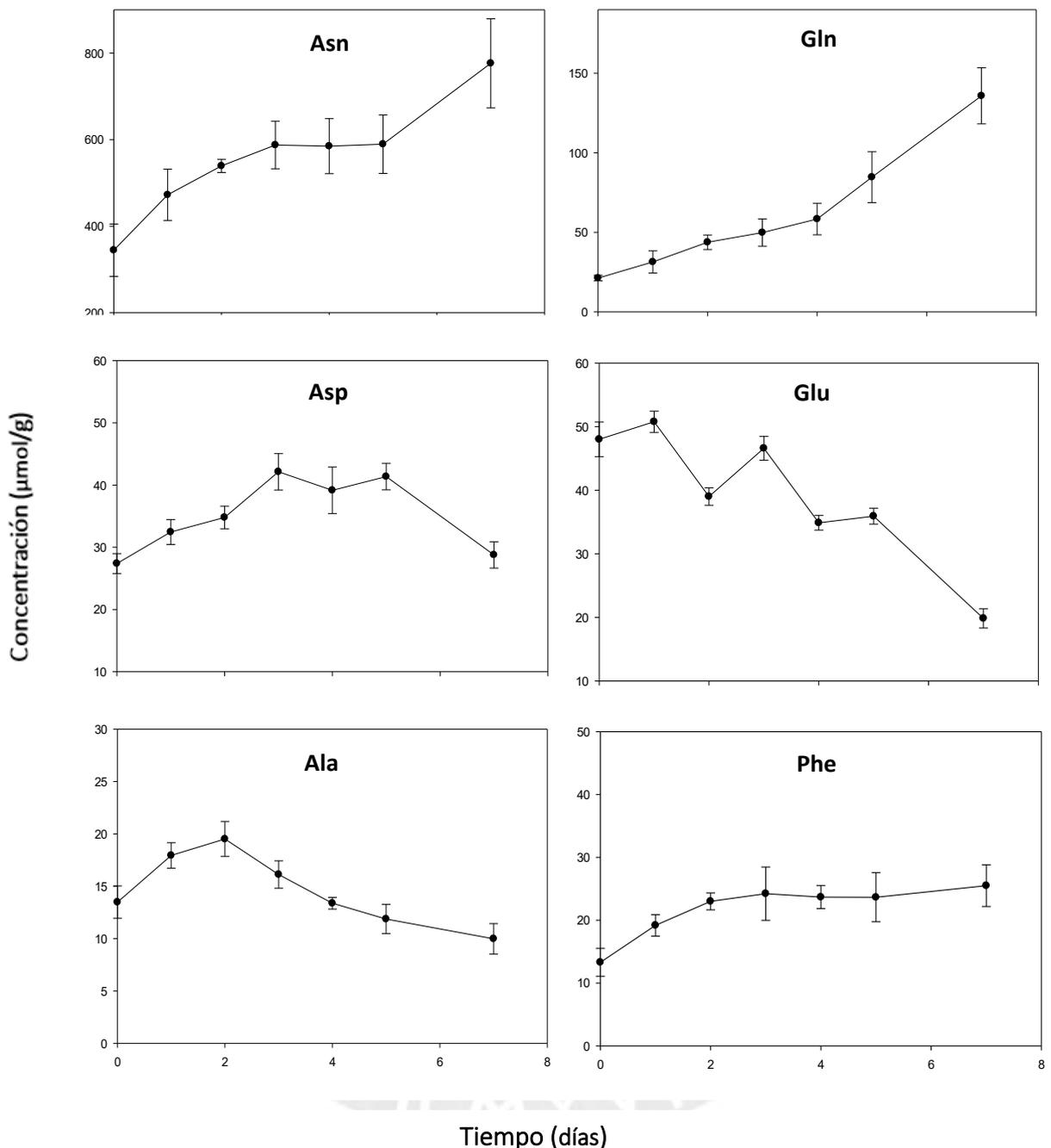


Figura 13. Variación de la concentración (μmol/g) de aminoácidos en puntas de espárragos. Para cada medición se tomó el promedio de cuatro extracciones de cuatro semanas diferentes. Cada extracción fue realizada a tres grupos de turiones cada día durante 7 días. Se gráfica también el error estándar de las cuatro extracciones (n=12).

El amoníaco, de manera similar a la glutamina y a la asparagina, presentó el mayor valor el último día de incubación. En la figura 14 se aprecia que el contenido desde el día 0 hasta el día 4 presentó un aumento que va desde 15.53 hasta 23.01 μmol/g de espárrago. Sin embargo, luego del día 4 y de manera similar que el contenido de glutamina, el contenido de amoníaco se incrementó de manera acelerada hasta alcanzar su valor máximo de 76.70 μmol/g de

espárrago el día 7. Este valor es casi cuatro veces más que el valor del día 4. Además, del día 2 al día 3 de incubación, el contenido de amoniaco aumentó en un 40 %.

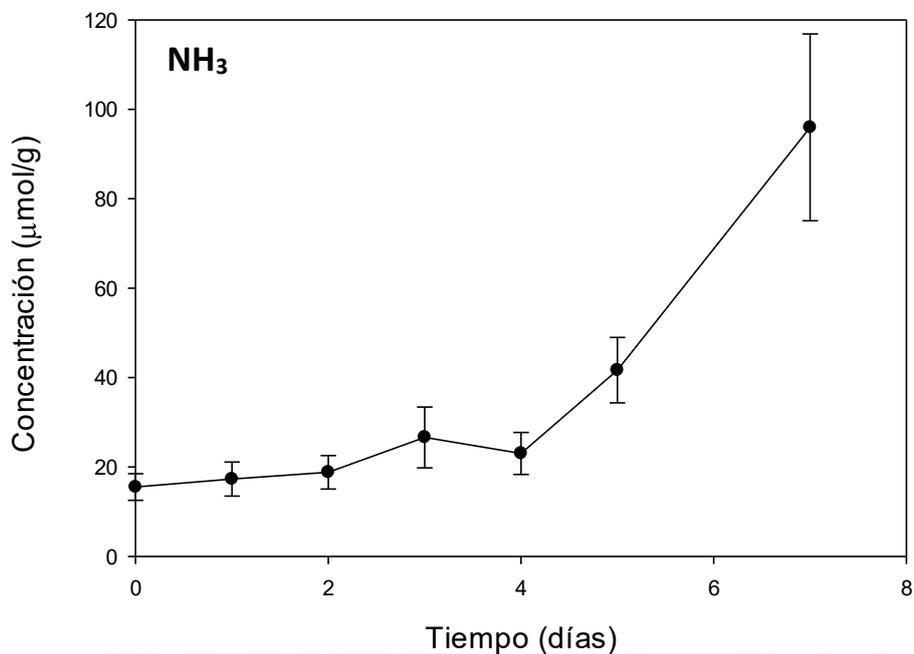


Figura 14. Variación de la concentración de amoniaco en puntas de espárragos. Para cada medición se tomó el promedio de cuatro extracciones de cuatro semanas diferentes. Cada extracción fue realizada a tres grupos de turiones cada día durante siete días. Se gráfica también el error estándar de las cuatro extracciones ( $n=12$ ).

Todos los valores del contenido de los analitos se pueden observar en la tabla 6. Con estos datos se puede observar mejor el porcentaje de variación entre los días del periodo de incubación. Asimismo, se muestra el error estándar de la medición de cada día para cada analito. Con estos valores se pudieron hacer cálculos posteriores para la determinación del contenido de nitrógeno.

Tabla 6. Concentración promedio ( $\mu\text{mol/g}$ ) y error estándar de aminoácidos y amoníaco durante siete días de incubación.

Analito	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 7
Asn	344.5 $\pm$ 60.5	472.4 $\pm$ 59.2	539.2 $\pm$ 15.2	587.5 $\pm$ 55.0	584.9 $\pm$ 63.6	589.5 $\pm$ 67.5	776.4 $\pm$ 103.0
Gln	21.3 $\pm$ 1.8	31.4 $\pm$ 7.0	43.8 $\pm$ 4.6	49.9 $\pm$ 8.5	58.4 $\pm$ 9.9	84.7 $\pm$ 16.0	135.8 $\pm$ 17.6
Ala	13.5 $\pm$ 1.6	17.9 $\pm$ 1.2	19.5 $\pm$ 1.7	16.1 $\pm$ 1.3	13.4 $\pm$ 0.	11.9 $\pm$ 1.4	10.0 $\pm$ 1.5
Phe	13.3 $\pm$ 2.2	19.2 $\pm$ 1.7	23.0 $\pm$ 1.4	24.2 $\pm$ 4.2	23.7 $\pm$ 4.2	23.7 $\pm$ 3.9	25.5 $\pm$ 3.3
Asp	27.4 $\pm$ 1.6	32.5 $\pm$ 2.0	34.8 $\pm$ 1.8	42.1 $\pm$ 2.9	39.2 $\pm$ 3.8	41.4 $\pm$ 2.1	28.8 $\pm$ 2.1
Glu	48.0 $\pm$ 2.7	50.8 $\pm$ 1.7	39.00 $\pm$ 1.4	46.6 $\pm$ 1.9	34.9 $\pm$ 1.2	35.9 $\pm$ 1.3	19.8 $\pm$ 1.5
NH <sub>3</sub>	15.5 $\pm$ 3.0	17.3 $\pm$ 3.8	18.8 $\pm$ 3.7	26.6 $\pm$ 6.8	23.0 $\pm$ 4.7	41.7 $\pm$ 7.3	96.0 $\pm$ 20.3

### 3.5. Contenido de proteína totales y solubles

El contenido de proteínas totales y solubles disminuyó conforme transcurren los días de la semana de incubación. Este contenido es expresado en mg de proteína por g de espárrago seco (liofilizado). La disminución del contenido de proteínas totales fue continua a lo largo de todo el periodo de incubación y fue de la mano con el cambio en el contenido de proteínas solubles. Sin embargo, como se puede ver en la figura 15, las proteínas totales presentan una tasa de reducción lenta los primeros 3 días (0-2); mientras que, en este mismo periodo, las proteínas solubles se redujeron de manera más acelerada. En general, para toda la semana de incubación, las proteínas totales disminuyeron un 36 % y las solubles un 43 %.

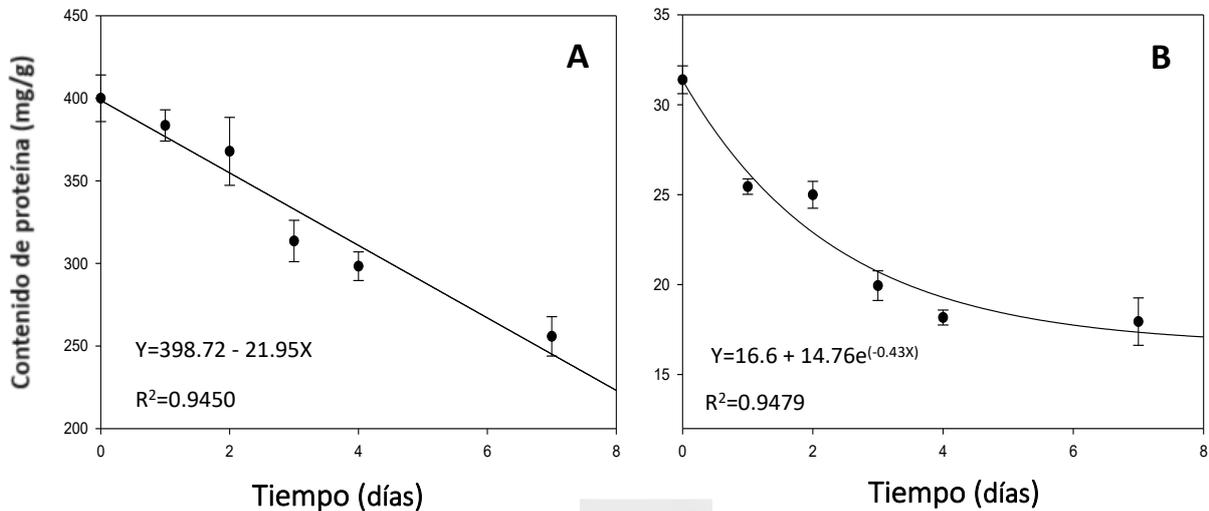


Figura 15. Variación del contenido de proteínas totales (A) y proteínas solubles (B) en puntas de espárragos. Se muestra el error estándar para cada día de análisis (n=9).

### 3.6. Propiedades organolépticas en los turiones

Durante los primeros días de incubación (día 0 y 1) no hubo cambios notorios en la apariencia del turión. En el día 2, se percibieron cambios ligeros como arrugas debajo de la punta; además, el calibre del turión disminuyó 0.26 mm y se presentó un ligero olor desagradable. A partir del día 3, los cambios mencionados en el día 2 se hicieron mucho más notorios. Las puntas de los turiones perdieron turgencia mientras que en la parte inferior aumenta la rigidez por el proceso de lignificación. Desde el día 2 hasta el día 4 no se observaron cambios significativos en el calibre.

Luego del cuarto día de incubación los cambios relacionados a la pérdida de frescura se hicieron claros. Del día 4 hasta el día 7 el calibre del turión se redujo considerablemente (casi 1.5 mm). Además, el color de la punta se hizo más oscuro, aparecieron más arrugas y se volvió flácido en algunas zonas. Para el último día de incubación (día 7) las hojas escamosas del turión se marchitaron y dieron apariencia de sequedad a éste. También, el olor que apareció entre el día 2 y 3 en otros turiones, se hizo más intenso. Los cambios de apariencia y

la variación del calibre (mm) se pueden observar en la figura 16. Asimismo, en algunos turiones, los últimos días presentaron crecimiento de hongos y decoloración.

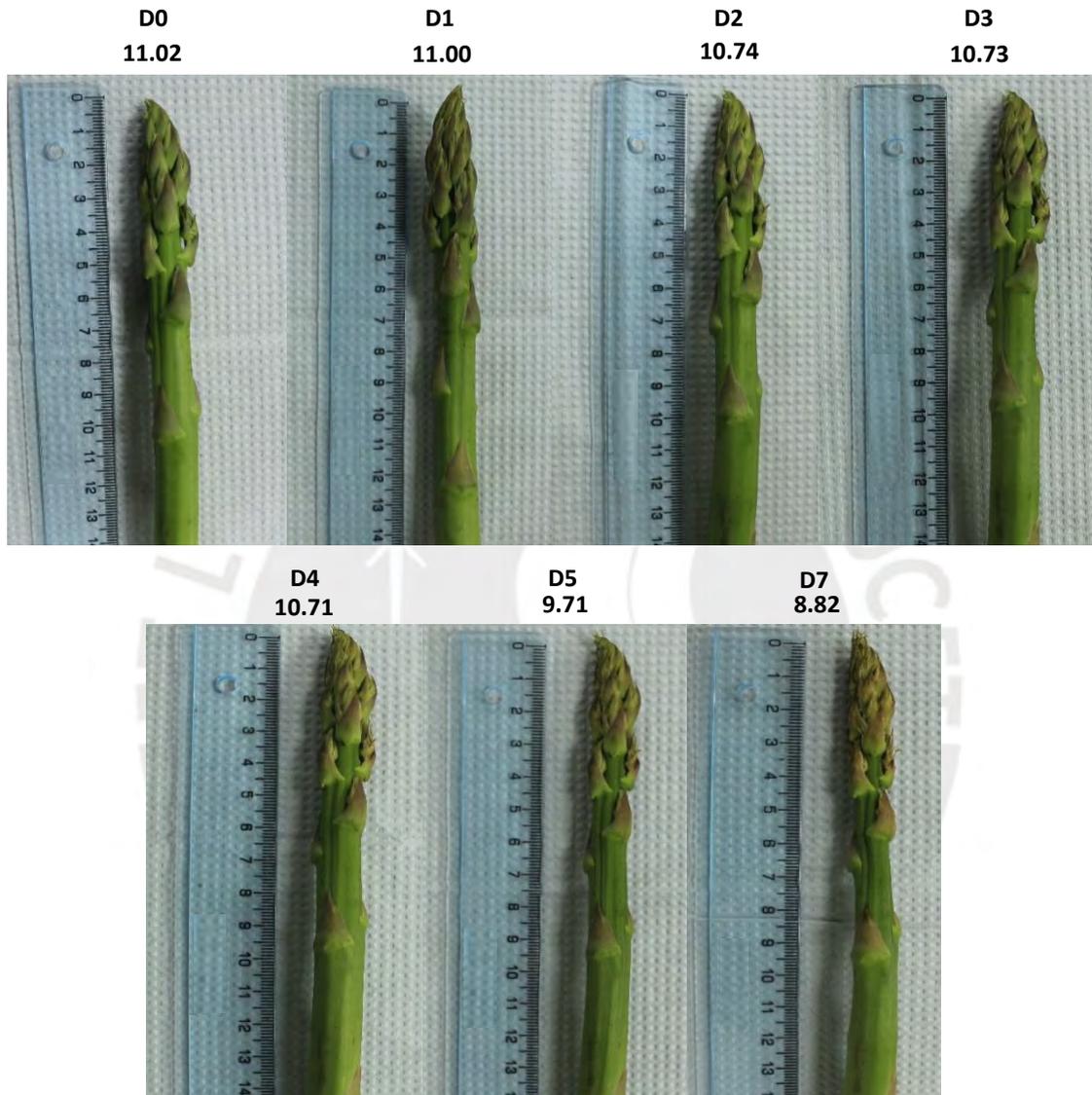


Figura 16. Fotografía de la parte superior de un turión a lo largo de 1 semana. Cada número representa el día del periodo de incubación en que se tomó la foto. Las fotos fueron tomadas a escala manteniendo la misma posición del turión. También, se midió el calibre (mm) del turión a los 8 cm medidos desde la punta. Este valor se encuentra debajo del día.

### 3.7. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno

Con los valores obtenidos del contenido (%) de carbono y nitrógeno para cada día, se graficó su variación durante toda la semana de incubación. Asimismo, se determinó el valor del error estándar para cada muestra ( $n=9$ ). Como se puede ver en la figura 17, el contenido de carbono (A) se redujo en el transcurso de la semana de manera continua. Dentro de este periodo, se observó una tendencia sigmoideal, siendo el día 7 el día con menor contenido de carbono. El contenido de carbono en este día fue 2.7 % menos que el contenido del día 0. Por otro lado, el contenido de nitrógeno (B) aumentó ligeramente durante el periodo de incubación. El día 7 el contenido fue 0.8% mayor que el día 0. A pesar de que la variación del contenido en el transcurso del día 2 al día 3 presentó una irregularidad, esta no es significativa. En otras palabras, a pesar de que se estimó una tendencia lineal creciente, se podría decir que el contenido de nitrógeno se mantuvo constante.

También, con los valores mencionados anteriormente, se determinó la relación carbono:nitrógeno (C:N) para cada día del periodo de incubación. De este modo, se pudo graficar la tendencia que esta relación sigue (figura 17-C). Esta tendencia se redujo de forma exponencial y se debe principalmente a la disminución del contenido de carbono. Asimismo, este descenso se ve afectado de manera ligera por el aumento en el contenido de nitrógeno conforme transcurre la semana.

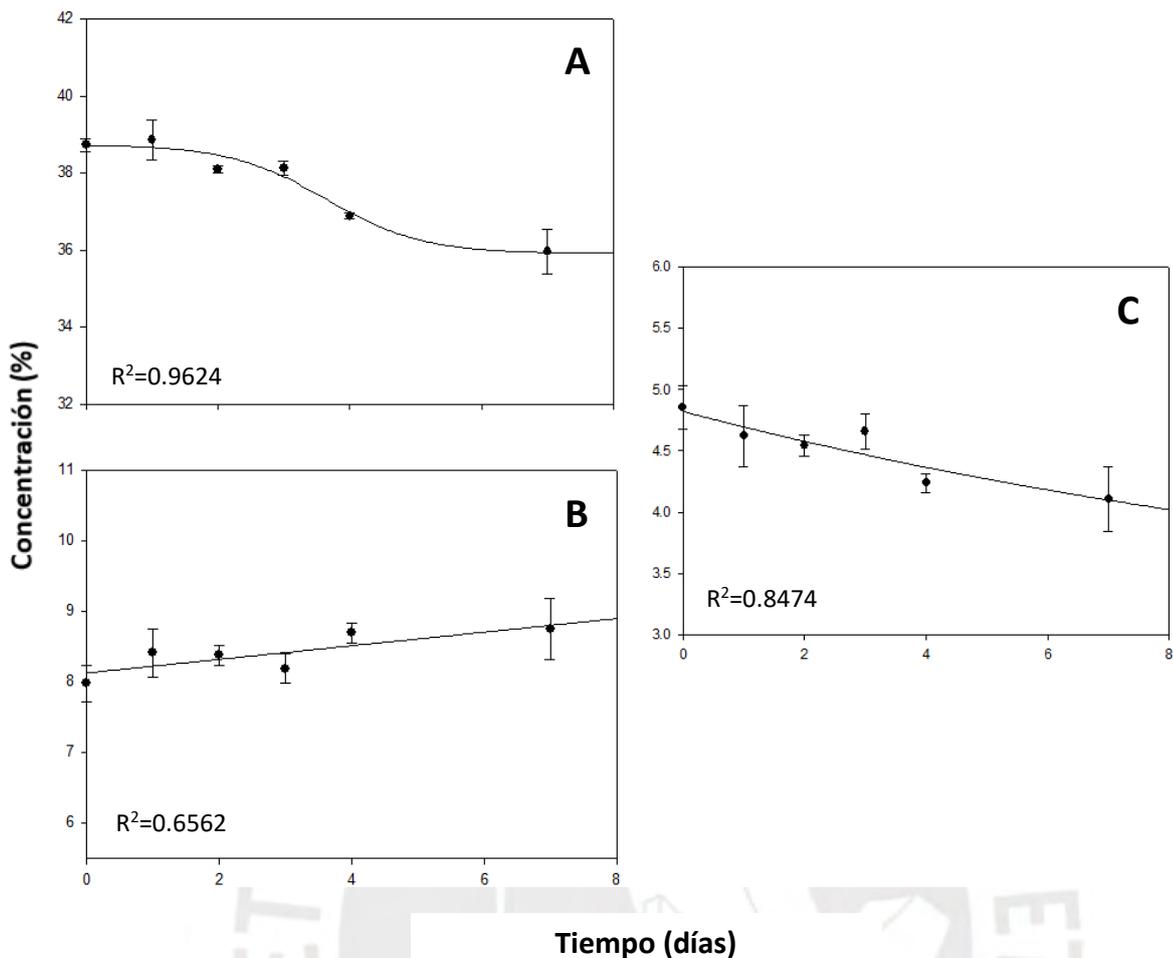


Figura 17. Variación del contenido de carbono (A), nitrógeno (B) y relación C/N (C) durante una semana de incubación. Se graficó las barras de error estándar (n=9).

Adicionalmente, con el contenido de aminoácidos (tabla 6) y de proteínas, se calculó la variación de nitrógeno. Para el caso de los aminoácidos, se convirtió su contenido en contenido de nitrógeno según los átomos de nitrógeno que presentaban en su estructura. Por otro lado, en el caso del contenido de proteínas, se dividió su valor entre 6.25. De esta forma, se determinó la variación del contenido total de nitrógeno para toda la semana de incubación. En la tabla 7 se puede observar que el nitrógeno proveniente de aminoácidos y amoníaco aumentó en 16.16 mg, mientras que el que proviene de las proteínas se redujo 23.06 mg.

Tabla 7. Variación de contenido de nitrógeno durante toda la semana de incubación. Este valor es expresado en mg sobre gramos de espárragos secos.

	día 0 (mg N /g)	día 7 (mg N /g)	Variación después de la semana (mg N /g)
<b>Aminoácidos y amoniaco</b>	11.9 ± 1.9	28.06 ± 3.79	↑ 16.16 ± 5.69
<b>Proteínas totales</b>	64 ± 2.26	40.94 ± 1.91	↓ 23.06 ± 4.17

#### 4. Discusión de resultados

##### 4.1. Incubación de turiones

Para controlar que no se acelere la madurez de los turiones por algún factor ambiental se monitorearon los parámetros de humedad y temperatura de la incubadora. También, la luz se mantuvo constante durante toda la incubación de los turiones. Este factor no influye en el metabolismo de nitrógeno durante los primeros días de senescencia (Hurst y col, 1993). La temperatura, la cual es uno de los parámetros que más influyen en la madurez vegetal (Lipton 1990), se mantuvo constante durante toda la semana (figura 9). Por otro lado, la humedad relativa promedio presentó una ligera reducción durante la semana de incubación (figura 8). Esta desde 79.78 % registrado el primer día, hasta 75.43% registrado el último día de incubación.

Esta pérdida de agua en la atmósfera de incubación no se consideró significativa como para provocar algún tipo de deshidratación en los turiones. La razón principal por la que se presentó un mayor contenido de agua los primeros días es por los residuos de agua del lavado. Asimismo, para evitar que el flujo de aire que se instaló en la incubadora y el sistema de reflujo que esta posee seque la atmosfera de incubación, se colocó una fuente de agua (figura 7). De este modo, se aseguró que no hubiese cambios irregulares en la atmosfera de la incubadora que pudieran acelerar la deshidratación del turión.

## 4.2. Separación e identificación de analitos

Las primeras pruebas (no reportadas) para definir el método de separación cromatográfica fueron realizadas en una columna Chromolith Performance (RP-18) 100 mm x 4.6 mm. Debido a la poca longitud que tenía la columna, no se pudo lograr una buena separación de la asparagina con respecto a la serina. En la figura 11 la serina es la única señal que se encuentra entre la glutamina y la asparagina. Esta no se señala debido a que no es un analito de interés y solo se utilizó para definir el método de separación. Del mismo modo, otro inconveniente que se tuvo con esta columna fue la separación del amoniaco. El amoniaco presentaba un tiempo de retención mucho mayor que la asparagina y no se podía establecer unas condiciones adecuadas para lograr separar la asparagina y la serina y, en el mismo método, separar el amoniaco. Estos inconvenientes llevaron a que se utilice otra columna con mayor longitud, pero con la misma polaridad de fase estacionaria.

Utilizando una columna con mayor longitud, la cual se mencionó anteriormente en la sección 2.1.2, se realizaron una serie de pruebas con estándares para identificar las señales de interés. Las pruebas consistieron en variar la fase móvil hasta establecer un gradiente adecuado para separar los analitos. Una vez identificados y separados los analitos, se añadieron los estándares a una muestra de extracto de espárragos para comprobar si presentaban alguna interferencia. De esta manera, se pudo determinar que el valor de la resolución de todas las señales era mayor que 1.2 con respecto a señales adyacentes. Adicionalmente, se revisó la pureza de las señales de analitos sus espectros UV proporcionados por el mismo equipo. Así, se comprobó que no existió alguna interferencia con alguna otra señal y se aceptó el método de separación.

La cuantificación del contenido de todos los aminoácidos y amoniaco se realizó una semana después de que estos fueron extraídos. A pesar de esto, se pudo asegurar que no hubo pérdidas en las señales debido a la estabilidad que tienen los compuestos derivatizados con DEEMM. Incluso, esto se comprobó realizando pruebas un mes después de muestras aleatorias de extracto de espárrago. Estas dieron valores similares de absorbancia en todos los analitos.

### 4.3. Cambios físicos y variación de analitos

Para determinar el contenido de cada analito analizado por HPLC se utilizaron las curvas de calibración (tabla 4) y el peso corregido con la ecuación de la figura 10. Los valores obtenidos del contenido de cada analito estuvieron dentro del rango lineal establecido y fueron aceptados debido al valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual fue cercano a 1. Por otro lado, a pesar de que no se tomaron muestras para corregir el peso seco de manera diaria, se aceptó la aproximación de la curva para toda la semana de incubación. Adicionalmente, el complemento de esta curva es el porcentaje de agua que pierden las puntas de los turiones durante una semana en las condiciones establecidas (figura 18).

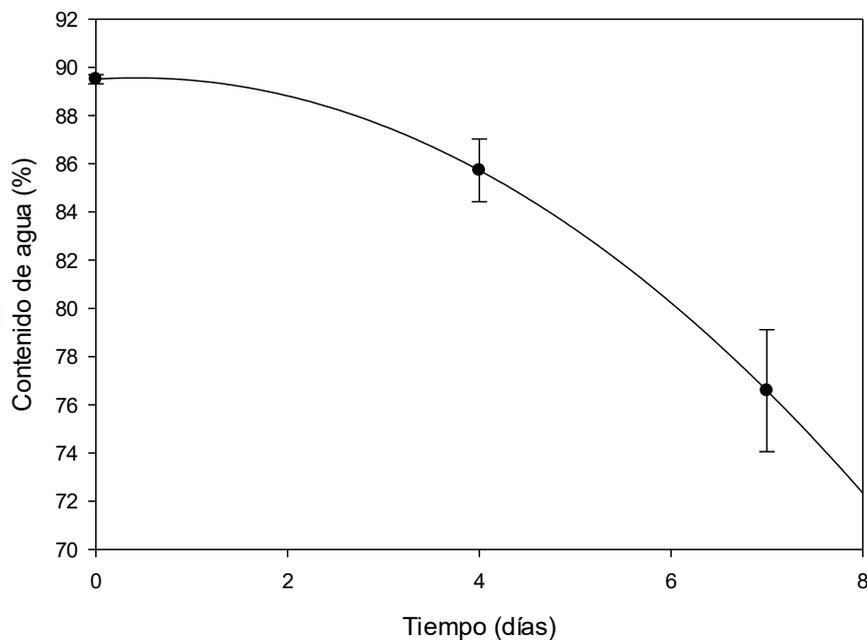


Figura 18. Variación porcentual del contenido de agua en puntas de espárragos. Para la medición se tomaron tres muestras de tres puntas de espárrago cada una. Asimismo, se gráfica el error estándar para cada punto (n=9).

La reducción en el contenido de agua en la punta se relaciona con la pérdida de peso. Una pérdida de peso de aproximadamente 3-10 % es una señal de que la frescura del vegetal se reduce y cuando este valor es mayor que 5 % se reduce también el valor de venta como producto (Benyathiar y col, 2020). En el caso de los turiones, la mayor parte del peso que se pierde se puede atribuir al contenido de agua. Como se muestra en la figura 18, el contenido de agua en la punta de los turiones desciende desde 89.51 % hasta 76.59 % (aproximadamente 13 % en total). Siguiendo la curva se puede ver que, pasando el cuarto día

de incubación, los turiones ya estarían menos aptos para el consumo/venta debido a que la reducción de agua pasa el 5% y a la apariencia que posee.

A partir del cuarto día, la parte inferior de la punta se contrajo (arrugas más notorias) y el diámetro disminuyó considerablemente (daño estructural). Esto se relacionó con la flacidez del turión los días 4,5 y 7. Del mismo modo, se pudo notar oscurecimiento en la punta del vegetal. Así, se pudo decir que a partir del día 4 los turiones han perdido valor comercial y esto coincide con lo reportado por King y colaboradores (1995).

La reducción en el contenido de agua que poseen las puntas se debe a la alta tasa de respiración que poseen los turiones y también a su transpiración. Del mismo modo, otro compuesto que se elimina durante la respiración vegetal es el CO<sub>2</sub>. La reducción del contenido de carbono en las puntas se atribuye a este proceso (figura 17-A). Esta reducción está relacionada con el consumo de carbohidratos solubles (sustratos respiratorios). Así, la tasa de reducción de carbono se desacelera en los últimos días ya que solo estaría quedando el carbono de compuestos estructurales.

Por otro lado, como se puede ver en la figura 17-B, el contenido de nitrógeno tendió a aumentar ligeramente conforme transcurrió la semana de incubación. A pesar de que existen diferentes especies nitrogenadas, se atribuyó esta variación principalmente a los aminoácidos, amoníaco y proteínas, ya que son los compuestos mayoritarios. De este modo, se pudo establecer una relación entre el aumento del contenido de nitrógeno con la variación en el contenido de amoníaco, proteínas y aminoácidos analizados.

Como se puede ver en la tabla 7, el aumento del contenido de nitrógeno proveniente de los aminoácidos y amoníaco fue menor que la disminución del contenido de nitrógeno proveniente de las proteínas. Esto significa que para la semana de incubación el contenido de nitrógeno tuvo que descender, lo cual contrastó con la figura 17-B. Sin embargo, este contraste se debe a que el cálculo fue solo un estimado debido a que no se están considerando aminoácidos totales. A pesar de ello, con estos resultados se apreció que el nitrógeno que se acumuló como aminoácidos provino de la degradación de proteínas, lo cual evidencia el reciclaje de nitrógeno. Asimismo, no se descartó la idea que también exista una traslocación de aminoácidos desde zonas inferiores del turión, pero se tendría que comprobar con un análisis más completo de compuestos nitrogenados y utilizando otras partes del turión.

La variación en el contenido de aminoácidos y amoníaco (aumento del contenido de nitrógeno), y el proceso de respiración vegetal (variación en el contenido de carbono)

ocasionó la disminución del ratio carbono:nitrógeno (figura 17-C). La reducción de este valor indica diversos cambios que experimenta el órgano vegetal y se puede relacionar a respuestas al entorno (Zhang y colaboradores, 2020). En este caso, el consumo constante de carbohidratos (liberación  $\text{CO}_2$ ) sería el factor principal de la tendencia exponencial decreciente del valor de C:N. Cabe la posibilidad de que esto cambie si es que aumenta el transporte, desde otras zonas del turión, de especies nitrogenadas como la asparagina o la glutamina días posteriores.

Los últimos días, al igual de lo que esperaría en los días posteriores a la semana de incubación (día 8 en adelante), el contenido de ciertos aminoácidos tendió a aumentar. Del mismo modo, el contenido de amoníaco aumentó en los últimos días de la semana de incubación (figura 14). A pesar de que se conoce que este proviene de la deaminación de aminoácidos, se especuló tres posibles causas para su acumulación: el incremento acelerado en la tasa de deaminación para obtención de sustratos respiratorios, la reducción de actividad enzimática en los procesos de asimilación o una limitación en los sustratos para que pueda ser asimilado.

Dentro de los aminoácidos analizados, los principales en deaminarse para obtener sustratos respiratorios fueron la alanina y el ácido glutámico. La alanina y el ácido glutámico se deaminan para formar oxalacetato y 2-oxoglutarato, respectivamente; ambos son utilizados como sustratos respiratorios (Reitzer, 2014). Esto se evidenció en la reducción del contenido de alanina a partir del día 2 y la reducción irregular del contenido de ácido glutámico (figura 13). La irregularidad en la reducción del ácido glutámico se debe a que este, al mismo tiempo que se consume como sustrato respiratorio o algún otro proceso (donador de nitrógeno), está siendo sintetizado para asimilar amoníaco. Sin embargo, a pesar de que no se estén considerando otros posibles aminoácidos, el incremento del contenido de amoníaco es muy elevado comparado con la reducción de la alanina y el ácido glutámico. Así, se descartó a que el incremento de la tasa de deaminación sea la razón principal del aumento del contenido de amoníaco.

Otra posible causa de la acumulación de amoníaco pudo ser la reducción de actividad de las enzimas glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa (Chen y col, 1997; Hurst y col, 1988). A pesar de que en este trabajo no se hayan realizado análisis enzimáticos, se pudo especular acerca de su actividad con la tasa de acumulación del contenido de glutamina y la irregular reducción del ácido glutámico (forma protonada del glutamato). El incremento en la

tasa de acumulación de glutamina, que coincidió con el aumento del contenido de amoniaco, indica una respuesta inmediata del proceso de detoxificación en el que participa la glutamina sintetasa. Así, se puede decir que esta enzima se mantuvo activa debido a que el contenido de glutamina aumentó constantemente durante toda la semana. Entonces, si bien pudo haber existido una reducción en la actividad enzimática, no fue la razón principal de que el amoniaco se acumulase. Del mismo modo, se pudo relacionar la actividad de la glutamato deshidrogenasa con el ácido glutámico, ya que de no haber estado activa la reducción del ácido glutámico hubiese sido exponencial y regular por la constante producción de glutamina.

De este modo, solo quedó la idea de que el amoniaco se acumuló por la falta de sustratos para ser asimilado, en este caso  $\alpha$ -cetoglutarato. A pesar de que esto se refuerza por el hecho de que el turión se encuentra en condiciones limitadas de nutrientes, se pudo relacionar su déficit con la variación del contenido de glutamato y la reducción en el contenido proteínas (catabolismo). Una reducción del contenido de glutamato durante toda la incubación evidenció el hecho de que su consumo fue mucho mayor que su producción, lo cual indicó una reducción de una de sus rutas de síntesis la cual utiliza amoniaco. Así, la ausencia de  $\alpha$ -cetoglutarato limitó la producción de glutamato y en consecuencia suprimió una vía de asimilación de amoniaco, originando su acumulación. Asimismo, el déficit de  $\alpha$ -cetoglutarato no solo limitó la asimilación de amoniaco, sino que también pudo inducir a la deaminación de glutamato, generando así más amoniaco.

La ausencia de nutrientes del turión se puede evidenciar a partir del día 2 y se vuelve mucho más notoria luego del día 4. Durante este periodo, se percibió daño estructural, incremento de amoniaco, consumo de alanina y degradación de proteínas. Todos estos cambios son la consecuencia de mantener la homeostasis del vegetal. Sin embargo, en adición a los cambios mencionados, se producen otros que también son característicos de la senescencia como la acumulación de glutamina y asparagina. La producción de estos se da con el fin de almacenar y conservar el nitrógeno después de una serie de procesos de deaminación e interconversión de aminoácidos como se puede ver en la figura 19.

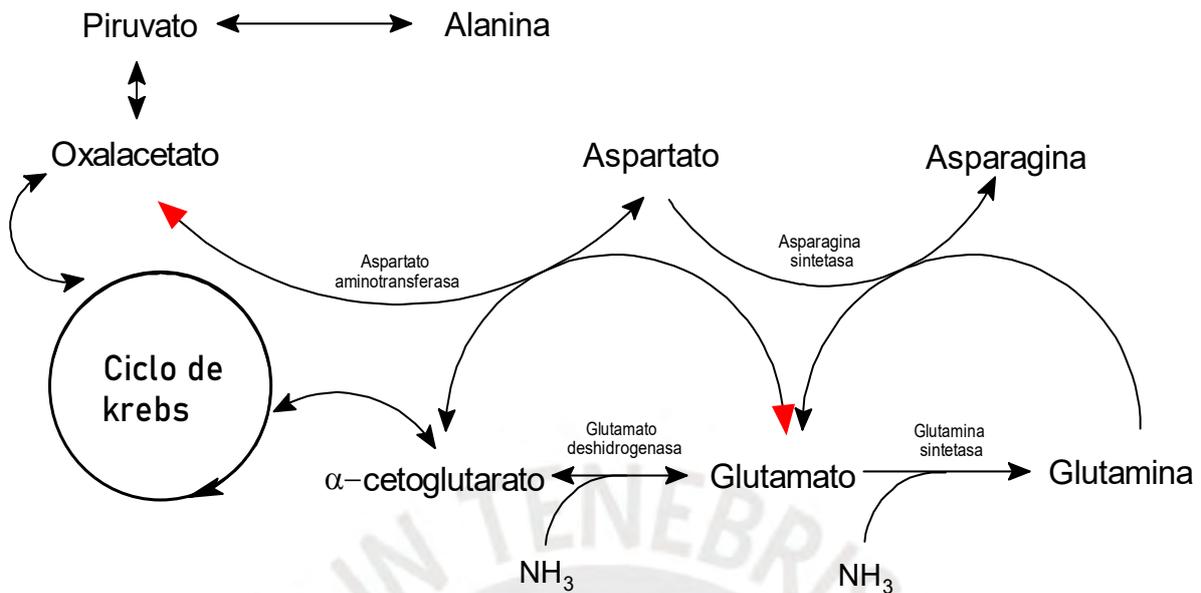


Figura 19. Esquema propuesto de interconversión de aminoácidos y asimilación de amoníaco. Se muestran procesos de transaminación, aminación y deaminación, y asimilación de amoníaco con el fin de obtener sustratos para el ciclo de Krebs y almacenar nitrógeno.

A pesar de que la asparagina es un mejor compuesto almacenador de nitrógeno que la glutamina debido a su estabilidad y su uso metabólico más limitado (Joy 1988; Lea y col, 2007), la tasa de acumulación de glutamina fue mucho mayor a la de asparagina y su aumento fue constante durante toda la semana. Una de las razones por la que se da esto es por la función detoxificante que tiene la glutamina. Por otro lado, a pesar de que el contenido de asparagina fue mayor, su acumulación no es constante durante toda la semana. Entonces, si bien el punto final de la conservación del nitrógeno es formar este aminoácido, hay factores que limitan o regulan su formación. En un trabajo realizado por Peeters y Van Laere (1992) en hojas senescentes se estableció que el ácido aspártico es el limitante de la formación de asparagina.

Durante los primeros días (0-3) la variación del contenido de asparagina fue similar a la del ácido aspártico. Si bien se esperaba una relación inversamente proporcional, el turión aún fresco posee las reservas nutritivas para poder sintetizar estos aminoácidos sin obstrucción. Sin embargo, luego del día tres se pudo apreciar mejor una relación sustrato/producto. El contenido de ácido aspártico se mantuvo constante y solo se redujo cuando el contenido de asparagina empezó a aumentar. Coincidentemente con el Asp, el contenido de Asn también tuvo un periodo en el que no presentó cambios significativos en su contenido. Así, se llegó a

la idea de que el uso del ácido aspártico, en condiciones limitadas de nutrientes, es principalmente para formar asparagina.

La reducción en la tasa de acumulación de la asparagina durante los días 2-5 evidenció que el proceso de almacenamiento de nitrógeno aún no es prioridad. Así, en este lapso se priorizan procesos de deaminación para obtener sustratos para la respiración. Esto se reflejó con el aumento en glutamina (asimilación de amoníaco) y la reducción de otros aminoácidos como la alanina. Así, se fortalece la idea que el aumento de glutamina es más con fines detoxificantes que para almacenar el nitrógeno. De este modo, cuando comienza el aumento en la tasa de acumulación de asparagina (día 5 en adelante), se puede decir que se comienzan a priorizar los procesos de almacenamiento de nitrógeno. La acumulación de asparagina, al igual que la acumulación de amoníaco, es característica de la etapa final de la senescencia.

Se descartó que la acumulación de asparagina se dio para algún otro proceso bioquímico, ya que su contenido no descendió ningún día del periodo de incubación. Además, las rutas metabólicas de asparagina requieren la presencia de ciertos carbohidratos que, en este caso, están limitados (Sieciechowicz y col, 1988). Con esto se comprobó así su función como almacenador de nitrógeno. Sin embargo, como se puede ver en la figura 19, puede que la producción de asparagina este regulada por la deficiencia de carbohidratos y se dé como consecuencia del proceso de síntesis de glutamato utilizando glutamina.

Además de analizar la variación de los aminoácidos que participan directamente en la asimilación de amoníaco y almacenamiento de nitrógeno, se analizó la variación del contenido de alanina y fenilalanina. Por un lado, se utilizó la alanina como control de otras rutas en la cual interviene el nitrógeno (en forma de algún aminoácido). Como se discutió anteriormente, la reducción en su contenido se relacionó con el déficit de carbohidratos y coincidió con las primeras señales de aumento en el contenido de amoníaco lo cual indica proceso de deaminación. Este aminoácido puede ser utilizado para sintetizar piruvato que posteriormente se transformará en oxalacetato y será utilizado como sustrato respiratorio (Reitzer, 2014).

Por otro lado, se adicionó el análisis de la variación del contenido fenilalanina debido a que este es precursor del ácido cinámico y este, a su vez, es precursor en metabolismo microbiano del estireno. Rabines Lara (2012) detectó la presencia de estireno en turiones incubados bajo las mismas condiciones después del día 7 y hasta el día 11 (senescencia tardía), estableciéndolo, así como bioindicador de la senescencia del turión. Sin embargo,

posteriormente se determinó que la transformación de ácido cinámico a estireno correspondía al metabolismo extendido de hongos endófitos del turión. A pesar de que en este trabajo se realizó solo durante una semana, el resultado obtenido se relaciona con el trabajo de Rabines Lara (2012), ya que en su trabajo no se reporta estireno antes del día 7 y la concentración de fenilalanina que se obtuvo, hasta ese día, no disminuye. Es de esperar que el metabolismo del microbioma endófito y el de otros descomponedores adquiere un papel más relevante más allá de la primera semana, pero esto no es de importancia comercial ya que el producto ya no estaría en condiciones de venderse.

## 5. Conclusiones

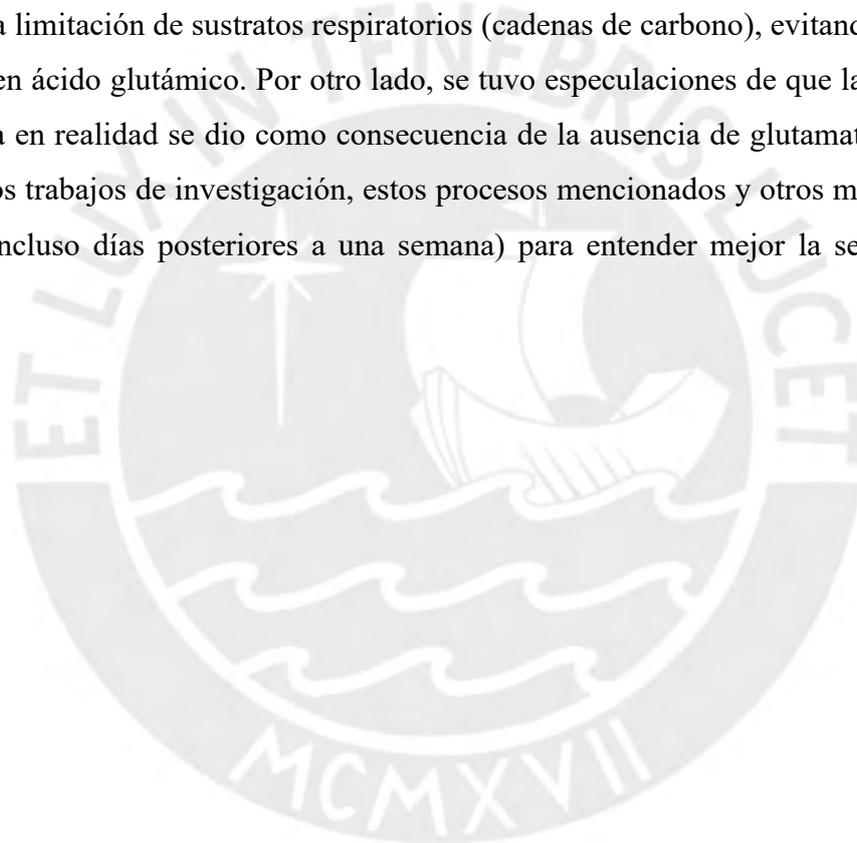
Con este trabajo se logró establecer una correlación entre los principales aminoácidos que participan en el proceso de reutilización de nitrógeno que tiene el espárrago durante su almacenamiento en condiciones de venta (anaquel). De este modo, se pudo establecer lapsos de tiempo en el cual se pudieron identificar biomarcadores del proceso como la acumulación de amoníaco e incremento de ciertos aminoácidos que cumplen funciones de almacenamiento y transporte como la glutamina y la asparagina. Así, en base a la relación de todos los parámetros analizados (contenido de aminoácidos y amoníaco, contenido de agua, contenido de proteínas y propiedades organolépticas) los periodos establecidos fueron los siguientes:

- Día 0-Día 2: Aunque se presentaron las primeras señales de senescencia (degradación de proteínas) el turión aún se considera fresco. Este aún posee las reservas nutritivas para realizar la respiración vegetal, asimilar amoníaco y sintetizar aminoácidos.
- Día 2-Día 4: Aparecieron las primeras señales de pérdida de calidad reflejadas en daño estructural ligero. En este periodo, se priorizan los procesos catabólicos para obtener sustratos respiratorios (deaminación de aminoácidos) sobre los procesos de almacenamiento de nitrógeno. Asimismo, se evidenció primeras señales de aumento en el contenido de amoníaco.
- Día 4-Día 7: Completa ausencia de frescura de los turiones. Se percibieron bioindicadores de senescencia tardía como la acumulación de amoníaco, asparagina y glutamina. La acumulación de estos aminoácidos mencionados se relaciona con procesos de almacenamiento de nitrógeno. Por otro lado, se evidenció la utilización de

otros aminoácidos (mucho menor contenido que presentaron en el primer día) como posibles sustratos respiratorios.

El análisis de la variación de aminoácidos y amoniaco se logró realizar con un método rápido que se desarrolló mediante el uso de cromatografía líquida. Este método puede estar sujeto a modificaciones si se desea analizar un perfil más completo de aminoácidos. Un perfil más completo de aminoácidos podría ser útil para conocer si existen procesos de movilización de aminoácidos desde otras zonas a través del análisis del contenido de nitrógeno.

Con el análisis realizado se pudo estudiar ciertos cambios en los procesos bioquímicos que se generan durante la senescencia vegetal. De este modo, se atribuyó la acumulación de amoniaco a la limitación de sustratos respiratorios (cadenas de carbono), evitando así que este se convierta en ácido glutámico. Por otro lado, se tuvo especulaciones de que la acumulación de asparagina en realidad se dio como consecuencia de la ausencia de glutamato. Así, con la ayuda de otros trabajos de investigación, estos procesos mencionados y otros mas podrían ser estudiados (incluso días posteriores a una semana) para entender mejor la senescencia del turión.



## 6. Bibliografía

- Amarante, L. do, J. D. Lima, y L. Sodek. 2006. "Growth and Stress Conditions Cause Similar Changes in Xylem Amino Acids for Different Legume Species." *Environmental and Experimental Botany* 58(1–3): 123–29.
- Azimi, Kaveh et al. 2012. *Asparagus in Perú. Microeconomics of Competitiveness*.  
[https://www.isc.hbs.edu/resources/courses/moc-course-at-harvard/Documents/pdf/student-projects/Asparagus Cluster- Final Report.pdf](https://www.isc.hbs.edu/resources/courses/moc-course-at-harvard/Documents/pdf/student-projects/Asparagus%20Cluster-Final%20Report.pdf).
- Bala, Jyoti, Anupam J. Das, y Hoshang Unwalla. 2018. "Senescence-Associated Markers." In *Senescence Signalling and Control in Plants*, eds. Sarwat Maryam y Tuteja Narendra. Massachusetts: Academic Press, 273–81.
- Baqir, H. A., N. H. Zeboon, and A. A.J. Al-Behadili. 2019. "The Role and Importance of Amino Acids within Plants: A Review." *Plant Archives* 19(january): 1402–10.
- Benyathiar, Patnarin, Bruce Harte, y Janice Harte. 2020. "Shelf Life Extension of Fresh Asparagus Using Modified Atmosphere Packaging and Vacuum Skin Packaging in Microwavable Tray Systems." *Packaging Technology and Science* 33(10): 407–15.
- Bhowmik, Pankaj Kumar, Toshiyuki Matsui, y Kazuhide Kawada. 2000. "Textural and Compositional Changes of Asparagus Spears During Storage at 1 °C and Subsequent Senescence at 25 °C." *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3(5): 787–90.
- Brash, Don W., Chris M. Charles, Sandy Wright, y Bruce L. Bycroft. 1995. "Shelf-Life of Stored Asparagus Is Strongly Related to Postharvest Respiratory Activity." *Postharvest Biology and Technology* 5(1–2): 77–81.
- Bradford, M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical biochemistry*.72:248-254.
- Buchanan-Wollaston, Vicky. 1997. "The Molecular Biology of Leaf Senescence." *Journal of Experimental Botany* 48(2): 181–99.

- Burg, S P. 1968. "Ethylene, Plant Senescence and Abscission." *Plant physiology* 43(9 Pt B): 1503–11.
- Centro de información de recursos naturales (CIREN). 1987. *Manual Del Cultivo Del Espárrago*.  
[http://www.fintrac.com/docs/elsalvador/Manual\\_del\\_Cutivo\\_de\\_Tomate\\_WEB.pdf](http://www.fintrac.com/docs/elsalvador/Manual_del_Cutivo_de_Tomate_WEB.pdf).
- Chen, Shu Jiuan, Kuo Tung Hung, y Ching Huei Kao. 1997. "Ammonium Accumulation Is Associated with Senescence of Rice Leaves." : 195–201.
- Chitrakar, Bimal, Min Zhang, y Benu Adhikari. 2019. "Asparagus (*Asparagus Officinalis*): Processing Effect on Nutritional and Phytochemical Composition of Spear and Hard-Stem Byproducts." *Trends in Food Science and Technology* 93(May): 1–11.
- Eppendorfer, Wilfried H., y Søren W. Bille. 1996. "Free and Total Amino Acid Composition of Edible Parts of Beans, Kale, Spinach, Cauliflower and Potatoes as Influenced by Nitrogen Fertilisation and Phosphorus and Potassium Deficiency." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71(4): 449–58.
- Fan, Rui et al. 2015. "Extraction and Analysis of Antioxidant Compounds from the Residues of *Asparagus Officinalis* L." *Journal of Food Science and Technology* 52(5): 2690–2700.
- Feller, C., E. Richter, T. Smolders, y A. Wichura. 2012. "Phenological Growth Stages of Edible Asparagus (*Asparagus Officinalis*): Codification and Description According to the BBCH Scale." *Annals of Applied Biology* 160(2): 174–80.
- "Food and Agriculture Organization of United Nations." *FAOSTAT. Data*.  
<https://www.fao.org/faostat/es/#home> (november 24, 2021).
- Fuentes-Alventosa, J. M. et al. 2013. "Preparation of Bioactive Extracts from Asparagus By-Product." *Food and Bioproducts Processing* 91(2): 74–82.
- Gómez-Alonso, Sergio, Isidro Hermosín-Gutiérrez, and Esteban García-Romero. 2007. "Simultaneous HPLC Analysis of Biogenic Amines, Amino Acids, and Ammonium Ion as Aminoenone Derivatives in Wine and Beer Samples." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(3): 608–13.

- Guo, Qingbin et al. 2020. "The Bioactive Compounds and Biological Functions of Asparagus Officinalis L. – A Review." *Journal of Functional Foods* 65(November): 103727.
- Hansen, Jürgen y Møller IB.1975. "Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone". *Analytical biochemistry* 68:87-94.
- Hamdi, Amel et al. 2020. "Asparagus." In *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, ed. Amit Jaiswal. Massachusetts: Academic Press, 121–40.
- Hörtensteiner, Stefan, y Urs Feller. 2002. "Nitrogen Metabolism and Remobilization during Senescence." *Journal of Experimental Botany* 53(370): 927–37.
- Hurst, P. L., G. Boulton, y R. E. Lill. 1998. "Towards a Freshness Test for Asparagus: Spear Tip Asparagine Content Is Strongly Related to Post Harvest Accumulated Heat Units." *Food Chemistry* 61(3): 381–84.
- Hurst, Paul L., y Christopher J. Clark. 1993. "Postharvest Changes in Ammonium, Amino Acids and Enzymes of Amino Acid Metabolism in Asparagus Spear Tips." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 63(4): 465–71.
- Hurst, Paul L., King, Graeme A., David C. Woollard, y Wilhelmina M. Borst. 1993. "Nitrogen Metabolism in Harvested Asparagus: No Difference between Light and Dark Storage at 20°C." *Food Chemistry* 47(4): 329–32.
- Huyskens-Keil, S., y W. B. Herppich. 2013. "High CO<sub>2</sub> effects on Postharvest Biochemical and Textural Properties of White Asparagus (*Asparagus Officinalis* L.) Spears." *Postharvest Biology and Technology* 75: 45–53.
- Instituto peruano del espárrago y hortalizas (IPEH). 2014. Manual del cultivo del espárrago *Manual Del Cultivo Del Espárrago*. <https://www.ipeh.org.pe/>.
- Jiménez-Sánchez, Cecilia et al. 2016. "Comprehensive, Untargeted, and Qualitative RP-HPLC-ESI-QTOF/MS<sup>2</sup> Metabolite Profiling of Green Asparagus (*Asparagus Officinalis*)." *Journal of Food Composition and Analysis* 46: 78–87.

- Joy, K.W. 1988. "Ammonia, Glutamine, and Asparagine: A Carbon-Nitrogen Interface." *Canadian Journal of Botany* 66(34): 2103–9.
- King, G. A., y S. C. Morris. 1994. "Early Compositional Changes during Postharvest Senescence of Broccoli." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 119(5): 1000–1005.
- King, Graeme A. et al. 1988. "Flavour and Metabolic Changes in Asparagus during Storage." *Scientia Horticulturae* 36(3–4): 183–90.
- King, Graeme A., David C. Woollard, Donald E. Irving, y Wilhelmina M. Borst. 1990. "Physiological Changes in Asparagus Spear Tips after Harvest." *Physiologia Plantarum* 80(3): 393–400.
- King, Graeme A, Kevin M Davies, Richard J Stewart, y Wilhelmina M Borst. 1995. "Similarities in Gene Expression during the Postharvest-induced Senescence of Spears and Natural Foliar Senescence of Asparagus." *Planta* (1 995): 125–28.
- King, Graeme, Kate Henderson, y Ross Lill. 1988. "Shelf-life of Stored Asparagus Is Strongly Related to Post-harvest Accumulated Heat Units." *Annals of Applied Biology* 112(2): 329–35.
- Lea, P. J. et al. 2007. "Asparagine in Plants." *Annals of Applied Biology* 150(1): 1–26.
- Li, Weihua et al. 2012. "Determination of 20 Free Amino Acids in Asparagus Tin by High-Performance Liquid Chromatographic Method after Pre-Column Derivatization." *Food Analytical Methods* 5(1): 62–68.
- Lill, R. E., Graeme A. King, y Erin M. O'Donoghue. 1990. "Physiological Changes in Asparagus Spears Immediately after Harvest." *Scientia Horticulturae* 44: 191–99.
- Linares, Daniel M, Beatriz R1, Victor Ladero, y Miguel A Alvarez. 2007. "HPLC Quantification of Biogenic Amines in Cheeses : Correlation with PCR-Detection of Tyramine-Producing Microorganisms." (April).
- Lipton, Werner J. 1990. "Postharvest Biology of Fresh Asparagus." *Horticultural Reviews*: 69–155.

- Liu, Zun Ying, y Wei Bo Jiang. 2006. "Lignin Deposition and Effect of Postharvest Treatment on Lignification of Green Asparagus (*Asparagus Officinalis* L.)." *Plant Growth Regulation* 48(2): 187–93.
- López, G. et al. 1996. "Amino Acids and in Vitro Protein Digestibility Changes in Green Asparagus (*Asparagus Officinalis*, L.) during Growth and Processing." *Food Research International* 29(7): 617–25.
- Megías, Cristina et al. 2015. "Determination of L-Canavanine and Other Free Amino Acids in *Vicia Disperma* (Fabaceae) Seeds by Precolumn Derivatization Using Diethyl Ethoxymethylenemalonate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography." *Talanta* 131: 95–98.
- Pageau, Karine, Michèle Reisdorf-Cren, Jean François Morot-Gaudry, y Céline Masclaux-Daubresse. 2006. "The Two Senescence-Related Markers, GS1 (Cytosolic Glutamine Synthetase) and GDH (Glutamate Dehydrogenase), Involved in Nitrogen Mobilization, Are Differentially Regulated during Pathogen Attack and by Stress Hormones and Reactive Oxygen Species in Nicoti." *Journal of Experimental Botany* 57(3): 547–57.
- Park, Me Hea. 2016. "Sucrose Delays Senescence and Preserves Functional Compounds in *Asparagus Officinalis* L." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 480(2): 241–47.
- Peeters, Kurt M.U., y André J. Van Laere. 1992. "Ammonium and Amino Acid Metabolism in Excised Leaves of Wheat (*Triticum Aestivum*) Senescing in the Dark." *Physiologia Plantarum* 84(2): 243–49.
- Rabines Lara, Mayra. 2012. "Identificación de Marcadores Biológicos En El Proceso de Senescencia En Espárrago Fresco (*Asparagus Officinalis*)." Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Rebane, Riin, y Koit Herodes. 2010. "A Sensitive Method for Free Amino Acids Analysis by Liquid Chromatography with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection Using Precolumn Derivatization with Diethyl Ethoxymethylenemalonate: Application to the Honey Analysis." *Analytica Chimica Acta* 672(1–2): 79–84.

- Redruello, Begoña et al. 2013. "A Fast, Reliable, Ultra High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Amino Acids, Biogenic Amines and Ammonium Ions in Cheese, Using Diethyl Ethoxymethylenemalonate as a Derivatising Agent." *Food Chemistry* 139(1–4): 1029–35.
- Reitzer, L. 2014. Reference Module in Biomedical Sciences *Amino Acid Synthesis*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02427-2>.
- Rodríguez-Arcos, Rocio C., Andrew C. Smith, y Keith W. Waldron. 2002. "Effect of Storage on Wall-Bound Phenolics in Green Asparagus." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11): 3197–3203.
- Rodríguez, Rocío et al. 2005. "Cell Wall Phenolics of White and Green Asparagus." 978(June 2003): 971–78.
- Sade, Nir, Mariá Del Mar Rubio-Wilhelmi, Kamolchanok Umnajkitikorn, and Eduardo Blumwald. 2018. "Stress-Induced Senescence and Plant Tolerance to Abiotic Stress." *Journal of Experimental Botany* 69(4): 845–53.
- Shou, Senyan, Gang Lu, y Xizhi Huang. 2007. "Seasonal Variations in Nutritional Components of Green Asparagus Using the Mother Fern Cultivation." *Scientia Horticulturae* 112(3): 251–57.
- Siddiq, Muhammad, y Mark Uebersax. 2018. "Asparagus: Production, Quality and Processing." In *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd, 493–504.
- Sieciechowicz, Konrad A., Kenneth W. Joy, y Robert J. Ireland. 1988. "The Metabolism of Asparagine in Plants." *Phytochemistry* 27(3): 663–71.
- Slatnar, Ana et al. 2018. "Game of Tones: Sugars, Organic Acids, and Phenolics in Green and Purple Asparagus (*Asparagus Officinalis* L.) Cultivars." *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 42(1).
- Stoscheck, CM. (1990). "Quantitation of protein". *Methods in enzymology* 182: 50-69.
- Taiz, Lincoln, y Eduardo Zeiger. 2002. "Senescencia y Muerte Celular Programada." In *Fisiología Vegetal*, Sunderland: Sinauer Associates, inc, 695–98.  
[https://books.google.com.pe/books?id=7QIbYgOC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=7QIbYgOC5AC&printsec=frontcover&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).

- United States Department of Agriculture. “Germplasm Resources Information Network (GRIN).” <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=300050> (january 18, 2019).
- Woo, Hye Ryun, Celine Masclaux-Daubresse, y Pyung Ok Lim. 2018. “Plant Senescence: How Plants Know When and How to Die.” *Journal of Experimental Botany* 69(4): 715–18.
- Yadav, S., Srivastava, A., Biswas, S. *et al.* 2020. “Comparison and optimization of protein extraction and two-dimensional gel electrophoresis protocols for liveworts. *BMC res notes* 13: 60
- Yang, Jiading, y Michael Udvardi. 2018. “Senescence and Nitrogen Use Efficiency in Perennial Grasses for Forage and Biofuel Production.” *Journal of Experimental Botany* 69(4): 855–65.
- Zhang, Hongxia, y Alaa El-din Bekhit. 2019. “Review Phytochemical Compounds and Biological Activity in Asparagus Roots : A Review.” *International Journal of food science and technology* 54: 966–77.
- Zhang J, He N, Liu C, et al. 2020. “Variation and evolution of C:N ratio among different organs enable plants to adapt to N-limited environments”. *Glob Change Biol.* 26:2534–2543