





# **Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas**

**100** UNAM  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE MEXICO  
1910 - 2010

**Facultad de Química, UNAM**

# **Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas**

**Francisca Iturbe  
Julieta Sandoval**



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Química  
**México, 2011**



# ÍNDICE

<b>Fundamentos .....</b>	<b>1</b>
1	Determinación de humedad..... 1
1.1	Definición de humedad..... 1
1.2	Métodos de secado..... 1
1.2.1	Método por secado de estufa ..... 2
1.2.2	Método por secado en estufa de vacío ..... 3
1.2.3	Método de secado en termobalanza ..... 3
1.2.4	Método de destilación azeotrópica..... 3
1.2.5	Método de Karl Fischer ..... 4
<b>Análisis de Minerales .....</b>	<b>7</b>
2.1	Definición de cenizas..... 7
2.2	Método de cenizas totales..... 7
2.3	Determinación de cenizas en húmedo..... 8
2.4	Determinación de elementos minerales ..... 9
2.4.1	Determinación de cloruros (Método de Mohr) ..... 9
2.4.2	Determinación de hierro (Reacción con ortofenantrolina)..... 10
2.4.3	Determinación de calcio (Titulación con permanganato). ..... 11
2.4.4	Determinación de calcio (Formación de complejo con EDTA)..... 11
<b>Análisis de Lípidos .....</b>	<b>12</b>
3.1	Métodos de extracción y cuantificación ..... 12
3.1.1	Método de Soxhlet..... 12
3.1.2	Método de Goldfisch..... 13
3.1.3	Método por lotes ..... 13
3.1.4	Método de Bligh-Dyer ..... 13
3.1.5	Método de Rose-Gottlieb ..... 14
3.1.6	Método de Gerber..... 14
3.1.7	Método de Mojonnier ..... 14
3.2	Caracterización de lípidos..... 15
3.2.1	Peso específico..... 15

3.2.2	Índice de refracción.....	16
3.2.3	Índice de saponificación .....	16
3.2.4	Material insaponificable.....	16
3.2.5	Colesterol.....	16
3.2.6	Determinación de Índice de Yodo. (Método de Wijs y Método de Hanus).....	17
3.2.7	Cuantificación de vitamina A. (Método de Carr Price) .....	18
3.3	Deterioro de lípidos. ....	18
3.3.1	Acidez titulable .....	18
3.3.2	Determinación del Índice de Peróxidos. (Método volumétrico).....	18
3.3.3	Determinación de peróxidos. Método volumétrico-Micrométodo ...	19
3.3.4	Determinación de Índice de Peróxidos (Método colorimétrico).....	19
3.3.5	Índice de Kreis.....	19
3.3.6	Índice de TBA.....	19

## **Análisis de Proteínas ..... 20**

4.1	Determinación de proteínas.....	20
4.1.1	Método de Kjeldahl .....	20
4.1.2	Absorción a 280 nm. ....	21
4.1.3	Método de Biuret.....	22
4.1.4	Método de Lowry .....	22
4.1.5	Método turbidimétrico .....	23
4.1.6	Unión de colorantes.....	23
4.2	Extracción de proteínas. (Método de Osborne y Mendel).....	24
4.3	Propiedades funcionales de las proteínas.....	25
4.3.1	Capacidad de gelificación .....	25
4.3.2	Capacidad de emulsificación .....	25
4.3.3	Capacidad de espumado.....	26
4.3.4	Capacidad de retención de agua .....	26

## **Análisis de Carbohidratos ..... 28**

5.1	Carbohidratos totales .....	28
5.1.1	Determinación por diferencia.....	28
5.1.2	Método de fenol-sulfúrico .....	28
5.2	Análisis de polisacáridos .....	29



5.2.1	Extracción selectiva de almidón.....	29
5.2.2	Cuantificación de almidón.....	30
5.2.3	Análisis de pectinas.....	31
5.2.4	Determinación de Fibra dietética.....	31
5.3	Azúcares en solución.....	32
5.3.1	Carbohidratos solubles totales.....	32
5.3.2	Determinación de carbohidratos reductores.....	33
<b>Otras Determinaciones .....</b>		<b>35</b>
6.1	Densidad Calórica.....	35
6.1.1	Cálculo del valor calórico de los alimentos.....	35
6.1.2	Bomba calorimétrica .....	35
<b>Procedimientos .....</b>		<b>37</b>
<b>Determinación de Humedad .....</b>		<b>37</b>
7.1	Método por secado en estufa.....	37
7.2	Método por secado en estufa de vacío.....	37
7.3	Método de secado en Termobalanza.....	37
7.4	Método de destilación azeotrópica.....	37
<b>Determinación de Minerales .....</b>		<b>39</b>
8.1	Método cenizas totales (calcinación).....	39
8.2	Método cenizas totales (digestión húmeda).....	39
8.3	Determinación de minerales .....	39
8.3.1	Determinación de cloruros en la muestra. Método de Mohr.....	39
8.3.2	Determinación de cloruros en las cenizas. Método de Mohr.....	40
8.3.3	Determinación de hierro en las cenizas.....	40
8.3.4	Determinación de calcio. Titulación con EDTA .....	40
<b>Análisis de Lípidos .....</b>		<b>41</b>
9.1	Extracción y cuantificación de lípidos.....	41
9.1.1	Método de Soxhlet.....	41
9.1.2	Método de Goldfisch.....	41

9.1.3	Método por lotes .....	42
9.1.4	Método Mojonnier .....	42
9.1.5	Método Rose-Gottlieb .....	43
9.2	Caracterización de Lípidos .....	44
9.2.1	Índice de saponificación .....	44
9.2.2	Material Insaponificable.....	44
9.2.3	Índice de yodo (Método de Hanus).....	44
9.2.4	Peso específico.....	45
9.2.5	Índice de refracción.....	45
9.2.6	Vitamina A. Método de Carr-Price .....	45
9.2.7	Colesterol.....	46
9.3	Deterioro de Lípidos.....	46
9.3.1	Acidez titulable .....	46
9.3.2	Determinación de Índice de Peróxidos (Método volumétrico) .....	46
9.3.3	Método Volumétrico-Micrométodo .....	47
9.3.4	Determinación de Índice de Peróxidos (Método colorimétrico).....	47
9.3.5	Índice de Kreis.....	48

## **Análisis de Proteínas ..... 49**

10.1	Determinación de Proteínas.....	49
10.1.1	Proteína cruda. (Método de Kjeldahl).....	49
10.1.2	Absorción a 280 nm.....	50
10.1.3	Método de Biuret.....	50
10.1.4	Método de Lowry .....	50
10.1.5	Método turbidimétrico .....	50
10.1.6	Unión a colorantes (Método de Bradford) .....	51
10.2	Extracción de Proteínas .....	51
10.2.1	Albúminas .....	51
10.2.2	Globulinas .....	52
10.2.3	Prolaminas.....	52
10.2.4	Glutelinas.....	52
10.3	Propiedades Funcionales.....	52
10.3.1	Capacidad de gelificación .....	52
10.3.2	Capacidad de emulsificación .....	53

10.3.3	Capacidad de espumado.....	53
10.3.4	Capacidad de retención de agua .....	53
<b>Análisis de Carbohidratos .....</b>		<b>54</b>
11.1	Carbohidratos totales.....	54
11.1.1	Método del fenol-sulfúrico.....	54
11.2	Análisis de polisacáridos.....	54
11.2.1	Determinación de fibra dietética (Método enzimático-gravimétrico).....	54
11.2.2	Almidón.....	56
11.2.3	Análisis de pectinas.....	59
11.3	Azúcares en solución.....	59
11.3.1	Preparación de la muestra .....	59
11.3.2	Carbohidratos solubles totales.....	60
11.3.3	Determinación de carbohidratos reductores .....	60
<b>Otras Determinaciones .....</b>		<b>62</b>
12.1.1	Determinación de densidad calórica.....	62
<b>Bibliografía .....</b>		<b>65</b>
<b>Anexo I. Preparación de Soluciones .....</b>		<b>69</b>
14.1	Reactivo de Hanus .....	69
14.2	Reactivo de DNS.....	69
14.3	Reactivo de Biuret.....	69
14.4	Reactivo de Lowry .....	69
14.5	Reactivo de Fehling .....	70
14.6	Reactivo de yodo (para determinación colorimétrica de almidón) .....	70
14.7	Ortofenantrolina al 1%.....	70
14.8	Buffer de Acetatos para determinación de hierro.....	70
14.9	Acido bórico con indicadores .....	70
14.10	Reactivo colorante Azul Brillante .....	70
14.11	Solución de Carrez I.....	70

14.12	Solución de Carrez II.....	70
14.13	Solución I/KI al 3%.....	70
14.14	Solución de cloruro de sodio alcohólica.....	70
<b>Anexo II Descripción de Equipo Kjeldahl (Büchi) .....</b>		<b>71</b>
<b>Anexo III Descripción de Bomba Calorimétrica (Parr).....</b>		<b>72</b>
<b>Anexo IV. Glosario.....</b>		<b>74</b>

## Introducción

La Química y el Análisis de los alimentos son disciplinas muy amplias que se basan en los principios de la Físicoquímica, Química Orgánica, Biología y Química Analítica. Los avances en estas ciencias realizados en los siglos XIX y XX, tuvieron un efecto importante en la comprensión de muchos aspectos de la ciencia y tecnología de alimentos, y han sido decisivos en el mejoramiento de la cantidad, calidad y disponibilidad del suministro de alimentos a nivel mundial.

El Análisis de Alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de alimentos y sus componentes. Esta información es crítica para el entendimiento de los factores que determinan las propiedades de los alimentos, así como la habilidad para producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor.

Existe un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí la necesidad de seleccionar la más apropiada para la aplicación específica. La técnica seleccionada dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y el propósito de llevar a cabo el análisis.

Las determinaciones que se realizan con más frecuencia para conocer la composición de los alimentos incluyen la determinación de humedad, cenizas, extracto etéreo (grasa cruda), proteína total, fibra y carbohidratos asimilables, en un protocolo conocido como Análisis Proximal. Asimismo, de acuerdo con el objetivo del análisis, resultan importantes las determinaciones relacionadas con la caracterización de algún grupo de nutrientes

en particular, tal es el caso del análisis de carbohidratos, en el que se podría considerar la diferenciación de los que presentan poder reductor, del contenido total. En el mismo sentido, se podrían analizar las proteínas solubles o considerar la caracterización de los lípidos extraídos de un alimento.

El objetivo de este documento es revisar los principios básicos de los procedimientos empleados comúnmente para el análisis de los alimentos y establecer las principales ventajas y desventajas.

Este documento tuvo su inicio para el curso de Laboratorio de Análisis de Alimentos, de la licenciatura en Química de Alimentos, de la Facultad de Química de la UNAM, con duración de un semestre; sin embargo, ha evolucionado para ser parte fundamental de la nueva asignatura Laboratorio de Alimentos I, y pretende ser un apoyo para cualquier asignatura o actividad que requiera el análisis de los componentes de los alimentos. Se hace hincapié en la comprensión de los principios químicos y analíticos fundamentales en que se basan las relaciones entre la composición de los alimentos y algunas de sus propiedades funcionales y nutricionales. Además, se introducen diversas técnicas de laboratorio comunes en la investigación básica y aplicada en Química y Análisis de Alimentos.

Una vez revisados los conceptos teóricos de los procedimientos, en la primera parte del documento, se presentan los procedimientos detallados y por último, un condensado con la preparación de algunas soluciones importantes para el adecuado desarrollo de las prácticas experimentales.

A través de los años en que se ha trabajado con este material, muchos estudiantes han efectuado con éxito las determinaciones que se describen y continuamente sus resultados son comparados con los obtenidos, para los mismos alimentos, en laboratorios de investigación con personal capacitado.

Agradecemos al PAPIME EN203504 por el financiamiento para el desarrollo del Proyecto.

# Fundamentos





# 1

## Determinación de Humedad

### 1. Definición de humedad

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización al que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido en agua varían entre 60 y 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: “agua libre” y “agua ligada”. El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad. El agua ligada se encuentra combinada o absorbida en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos), o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales (Hart, 1991).

Existen diversas razones por las cuales la mayoría de las industrias de alimentos determinan la humedad; las principales son las siguientes:

- a) El comprador de materias primas no desea adquirir agua en exceso.
- b) El agua, si está presente por encima de ciertos niveles, facilita el desarrollo de microorganismos.
- c) Para la mantequilla, margarina, leche en polvo y queso, está señalado el máximo legal.
- d) Los materiales pulverulentos se aglomeran en presencia de agua, por ejemplo azúcar y sal.
- e) La humedad de trigo debe ajustarse adecuadamente para facilitar la molienda.

- f) La cantidad de agua presente puede afectar la textura.
- e) La determinación del contenido en agua representa una vía sencilla para el control de la concentración en las distintas etapas de la fabricación de alimentos.

## 1.2. Métodos de Secado

Los métodos de secado son los procedimientos más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos: Se calcula el porcentaje en agua por la pérdida en peso debida a su eliminación por calentamiento bajo condiciones normalizadas. Aunque estos métodos dan resultados que pueden interpretarse sobre bases de comparación, es preciso considerar que *a)* algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; *b)* a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua, y *c)* también pueden perderse otras materias volátiles aparte de agua (Kirk, *et al*, 1996).

### 1.2.1 Método por Secado de Estufa

La determinación de secado en estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua. Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable, y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa y balanza analítica, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra (Nollet, 1996).

Notas sobre las determinaciones de humedad en estufa.

- h) Los productos con un elevado contenido en azúcares y las carnes con un contenido alto de grasa, deben deshidratarse en estufa de vacío a temperaturas que no excedan de 70°C.
- i) Los métodos de deshidratación en estufa son inadecuados para productos como las especias, ricas en sustancias volátiles distintas del agua.
- j) La eliminación del agua de una muestra requiere que la presión parcial de agua en la fase de vapor sea inferior a la que alcanza en la muestra; de ahí que sea necesario cierto movimiento del aire. En una estufa de aire se

logra abriendo parcialmente la ventilación, y en las estufas de vacío dando entrada a una lenta corriente de aire seco.

- k) La temperatura no es igual en los distintos puntos de la estufa, de ahí la conveniencia de colocar el bulbo del termómetro en las proximidades de la muestra. Las variaciones pueden alcanzar hasta más de tres grados en los tipos antiguos, en los que el aire se mueve por convección. Las estufas más modernas de este tipo, están equipadas con eficaces sistemas de recirculación, y por lo que la temperatura no varía un grado en las distintas zonas.
- l) Muchos productos son, tras su deshidratación, bastante higroscópicos. Por ello es preciso colocar la tapa de manera que ajuste tanto como sea posible inmediatamente después de abrir la estufa, y es necesario también pesar la cápsula cuando alcance la temperatura ambiente. Para esto, puede precisarse hasta una hora si se utiliza un desecador de vidrio.
- m) La reacción de oscurecimiento producida por interacción entre los aminoácidos y los azúcares reductores libera agua durante la deshidratación, y se acelera a temperaturas elevadas. Los alimentos ricos en proteínas y azúcares reductores deben, por ello, desecarse con precaución, de preferencia en una estufa de vacío a 60°C (Hart, 1991).

### 1.2.2. Método por Secado en Estufa de Vacío

Se basa en el principio fisicoquímico que relaciona la presión de vapor con la presión del sistema a una temperatura dada. Si se abate la presión del sistema, se abate también la presión de vapor y necesariamente se reduce su punto de ebullición.

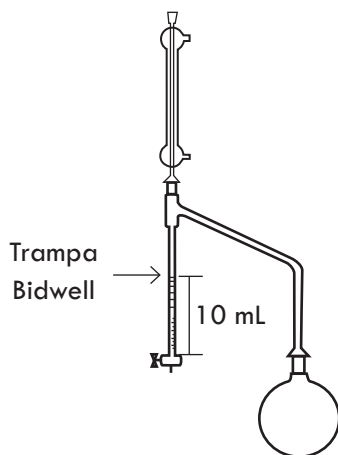
Es necesario que la estufa tenga una salida de aire constante y que la presión no exceda los 100 mm Hg y 70°C, de manera que la muestra no se descomponga y no se evaporen sus compuestos volátiles, cuya presión de vapor también ha sido modificada (Nollet, 1996).

### 1.2.3. Método de Secado en Termobalanza

Este método se basa en evaporar, de manera continua, la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante. El error de pesada en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente (Nollet, 1996).

### 1.2.4. Método de Destilación Azeotrópica

El método se basa en la destilación simultánea del agua con un líquido inmiscible en proporciones constantes. El agua es destilada en un líquido inmiscible de alto punto de ebullición, como son tolueno y xileno. El agua, destilada y condensada, se recolecta en una trampa Bidwell para medir el volumen (ver **Fig. 1**) [Nollet, 1996].



**Fig. 1. Diagrama de destilación azeotrópica.**

Notas sobre los procedimientos de destilación con disolvente.

1. Se recomienda emplear los siguientes disolventes:

Disolventes	P. ebullición (°C)
Tetracloruro de carbono	77
Benceno	80
Metil ciclohexano	100
Tolueno	111
Tetracloroetileno	121
Xileno	137-140

2. La Asociación Americana de Comercio Especies, en sus métodos oficiales analíticos, recomienda el uso de benceno en lugar de tolueno, con productos tales como pimientos

rojos, cebollas deshidratadas, ajos deshidratados, etc., que son ricos en azúcares y otras sustancias que pueden descomponerse, liberando agua, a la temperatura de ebullición del tolueno.

3. Es preciso limpiar la totalidad del aparato, cada vez que se utilice, con ácido sulfúrico-dicromato, enjuagarlo primero con agua y luego con alcohol y, finalmente, secarlo.

4. Debe calibrarse el colector por sucesivas destilaciones con tolueno de cantidades de agua medidas con precisión. Las lecturas deben aproximarse en centésimas de mililitro.

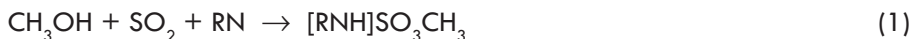
5. La elección del colector depende del volumen de agua que se espera recoger, del grado de precisión requerido y de la facilidad con que el disolvente ebulle y refluje (Hart, 1991).

### 1.2.5. Método de Karl Fischer

Es el único método químico comúnmente usado para la determinación de agua en alimentos. Se basa en la titulación del reactivo que lleva su nombre. Este reactivo fue diseñado en 1936 y consta de yodo, dióxido de azufre, una amina (originalmente se empleaba piridina, sin embargo, por cuestiones de seguridad y toxicidad se está reemplazando por imidazol) en un alcohol (ejemplo metanol).

Inicialmente, el dióxido de azufre reacciona con el metanol para formar el éster el cual es neutralizado por la base (1). El éster es oxidado por el yodo a metil sulfato en una reacción que involucra al agua (2).

Las reacciones son las siguientes (James, 1999):



Habitualmente, se utiliza un exceso de dióxido de azufre, piridina y metanol, de manera que la fuerza del reactivo venga determinada por la concentración de yodo.

Este reactivo es un poderoso deshidratante, por lo que tanto la muestra como el reactivo deben protegerse contra la humedad del aire, cualquiera que sea la técnica usada. Se hace por titulación y éstas pueden ser visuales o potenciométricas. En su forma más simple, el mismo reactivo funciona como indicador. La disolución muestra mantiene un color amarillo canario mientras haya agua, y cambia luego a amarillo cromato y después a pardo, en el momento del vire.

En su forma más simple, el método potenciométrico consta de una fuente de corriente directa, un reóstato, un galvanómetro o microamperímetro y electrodos de platino. Dos cosas son necesarias para la determinación: Una diferencia de potencial que dé una corriente y el contacto del titulante con el analito (Hart, 1991).

Este método se aplica a alimentos con bajo contenido de humedad, por ejemplo frutas y vegetales deshidratados, aceite y café tostado; no es recomendable para alimentos con alto contenido de humedad (James, 1999).

En la **Tabla 1** se muestran las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos para determinar humedad.

**Tabla 1.** Comparación entre los métodos para determinar humedad.

Método	Ventajas	Desventajas
Secado en estufa	<p>Es un método convencional.</p> <p>Es preciso.</p> <p>Se pueden acomodar varias muestras.</p> <p>Se llega a la temperatura deseada rápidamente.</p>	<p>La temperatura va a fluctuar debido al tamaño de la partícula, peso de la muestra, posición de la muestra en el horno, etc.</p> <p>Pérdida de sustancias volátiles durante el secado.</p> <p>Descomposición de la muestra, ejemplo: azúcar.</p>

Secado en estufa de vacío	<p>Se calienta a baja temperatura y por lo tanto se previene la descomposición de la muestra.</p> <p>Es recomendable para muestras que contengan compuestos volátiles orgánicos.</p> <p>Calentamiento y evaporación constante y uniforme.</p>	<p>La eficiencia es baja para alimentos con alta humedad.</p> <p>Requiere más tiempo que secado en estufa convencional.</p>
Destilación azeotrópica	<p>Determina el agua directamente y no por pérdida de peso.</p> <p>El dispositivo es sencillo de manejar.</p> <p>Toma poco tiempo.</p> <p>Se previene la oxidación de la muestra.</p> <p>No afecta la humedad del ambiente.</p>	<p>Baja precisión del dispositivo para medir volumen de agua.</p> <p>Los disolventes inmiscibles como tolueno son inflamables.</p> <p>Se puede registrar altos residuos debido a la destilación de componentes solubles en agua, como glicerol y alcohol.</p> <p>Cualquier impureza puede generar resultados erróneos.</p>
Secado en termobalanza	<p>Es un método semiautomático y automático.</p> <p>La muestra no es removida por lo tanto el error de pesada es mínimo.</p>	<p>Es excelente para investigación, pero no es práctico.</p>

Karl Fischer	<p>Es un método estándar para ensayos de humedad. Precisión y exactitud más altos que otros métodos. Es útil para determinar agua en grasas y aceites previniendo que la muestra se oxide. Una vez que el dispositivo se monta, la determinación toma pocos minutos.</p>	<p>Los reactivos deben ser pureza analítica para preparar el reactivo de Fischer. El punto de equivalencia de titulación puede ser difícil de determinar. El reactivo de Fischer es inestable y debe estandarizarse <i>in situ</i>. El dispositivo de la titulación debe protegerse de la humedad atmosférica debido a la excesiva sensibilidad del reactivo a la humedad. El uso de la piridina, que es muy reactiva.</p>
--------------	--	--

Nollet, L. M. L (Ed); (1996). *Handbook of Food Analysis*; Marcel Dekker, New York, USA. Pág 68



# 2

## Análisis de Minerales

### Definición de cenizas

Las cenizas de un alimento son un término analítico equivalente al residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica. Las cenizas, normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes.

El valor principal de la determinación de cenizas (y también de las cenizas solubles en agua, la alcalinidad de las cenizas y las cenizas insolubles en ácido) es que supone un método sencillo para determinar la calidad de ciertos alimentos. Por ejemplo, en las especias y en la gelatina es un inconveniente un alto contenido en cenizas. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación (Kirk, *et al*, 1996).

En los vegetales predominan los derivados de potasio, y en las cenizas animales los del sodio. El carbonato potásico se volatiliza apreciablemente a 700°C, y se pierde casi por completo a 900°C. El carbonato sódico permanece inalterado a 700°C, pero sufre pérdidas considerables a 900°C. Los fosfatos y carbonatos reaccionan además entre sí (Hart, 1991).

**Notas:**

- a) Los productos que contienen mucha agua se deben secar primero sobre un plato eléctrico caliente o al baño María.
- b) La consideración principal es que el producto no desprenda humo.
- c) En general, la temperatura adecuada de la mufla es de 550°C. Sin embargo, los cloruros, pueden volatilizarse a esta temperatura.
- d) Las cenizas se utilizan muchas veces para la determinación de constituyentes individuales, por ejemplo cloruros, fosfatos, hierro y calcio (Kirk, *et al*, 1996).

Para la determinación de cenizas, se siguen principalmente dos métodos. En seco y vía húmeda.

## **2.2. Método de cenizas totales**

La determinación en seco es el método más común para cuantificar la totalidad de minerales en alimentos, y se basa en la descomposición de la materia orgánica quedando solamente materia inorgánica en la muestra. Es eficiente, ya que determina tanto cenizas solubles en agua, insolubles y solubles en medio ácido.

En este método toda la materia orgánica se oxida en ausencia de flama a una temperatura que fluctúa entre los 500-550°C; el material inorgánico que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza (Nollet, 1996).

## **2.3. Determinación de cenizas en húmedo**

La determinación húmeda se basa en la descomposición de la materia orgánica en medio ácido, por lo que la materia inorgánica puede ser determinada por gravimetría de las sales que precipiten, y también por algún otro método analítico para las sales que permanezcan en disolución acuosa o ácida. Para la determinación húmeda, se dan cenizas alcalinas, ácidas y neutras y esto se basa en el tipo de anión o catión ya sea metálico o complejo, de tal forma hay minerales como tartratos, citratos que producirán cenizas con un carácter alcalino. Es necesario tomar en cuenta que también un índice de alcalinidad de cenizas es muestra del contenido de carbonatos en disolución acuosa.

Las ventajas y desventajas de estos métodos se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla2.** Comparación entre métodos para determinar cenizas totales

Método	Ventaja	Desventaja
Seco	<p>Simple.</p> <p>No se requiere atención durante la generación de cenizas.</p> <p>No se requieren reactivos.</p> <p>Se pueden manejar muchas muestras.</p> <p>Es un método estándar para la determinación de cenizas.</p> <p>Se puede determinar cualquier tipo de materia inorgánica.</p>	<p>Se requiere alta temperatura.</p> <p>El equipo es caro.</p> <p>Hay pérdidas por volatilización.</p> <p>Hay interacciones entre minerales y recipientes.</p> <p>Hay absorción de elementos traza por recipientes de porcelana o sílice.</p> <p>Poca utilidad para análisis de Hg, As, P y Se.</p> <p>Calentamiento excesivo puede hacer ciertos componentes insolubles.</p> <p>Hay una dificultad de manejo de cenizas por ser higroscópicas, sensibles a la luz, etc.</p>
Húmedo	<p>No se requiere alta temperatura.</p> <p>El dispositivo es simple.</p> <p>La oxidación es rápida.</p> <p>Se mantiene la disolución acuosa lo cual es bueno para análisis mineral.</p> <p>El equipo no es caro.</p> <p>No hay volatilización de minerales.</p>	<p>Se requieren altas cantidades de materiales corrosivos.</p> <p>Se requieren ácidos explosivos</p> <p>Se requiere estandarizar los reactivos.</p> <p>Las reacciones son fumantes.</p> <p>Manejar sistemáticamente varias muestras no es sencillo.</p> <p>El procedimiento es tedioso y requiere mucho tiempo.</p>

Nollet, L. M. L (Ed); (1996). *Handbook of Food Analysis*; Marcel Dekker, Nueva York. Pág 89

## 2.4 Determinación de elementos minerales

El término elementos minerales es poco preciso, pues en los minerales se encuentran elementos orgánicos como carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. Sirve para agrupar a aquellos elementos, en su mayoría metálicos, que se presentan en cantidades minoritarias en los alimentos, y suelen determinarse como elementos más

que como compuestos específicos o grupos de compuestos.

El número de estos elementos que se encuentran en los alimentos es muy considerable, incluyéndose silicio, calcio, magnesio, sodio, potasio, fósforo, azufre, cloro, hierro, aluminio, manganeso, flúor, arsénico, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, plomo, selenio, estroncio, zinc, yodo, mercurio y boro. En algunos casos, estos elementos son naturales en los alimentos mientras que en otros casos son producto de la contaminación.

Los métodos de determinación más comunes se basan en la titulación complejométrica con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o algún otro quelante, y por gravimetría (para cationes metálicos).

Hay variantes para elementos con sodio y potasio que no se pueden titular con EDTA; este método es de cloroplatinato de Lindo-Gladding. Este procedimiento se basa en la insolubilidad del perclorato en alcohol y en otros disolventes orgánicos. Si la determinación es cuidadosa, el método de cloroplatinato produce resultados muy precisos, pero en la actualidad tienden a sustituirse por métodos basados en el descubrimiento reciente de la insolubilidad del tetrafenilborato de potasio, o en la fotometría de llama.

Para la determinación de fósforo se realiza su conversión a fosfomolibdato. Separado por filtración, el fosfomolibdato amónico puede disolverse en un exceso de álcali patrón que luego es titulado por retroceso con ácido, o en un exceso de amoníaco para precipitar luego el fósforo como fosfato amónico magnésico, que se incinera y se pesa como pirofosfato magnésico. Cuando se trata de trazas de fósforo, se puede reducir el fosfomolibdato a azul de molibdeno y determinar colorimétricamente.

Para determinar azufre libre es necesaria su oxidación antes de la incineración, con el objeto de determinar azufre como sulfato de bario. Para ello se utiliza comúnmente peróxido de sodio, nitrato de magnesio y ácido perclórico (Hart, 1991).

### **2.4.1. Determinación de cloruros (Método de Mohr)**

El método se utiliza para determinar iones cloruro y bromuro de metales alcalinos, magnesio y amonio. La valoración se hace con solución patrón de nitrato de plata. El método se basa en la formación de un precipitado ladrillo proveniente del cromato

de plata formado a partir del precipitado de cloruro de plata, una vez que todo el  $\text{Cl}^-$  haya reaccionado con el nitrato de plata, como se muestra en las siguientes reacciones:



La solución debe tener un pH neutro o cercano a la neutralidad. Un pH de 8.3 es adecuado para la determinación (Nielsen, 1998).

### 2.4.1. Determinación de hierro (Reacción con ortofenantrolina)

Método descrito en AOAC 944.02 y en NMX-F-503-1987.

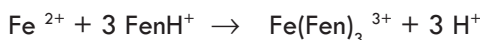
La ortofenantrolina reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$ , originando un complejo de color rojo característico (ferroína) que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible de alrededor de 505 nm. El  $\text{Fe}^{3+}$  no presenta absorción a esa longitud de onda, y debe ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante un agente reductor apropiado, como la hidroxilamina, para su determinación (en forma de clorato para incrementar su solubilidad) (Boumans, *et al*, 1997).

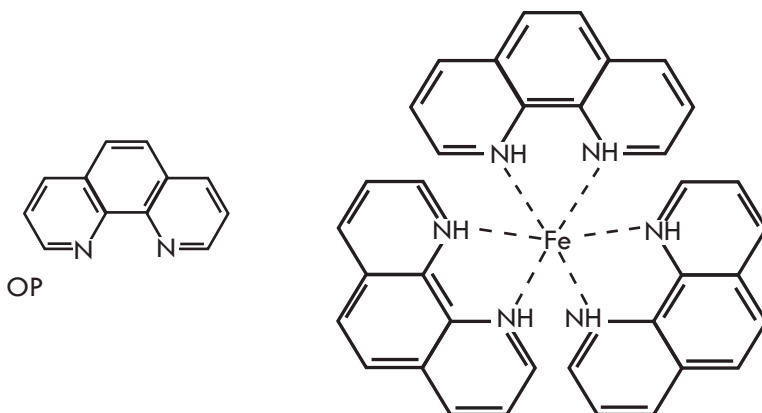
La reducción cuantitativa de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  ocurre en pocos minutos en un medio ácido (pH 3-4), de acuerdo con la siguiente ecuación:



Después de la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , se da la formación de un complejo con la adición de ortofenantrolina. En un medio ácido, la ortofenantrolina se encuentra en su forma protonada como ion 1,10-fenantrolina ( $\text{FenH}^+$ ).

La reacción de complejación puede ser descrita por la siguiente ecuación (La estructura química del complejo se muestra en la **Figura 2**):





**Fig. 2.** Estructura química de la ferroína. Consiste en tres moléculas de ortofenantrolina (OP) alrededor de un átomo central de Fe.

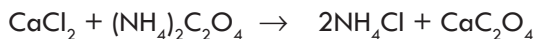
### 2.4.3 Determinación de calcio (Titulación con permanganato)

Método descrito en AOAC 944.03

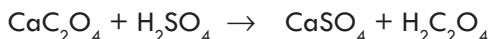
El Calcio se precipita a pH 4 como oxalato (si hay fosfato presente se puede eliminar con ácido acético), posteriormente el oxalato se disuelve en ácido sulfúrico liberando ácido oxálico, el cual se titula con una solución valorada de permanganato de potasio (James, 1999).

Las reacciones involucradas son:

Precipitación del calcio con oxalato de amonio.



Liberación del ácido oxálico por la acción del ácido sulfúrico sobre el oxalato de calcio.



Titulación del ácido oxálico con permanganato de potasio



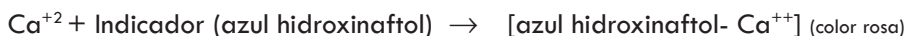
#### 2.4.4. Determinación de calcio (Formación de complejo con EDTA)

Método descrito en NOM-187-SSA1/SCFI-2002.

Cuando se añade a una muestra conteniendo calcio (o magnesio) ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o su sal, los iones se combinan con el EDTA. Se puede determinar calcio en forma directa, añadiendo NaOH para elevar el pH de la muestra entre 12 y 13 unidades. Para que el magnesio precipite como hidróxido y no interfiera, se usa, además, un indicador que se combine solamente con el calcio (azul de hidroxinaftol).

En el análisis de calcio la muestra es tratada con NaOH 4N para obtener un pH de entre 12 y 13, lo que produce la precipitación del magnesio en forma de  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ : Enseguida, se agrega el indicador azul de hidroxinaftol que forma un complejo de color rosa con el ion calcio, y se procede a titular con solución de EDTA hasta la aparición de un complejo color púrpura:

Las reacciones que se llevan a cabo son:



+ azul hidroxinaftol  
(color púrpura)





# 3

## Análisis de Lípidos

Los lípidos, junto con las proteínas y carbohidratos, constituyen los principales componentes estructurales de los alimentos (Nielsen, 1998).

Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de compuestos insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos, tales como éter, cloroformo, benceno o acetona. Todos los lípidos contienen carbono, hidrógeno y oxígeno, y algunos también contienen fósforo y nitrógeno (Aurand, *et al*, 1987). Los lípidos comprenden un grupo de sustancias con propiedades comunes y similitudes en la composición; sin embargo; algunos, tales como los triacilgliceroles, son muy hidrofóbicos. Otros, tales como los di y monoacilgliceroles, tienen movilidad hidrofóbica e hidrofílica en su molécula, por lo que pueden ser solubles en disolventes relativamente polares (Nielsen, 1998).

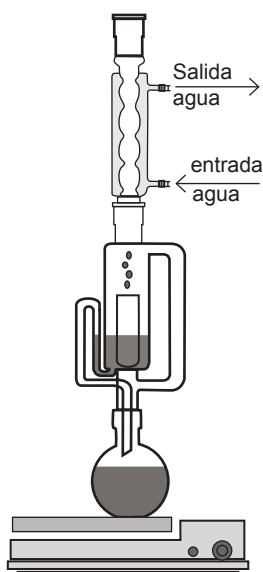
### 3.1. Métodos de extracción y cuantificación

El contenido total de lípidos se determina comúnmente por métodos de extracción con disolventes orgánicos (por ejemplo, Soxhlet, Goldfisch, Mojonnier); sin embargo, también puede cuantificarse por métodos de extracción que no incluyen disolventes (por ejemplo, Babcock, Gerber) y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos (por ejemplo, infrarrojo, densidad y absorción de rayos X) (Nielsen, 2003).

#### 3.1.1. Método de Soxhlet

Es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra, la cual queda sumergida en el disolvente (**ver Fig. 3**). Posteriormente, éste es sifoneado al matraz de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre el matraz conteniendo el extracto lipídico y el matraz a peso constante (Nielsen, 2003).

**Fig. 3.** Esquema de extracción Soxhlet.



### 3.1.2. Método de Goldfisch

Es una extracción continua con un disolvente orgánico. Éste se calienta, volatiliza para posteriormente condensarse sobre la muestra. El disolvente gotea continuamente a través de la muestra para extraer la grasa (**ver Fig. 4**). El contenido de grasa se cuantifica por diferencia de peso entre la muestra o la grasa removida (Nielsen, 2003).

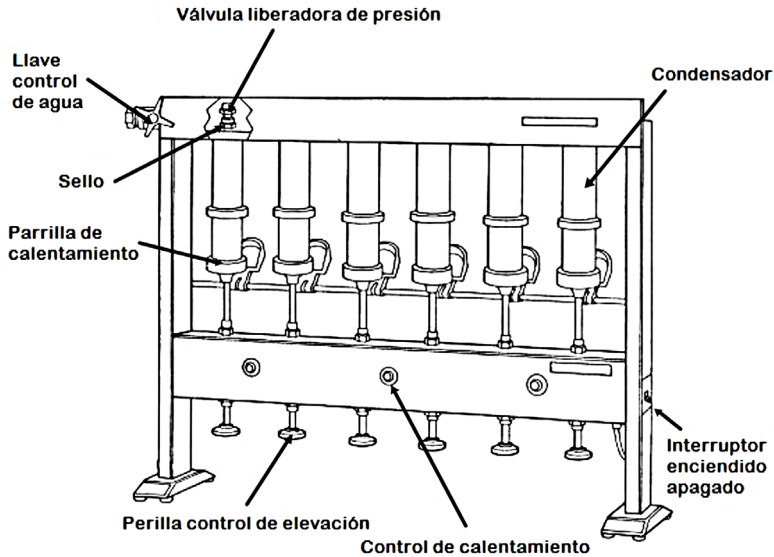


Fig. 4. Equipo de extracción Goldfish.

### 3.1.3. Método por Lotes

Este método hace uso de la solubilidad intrínseca de la sustancia a separar; es claro que un compuesto no polar es soluble en un disolvente no polar (Hoffman, 1989). La extracción se realiza en frío para evitar el daño del material lipídico, y por lotes para incrementar la eficiencia.

### 3.1.4. Método de Bligh-Dyer

El método de Bligh-Dyer, así como su modificación por Hanson y Olley, proporciona un procedimiento rápido para la extracción de lípidos de tejidos y productos alimenticios que contienen una cantidad significativa de agua. El método se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones tales, que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra. Al añadir alícuotas de cloroformo y agua, se logra la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase no acuosa, mientras que el no lipídico se encuentra en la acuosa. Los lípidos se pueden extraer de dos gramos de muestra seca, hasta 20 gramos de muestra húmeda.

El contenido de agua de la muestra se ajusta a 16 mililitros para conservar la propor-

ción de cloroformo, metanol y agua, la cual es esencial si se pretende una separación de fases y una extracción cuantitativa de lípidos. La ventaja de este procedimiento es que las etapas de filtrado y lavado son eliminadas. Sin embargo, es un método que tiene un elevado margen de error para muestras secas de cereales (Rossell y Pritchard, 1991).

### 3.1.5. Método de Rose-Gottlieb

De acuerdo este método, la separación de la grasa es lograda por amoníaco y etanol con un posterior efecto de deshidratación sobre los fosfolípidos. La grasa es disuelta en éter recién destilado y se añade algo de petróleo, de tal manera que se separen algunos compuestos no lipídicos que se puedan encontrar en la fase etérea. Esta mezcla es completamente inmiscible en agua, de manera que mediante una extracción adecuada es simple dejar la grasa en la fase etérea y el residuo graso es pesado.

Este método es particular para leche fresca que no contiene ácidos grasos libres, los cuales en disolución alcalina forman sales de amonio y esto es insoluble en éter. Esta es la razón por la cual esto no se aplica a quesos, los cuales sí tienen ácidos grasos libres (Boekenoogen, 1964).

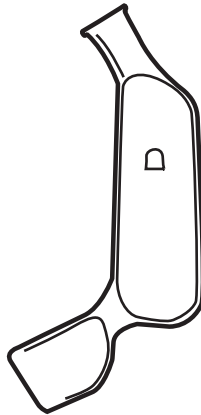
### 3.1.6. Método de Gerber

Este, así como los demás métodos volumétricos, presentan un carácter un tanto empírico, ya que varios factores afectan la gravedad específica de la grasa separada: Variaciones propias de la grasa, ácidos grasos presentes, solubilidad de la grasa en los disolventes, etc. Con estos métodos volumétricos la muestra se sitúa en un butirómetro y se descompone utilizando ácidos o álcalis, de manera que la grasa es liberada; ésta se separa por métodos mecánicos (centrífuga) y se colecta en el cuello calibrado. (Boekenoogen, 1964).

### 3.1.7. Método de Mojonnier

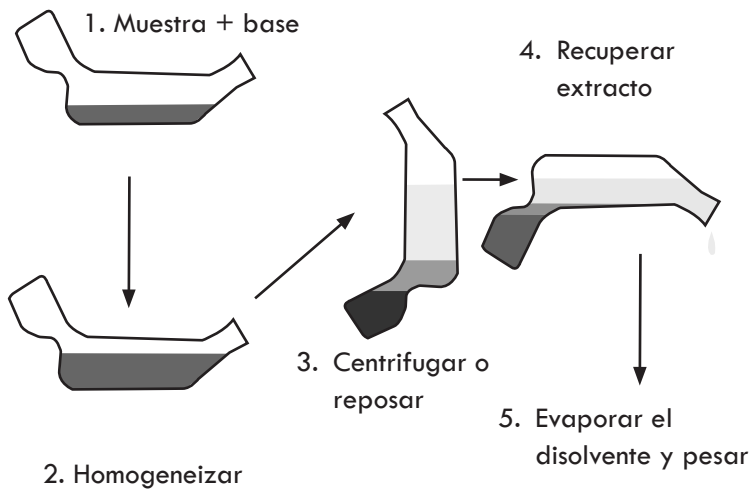
El contenido de grasa se determina gravimétricamente después de una extracción con una mezcla de éter etílico y éter de petróleo, en un matraz de Mojonnier (**Fig. 5**) de una solución de la muestra en alcohol y amoníaco.

**Fig. 5.** Matraz de extracción Mojonnier.



La prueba de Mojonnier es un ejemplo de extracción discontinua con disolvente (ver **Fig. 6**). Esta extracción no requiere remover previamente la humedad de la muestra (Nielsen, 1998).

**Fig 6.** Esquema de extracción Mojonnier.



## 3.2. Caracterización de Lípidos

### 3.2.1. Peso específico

Es una determinación gravimétrica donde un picnómetro se llena con la muestra de aceite y permanece en un baño a 25°C por 30 min, se seca y pesa. Se expresa el peso específico como la relación del peso del aceite respecto al agua (g de aceite/g agua), [Aurand, *et al*, 1987]

### 3.2.2. Índice de refracción

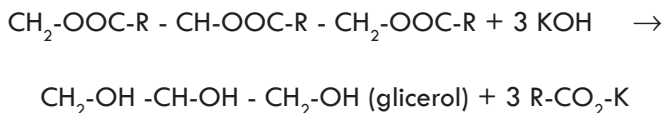
Se define como la relación de la velocidad de la luz en el aire (técnicamente un vacío) respecto a la velocidad de la luz en el aceite. Se obtiene al medir directamente en un refractómetro a 20-25°C para los aceites, y a 40°C para las grasas. (Nielsen 1998).

### 3.2.3. Índice de saponificación

El índice de saponificación denota el peso de hidróxido potásico en mg que se requiere para saponificar un gramo del aceite o grasa.

El aceite se saponifica calentándolo con un exceso de álcali cáustico alcohólico. La cantidad de álcali consumida se calcula valorando por retroceso con ácido clorhídrico. El índice de saponificación es inversamente proporcional a la medida de los pesos moleculares de los ácidos grasos de los glicéridos presentes en el aceite o grasa.

Como muchos aceites dan índices similares, el índice de saponificación es menos valioso que el índice de yodo cuando se trata de identificar un aceite desconocido. Notables excepciones son los altos índices del aceite de coco y el aceite de almendra de palma (ambos utilizados en la margarina) así como de la grasa de mantequilla (Pearson, 1993).

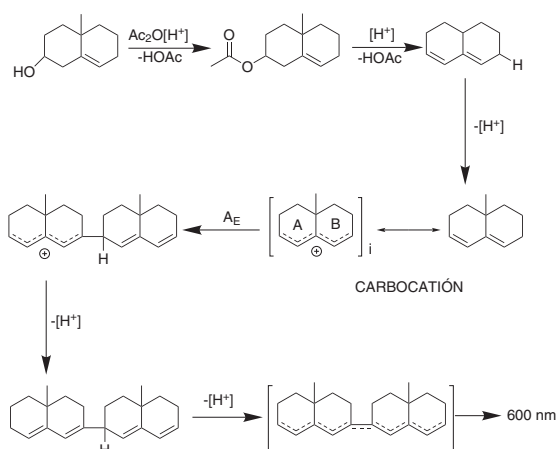


### 3.2.4. Material insaponificable

La materia insaponificable consta de aquellas sustancias contenidas en los aceites comerciales y grasas (diferentes a las de bajo punto de ebullición, a los ácidos libres y a la materia mineral) que, después de saponificar y extraer con éter dietílico, quedan sin volatilizarse luego de secar a 80°C. Incluyen hidrocarburos y alcoholes de alto peso molecular. La mayoría de los aceites y grasas contienen una pequeña parte de materia insaponificable (normalmente menos del 2 %) [Pearson, 1993].

### 3.2.5. Colesterol

El método químico de Liebermann-Burchard para la determinación de colesterol en una muestra lipídica, se basa en el desarrollo de una coloración verde en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado después de 30 min de reacción (Nollet, 1996). La intensidad de la coloración es medida por absorción en el espectrofotómetro a 620 nm. La intensidad tiene una relación lineal con la concentración de colesterol entre 100 y 600µg, se debe realizar una solución control de colesterol de diferentes concentraciones para realizar una comparación (Kenny, 1952). El mecanismo de reacción se muestra en la **Fig. 7**.



**Fig. 7.** Mecanismo de reacción del colesterol con anhídrido acético en medio ácido (Reacción Liebermann-Burchard). El compuesto formado absorbe de 600-620 nm (Burke, R. W; Diamondstone B. I; Velapoldi R. A. & Menis O.; 1974, "Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol", *Clinical Chemistry* 20, 7, 794-801).

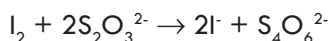
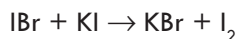
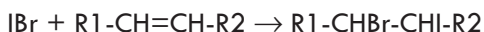
### 3.2.6. Determinación de índice de yodo (Método de Wijs y Método de Hanus)

El índice de yodo de los lípidos depende de su grado de insaturación. La grasa disuelta se hace reaccionar con monobromuro de yodo en exceso. La cantidad de monobromuro de yodo que no se adiciona a los dobles enlaces, oxida una disolución de yoduro a yodo, y éste se determina por valoración con una disolución de tiosulfato de sodio. La reacción de adición se lleva a cabo en oscuridad, para evitar que se produzcan reacciones laterales de radicales inducidos por la luz (y con ello un gasto aparente de halógeno mayor).

Dado que el reactivo halogenante va preparado en acético glacial y es de concentración aproximada y variable, deberá hacerse siempre un ensayo en blanco para calcular su equivalencia en yodo (Nielsen, 2003). Se expresa convencionalmente por el peso de yodo absorbido por 100 partes en peso de materia grasa.

La diferencia entre ambos métodos es el agente halogenado. En el Método de Hanus, el agente es IBr, preparado de la mezcla de I<sub>2</sub> con Br<sub>2</sub> en ácido acético. En el Método de Wijs, el agente es ICl, preparado de la mezcla de ICl<sub>3</sub> con I<sub>2</sub> en medio de ácido acético (Pearson, 1993).

Las reacciones que se llevan a cabo son:



### 3.2.7. Cuantificación de vitamina A (Método de Carr Price)

La vitamina A es muy sensible a la luz. Su determinación se debe efectuar con luz suave o artificial color ámbar.

La vitamina A se puede determinar mediante el método rápido Carr-Price, en el cual se mide el color azul que se forma con tricloruro de antimonio. En la mayoría de las



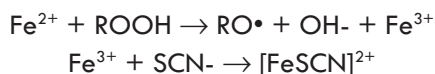


### 3.3.3. Determinación de peróxidos. Método volumétrico-Micrométodo

Tiene el mismo principio que el método volumétrico descrito en el AOAC, 2005. Es un método propuesto por Crowe y White en 2001, donde demuestran que tiene una relación lineal ( $r^2 = 0.998$ ), además de sensibilidad y precisión adecuadas empleando sólo 10% de los reactivos químicos necesarios para el método oficial.

### 3.3.4. Determinación de índice de peróxidos (Método colorimétrico)

Este es un método colorimétrico indirecto. Se basa en que a una muestra que contenga peróxidos se adiciona un reactivo de hierro (II); en la muestra se llevará a cabo la oxidación electroquímica de hierro (II) a hierro (III) [Jiang, *et al*, 1992] y éste último será cuantificado por su reacción de complejación con tiocianato mostrando un color rojo característico (Kirk, 1991).

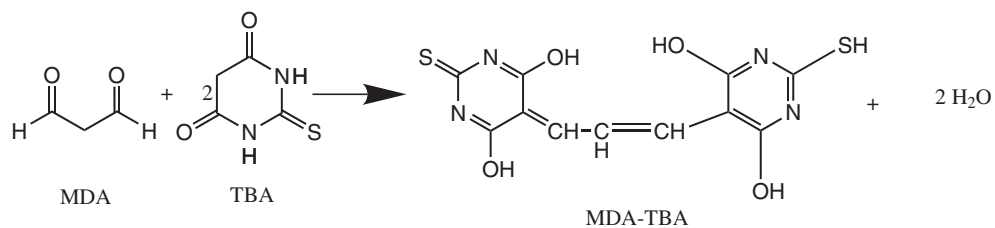


### 3.3.5. Índice de Kreis

La floroglucina reacciona en medio ácido con las grasas oxidadas, dando una coloración roja, cuya intensidad aumenta con el deterioro, debido probablemente a la presencia de aldehído malónico o de aldehído epihidrínico (Aurand, *et al*, 1987).

### 3.3.6. Índice de TBA

El ácido tiobarbitúrico (TBA, por sus siglas en inglés) reacciona con productos de oxidación secundaria de los lípidos. El malonaldehído (MDA) reacciona con TBA para producir un compuesto colorido y se puede medir espectrofotométricamente. Debido a que no es específica para el malonaldehído, algunas veces el resultado se reporta como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La reacción es:





# 4 Análisis de Proteínas

## 4.1. Determinación de Proteínas

### 4.1.1. Método de Kjeldahl

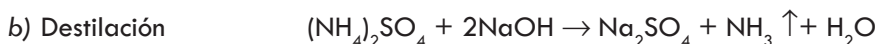
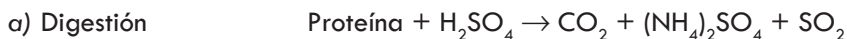
En el trabajo de rutina se determina mucho más frecuentemente la proteína total que las proteínas o aminoácidos individuales. En general, el procedimiento de referencia Kjeldahl determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto las no proteínas como las proteínas verdaderas (Aurand, *et al*, 1987).

El método que se basa en la determinación de la cantidad de nitrógeno contenido en productos alimentarios, compromete dos pasos consecutivos:

- a) La descomposición de la materia orgánica bajo calentamiento en presencia de ácido sulfúrico concentrado.
- b) El registro de la cantidad de amoníaco obtenida de la muestra.

Durante el proceso de descomposición ocurre la deshidratación y carbonización de la materia orgánica, combinada con la oxidación de carbono a dióxido de carbono. El nitrógeno es transformado a amoníaco que se retiene en la disolución como sulfato de amonio. La recuperación del nitrógeno, y la velocidad del proceso pueden ser incrementadas adicionando sales que abaten la temperatura de descomposición (sulfato de potasio), o por la adición de oxidantes (peróxido de hidrógeno, tetracloruro, persulfato o ácido crómico) y por la adición de un catalizador (Nollet, 1996).

El método de Kjeldahl consta de las siguientes etapas:



(recibiendo en HCl)



c) Titulación



En la mezcla de digestión se incluye sulfato sódico para aumentar el punto de ebullición y un catalizador para acelerar la reacción, tal como sulfato de cobre. El amoníaco en el destilado se retiene, o bien por un ácido normalizado, y se valora por retroceso, o en ácido bórico y valora directamente. El método Kjeldahl no determina, sin embargo, todas las formas de nitrógeno, a menos que se modifiquen adecuadamente; esto incluye nitratos y nitritos (Pearson, 1993).

Para convertir el nitrógeno a proteína, se emplea el factor de 6.25, el cual proviene de la consideración de que la mayoría de las proteínas tienen una cantidad aproximada de 16% de nitrógeno.

$$\text{factor} = \frac{100\text{g Proteína}}{16\text{g Nitrógeno}} = 6.25$$

En la **Tabla 3** se muestran algunos de los factores comúnmente empleados en los alimentos.

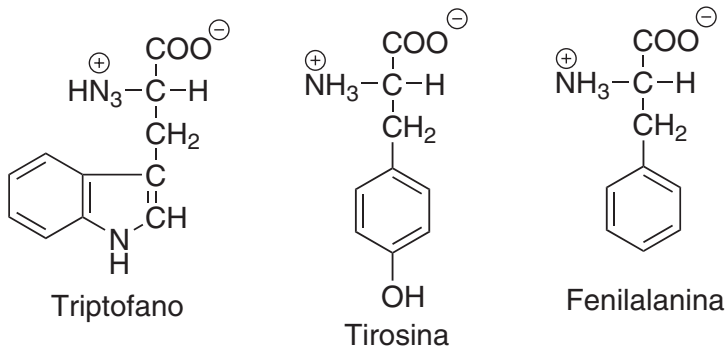
**Tabla 3.** Factores de conversión de nitrógeno a proteína para algunos alimentos

Alimento	% N en proteína	Factor
Huevo o carne	16.00	6.25
Leche	15.70	6.38
Trigo	18.76	5.33
Maíz	17.70	5.65
Avena	18.66	5.36
Soya	18.12	5.52
Arroz	19.34	5.17

Nielsen S. (ed); (1998). *Food Analysis*, Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. USA Pág 241

#### 4.1.2. Absorción a 280 nm

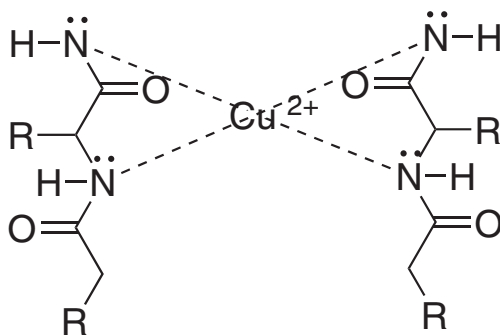
La mayoría de las proteínas muestra una absorción a 280 nm, la cual se atribuye al grupo fenólico de la tirosina, al grupo indólico del triptofano y al grupo aromático de la fenilalanina (**Fig. 8**). La cuantificación de proteínas basada en la absorción en la región de UV, tiene la ventaja de que no es necesario utilizar reactivos, y la muestra no se daña o destruye durante la determinación. Se toma en cuenta la absorción del disolvente, ya que este puede absorber en la misma región. Este método sufre interferencias de compuestos que contengan anillos de purina y pirimida. Se realiza una comparación con una proteína estándar, de la que se debe conocer su composición (Nollet, 1996).

**Fig. 8.** Estructura química de los aminoácidos aromáticos

### 4.1.3. Método de Biuret

El método comprende un ensayo colorimétrico de un paso donde se cuantifica la formación de un complejo estable entre el enlace peptídico de las proteínas y el cobre (II). El complejo presenta un color violeta característico, que se puede observar a 310 nm o 540-560 nm, el cual se da por la coordinación de un átomo de cobre con cuatro átomos de nitrógeno. El complejo se basa en la desprotonación de los grupos amida para formar el enlace con el cobre (II), o por el establecimiento de un enlace coordinado entre el metal y los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno y de nitrógeno del péptido (**Ver Fig. 9**).

Después de la adición del reactivo de cobre, se requiere tiempo para desarrollar una coloración de Biuret estable; es necesario considerar la posible influencia de aminoácidos libres que forman buffer en configuración tris y amoniaco (Nollet, 1996).



**Fig. 9.** Estructura del complejo entre el cobre y los enlaces peptídicos.

### 4.1.4. Método de Lowry

El método de Lowry, *et al*, (1951) combina la reacción de Biuret con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico) por la oxidación de tirosina, triptofano, cisteína, cistina de las cadenas polipeptídicas (Nielsen, 1988). El proceso de óxido-reducción se acompaña de la formación de un color azul característico (**Ver Fig 10**).





### 4.1.6. Unión de colorantes

Controlando el pH y la fuerza iónica del medio, los grupos funcionales ácidos y básicos de las proteínas pueden interactuar con grupos orgánicos de carga opuesta. Al realizarse la unión, se presenta coloración o bien un cambio de ésta. Comúnmente se usan colorantes sulfonados, los cuales reaccionan a pH ácido con el grupo  $\alpha$ -amino de la lisina y el grupo guanidina de la arginina, el imidazol de la histidina y un número limitado de  $\alpha$ -amino terminales (Nollet, 1996).

En la **Tabla 4** se comparan las ventajas y desventajas de los métodos más comunes para la determinación de proteínas.

Método	Ventajas	Desventajas
Kjeldahl	<p>Es apropiado para varios tipos de productos.</p> <p>Su alta confiabilidad y disponibilidad.</p> <p>Esta incluido en los métodos aprobados por las organizaciones internacionales.</p>	<p>Puede presentarse interferencia de compuestos nitrogenados no proteicos.</p> <p>Durante la digestión se produce demasiado humo.</p> <p>Uso de catalizadores caros o tóxicos.</p> <p>Baja sensibilidad.</p> <p>Tarda demasiado tiempo.</p>
Absorción a 280 nm	<p>Rápida y no destructiva.</p> <p>No se necesitan reactivos.</p> <p>Alta sensibilidad.</p> <p>Baja dependencia de la respuesta de la señal a la composición del aminoácido.</p> <p>Baja interferencia de ácidos nucleicos y nucleótidos.</p>	<p>La interferencia de otros compuestos que absorban en UV.</p> <p>Se necesita usar muestras limpias y lámparas relativamente nuevas.</p>



Biuret	<p>No hay interferencia de aminoácidos libres.</p> <p>Pequeña influencia de la composición del aminoácido en el desarrollo de color.</p> <p>La operación es simple y se puede manejar número grande de muestras.</p>	<p>Interferencia de amoniaco, buffer, detergentes.</p> <p>Baja sensibilidad.</p>
Lowry	<p>Alta sensibilidad.</p> <p>Fácil de operar.</p> <p>Fácil de manejar un gran número de muestras.</p>	<p>Dependencia del color con la composición del aminoácido.</p> <p>Interfieren un gran número de compuestos.</p> <p>Inestabilidad del reactivo Folin-Ciocalteu a pH alcalino.</p>

Nollet, L. M. L (Ed); (1996). *Handbook of Food Analysis*; Marcel Dekker, Nueva York. Pág 285-286

#### 4.2. Extracción de proteínas (Método de Osborne y Mendel)

El método se fundamenta en la relación estructura-solubilidad de las proteínas. Por ejemplo, se sabe que la zeína que es soluble en un alcohol fuerte o en disoluciones alcalinas diluidas, pero es insoluble en agua o en soluciones neutras inorgánicas. Las glutelinas, por ejemplo, son insolubles en agua, en soluciones salinas y en alcohol, y bastante soluble, en sosa y potasa.

Es importante notar que la mayor parte de nitrógeno proveniente de proteínas es soluble en alcohol y en disoluciones alcalinas. Las globulinas, albúminas y prolinas son solubles en disoluciones alcalinas diluidas (Osborne, 1914).

## **4.3. Propiedades Funcionales de las Proteínas**

### **4.3.1. Capacidad de gelificación**

Cuando las proteínas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteica ordenada, al proceso se le denomina gelificación.

La gelificación es una propiedad funcional muy importante de algunas proteínas, se utiliza, no sólo para formar geles sólidos viscoelásticos, sino también para mejorar la absorción de agua, los efectos espesantes, la fijación de partículas (adhesión) y para estabilizar emulsiones y espumas (Fennema, 1993).

La capacidad de una proteína a gelificar depende de factores intrínsecos relacionados con las propiedades químicas, de las condiciones que afectan la velocidad de desnaturalización y de las interacciones subsecuentes de las cadenas desdobladas. Las proteínas grandes que tienen PM arriba de 60kDa y contienen más de 30 de residuos hidrofóbicos tienden a formar geles irreversibles tipo coágulo, debido a que pueden interactuar fácilmente con sus fragmentos hidrofóbicos; por ejemplo, hemoglobina y albúmina de huevo. Las proteínas que gelifican contienen grupos hidrofóbicos, por ejemplo proteínas de la soya y gelatina.

El mecanismo de gelificación se da en dos etapas. En la primera ocurre una disociación de la estructura cuaternaria y despliegamiento de la molécula de proteína (dependerá de la estabilidad térmica; la desnaturalización generalmente ocurre a temperaturas cercanas a 40°C). En la segunda etapa, usualmente a mayores temperaturas, las moléculas desnaturalizadas se reacomodan y forman una red tridimensional debido a interacciones de los grupos reactivos de las cadenas (Sikorski, 2001).

### **4.3.2. Capacidad de emulsificación**

La capacidad de las proteínas para actuar como surfactantes y emulsificantes, depende de su habilidad para adsorberse en una interfase agua-aceite.

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se encuentra bajo la forma de pequeñas gotas dispersas en el otro líquido que constituye la fase continua dispersante (Cheftel, *et al*, 1989).

Las proteínas se adsorben en la interfase entre las gotas de aceite disperso y la fase acuosa continua, y aportan propiedades físicas y reológicas (viscosidad, elasticidad, rigidez, etc.) que determinan resistencia a la coalescencia. Asimismo, según el pH, se puede producir la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos y esto aporta fuerzas de repulsión electrostática que favorece la estabilidad de la emulsión (Damodoran y Paraf, 1997).

### 4.3.3. Capacidad de espumado

Las espumas son sistemas coloidales, en el cual pequeñas burbujas de aire son dispersas en una fase acuosa. Muchos alimentos procesados, como crema batida, helado, pastel, merengues y malvaviscos, son productos obtenidos aplicando la propiedad funcional de formación de espuma. En esos productos, las proteínas son los agentes principalmente estabilizadores de la fase gaseosa dispersa.

Generalmente, las espumas se forman por burbujeo, agitación o batido de la solución de proteína. Las propiedades de espumado consideran dos aspectos *a)* la habilidad de producir un área en la interfase tal, que una gran cantidad de gas puede incorporarse en el líquido (comúnmente referido como espumado o capacidad de espumado), y *b)* la habilidad de formar una película determinada que pueda contrarrestar las fuerzas internas y externas (Yada, 2004).

La capacidad de espumado (CE) de una proteína se puede definir como (Damodoran y Paraf, 1997):

$$CE = \frac{\text{Vol. Espuma} - \text{Vol. líquido inicial}}{\text{Vol líquido inicial}} \times 100$$

### 4.3.4. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención del agua puede definirse como la cantidad de agua que se mantiene unida a la proteína hidratada, aun después de la aplicación de una fuerza externa como presión, o más comúnmente centrifugación (Theobaudin, *et al*, 1997). En este método se mide tanto el agua ligada (agua de hidratación, no congelable), como el agua capilar, retenida físicamente entre las moléculas proteicas. La concentración proteínica, el pH, la temperatura, el tiempo, la fuerza iónica y la presencia

de otros componentes afectan a las fuerzas que toman parte en las interacciones proteína-proteína y proteína-agua.

La fijación de agua por las proteínas desciende generalmente a medida que se eleva la temperatura, debido a la disminución de los puentes de hidrógeno. El calentamiento provoca la desnaturalización y la agregación, pudiendo esta última reducir el área superficial y el número de grupos amino polares disponibles para fijar agua. Por otro lado, cuando se calientan proteínas con una estructura muy compacta, la disociación y el desplegamiento ocasionados pueden exponer enlaces peptídicos y cadenas laterales polares previamente ocultas, lo que aumenta la fijación.

El tipo y la concentración de iones ejercen un considerable efecto sobre la absorción de agua. Generalmente, se establece una competencia en la interacción entre el agua, la sal y las cadenas laterales de los aminoácidos (Fennema, 1993).

# 5

## Análisis de Carbohidratos

### 5.1. Carbohidratos Totales

#### 5.1.1. Determinación por diferencia

Los carbohidratos pueden determinarse a partir del porcentaje remanente de la cuantificación de los principales componentes del alimento. Es decir:

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - \% \text{ humedad} - \% \text{ proteína} - \% \text{ lípidos} - \% \text{ minerales}$$

Sin embargo, este método podría obtener resultados erróneos debido a las fallas experimentales de la cuantificación del resto de los componentes. Por eso, es recomendable determinar la fracción de carbohidrato de interés para obtener mayor precisión (Nielsen, 1998).

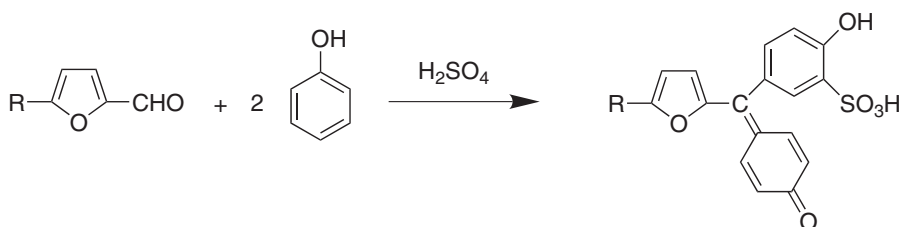
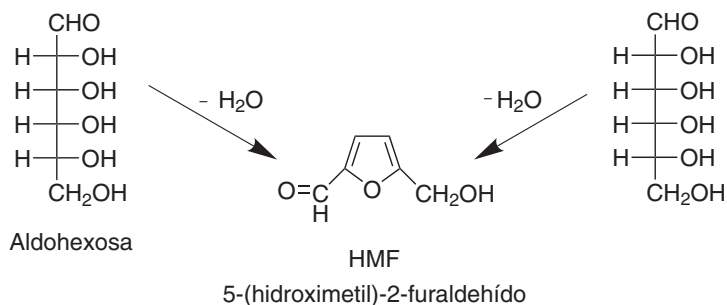
#### 5.1.2. Método de fenol-sulfúrico

Es un método espectrofotométrico propuesto por Dubois, *et al* en 1956. Se fundamenta en que los carbohidratos en medios fuertemente ácidos y altas temperaturas, sufren deshidrataciones simples y producen varios derivados del furano que se condensan con el fenol, dando origen a compuestos coloridos. Este método es fácil, eficaz y rápido.

Todos los azúcares, como oligosacáridos y polisacáridos, pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica, y depende de la estructura del azúcar; por lo tanto, se realiza una curva patrón (Nielsen, 1998).

Las reacciones que se llevan a cabo son:



## 5.2. Análisis de Polisacáridos

### 5.2.1. Extracción selectiva de almidón

Los dos tipos de moléculas que se pueden encontrar en el almidón difieren apreciablemente en sus solubilidades en disolventes acuosos. Por ejemplo, la extracción en agua caliente removerá una parte considerable de amilosa y dextrinas, dejando una parte de amilopectina (Southgate, 1991).

#### 5.2.1.1. Con cloruro de calcio

La extracción con cloruro de calcio ha sido utilizada ampliamente en el análisis de almidones en cereales por métodos polarimétricos, dando resultados reproducibles. Otros polisacáridos son solubles en este reactivo, y es necesario tener cuidado en la aplicación de este método a otros tipos de alimentos (Southgate, 1991).



### 5.2.1.2. Con ácido perclórico

El almidón se extrae de una muestra seca con ácido perclórico y se precipita como complejo yodurado el cual, se descompone antes de que se hidrolice el almidón. (Southgate, 1991).

### 5.2.1.3. Con etanol y ácido perclórico

El método se diseñó originalmente para cereales y envuelve la extracción de azúcares libres con etanol acuoso y la extracción del almidón con ácido perclórico del residuo, con métodos como el de antrona. (Southgate, 1991).

### 5.2.1.4. Con dimetil sulfóxido (DMSO)

El almidón se dispersa en DMSO y luego se convierte cuantitativamente en D-glucosa con  $\alpha$ -amilasa termoestable, llevando a cabo hidrólisis del almidón.

Una glucoamilasa completa la acción de la  $\alpha$ -amilasa para determinar la D-glucosa, usando un reactivo que contiene una parte incolora que se oxida a un compuesto colorido por medio del peróxido de hidrógeno proveniente de la glucosa (Nielsen, 1998).

## 5.2.2. Cuantificación de Almidón

### 5.2.2.1. Por hidrólisis ácida directa

La hidrólisis ácida del almidón da un rendimiento casi teórico de glucosa, y este proceso ha sido el principio de varios métodos analíticos.

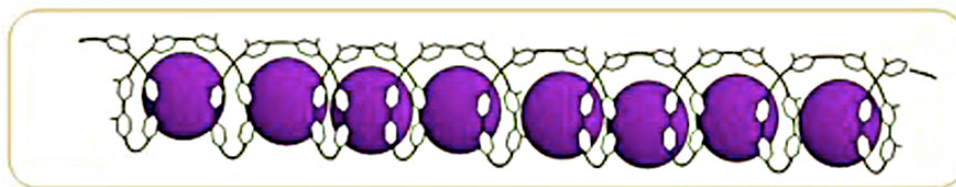
La fuerza del ácido utilizado para la hidrólisis puede variar pero se sabe que una disolución 0.2 M de ácido sulfúrico por cuatro horas en reflujo convierte el almidón en glucosa, de tal suerte que el uso de ácidos más fuertes es innecesario. La limitante del proceso es el contenido de proteínas y ácidos grasos en el alimento, ya que dan productos de condensación en estas condiciones (Southgate, 1991).

### 5.2.2.2. Por formación de complejos de inclusión con yodo

El almidón está formado por dos tipos de moléculas: Amilosa y amilopectina, la amilosa es una molécula lineal, en la cual la glucosa está unida por enlaces  $\alpha$ -1,4, se dispersa rápidamente en agua, pero las cadenas se recombinan y sufren un proceso de retrogradación. La amilosa forma complejos con el yodo y es responsable del color azul característico del complejo almidón-yodo. El complejo con yodo es del tipo de inclusión (**Ver Fig. 11**).

La molécula de amilopectina ha dado evidencia de no formar complejos estables con yodo, pero dan un color rojo pálido en su presencia. La proporción de amilosa y amilopectina en el almidón tiene efectos importantes en las propiedades físicas del almidón.

La determinación de amilosa en el almidón normalmente envuelve la formación de complejos con yodo y la titulación potenciométrica de yoduro (Southgate, 1991).



**Fig. 11.** Estructura esquemática del complejo de inclusión del yodo con la amilosa. La cadena de amilosa forma una hélice que rodea las unidades de  $I_3$ .

### 5.2.2.3. Por precipitación de complejos con yodo

El almidón se extrae de una muestra seca con ácido perclórico y se precipita como complejo yodurado, el cual se descompone antes de que se hidrolice el almidón. (Southgate, 1991).

### 5.2.3. Análisis de pectinas

Las soluciones pécticas son solubles en agua con una alta proporción de galacturonanos o galacturomananos, aunque también arabinanos, galactanos y arabinogalactanos han sido aislados de la fracción péctica de varias plantas.

Las soluciones pécticas incluyen polisacáridos que pueden ser extraídos con agua caliente. Es usual añadir un agente quelante como EDTA u oxalato de amonio al medio de extracción para liberar aquellas pectinas que están presentes como sales de calcio (Southgate, 1991).

#### 5.2.4. Determinación de fibra dietética

La fibra dietética se define como los polisacáridos y lignina que no son digeridos por enzimas humanas (Lee y Prosky, 1995).

Los métodos AOAC 985.29, y 993.21, (Horwitz, 2005) se fundamentan en aislar la fracción del interés con la precipitación selectiva y después determinar su peso. Una muestra gelatinizada de alimento seco, desengrasado se digiere enzimáticamente con alfa-amilasa, amiloglucosidasa y proteasa para hidrolizar al almidón y la proteína. El contenido total de la fibra de la muestra se determina agregando etanol a 95% a la solución para precipitar toda la fibra. La solución entonces se filtra, se recupera, se seca y se pesa, el residuo se reporta como fibra (Prosky, *et al*, 1984; Prosky, *et al*, 1985).

Alternativamente, los componentes solubles e insolubles en agua de la fibra pueden ser determinados filtrando la muestra enzimático-digerida (Método 991.43, Horwitz, 2005). La fibra soluble se encuentra en la solución del líquido filtrado, y la fibra insoluble en el residuo. El componente insoluble se recoge del filtro, se seca y se pesa. El componente soluble es precipitado de la solución agregando el alcohol del 95% al líquido filtrado, y entonces recuperado por la filtración, secado y pesado.

Ambas metodologías se corrigen determinando proteína y ceniza de las fracciones.

Estos métodos han sido reportados oficialmente por el AOAC y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para determinar el contenido de la fibra de una variedad de alimentos. Su desventaja principal es que tienden a sobrestimar el contenido de la fibra de los alimentos que contienen altas concentraciones de azúcares simples, por ejemplo, frutas deshidratadas, posiblemente porque estos carbohidratos son atrapados en los precipitados formados cuando se agrega el etanol.

## 5.3. Azúcares en Solución

Se requiere que al tratar estas muestras se remuevan sustancias que puedan interferir. Los pigmentos y otras sustancias coloridas interfieren con procedimientos colorimétricos y otros métodos, particularmente con los de reducción. Para decolorar se han utilizado una gran variedad de métodos, como el uso carbón activado y tratamientos con sales de plomo.

Cuando se usan sales de plomo, se debe evitar el uso de acetato de plomo básico para medidas polarimétricas, en cuyo caso se prefiere acetato de plomo neutro, éste se usa con una solución acuosa saturada y el exceso se elimina con oxalato de plomo u oxalato de sodio (Southgate, 1991).

### 5.3.1. Carbohidratos solubles totales

#### 5.3.1.1. Índice de refracción

Cuando la radiación electromagnética pasa de un medio a otro, cambia de dirección, se dobla o se refracta. La relación entre el ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción se llama índice de refracción (RI).

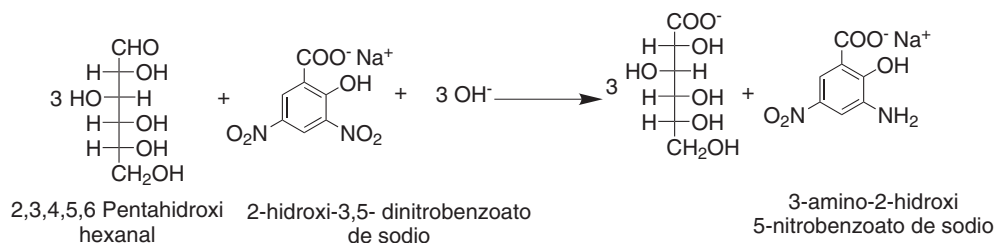
El RI varía con la naturaleza del compuesto, la temperatura, la longitud de onda de la luz y la concentración del compuesto. Si las tres primeras variables se hacen constantes la concentración del compuesto se puede determinar midiendo el RI, de tal forma que el RI se utiliza para determinar sólidos totales en disolución. El uso del RI para determinar concentraciones es preciso solamente para sacarosa pura u otras disoluciones puras, también se utiliza para obtener concentraciones aproximadas de azúcares para productos líquidos, en cuyo caso la solución debe ser clara. Los refractómetros pueden leer directamente en unidades de sacarosa (Nielsen, 1998).

### 5.3.2. Determinación de carbohidratos reductores

#### 5.3.2.1. Método ácido dinitrosalicílico (DNS)

En disolución alcalina, el azúcar se enoliza produciendo un compuesto que reduce a un grupo nitro del DNS, para dar el producto monoamino correspondiente. Esta reacción da un producto colorido en solución alcalina. El procedimiento original de Dahlquist ha sido modificado en un proceso automatizado para análisis de azúcares totales

producidos por la hidrólisis de polisacáridos que no contengan almidón. Para éste se requieren estándares similares a la muestra (Southgate, 1991). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Nielsen S. (ed); (1998) *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, USA

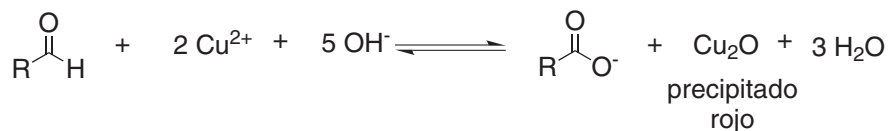
### 5.3.2.2. Método de Fehling

Cuando un azúcar reductor se calienta en condiciones básicas se degrada y algunos de los productos de degradación reducen los iones cúpricos para formar óxido cuproso. (Pomeranz y Meloan, 2000).

Se han utilizado para determinar azúcares reductores, una amplia variedad de métodos; Todos han sido variaciones del método de Fehling. Estas variaciones han sido para cada tipo de alimento; en cualquier caso, el principal logro de las modificaciones ha sido mejorar la precisión de reducción y eliminar cualquier factor que interfiera con la producción de óxido de cobre. De los factores estudiados, la alcalinidad del reactivo, la proporción, el tiempo de calentamiento, la concentración del azúcar, parecen ser los más importantes.

A partir de esto, diferentes técnicas han sido utilizadas para determinar el óxido cuproso que se forma y se han obtenido datos de calibración; de estos métodos los más usados son el método de Lane-Eynon y el método Munson y Walker.

En el método Lane-Eynon se titula con el reactivo de Fehling caliente en dos etapas. Primero se añade una cantidad de reactivo de Fehling tal, que se lleve a cabo la total reducción y después se determina el punto final con azul de metileno por goteo. Es necesario un control de la temperatura y se sugieren dos titulaciones (Pomeranz y Meloan, 2000). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



# 6

## Otras Determinaciones

### 6.1. Densidad Calórica

#### 6.1.1. Cálculo del valor calórico de los alimentos

Se puede calcular conociendo la composición del alimento (por ejemplo, a través de un análisis proximal) y el valor calórico de cada uno de los constituyentes (ver **Tabla 5**).

De un análisis proximal se obtiene: % humedad, % cenizas, % grasa, % proteína y % fibra. Los carbohidratos digeribles se obtienen por diferencia de estos componentes.

El valor energético del alimento está determinado por la suma del valor calórico de cada uno de sus constituyentes (James, 1999).

**Tabla 5.** Valor calórico de los componentes de los alimentos

Constituyente	kcal/g	kJ/g
Carbohidratos digeribles	4	17
Proteína	4	17
Grasa	9	37

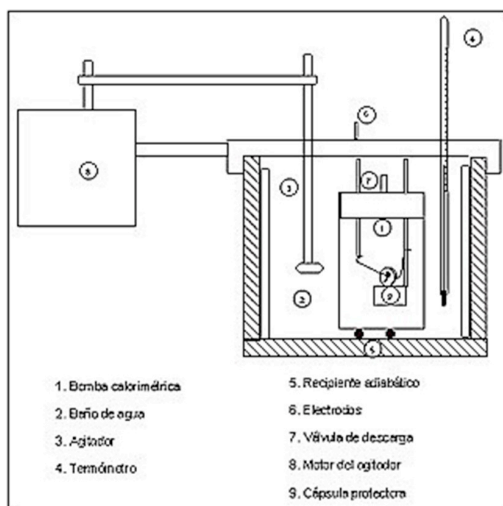
James, C.S; (1999) *Analytical Chemistry of Foods*, An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland. Pág 135.

## 6.1.2. Bomba calorimétrica

El aparato más importante para realizar la medición del valor calórico es la bomba calorimétrica adiabática (**ver Fig 12**). La reacción se inicia dentro de un recipiente a volumen constante (el que, si la reacción es una combustión, contiene oxígeno a una presión de 30 atm aproximadamente) y se registra la temperatura. La temperatura del baño de agua que rodea el recipiente se detecta simultáneamente y se ajusta al mismo valor: Esto elimina el gradiente de temperatura entre el calorímetro y sus alrededores (el baño) y elimina toda posible pérdida de calor (de ahí el nombre de calorímetro adiabático). El cambio producido por la reacción completa se transforma en calor de combustión utilizando la capacidad calorífica conocida del calorímetro.

Partiendo de esta elevación de temperatura y conociendo la cantidad de calor requerido para elevar en un grado la temperatura del calorímetro con su contenido, se puede calcular el calor de combustión por mol de sustancia quemada. Se procura que la variación de la temperatura sea pequeña utilizando para ello una gran masa de agua, de esta manera, la temperatura final de los productos de reacción queda próxima a la temperatura inicial de los reactivos.

El aparato se calibra con frecuencia contra un estándar (es decir, la combustión del ácido benzoico) [Atkins, 1985].



**Fig. 12.** Representación esquemática de la bomba calorimétrica.



# **PROCEDIMIENTOS**



# 7

## Determinación de Humedad

### 7.1. Método por secado en estufa

Pesar de 2 a 3 g de muestra en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 h a 130°C aprox.). Secar la muestra en la estufa 2 h a 100-110°C. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en el desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Repetir hasta peso constante (Nielsen, 2003).

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida por secado a 100-110°C.

### 7.2. Método por secado en estufa de vacío

Pesar de 2 a 3 g de muestra en un pesafiltro con tapa (previamente pesado después de tenerlo a peso constante 2 h a 130°C aprox.). Secar la muestra al menos por 24 h en la estufa conectada a vacío a una temperatura de 70°C como máximo. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y pesar tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Repetir la operación hasta peso constante (Nielsen, 2003).

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida por secado en estufa de vacío a 70±1°C.

### 7.3. Método de secado en Termobalanza

Pesar de 8 a 10 g de muestra y colocarlos en una charola de aluminio formando una capa lo más homogénea posible. Colocar la charola con muestra en el espacio destinado para ello en la termobalanza y encender el equipo. Registrar la pérdida de peso o, en su caso, el porcentaje de humedad (según el equipo) después de 10-15 min, o bien cuando ya no haya variación en la lectura (Kirk, *et al*, 1996).

Calcular el porcentaje de humedad.

**Nota:** Dependiendo del equipo, es necesario regular la intensidad de la lámpara para evitar que la muestra se queme y el resultado sea erróneo.

### 7.4. Método de destilación azeotrópica

Pesar 10-25 g de muestra en un matraz bola de 500 mL con junta esmerilada. Cubrir la muestra con tolueno (100 mL aprox.). Acople al matraz un colector para destilación azeotrópica y un refrigerante a este último, en posición de reflujo conectado al flujo de agua. Llene el vástago graduado del colector con el mismo solvente desde la parte superior del refrigerante. Destile lentamente al principio e incrementando la velocidad hasta que toda el agua haya sido destilada. Poco antes del final de la destilación, lave el refrigerante con un poco de disolvente desde la parte superior. Continúe la destilación hasta que ya no varíe la cantidad de agua destilada en el tubo colector. Lea el volumen directamente del tubo colector y calcule el porcentaje de humedad considerando la densidad del agua (Nielsen, 2003).

# 8

## Determinación de Minerales

### 8.1. Método cenizas totales (calcinación)

Colocar a peso constante un crisol 2 h aproximadamente en la mufla a 600°C.

Pesar de 3 a 5 g de muestra en el crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente pesado. Calcinarse la muestra, primeramente con un mechero en la campana hasta que no se desprendan humos, y posteriormente meter a la mufla 2 h cuidando que la temperatura no pase de 550°C. Repetir la operación anterior si es necesario, hasta conseguir unas cenizas blancas o ligeramente grises, homogéneas. Enfriar en desecador y pesar (Kirk, *et al*, 1996).

**Nota:** No colocar los crisoles calientes en la mesa de la mufla.

Calcular el porcentaje de cenizas.

### 8.2. Método cenizas totales (digestión húmeda)

Pesar 5 g de muestra en un vaso de precipitados, adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado, calentar durante una hora hasta la obtención de color traslúcido, enfriar, recuperar, filtrar en matraz aforado de 100 mL, aforar con agua.

Tomar una alícuota de 10 mL y colocarlo en un vaso de precipitados de 250 mL a peso constante, evaporar a sequedad, colocar en estufa hasta peso constante. Calcular

por diferencia de peso la cantidad de minerales en la alícuota y relacionarlo con el aforo total (NOM-117-SSA1-1994).

### **8.3. Determinación de minerales**

#### **8.3.1. Determinación de cloruros en la muestra. Método de Mohr**

Medir 10 mL de una solución al 1% de su muestra en un matraz Erlenmeyer de 150 mL, adicionar 15 mL de agua destilada y 1 mL de cromato de potasio al 5%; posteriormente, titular con una solución patrón de nitrato de plata 0.1N hasta que aparezca un precipitado seguido de un color rojo ladrillo que permanezca por lo menos 30 segundos. (Kirk, *et al*, 1996)

**NOTA.** En caso de que la solución problema presente sólidos en suspensión, filtre antes de realizar la determinación.

#### **8.3.2. Determinación de cloruros en las cenizas. Método de Mohr**

Obtener por calcinación a 500-550°C las cenizas. En un matraz cónico o en crisol de porcelana blanca lavar las cenizas con un mínimo de agua. Agregar 1 mL de solución de cromato de potasio al 5% y titular con solución 0.1M de nitrato de plata hasta que aparezca un color naranja (Nielsen, 2003).

Calcular el porcentaje de cloruros en las cenizas.

#### **8.3.3. Determinación de Fe en las cenizas**

Dilución de las cenizas: Al crisol frío añadir con pipeta y en la campana, 2mL de HCl concentrado para disolver las cenizas. Evaporar en la campana, enfriar añadir 1 mL de HCl conc. y 3.5 mL de agua destilada. Con un agitador de vidrio tratar de disolver las cenizas en su totalidad. Pasar cuantitativamente el líquido a un matraz aforado de 50 mL. Volver a lavar el crisol con agua dos o tres veces más, pasando los líquidos de lavado al matraz y después aforar.

Cuantificación de hierro: Filtrar la solución de cenizas y tomar alícuotas de 10 mL. Desarrollar el color añadiendo en el siguiente orden: 1 mL de solución clorhidrato de

hidroxilamina (al 10%) y agitar, 5 mL de buffer de acetatos y agitar, y 1 mL ortofenantrolina al 1% y agitar. Dejar en reposo entre 10 y 15 min. Leer a 530 nm frente a un blanco preparado con agua tratada de la misma manera. Es muy importante añadir los reactivos en el orden descrito.

La concentración de hierro se obtiene interpolando en una curva patrón preparada a partir de una solución de sulfato ferroso amoniacal tratada de la misma forma, en concentraciones de 0.01 a 0.1 mg/mL de hierro (NMX-F-503-1987).

#### **8.3.4. Determinación de calcio titulación con EDTA**

A 50 mL de muestra se añaden 2 mL de solución de hidróxido de sodio 1N o un volumen suficiente para obtener un pH de 12-13 y una punta de espátula de indicador, y se valora con solución de EDTA 0,01M hasta viraje de rosa a púrpura (APHA, 1995).





# 9

## Análisis de Lípidos

### 9.1. Extracción y Cuantificación de Lípidos

#### 9.1.1. Método de Soxhlet

Colocar a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100°C, aproximadamente 2 h.

Pesar de 4 a 5 g de muestra sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón (no apretar el algodón contra la muestra) y colocar el cartucho en el extractor.

Conectar el matraz al extractor, en el que se debe encontrar el cartucho con la muestra, y posteriormente conectar éste al refrigerante (no poner grasa en las juntas). Agregar dos cargas del disolvente (generalmente éter etílico) por el refrigerante y calentar el matraz con parrilla a ebullición suave. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

Una vez extraída toda la grasa, quitar el cartucho con la muestra desengrasada, seguir calentando hasta la casi total eliminación del disolvente, recuperándolo antes de que se descargue. Quitar el matraz y secar el extracto en la estufa a 100°C por 30 min, enfriar y pesar (James, 1999).

Calcular el porcentaje de grasa.

### 9.1.2. Método de Goldfisch

Colocar un vaso para Goldfisch en la estufa a 100°C hasta peso constante, aproximadamente 2 h.

Pesar de 4 a 5 g de muestra sobre un papel, enrollarlo y colocarlo en un cartucho de celulosa, tapar con un algodón. Situar el cartucho en un recipiente con el fondo perforado y colocarlo en el sostenedor del equipo.

Adicionar en el vaso para Goldfisch aproximadamente 40 mL del disolvente (éter etílico) y colocarlo en el equipo mediante un anillo de hierro con empaque de hule. Subir la parrilla girando hacia un lado y al contrario. Calentar hasta la extracción completa de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

Al finalizar, cambiar el sostenedor del cartucho por un recipiente sin perforación y calentar de nuevo para recuperar el disolvente del vaso.

Quitar el vaso del equipo y secar el extracto en una estufa a 100°C por 30 min, enfriar y pesar (Pomeranz y Meloan, 2000).

Calcular el porcentaje de grasa.

### 9.1.3. Método por lotes

Colocar a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100°C, aproximadamente 2 h.

Pesar de 5 a 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 40 mL de disolvente. Agitar durante 10 min, dejar sedimentar y filtrar la parte superior sobre el matraz bola.

Recuperar el residuo y adicionarle 40 mL del disolvente, agitar, dejar sedimentar y filtrar, juntar este filtrado con el anterior.

Repetir la extracción hasta la extracción total de la grasa. Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota del filtrado sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

Evaporar el disolvente en rotavapor, secar el extracto lipídico en la estufa a 100°C durante 30 min.

Calcular el porcentaje de grasa.

#### **9.1.4. Método Mojonnier**

Pesar 10 g de muestra y colocarla en el tubo de extracción Mojonnier, Adicionar 1 mL de hidróxido de amonio 0.88 y mezclar. Adicionar 10 mL de etanol, mezclar y enfriar.

Adicionar 25 mL de éter etílico, tapan el tubo y agitar vigorosamente por un minuto. Enfriar, adicionar 25 mL de éter de petróleo, agitar vigorosamente por 30 s. Dejar reposar por 30 min o hasta que esté completamente separada la fase orgánica. Si es necesario, adicione agua destilada para establecer una interfase entre los dos líquidos en la parte más angosta del tubo.

Decantar la fase etérea en un matraz bola previamente puesto a peso constante.

Repetir la extracción tres veces usando una mezcla de 5 mL de etanol, 25 mL de éter etílico y 25 mL de éter de petróleo. Adicionando el extracto en el matraz bola.

Evaporar el disolvente en rotavapor, secar el extracto lipídico en la estufa a 100°C durante 1 h y pesar (James, 1999).

Calcular el porcentaje de grasa.

#### **9.1.5. Método Rose-Gottlieb**

Colocar a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 100°C, aproximadamente 1 h.

A) Pretratamiento a la muestra.

- a) Leche. Pesar 10-11 g de muestra en un tubo Rose Gottlieb. Adicionar 1 mL de hidróxido de amonio 0.88 y mezclar. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente.
- b) Leche en polvo. Pesar 1g de muestra en un tubo de extracción Rose Glottlieb. Adicionar cuidadosamente 9 mL de agua y mezclar hasta que desaparezcan los grumos. Adicionar 1 mL de hidróxido de amonio 0.88 y mezclar. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente.
- c) Crema. Pesar 2g de muestra en un tubo de extracción Rose-Gottlieb. Adicionar 8 mL de una solución de cloruro de sodio 0.5% (m/v). Adicionar 1 mL de hidróxido de amonio 0.88 y mezclar. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente.
- d) Yogurt, helado y dulce de leche. Pesar 4 g de muestra en un tubo Rose-Gottlieb. Adicionar 6 mL de agua a 60°C, agitar hasta dispersar la muestra. Adicionar 1.5mL de hidróxido de amonio 0.88 y mezclar. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente.

B) Extracción de grasa.

Adicionar 10 mL de etanol, mezclar y enfriar. Adicionar 15 mL de éter etílico, tapar el tubo y agitar por un minuto. Enfriar, adicionar 15 mL de éter de petróleo y agitar por un minuto. Dejar reposar por 30-60 min o hasta que la capa etérea esté completamente separada.

Quitar el tapón, enjuagarlo y colocar el cuello del matraz con 5 mL de una mezcla de éter etílico: Éter de petróleo (1:1). Insertar el tubo sifón, recuperar el solvente en el matraz bola a peso constante, enjuagar el tubo sifón con solvente recuperando éste en el matraz. Repetir la extracción y lavados 2 veces.

Eliminar el disolvente en el rotavapor, secar el matraz por 1h a 100°C y pesar (James, 1999).

Calcular el contenido de grasa.

## 9.2. Caracterización de Lípidos

### 9.2.1. Índice de saponificación

Montar un equipo de reflujo en la campana, colocar en el matraz bola con boca esmerilada 2 g de lípidos y adicionar 25 mL de solución alcohólica de KOH 0.5 M. Llevar a ebullición suave y mantener durante 1 h. Adicionar 1 mL de solución de fenolftaleína (0.1%). Titular en caliente el exceso de álcali con ácido clorhídrico 0.5 N (Nielsen, 2003).

Calcular el índice de saponificación (mg KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos totales de un gramo de muestra).

### 9.2.2. Material insaponificable

Transferir el líquido titulado del índice de saponificación a un embudo de separación, usando 50 mL de agua para lavar el matraz. Extraer la solución con 50 mL de éter etílico, tres veces, juntar los extractos etéreos. Lavar dos veces con 20 mL de agua en un embudo de separación los extractos etéreos.

Deshidratar el extracto etéreo pasándolo por un filtro con sulfato de sodio anhidro. Recuperar el extracto etéreo en un matraz parado y evaporar el disolvente a presión reducida, hasta sequedad, utilizando un rotavapor.

Colocar el matraz en una estufa de secado a 70 °C, hasta llegar a peso constante (método AOAC 972.28F). Cuantificar el material in saponificable por gramo de muestra.

### 9.2.3. Índice de yodo (Método de Hanus)

Pesar de 0.1g a 0.5g de muestra en matraces de yodo. Adicionar 10 mL de diclorometano para disolver la grasa.

Preparar un blanco con 10 mL de diclorometano.

Pipetear 25 mL del reactivo de Hanus en el matraz. Dejar reposar por 30 min en la oscuridad, agitando ocasionalmente.

Adicionar 10 mL de KI al 15%, agitar vigorosamente. Adicionar 100mL de agua recientemente hervida y fría, enjuagando el tapón.

Titular el yodo con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio 0.1N adicionando gradualmente y con agitación vigorosa hasta que el color amarillo desaparezca. Adicionar 1mL de solución indicadora de almidón y continuar titulando hasta que desaparezca el color azul. Registrar el volumen gastado (Nielsen, 2003).

Reportar g de yodo absorbido por 100g de muestra.

#### **9.2.4. Peso específico**

Colocar un picnómetro a peso constante. Llenar con el aceite y colocarlo en un baño a 25°C por 30 min. Secar y pesar (Aurand, *et al*, 1987).

Referir el peso específico relacionando el peso del aceite al peso del agua a 25°C.

#### **9.2.5. Índice de refracción**

Se emplea un refractómetro, se realiza la prueba de 20-25°C para aceites y a 40°C para grasas. Se puede mantener la temperatura empleando un baño de agua a temperatura constante para que circule a través de los prismas.

Colocar la muestra en los prismas del refractómetro de campo, adecuadamente calibrado. Cierre la tapa, suavemente, la muestra debe cubrir completamente la superficie del prisma. Mirar la escala a través de la “mirilla”. Leer en la escala, en la intersección de los campos. En caso de que la separación de los campos no sea clara, ajustar moviendo la base del objetivo. Eliminar la muestra del prisma, utilizando un papel suave (Aurand, *et al*, 1987).

#### **9.2.6. Vitamina A. Método de Carr-Price**

Preparación de la muestra:

Saponificación. Se agregan 30 mL de etanol a 100 mg de muestra en un matraz de 250 mL. Posteriormente, se añade 10 mL de hidróxido de potasio (50g/50mL agua) y se somete a reflujo durante 30 min.

Extracción. Una vez saponificada la muestra, se deja enfriar a temperatura ambiente. Se extrae la fracción insaponificable en un embudo de separación con 4 ó 5 lavados de 30 mL de éter etílico. Se juntan los extractos etéreos y se lavan con agua destilada hasta que los lavados no den reacción con la fenoltaleína. El extracto etéreo se trata con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua.

Evaporación del disolvente. El extracto etéreo se evapora en el rotavapor.

Determinación:

Las lecturas se deben realizar 10 s después de haber agregado el reactivo de Carr-Price (tricloruro de antimonio al 20% en diclorometano o cloroformo).

En un tubo se colocan 0.5mL de solución problema, y se adicionan 5 mL del reactivo de Carr Price. Se lee en el espectofotómetro a 620nm (Aurand, *et al*, 1987).

Se prepara una curva estándar de 7-30UI/mL (mínimo 5 puntos) de la misma forma que la muestra.

### 9.2.7. Colesterol

Pesar 100 mg. de material lipídico y disolver en un volumen conocido de diclorometano. Colocar 0.2 mL en un tubo de ensaye. Adicionar con precaución 4 mL de anhídrido acético (6.33 M en ác. acético). Mezclar y dejar 10 min en reposo. Adicionar 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. y agitar con precaución. Dejar 30 min a temperatura ambiente. Leer contra un blanco de reactivos a 620 nm.

Preparar una curva patrón con colesterol en un intervalo de concentración de 0.2 -2 mg/mL. Mínimo cinco puntos. Llevar a cabo la reacción, como se mencionó anteriormente y leer a 620 nm (Kenny, 1952).

Calcular el contenido de colesterol por gramo de lípidos y por gramo de muestra.

### **9.3. Deterioro de Lípidos**

#### **9.3.1. Acidez titulable**

En un matraz Erlenmeyer de 125 ó 250 mL, colocar 0.5 g de lípidos y adicionar 25 mL de alcohol previamente neutralizado (utilizando fenolftaleína 0.1% como indicador). Calentar en un baño de agua en ebullición suave y titular en caliente con KOH 0.0025 N, agitando fuertemente después de cada adición de álcali (Nielsen, 2003).

Calcular el índice de acidez, como equivalentes de KOH por 100 g de aceite.

#### **9.3.2. Determinación de Índice de Peróxidos**

##### **9.3.2.1. Método volumétrico**

Pesar  $5.00 \pm 0.05$  g de aceite o grasa en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y agregar 25 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), disolviendo perfectamente. Adicionar 0.5 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y dejar reposar en la oscuridad durante 60 s, medidos con cronómetro.

Añadir 75 mL de agua desionizada hervida y fría, titular lentamente con tiosulfato de sodio 0.1 N. Si se gastan menos de 3 mL, diluir el titulante a 0.01 N. Agitar vigorosamente durante la titulación hasta obtener un color amarillo pálido. Adicionar 0.5 mL de solución de almidón indicador (almidón soluble al 1% en agua) y continuar la titulación hasta la desaparición del color azul por 30 seg.

El índice de peróxidos se obtiene calculando los miliequivalentes de tiosulfato utilizados en la titulación por kilogramo de muestra (método AOAC 965.33).

##### **9.3.2.2. Método Volumétrico-Micrométodo**

Pesar  $0.5 \pm 0.05$  g de aceite o grasa en un matraz Erlenmeyer de 125 o 250 mL y adicionar 2.5 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), disolviendo perfectamente. Agregar 0.05 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y dejar reposar en la oscuridad durante 60 seg, medidos con cronómetro.

Añadir 7.5 mL de agua desionizada hervida y fría, adicionar 0.1 mL de solución de almidón indicador (almidón soluble al 1% en agua). Si se presenta una coloración



azul oscuro (en toda la solución o en forma de puntos aislados) titular lentamente con tiosulfato de sodio 0.001 N hasta la desaparición total del color azul (Crowe y White, 2001).

El índice de peróxidos se obtiene calculando los miliequivalentes de tiosulfato utilizados en la titulación por kilogramo de muestra.

### 9.3.2.3. Método colorimétrico

Disolver una cantidad conocida de grasa o aceite en una mezcla de diclorometano/metanol (70:30).

Colocar el equivalente a 0.001-0.1 g de lípidos en un tubo de vidrio y llevarlo a 10 mL con el mismo disolvente. Adicionar 0.05 mL de una solución de tiocianato de amonio (30%), mezclar y medir la absorbancia a 500 nm frente a un blanco de disolventes (E<sub>0</sub>).

Adicionar 0.05 mL de solución de cloruro ferroso (FeCl<sub>2</sub>), al 0.35% con 2% de HCl 10M, mezclar y tomar el tiempo. Después de exactamente 5 min medir la absorbancia a 500 nm (E<sub>2</sub>).

Simultáneamente hacer una determinación del blanco (E<sub>1</sub>).

Preparar una curva de calibración con cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) en concentraciones que contengan entre 5 y 50 µg de Fe/10 mL (mínimo cinco puntos). Es importante mencionar que el FeCl<sub>3</sub> deberá encontrarse disuelto en la mezcla de disolventes. La curva se prepara mezclando 10 mL de cada dilución de FeCl<sub>3</sub> con 0.05 mL de tiocianato de amonio y 0.05 mL de HCl 0.2M, leyendo a la misma longitud de onda.

El índice de peróxidos (IP en mEq/Kg) se obtiene relacionando la cantidad de Fe, expresados como µg/10 mL obtenidos en la reacción, con el peso de la muestra. La cantidad de Fe se obtiene a partir de la curva de calibración, utilizando la absorbancia obtenida, una vez corregida por los blancos [E<sub>2</sub> - (E<sub>1</sub> + E<sub>0</sub>)] (Kirk, *et al*, 1996).

### 9.3.3. Índice de Kreis

Disolver de 50 a 500 mg de grasa en 5 mL de diclorometano. Añadir 10 mL de una solución de ácido tricloroacético al 30% en ácido acético glacial y 1 mL de floroglucinol al 1% en ácido acético. Agitar e incubar por 15 min, en un baño maría a 45°C, dejar enfriar y agregar 4 mL de etanol. Medir la absorbancia de la muestra a 540 nm frente a un blanco de reactivos (Holm y Greenbank, 1923).

El Índice de Kreis se calcula como Abs a 540 nm/g de grasa.

# 10

## Análisis de Proteínas

### 10.1. Determinación de Proteínas

#### 10.1.1. Proteína cruda

##### Método de Kjeldahl

##### Método Oficial AOAC 2001.11

#### Digestión

Pesar de 0.1-0.2g de muestra e introducir en un tubo de Kjeldahl, agregar 0.15g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5g de sulfato de potasio o sulfato de sodio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Encender el aparato y precalentar a la temperatura de 360°C. Colocar los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl y colocarlo en el bloque de calentamiento.

Ajustar la unidad de evacuación de gases con las juntas colocadas sobre los tubos de digestión.

Accionar la trampa de succión de gases antes de que se produzcan éstos. Calentar hasta total destrucción de la materia orgánica, es decir hasta que el líquido quede transparente, con una coloración azul verdosa.

Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases, colgar el portatubos para enfriar.

Después del enfriamiento, desconectar la trampa.

### **Destilación**

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL adicionar (según se indique) 50 mL de HCl 0.1N y unas gotas de indicador rojo de metilo 0.1%, o bien 50 mL de ácido bórico al 4% con indicadores.

Conectar el equipo de destilación y esperar unos instantes para que se genere vapor.

Colocar el tubo de digestión con la muestra diluida y las sales disueltas en un volumen no mayor de 10 mL de agua destilada, en el aparato de destilación cuidando de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución.

Adicionar sosa al 36% (hasta 40 mL aproximadamente). Encender el equipo de destilación hasta alcanzar un volumen de destilado en el matraz Erlenmeyer de 100-150 mL, lavar la alargadera con agua destilada, recoger el agua de lavado sobre el destilado. Una vez finalizada la destilación, regresar la palanca de vapor a la posición original.

Titular el exceso de ácido (en el caso de recibir el destilado en HCl 0.1N) con una solución de NaOH 0.1 N. En el caso de recibir con ácido bórico, con una solución de HCl 0.1N.

Calcular el % de proteína considerando las reacciones que se llevan a cabo.

#### **10.1.2. Absorción a 280 nm**

Colocar la solución problema debidamente diluida en una celda de cuarzo del espectrofotómetro, de 1 cm de paso, y determinar la absorbancia a 280 nm, usando como blanco la solución en que se encuentra preparada la muestra (Warburg y Christian, 1941).

La concentración de proteína se obtiene por referencia a una curva de calibración preparada con albúmina bovina sérica en concentraciones de 50 a 500  $\mu\text{g/mL}$ . Considerar mínimo 5 puntos.

### 10.1.3. Método de Biuret

Colocar 1 mL de la solución de proteína adecuadamente diluida en tubos de ensaye perfectamente etiquetados, y adicionar 4 mL del reactivo de Biuret.

Mezclar y dejar en reposo 30 min. a temperatura ambiente.

Determinar la absorbancia del color violeta producido a 540 nm contra un blanco preparado de la misma manera con 1 mL de la solución en que se encuentra diluida la muestra. (Gornall et al, 1949)

La concentración de proteína se obtiene por referencia a una curva de calibración preparada con albúmina bovina sérica con concentraciones de 1 a 10 mg/mL considerando mínimo cinco puntos.

### 10.1.4. Método de Lowry

Colocar 1 mL de la solución adecuadamente diluida en tubos de ensaye perfectamente etiquetados, y adicionar tomando el tiempo 3 mL del reactivo C preparado recientemente (50 mL de A y 2 de B)

Después de exactamente 10 min. adicionar a la mezcla 0.3 mL del reactivo D (1 parte de reactivo de Folin con 1 parte de agua), agitando inmediatamente.

Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 30 min.

Determinar la absorbancia del color azul producido a 750 nm contra un blanco preparado de la misma manera con 1 mL de agua, en vez de la solución problema. (Lowry, et al, 1951)

La concentración de proteína se calcula a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica en concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  considerando 5 puntos mínimo, tratadas de la misma manera con los reactivos.

### 10.1.5. Método turbidimétrico

Mezclar 1 mL de la solución problema con 4 mL de alguna de las siguientes soluciones:

- ácido sulfosalicílico al 2.5%
- ácido tricloroacético al 5%
- ferrocianuro de potasio 0.75% y adicionar una gota de ácido acético

Dejar reposar durante 10 min a temperatura ambiente.

Medir espectrofotométricamente la turbiedad a 600 nm, utilizando un blanco con 1 mL de agua tratada de la misma manera (Layne, 1957).

La concentración de proteínas se calcula a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica en concentraciones de 0.1 a 1.0 mg/mL considerando mínimo 5 puntos, tratadas de la misma manera con los reactivos.

### 10.1.6. Unión a colorantes Método de Bradford

Colocar en un tubo de ensaye perfectamente etiquetado, 0.1 mL de la muestra adecuadamente diluida. Adicionar 5.0 mL del reactivo de colorante Azul Brillante de Coomassie G-250.

Mezclar perfectamente, en vórtex o por inversión del tubo. Dejar reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Lea la absorbancia a 595 nm, frente a un blanco de reactivos (Nielsen, 2003).

La concentración de proteína se calcula a partir de una curva patrón preparada con una solución de albúmina bovina sérica de 1 a 10 mg/mL considerando 5 puntos, tratada de la misma manera que el problema.

## 10.2. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas mediante el proceso secuencial desarrollado por Osborne y Mendel en 1914 se basa en las diferencias de solubilidad entre las proteínas. Las fracciones proteínicas que se obtienen son: Albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en álcali diluido)

### 10.2.1. Albúminas

Pesar 100 g de harina desengrasada en un vaso de precipitados de 500 mL, agitar con 250 mL de agua desionizada por 1 h en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min. Recolectar el sobrenadante y lavar con 200 mL de agua el residuo siguiendo el mismo procedimiento. Unir los sobrenadantes y dializar contra agua por 24 h, cambiando por lo menos tres veces el agua, finalmente las proteínas se liofilizan. El residuo se utiliza para la extracción de globulinas.

### 10.2.2. Globulinas

Agregar al residuo 250 mL de solución salina (NaCl 0.5M) y agitar por 1 h en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min, separar el sobrenadante y lavar el residuo siguiendo el mismo procedimiento. Unir los sobrenadantes y dializar contra agua, finalmente las proteínas son liofilizadas. El residuo se utiliza para la extracción de prolaminas.

### 10.2.3. Prolaminas

Agregar 100 mL de la solución alcohólica (etanol al 70%-acetato de sodio 0.5%) al residuo anterior y agitar por 1 h, en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min. Colectar el sobrenadante y lavar dos veces más el residuo siguiendo el mismo procedimiento. Unir los sobrenadantes y dializar contra agua por 24 h, cambiando por lo menos tres veces el agua, finalmente las proteínas se liofilizan. El residuo de utiliza para la extracción de glutelinas.

## 10.2.4. Glutelinas

Agregar 100 mL de solución de etanol al 70%-acetato de sodio 0.5%-mercaptoetanol 0.1 M al residuo anterior y agitar por 30 min. Separar el sobrenadante y lavar el residuo dos veces más con la solución de etanol-acetato de sodio-mercaptoetanol. Se juntan los sobrenadantes y dializar contra agua (Osborne y Mendel, 1914).

## 10.3. Propiedades Funcionales

### 10.3.1. Capacidad de gelificación

Realizar ensayos de calentamiento de suspensiones proteínicas de concentración conocida. Observar el aspecto después de un tiempo determinado de tratamiento. Color, consistencia y textura del producto.

Para realizar esta determinación, sellar en ambos extremos con tapones de goma tubos de vidrio de 5 cm de largo y 8 mm de diámetro. Introducir un volumen de suspensión de 0.5 mL aproximadamente. Utilizar suspensiones de cada fracción proteínica al 10, 7.5 y 5% p/v. (Avanza y Añón, 2001)

Reportar en una tabla las características: si es viscoso o gel, si es opaco o traslúcido y el color.

### 10.3.2 Capacidad de emulsificación

La capacidad de emulsificación se define como el volumen de aceite (mL) que puede ser emulsificado por cada gramo de proteína, antes de que se produzca la inversión de fases.

Para efectuar este ensayo, agitar una disolución o dispersión de la proteína en agua (o en una disolución salina), mientras se va añadiendo, a ritmo constante, aceite o grasa fundida. La inversión de fases se detecta por la caída súbita de la viscosidad, el cambio de color o el incremento de la resistencia eléctrica (Fennema, 1993).



### 10.3.3 Capacidad de espumado

La capacidad de espumado se define como los mL de espuma generada por mL de líquido.

Para determinarla, se utiliza el siguiente procedimiento: 75 mL ( $V_i$ ) de soluciones al 3% (p/v) de cada una de las fracciones, mezclar por 3 min usando una licuadora de alta velocidad, verter en una probeta graduada e inmediatamente registrar el volumen de espuma ( $V_f$ ).

La capacidad de espumado (FC) se calcula de acuerdo a la siguiente expresión:

$$FC = V_f / V_i$$

(Ahmedna, *et al*, 1999)

### 10.3.4 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua se define como la cantidad de agua que permanece unida a la proteína hidratada después de la aplicación de una fuerza externa (presión, o más comúnmente, centrifugación).

Para cuantificar la cantidad de agua retenida por un peso conocido de proteína, se realiza el siguiente procedimiento:

Pesar 1 g de muestra y colocar en un tubo de centrifuga, adicionar 30 mL de agua destilada, agitar y dejar en reposo por 18 h. Después de este tiempo centrifugar a 3000rpm  $\times$  g por 20 min. Decantar el sobrenadante y pesar el residuo rehidratado, posteriormente secar y nuevamente pesar. La capacidad de retención de agua se expresa como la cantidad de agua retenida por gramo de muestra seca (Robertson, *et al*, 2000).



# 11

## Análisis de Carbohidratos

### 11.1 Carbohidratos Totales

#### 11.1.1 Método del fenol-sulfúrico

Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

En tubos de ensaye perfectamente etiquetados, colocar 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra.

Para cada tubo adicionar 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Mezclando perfectamente, adicionar cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado, homogeneizar.

**Nota:** Realizar todo el procedimiento para un tubo antes de seguir con el siguiente.

Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min.) y determinar la intensidad del color naranja obtenido en un colorímetro a 480 nm, frente a un blanco preparado de la misma manera utilizando agua (Dubois, *et al*, 1956).

Calcular la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con el carbohidrato de interés en el intervalo del método (10-100  $\mu\text{g}$  de glucosa/mL), mínimo 5 puntos, tratada de la misma manera que el problema.

## 11.2. Análisis de Polisacáridos

### 11.2.1. Determinación de fibra dietética (Método enzimático-gravimétrico)

#### Método AOAC 985.29

#### Reactivos Kit TDF (Total Dietary Fiber Assay Kit):

1.  $\alpha$ -amilasa termoestable. Producto Sigma A3306
2. Proteasa. Producto Sigma C7906
3. Amiloglucosidasa. Producto Sigma A9913
4. Celita. Producto Sigma C8656

#### Preparación de material:

Calentar los crisoles por una hora a 525°C y enfriar. Adicionar 0.5 g de celita a cada crisol y secar a 130°C hasta peso constante. Enfriar en desecador y pesar. Registrar el peso.

#### Preparación de la muestra:

Homogeneizar, secar y moler la muestra en un homogenizador.

Pasar por un tamiz de malla de 0,3 - 0,5 mm.

Extraer con éter de petróleo si el contenido de grasa es superior al 10 %, tres veces con porciones de 25 mL/g de muestra.

Anotar la pérdida de peso por la remoción de la grasa y considerarlo en el cálculo final.

#### Determinación:

Efectuar la determinación del blanco en duplicado y en las mismas condiciones descritas en el procedimiento para el análisis de muestras.

Pesar por duplicado alrededor de 1 g de muestra en un matraz de 500 mL. El peso de las muestras no debe diferir en más de 20 mg.

Adicionar 50 mL de buffer de fosfatos 0.08 M pH 6.0, Medir pH y ajustar a  $\text{pH } 6 \pm 0.2$  si es necesario.

Adicionar 0.1 mL de la solución de  $\alpha$ -amilasa. Cubrir el matraz con papel aluminio, colocarlo en un baño de agua y hervir durante 15 minutos. Agitar a intervalos de 5 minutos. El contenido debe llegar a 95-100 °C.

Enfriar la solución a temperatura ambiente.

Ajustar pH a  $7.5 \pm 0.2$  con aproximadamente 10 mL NaOH 0.275 N.

Adicionar 5 mg de proteasa (preparar una solución de proteasa de 50mg/mL y adicionar 0.1mL a cada matraz). Cubrir el matraz con papel aluminio e incubar 30 minutos a 60 °C con agitación continua.

Enfriar y añadir 10 mL de HCl 0.325 N.

Medir el pH y ajustar a 4.0 - 4.6.

Añadir 0.1 mL amiloglucosidasa, cubrir con papel aluminio e incubar 30 minutos a 60 °C con agitación continua.

Adicionar 280 mL de etanol al 95 % precalentado a 60 °C.

Dejar precipitar a temperatura ambiente por 60 minutos.

Pesar el crisol que contiene celita, humedecerlo y redistribuir el celita en el crisol usando etanol al 78 % y aplicar succión.

Mantener la succión y transferir cuantitativamente el precipitado al crisol.

Lavar el residuo sucesivamente con tres porciones de 20 mL de etanol al 78 %, dos porciones de 10 mL de etanol al 95 % y dos porciones de 10 mL de acetona. Se puede formar goma con algunas muestras, atrapando el líquido. Si así fuera, rompa la película

de la superficie con espátula para mejorar el filtrado. El tiempo de filtración y lavado variará de 0,1 a 6 horas, con un promedio de 1 1/2 hora por muestra. Se pueden evitar tiempos largos de filtración, mediante una succión intermitente y cuidadosa.

Secar el crisol que contiene el residuo durante la noche en estufa de vacío a 70 °C o en estufa de aire a 105 °C.

Enfriar en desecador y pesar. Restar el peso del crisol y de la celita para determinar el peso del residuo.

Analizar proteínas usando N x 6,25 como factor de conversión en el residuo de una de las muestras de los duplicados.

Calcinar el residuo de la segunda muestra del duplicado durante 5 horas a 525 °C. Enfriar en desecador y pesar.

Restar el peso del crisol y de la celita para determinar cenizas. Efectuar la determinación del blanco en duplicado y en las mismas condiciones descritas en el procedimiento para el análisis de muestras.

Corregir el residuo restándole las cenizas, proteína y blanco correspondiente.

## **11.2.2. Almidón**

### **11.2.2.1. Extracción selectiva de almidón**

#### **11.2.2.1.1. Con cloruro de calcio (recomendado para el análisis polarométrico del almidón)**

Colocar 2-50g de muestra en un matraz Erlenmeyer y formar una pasta con 10 mL de agua. Adicionar 50 mL de solución de cloruro de calcio ácida (620 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 180 mL de agua, con 18 g de acetato de sodio trihidratado en 20 mL de agua, ajustar el pH a 2-3 con ácido acético) y calentar en autoclave a 120 °C por 10 min.

Enfriar la mezcla en un baño de agua fría y transferir a un matraz aforado de 100 mL, utilizando solución de cloruro de calcio hasta un volumen cercano a 90 mL. Adicionar 2 mL de reactivo de Carrez I y mezclar bien, adicionar 2 mL de solución de Carrez II, agitar nuevamente y llevar a la marca con solución de cloruro de calcio.

Filtrar a través de papel Whatman No. 541, el filtrado debe ser claro. En esta solución se encuentra el almidón disuelto.

#### **11.2.2.1.2. Con ácido perclórico (recomendado para la formación de un complejo insoluble con yodo)**

Colocar 50-250 mg de muestra seca en un tubo de ensaye con un poco de arena y adicionar 4 mL de agua. Calentar en un baño de agua hirviendo el tubo por 15 min., hasta gelatinizar el almidón. Enfriar el tubo a temperatura ambiente y adicionar rápidamente con agitación 3 mL de solución de ácido perclórico al 72%.

Dispersar la muestra con una varilla de vidrio durante un minuto, repetir la operación varias veces durante 15-20 min. Enjuagar con 20 mL de agua la varilla, recuperando en el tubo, centrifugar y decantar el sobrenadante.

Realizar una vez más la extracción en el residuo, con 4 mL de agua y 3 mL de ácido perclórico.

Combinar los sobrenadantes y llevarlos a un volumen de 50 mL con agua. Se recomienda analizar inmediatamente.

#### **11.2.2.1.3. Con etanol y ácido perclórico (recomendado para realizar una reacción con antrona o fenol-sulfúrico)**

Pesar aproximadamente 0.2 g de muestra sólida finamente molida y colocar en un tubo de centrifuga de 50 mL, adicionar dos gotas de etanol al 80% (v/v) para humedecer la muestra. Adicionar 5 mL de agua y agitar.

Adicionar 25 mL de etanol al 80% caliente, agitar y dejar reposar 5 min. Centrifugar, decantar el sobrenadante y repetir la extracción con 30 mL de etanol al 80%. En solución se encuentran los azúcares y para su análisis es necesario eliminar el alcohol por evaporación a presión reducida.

Adicionar 5 mL de agua a la porción insoluble, posteriormente 65 mL de solución de ácido perclórico al 52% (v/v), agitar la mezcla. Continuar la agitación por 15 min, después adicionar 20 mL de agua, centrifugar. Decantar el sobrenadante en un matraz

aforado de 100 mL y re-extraer el residuo como se indico previamente. Mezclar los extractos y llevar a la marca con agua, filtrar la solución si presenta partículas.

Las soluciones obtenidas pueden ser analizadas con métodos como el de antrona para cuantificar los carbohidratos totales, adjudicando el valor del extracto con ácido perclórico al almidón y el obtenido con etanol a los azúcares solubles.

#### **11.2.2.1.4. Con dimetil sulfóxido (DMSO) (recomendado para preparar extractos sometidos a hidrólisis con amiloglucosidasa)**

Mezclar porciones de aproximadamente 100 mg de muestra finamente dividida con 20 mL de DMSO y 5 mL de HCl 8M, calentar en un baño de agua a 60°C por 30 min. Diluir a 50 mL con agua y neutralizar con NaOH 5M.

Enfriar a temperatura ambiente y aforar a 100 mL. Filtrar si la solución no es clara.

Esta solución puede ser utilizada directamente para tratamiento con amiloglucosidasa para cuantificar la glucosa formada (Southgate, 1991).

### **11.2.2.2. Cuantificación de almidón**

#### **11.2.2.2.1. Por hidrólisis ácida directa**

Este procedimiento puede ser usado cuando se sabe que sólo se encuentran presentes almidón (y dextrinas), y cuando se permite un bajo nivel de precisión.

La muestra debe estar finamente molida o dispersa, para que se puedan tomar alícuotas representativas. Es recomendable eliminar la posible presencia de azúcares, por lo que se puede utilizar el residuo insoluble en etanol al 80%.

Colocar 100-500 mg de muestra en un matraz de bola de fondo plano de 1L y agregar 450 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.18M. Colocar a ebullición en reflujo por 4 h, asegurando que todas las partículas se encuentran inmersas en la solución de ácido, para ello a los 30 min enjuagar las paredes del matraz con la solución, realizar agitación leve, repetir esta operación las veces que sean necesarias.



Enfriar a temperatura ambiente una vez concluida la hidrólisis y neutralizar parcialmente con una solución de hidróxido de sodio 10M (aprox. 15 mL), llevar a un volumen de 500 mL. Filtrar y neutralizar completamente con carbonato de sodio sólido.

Cuantificar la glucosa liberada por la hidrólisis.

#### **11.2.2.2. Por precipitación de complejos con yodo**

Se recomienda utilizar el extracto obtenido por solubilización con ácido perclórico. Transferir una porción del extracto de ácido perclórico (1 a 10 mL) a un tubo calibrado a 10, 15 y 20 mL, y diluir a 10 mL.

Adicionar 2 mL de una solución de cloruro de sodio 20% (p/v), seguida de 2 mL de solución de I/KI al 3%. Dejar reposar 20 min.

Centrifugar y eliminar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 5 mL de solución de cloruro de sodio alcohólica y lavar por centrifugación.

El almidón se cuantifica gravimétricamente o descomponiendo el complejo en medio alcalino y cuantificando con un método como el de antrona o fenol-sulfúrico. Asimismo el almidón liberado puede ser sometido a hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa y cuantificar la glucosa liberada.

#### **11.2.2.3. Por formación de complejos de inclusión con yodo**

Este procedimiento únicamente puede ser utilizado cuando el almidón se encuentra completamente disuelto (gelatinizado).

Colocar 2 mL de la solución de almidón en un tubo de ensayo y adicionar 3mL de una solución de I/KI preparada diluyendo 2 mL de solución de yodo a 100 mL con agua.

Medir la intensidad del color azul producido en un espectrofotómetro a 600 nm, frente a un blanco de reactivos.

Calcular la cantidad de almidón presente en la muestra a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 0.02-0.2 mg de almidón soluble/mL, tratada de la misma manera que el problema.

Los resultados de esta determinación son relativos, ya que no todas las fuentes de almidón forman el mismo complejo colorido con yodo (Nielsen, 1998).

### **11.2.3. Análisis de pectinas**

Colocar 3 g de muestra desengrasada, de preferencia con etanol/benceno, en un embudo con filtro de vidrio poroso y extraer con una solución al 0.5% (p/v) de oxalato de amonio durante 2 hr. a 85°C. Repetir la extracción cuatro veces.

Combinar los filtrados y acidificar ligeramente con HCl 1M. Adicionar 4 volúmenes de etanol con agitación y dejar sedimentar el precipitado. Decantar el sobrenadante sobre un embudo con filtro de vidrio poroso previamente colocado a peso constante. Transfiera el precipitado al embudo y lave con etanol al 70% ligeramente acidificado con HCl, seguido de etanol y terminando con acetona.

Colocar el embudo en la estufa a 100°C hasta secar completamente, enfriar y pesar. El residuo corresponde a las sustancias pécticas (Nielsen, 1998).

## **11.3. Azúcares en solución**

### **11.3.1. Preparación de la muestra**

Si las soluciones de azúcares tienen partículas en suspensión, se requiere eliminarlas por filtración en papel Whatman Núm. 1.

Para muestras sólidas se recomienda disolver una cantidad conocida en un volumen exacto de agua y filtrar, en caso de presentarse material insoluble.

Cuando las muestras son turbias o muy coloridas, se requiere de clarificación, para lo cual tomar una alícuota (entre 10 y 50 mL, dependiendo de la cantidad de azúcares que contienen), y colocar en un matraz aforado de 100 mL. Diluir aproximadamente 50 mL y tratar con 1 mL de solución saturada de acetato de plomo, diluir al volumen y filtrar sobre papel Whatman Núm. 1, recuperando una solución clara. Para eliminar

el exceso de plomo, adicionar oxalato de sodio o potasio sólido, mezclar y filtrar nuevamente, descartando los primeros mL (Southgate, 1991).

### **11.3.2. Carbohidratos solubles totales**

#### **11.3.2.1. Medición por índice de refracción**

Colocar una o dos gotas de la solución en el prisma del refractómetro de campo, adecuadamente calibrado. Cierre la tapa, suavemente, la muestra debe cubrir completamente la superficie del prisma. Mirar la escala a través de la “mirilla”. Leer en la escala, en la intersección de los campos. En caso de que la separación de los campos no sea clara, ajustar moviendo la base del objetivo. Eliminar la muestra del prisma, utilizando un papel suave húmedo.

Los refractómetros ATC-1 y N10 solamente se calibran a 0%, colocando unas gotas de agua destilada en el prisma. Si la separación de los campos no marca 0%, en la escala, ajustar girando el tornillo que se encuentra en la parte superior de la base del prisma (James, 1999).

### **11.3.3. Determinación de carbohidratos reductores**

#### **11.3.3.1. Método ácido dinitrosalicílico (DNS)**

Tomar 1 mL de la solución acuosa de la muestra, adicionar 1 mL del reactivo de DNS y calentar por 5 min en un baño de agua hirviente, enfriar y diluir con 10 mL de agua destilada. Leer la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado igual que la muestra.

Cuantificar los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar preparada con el carbohidrato reductor de interés, en concentraciones de 0.2 a 2 mg/mL. Mínimo 5 puntos (Nielsen, 2003).

#### **11.3.3.2. Método de Fehling**

Mezclar en un matraz Erlenmeyer 2.5 mL de solución A y 2.5 mL del reactivo B y agregar 50 mL de agua destilada.

Calentar a ebullición (con un mechero o una plancha de calentamiento) y sin quitar de la fuente de calentamiento, añadir con bureta la solución con los carbohidratos reductores, de tal manera que sólo falte agregar de 0.5 a 1 mL para terminar la titulación, para lo que deberá realizarse una prueba inicial y agregue 0.5 mL de indicador de azul de metileno. Todo el proceso debe realizarse en menos de 3 min.

Las soluciones deberán tener una concentración tal, que se requiera más de 10 mL y menos de 40 mL para reducir todo el cobre del reactivo de Fehling, si se usa una bureta de 50 mL

Titular el reactivo de Fehling de igual forma, empleando una solución estándar para obtener el factor correspondiente, que debe ser expresado como gramos del carbohidrato que reduce todo el cobre en las condiciones de trabajo (Aurand, *et al*, 1987).

# 12

## Otras Determinaciones

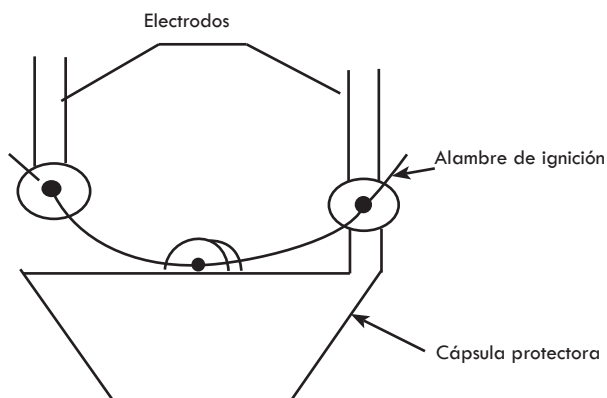
### 12.1.1. Determinación de densidad calórica

La muestra debe ser lo más representativa del total, para lo cual se recomienda esté finamente molida. Si se trata de una muestra de baja humedad ( $< 10\%$ ), como harinas o similares, se puede determinar el contenido calórico directamente. Si por el contrario se tiene una muestra líquida o semisólida, será necesario someterla a secado de preferencia en estufa de vacío, y determinar el contenido de humedad para poder expresar el resultado en la muestra original.

La cantidad de muestra depende del contenido calórico esperado, ya que se recomienda que la cantidad pesada libere aproximadamente 16 KJ (4.0 kcal), para que entre en el intervalo de detección del instrumento. Materiales con alta densidad calórica, como grasas con 0.4 g de muestra, será suficiente; mientras que para muestras con baja densidad como la urea, se requerirá hasta de 1.5 g de material.

La muestra en forma de harina se coloca en un crisol tarado junto con la mecha de algodón, de tal manera que el hilo quede introducido dentro de la muestra y se procede a pesar en una balanza analítica lo que corresponda al peso preliminar (Pp), recomendándose pesar un exceso aproximado del 10 % del peso deseado. Se compacta la muestra con el mango metálico, de tal forma que quede lo más uniforme posible y la mecha quede introducida dentro de la muestra, sobrando un tramo que servirá para contactar con el alambre de ignición de la bomba. Se debe eliminar con mucho cuidado el material que no se haya compactado, y el crisol con la muestra compactada se pesa nuevamente para tener el peso final (Pf).

El crisol se coloca en la base superior del pilar central de la bomba, y con mucho cuidado se introduce la punta suelta de la mecha de algodón en el alambre de ignición (ver Fig.13).



**Fig. 13.** Representación esquemática de colocación del alambre de ignición.

Se procede a realizar la combustión, para lo cual se debe revisar que el “O-RING” se encuentre en perfectas condiciones, ya que se debe obtener un cierre hermético. El cierre se realiza colocando el capuchón de la bomba sobre el anillo metálico y se gire éste hasta que coincida la rosca con el del capuchón; el sellado se debe hacer con la fuerza de la mano, no utilizar herramienta alguna. En seguida se coloca el sensor del termopar en el orificio del capuchón.

Teniendo suministro de oxígeno a presión (cilindro con mínimo 30 bars), se procede a abrir la válvula de paso girando de  $\frac{1}{4}$  a  $\frac{1}{2}$  la perilla, y se debe obtener una presión dentro de la bomba balística de 25 bars (1 bar = 0.987 atm) en aproximadamente 20 a 30 s. Una vez alcanzada la presión, se cierra la válvula de paso y se procede a ajustar el galvanómetro, primero con la ayuda del ajuste grueso y posteriormente con el dispositivo de ajuste fino. Si las condiciones anteriores se mantienen por aproximadamente 10 s, se oprime el botón de ignición y en 10 a 15 s se lleva a cabo la combustión, notándose por un aumento en la presión del manómetro, que a su vez se traduce en una señal en la escala del galvanómetro, ya que una vez alcanzado el valor máximo empieza a decaer rápidamente. La lectura máxima obtenida en el galvanómetro, es directamente proporcional al calor liberado en la combustión.

Una vez tomada la lectura, se abre la válvula de salida de los gases de combustión, la cual se localiza en la base de la bomba del lado opuesto a la entrada del oxígeno; a su vez, se desconecta el sensor del termopar y una vez liberados los gases de combustión, se procede a abrir la bomba girando el anillo metálico en sentido inverso al cierre. Por último, cierre la válvula de liberación de gases y enfríe el capuchón de la bomba en un baño de agua fría hasta temperatura ambiente, para poder realizar una nueva determinación.

## Cálculos

Para calcular la densidad calórica de la muestra, es necesario contar con una curva estándar, para la cual se debe realizar la combustión de diferentes pesos de ácido benzoico y anotar la respectiva lectura del galvanómetro. Se recomienda pesar entre 0.1 a 0.7g de ácido benzoico (valor calórico certificado); además, será necesario llevar acabo la combustión exclusiva de la mecha de algodón, ya que el valor obtenido se debe restar, o la escala del galvanómetro se puede ajustar para obtener la lectura en forma directa.

Es necesario realizar la determinación mínimo por triplicado, y una vez obtenida la lectura, convertir a unidades energéticas, para lo cual tenemos las siguientes conversiones:

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ g de ácido benzoico} & = & 26,454.3 \text{ J} = 26.45 \text{ KJ} \\ 4.1868 \text{ KJ} & & = 1 \text{ Kcal} \end{array}$$

Una vez que se cuente con la curva estándar de contenido calórico (abscisas) en función de la lectura del galvanómetro (ordenadas), se podrá obtener por interpolación la densidad calórica de la muestra. La determinación calórica en la bomba calorimétrica da la máxima energía potencial, que en términos fisicoquímicos corresponde al calor de combustión del respectivo material.

Por sí mismo el término de energía gruesa (EG) no tiene un valor práctico desde el punto de vista alimenticio, ya que los términos de mayor aplicación son aquellos que nos dan la energía biodisponible, como es el caso de la energía metabolizable (EM). No obstante, varios investigadores han realizado estudios bastante completos y representativos en alimentación humana y animal, de los cuales se han podido

derivar ecuaciones relativamente sencillas, que nos pueden estimar con cierta exactitud, términos energéticos de aplicación práctica.

A continuación, se tienen algunas fórmulas que pueden estimar con cierta aproximación, términos energéticos biológicos a partir de la EG, digestibilidad aparente y composición química de los Alimentos o dieta.

$$\text{TND} = (\text{g proteína} / \text{g dieta}) + (\text{g CHO's} / \text{g dieta}) + [2.25 * (\text{g lípidos} / \text{g dieta})]$$

$$\text{ED} = \text{TND} \times 18.42$$

$$\text{EM} = 0.95 \text{ EG} - 31.88 \text{ N}$$

$$\text{EM} = [(0.95 - \text{F}) \text{ EG}] - 31.4 \text{ N}$$

Donde:

TND: Total de nutrientes digeribles

EM: Energía metabolizable (KJ/g)

EG: Energía gruesa (KJ/g)

ED: Energía digerible (KJ/g)

N: Nitrógeno (g N/ g de alimento)

F: Fibra dietética (g fibra/ g de alimento)

La penúltima fórmula se usa para dietas que tengan un contenido bajo de fibra (< de una ingesta de 30 g de fibra/ día); mientras que la última puede ser empleada para cualquier tipo de dieta, pero se debe contar con el dato de contenido de fibra.



# 13 Bibliografía

- Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W. & Rao R.M. (1999) “Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potential food applications”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:1340-1345.
- APHA, AWWA, WEF. (1995). *Standard methods for the examination of water and waste water*. 19th edition. Washington.
- Atkins, P. (1985). *Físico-Química*, Fondo Educativo Interamericano, México.
- Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. (1987). *Food Composition and Analysis*. An AVI Book, New York.
- Avanza, M & Añón, M (2001). Proteínas funcionales de proteínas de amaranto: Capacidad de gelificación. *IWT*, 48:81-88.
- Boekenoogen, H. A. (1964). *Analysis and characterization of oils, fat, and fat products*; London, UK.
- Boumans, H., Van Gaalen, M.C.M., Grivell, L.A. & Berden, A. (1997). “Differential Inhibition of the Yeast bc1 Complex by Phenanthrolines and Ferroin”. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 2, 19753-19760.

- Burke, R. W; Diamondstone B. I; Velapoldi R. A. & Menis O.; (1974), "Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol", *Clinical Chemistry* 20, 7, 794-801
- Cheftel, J.C; Cuq, J.L. & Lorient, D., (1989), *Proteínas alimentarias*, Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Crowe T. D. & White P. J. (2001). "Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples". *Journal of the American Oil Chemical Society*. 78, 2, 1267-1269
- Damodoran, S. & Paraf, A. (Ed) (1997). *Food Proteins and their applications*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A & Smith, F. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356
- Fennema O.; (1993). *Química de alimentos*; Acribia, segunda edición; España
- Gornall, A.G; Bardawill, Ch. J. & David, M.M. (1949). "Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction". *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766
- Nollet, L. M. L (Ed). (1996). *Handbook of Food Analysis*, M. Dekker, New York, USA.
- Hart F. L; (1991). *Análisis moderno de los alimentos*; Acribia. Zaragoza, España.
- Hoffmann, G.; (1989). *The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products*; Academia Press, Londres
- Holm, G.E. & Greenbank, G.R. (1923) "Quantitative Aspects of the Kreis Test", *Industrial and Engineering Chemistry*, 12, 1051
- Horwitz, W. (Ed). (2005). *Official methods of Analysis of AOAC International*, 18th edition, AOAC International, Maryland, USA

- James, C.S; (1999) *Analytical Chemistry of Foods: An Aspen Publication*, Gaithersburg, Maryland.
- Jiang, Zhen-Yue; Hunt, J.V. & Wolff, SP. (1992). "Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein", *Analytical Biochemistry*, 202, 384-389
- Kenny A. P (1952). "The Determination of Cholesterol by the Liebermann-Burchard Reaction", *Biochemical Journal*, 52(4): 611–619.
- Kirk R. S., Sawyer R & Egan, H. (1996). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*, segunda edición; Compañía editorial continental, SA de CV, México.
- Layne E. (1957). "Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins". *Methods in Enzimology*, 3:447-454.
- Lee, S.C. y Prosky, L. (1995). "International survey on dietary fiber: definition, analysis and reference materials". *Journal of Association Official Analytical Chemists International* 78:22-36.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Servicio de publicaciones (Ed). 1985, *Análisis de Alimentos*. Colección Fomento de Calidad. Madrid.
- Nielsen S. (Ed); (1998). *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Nielsen S. (Ed); (2003). *Food Analysis Laboratory Manual*; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
- Osborne T. B; Mendel L. B. (1914). "Nutritive properties of proteins of the maize kernel". *Journal of Biological Chemistry*, 18, 1,
- Pearson. D; (1993). *Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos*; Acribia, S.A. Zaragoza (España).

- Pomeranz Y. & Meloan C. E.; (2000). *Food Analysis Theory and Practice*, Third Edition; Chapman & Hall, USA.
- Prosky, L., Asp, N.G; Furda, I; Devries, J.W; Swheizer, T.F; & Harland, B.F; (1984), Determination of Total Dietary Fiber in Foods, Food Products and Total Diets: Interlaboratory Study, *Journal of Association Official Analytical Chemists International*, 67,6:1044-1052.
- Prosky, L., Asp, N.G; Furda, I; Devries, J.W; Swheizer, T.F; & Harland, B.F; (1985), Determination of Total Dietary Fiber in Foods, Food Products: Collaborative Study, *Journal of Association Official Analytical Chemists International*, 68,4:677-679
- Robertson, J.A., Monredon, F.D., Dyssele, P., Guillon, F., Amdó, R. & Thibault, J.F. (2000). *Hydration properties of dietary fiber and resistant starch: a European Collaborative Study*. IWT, 33: 73-79.
- Rossell J.B., Pritchard J. L.R; (1991). *Analysis of Oilseeds, fats and Fatty Foods*; Elsevier Science Publishers Ltd, Irlanda.
- Sikorski, Z.E. (2001). *Chemical and functional properties of Food Proteins*. A Technomic Publishing Company, Pennsylvania, USA.
- SECOFI; 1987, NMX-F-503-1987. *Ingenios azucareros-determinación de fierro en muestras de azúcares*.
- Southgate, D.A.T.(1991). *Determination of Food Carbohydrates*, Second Edition; Elsevier Applied Science, New York, USA.
- SSA, 1994, NOM-117-SSA1-1994, *Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica*. México

SSA/SECOFI; (2002), NOM-187-SSA1/SCFI-2002. *Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba.*

Theobaudin, J.Y; Lefebvre, A.C; Harrington, M. & Bougeois, C.M. (1997). Dietary fibres: Nutritional and Technological interest. *Food Science and Technology*, 8, 41-47.

Yada, R. Y. (2004). *Proteins in food processing*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Warburg, O. & Christian, W. (1941). Isolierung and cristallisation of Garungs ferments. *Biochemische Zeitschrift* 310:384-421.



# 14

## Anexo I Preparación de Soluciones

### 14.1. Reactivo de Hanus

- Disolver 13.615 g de yodo en 825 mL de ácido acético glacial, calentar para disolver. Enfriar.
- Tomar 25 mL de la solución de yodo y titular con tiosulfato 0.1N, usando 1 mL de almidón como indicador.
- Adicionar 3 mL de Bromo a 205 mL de ácido acético glacial.
- A 5 mL de solución de bromo adicionar 10 mL de KI al 15% y titular con tiosulfato de sodio al 0.1N y 1 mL de almidón como indicador.
- Calcular el volumen de la solución de bromo requerida para adicionar a los 800 mL de solución de yodo, de forma que la solución final contenga el doble de halógeno.

### 14.2. Reactivo de DNS

- Mezclar 80 mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada, agregar 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.
- Calentar a 50°C y agitar constantemente.
- Agregar 5 g de DNS y agitar constantemente a 50°C., enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Aforar a 500 mL. Guardarlo en frasco ámbar en lugar fresco y seco.

### 14.3. Reactivo de Biuret

- Disolución A: Disolver 1,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 6 g de tartrato sódico-potásico en 500 ml de agua destilada.
- Disolución B: Preparar 300 ml de NaOH al 10% (p/v)
- Juntar las disoluciones A y B y llevar el volumen a 1 litro

### 14.4. Reactivo de Lowry

Preparación de las soluciones

- Solución prestock: Disolver 4 g de NaOH + 30 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Aforar con agua destilada a 1 L (guardar a temperatura ambiente).
- Tartrato de Sodio y Potasio 4% (wv): Disolver 4g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y aforar con agua destilada a 100 mL (guardar en refrigerador).
- Sulfato cúprico 2% (wv): Disolver 2g de sulfato de cobre y afora con agua destilada a 100mL (guardar a temperatura ambiente).

#### Solución Lowry A:

- Mezclar 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio + 1 ml de solución sulfato de cobre aforar con solución pre-stock a 100 ml. **Nota:** Respeta el orden de adición de las soluciones para evitar formación de precipitados. La cantidad de nuestra a preparar es de acuerdo al número de muestras a procesar.

#### Solución Lowry B:

- Diluir Reactivo Folin 1:1 con agua destilada. Calcular la cantidad a preparar, según las muestras procesadas diarias. Esta solución dura sólo un día.



## 14.5. Reactivo de Fehling

### Reactivo A

- Disolver 69.28 g de sulfato de cobre pentahidratado y 1 mL de ácido sulfúrico 1M en 1L de agua. La solución puede almacenarse indefinidamente.

### Reactivo B

- Disolver 346g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (sal de Rochelle) y 100g de hidróxido de sodio en agua y aforar a 1L. La solución es estable indefinidamente si se almacena en un recipiente hermético (James, 1999).

## 14.6. Reactivo de yodo (para determinación colorimétrica de almidón)

- Pesar 1.269 g  $I_2$  y mezclarlos con 1.8 g de KI disolver en 100 mL con agua.

## 14.7. Ortofenantrolina al 1%

- Pesar 0.1g de ortofenantrolina y disolverlo en 80mL de agua destilada a 80°C, enfriar y aforar a 100 mL).

## 14.8. Buffer de acetatos para determinación de Fe

- Pesar 8.3 g de acetato de sodio anhidro, adicionar 12 mL de ácido acético glacial y aforar a 100 mL con agua destilada.

#### **14.9. Acido bórico con indicadores**

- Pesar 40g de ácido bórico y disolverlo en 800 mL de agua destilada, posteriormente adicionar 35 mL de fenolftaleína al 0.1% en alcohol, y 10 mL de una mezcla de rojo de metilo 0.066% con verde de bromocresol 0.033% en alcohol. Aforar a 1L.

#### **14.10. Reactivo colorante azul brillante**

- Preparar una solución colorante de azul brillante de Coomasie G-250 0.1 mg/mL con ácido fosfórico al 8.5% y etanol al 4.75%.

#### **14.11. Solución de Carrez I**

- Pesar 21.9 g de acetato de zinc dihidratado y adicionar 3.0 mL de ácido acético glacial, aforar a 100 mL de agua.

#### **14.12. Solución de Carrez II**

- Pesar 10.6 g de ferrocianuro de potasio y disolverlo en 100 mL de agua.

#### **14.13. Solución I/KI al 3%**

- Disolver 7.5 g de I<sub>2</sub> y 7.5 g de KI en 250 mL de agua.

#### **14.14. Solución de cloruro de sodio alcohólica**

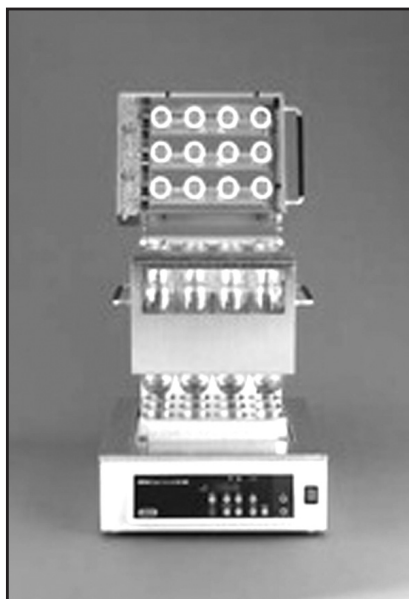
- Mezclar 350 mL de alcohol con 50 mL de solución de NaCl 20 % y aforar a 500 mL con agua

# 15

## Anexo II

### Descripción de Equipo Kjeldahl (Büchi)

Método digestión en parrilla (bloque de calentamiento **Fig. 14**) usando cobre como catalizador y unidad de destilación con vapor (**Fig. 16**).



**Fig. 14.** Unidad de digestión Kjeldahl. Büchi.



**Fig. 15.** Unidad de extracción y neutralización de vapores ácidos de la reacción Kjeldahl.



**Fig. 16.** Unidad de destilación Büchi.

# 16

## Anexo III Descripción de Bomba Calorimétrica (Parr)

1. Preparar la muestra y cargar la bomba de oxígeno.
2. Llenar el recipiente con agua, tarar el recipiente vacío y posteriormente adicionar  $2000 \pm 0.5$  g de agua destilada. La temperatura del agua debe ser cercana ( $1.5^{\circ}\text{C}$ ) a la temperatura ambiente.
3. Colocar el recipiente en el calorímetro. Tomar de la parte superior e introducir parcialmente la bomba en el agua, teniendo cuidado de no mover la muestra. Presionar los dos alambres de ignición en la cabeza de la bomba. Orientar los alambres lejos del agitador. Sumergir completamente la bomba en el agua.
4. Colocar la cubierta de la chaqueta. Girar el agitador con la mano y asegurarse que funciona libremente. Resbalar el cinturón en la polea y encender el motor. Encender el termómetro digital.
5. Dejar funcionando por 5 minutos el agitador hasta equilibrar. Al final del tiempo, registrar el tiempo del termómetro digital y leer la temperatura.
6. Leer y registrar las temperaturas a intervalos de un minuto durante 5 minutos.
7. Al minuto 6, regresar al calorímetro y encender la bomba, presionando el botón de ignición y mantenerlo así hasta que el indicador de la luz se apague.
8. La temperatura del recipiente empezará a incrementarse después de 20 s de encendido. El incremento será mayor en los primeros minutos y después

será más lento, hasta que se acerque al máximo. Como muestran las típicas curvas de calentamiento.

9. Medir el tiempo requerido para alcanzar 60% del total del incremento. Si no se puede estimar, tomar las lecturas (temperaturas) a los 45, 60, 75, 90 y 105 segundos después de encendido, e interpolar las lecturas para identificar el punto de 60% después del incremento total.
10. Después del período rápido de incremento (4 ó 5 minutos después de la ignición) registrar las temperaturas a intervalos de un minuto, hasta que la diferencia entre las lecturas sea constante por 5 minutos.
11. Después de la última lectura, apagar el motor, quitar el cinturón y levantar la cubierta del calorímetro. Secar el sensor de temperatura y el agitador con un pañuelo. Dejar la bomba fuera del recipiente, quitar los alambres de ignición y secar la bomba con un trapo limpio.
12. Abrir la perilla de la cabeza de la bomba para liberar la presión del gas antes de quitar la tapa. Después de que la presión, se ha liberado, quitar la tapa. Examinar el interior de la bomba para revisar si fue completa la combustión.
13. Lavar todas las superficies interiores de la bomba con un chorro de agua destilada y coleccionar los lavados en un vaso.
14. Quitar las piezas del alambre que quedaron de los electrodos de la bomba. Alinearlos y medir su longitud en centímetros. Restar de la longitud inicial de 10 cm y registrar en la hoja de resultados la cantidad neta del alambre quemado.
15. Titular los lavados de la bomba con una solución de carbonato de sodio (0.0709N) usando anaranjado o rojo de metilo como indicadores.
16. Analizar los lavados de la bomba para determinar el contenido de azufre de la muestra.



**Fig. 17.** Bomba calorimétrica Parr Modelo 1341.





# 17

## Anexo IV

### Glosario

#### **Agua desionizada**

Es aquella a la cual se le han quitado los cationes, como los de sodio, calcio, hierro, cobre y otros, y aniones como el carbonato, fluoruro, cloruro, etc., mediante un proceso de intercambio iónico. El agua desionizada puede cambiar su pH con facilidad al ser almacenada, debido a que absorbe el  $\text{CO}_2$  atmosférico. Éste, al disolverse, forma ácido carbónico, de ahí el aumento de la acidez, que puede ser eliminada hirviendo el agua.

#### **Agente reductor**

Compuestos capaces de reducir diversos agentes oxidantes. Por ejemplo, azúcares reductores, tales como glucosa, fructosa y maltosa.

#### **Agua de cristalización**

Agua que se encuentra presente en un hidrato, en proporciones definidas.

#### **Azeótropo**

Mezcla líquida cuyo punto de ebullición es constante. En el punto azeotrópico, la composición en el vapor es idéntica a la composición en el líquido.

#### **Blanco**

Solución que contiene todos los reactivos a las concentraciones apropiadas, menos la sustancia que se analiza. Es útil en particular en espectrofotometría para restar la absorbancia causada por las sustancias que no están en estudio.

### **Bomba calorimétrica**

Se usa para determinar el poder calorífico de un combustible cuando se quema a volumen constante.

### **Celita**

Es el nombre de una gama de productos que forman la llamada Tierra Diatomacea o Diatomita. El material del que se compone la celita, está formado por los restos de los esqueletos de diminutas plantas denominadas Diatomeas. Se emplea como ayudante de filtración por su gran retención de partículas sólidas o semi-sólida y a la vez de mantener un flujo adecuado en el líquido que se está filtrando.

### **Coalescencia**

Propiedad de las cosas de unirse o fundirse.

### **Coloide**

Sustancia que al disgregarse en un líquido, se divide en partículas de diámetro comprendido entre uno y cien milimicras aproximadamente, que se denominan micelas, y tienen como origen la agrupación de moléculas o iones.

### **Crisol**

Es un pequeño contenedor el cual posee una cavidad, la encargada de fundir o calcinar. El crisol de porcelana, al estar hecho de este material, tiene la propiedad de resistir las altas temperaturas.

### **Curva Patrón**

Se trata de una curva de referencia construida con cantidades conocidas de una sustancia que se utiliza para determinar la cantidad de esta sustancia presente en una muestra incógnita. En muchas determinaciones se cumple una relación proporcional entre la magnitud o intensidad de color que da una reacción, y la cantidad del reactivo que la provoca.

**Desecador**

Es un recipiente que permite mantener la atmósfera dentro del mismo prácticamente exenta de humedad, es hermético y contiene en su interior una sustancia desecante. Los desecadores se construyen generalmente en vidrio o plástico. Tanto el borde del desecador como el de la tapa están esmerilados y para aumentar la adherencia entre ellos y lograr así un cierre hermético, se les aplica a cada uno vaselina sólida (para los de plásticos existen juntas adecuadas construidas en goma).

**Exactitud**

Capacidad del método para proporcionar un resultado que sea lo más cercano posible al “valor real”.

**Floroglucina**

También conocido como Floroglucinol, 1,3,5-Trihidroxibenceno, Número CAS 108-73-6. Fórmula empírica  $C_6H_6O_3$ .

**Fosfolípidos**

El término fosfolípido se puede usar para designar cualquier lípido que contenga ácido fosfórico en forma mono o diéster.

**Glucoamilasa**

También denominada amiloglucosidasa se obtiene de un hongo, el *Aspergillus rhizopus*, y actúa sobre las dextrinas produciendo glucosa, lo que se traduce en una aceleración de la fermentación.

**Grado de instauración**

Se refiere a la cantidad de dobles enlaces presentes en una grasa o aceite.

**Gravimetría**

Se basa en las medidas de masa donde requiere fundamentalmente dos medidas experimentales, Peso de la muestra analizada, y peso del analito de una sustancia de composición química conocida que contenga el analito.

### **Higroscópico**

Compuesto o sustancia que absorbe agua con facilidad.

### **Método colorimétrico**

Hay ciertos elementos que al combinarse con otros dan coloraciones específicas. La colorimetría sirve para identificar compuestos por medio de su color característico. La colorimetría está basada en el hecho de que la luz blanca, al pasar a través de la solución, algunas longitudes de onda son absorbidas mientras que otras no. Por ejemplo, una solución verde resulta cuando las longitudes de onda rojas son absorbidas, mientras que las longitudes el amarillo o azul son transmitidas.

### **Método oficial**

Son los procedimientos que han sido evaluados y aprobados para ser utilizados como métodos de control.

### **Método volumétrico**

Se basa en la ley estequiométrica conocida como Ley de las Proporciones Recíprocas. La ecuación fundamental de la volumetría permite calcular la concentración de la disolución problema si se conoce la de la disolución patrón y los volúmenes de ambas disoluciones que se emplearon para alcanzar el punto final de la valoración.

### **Miscible**

Significa qué tan soluble está un líquido disuelto en otro.

### **Perlas de ebullición**

Se utilizan para regular la ebullición de líquidos. Además de perlas de vidrio, es posible utilizar trocitos de capilares, virutas de teflón o lana de vidrio. Debe ser material inerte y reutilizable.

### **Pesafiltro**

Son los recipientes donde se secan las muestras, se caracterizan por ser elementos pequeños y livianos con un cierre esmerilado que en los de buena calidad es absolutamente hermético.

### **Picnómetro**

Dispositivo de vidrio, de volumen y peso exactamente conocidos, que se utiliza para medir la densidad y de líquidos.

### **Precisión**

Repetibilidad y reproducibilidad del método, es la capacidad de obtener con una determinación el valor promedio de un gran número de determinaciones.

### **Retrogradación**

El proceso colectivo de pérdida de solubilidad del almidón disuelto se conoce como retrogradación. La velocidad de este proceso depende de diversas variables, entre las que se encuentran la relación de amilosa/amilopectina, las estructuras de las mismas que vienen determinadas por la fuente botánica del almidón; la temperatura, la concentración de almidón; y por último, la presencia y concentración de otros ingredientes como surfactantes y sales.

### **Selectividad**

Capacidad del método para medir solamente el componente de interés, en presencia de otros sin que interfieran.

### **Sensibilidad**

La capacidad del método para medir un valor que sea cercano al cero.

### **Sifón**

Está formado por un tubo, en forma de "U" invertida, con uno de sus extremos sumergidos en un líquido, que asciende por el tubo a mayor altura que su superficie, desaguando por el otro extremo. Para que el sifón funcione debe estar lleno de líquido, ya que el peso del líquido en la rama del desagüe es la fuerza que eleva el fluido en la otra rama.

### Solución patrón

Solución de concentración exactamente conocida que se usa en un proceso de valoración para determinar la concentración de otra.

### Triacilgliceroles

Son grasas neutras triésteres de glicerol y ácidos grasos. Aunque el glicerol es una molécula simétrica, el carbono central adquiere un carácter quiral (asimétrico) si se esterifica uno de los hidroxilos primarios (los de los carbonos 1 y 3).

### Turbiedad

Es la expresión de la propiedad óptica de la muestra, que causa que los rayos de luz sean dispersados y absorbidos en lugar de ser transmitidos en línea recta a través de la muestra. Puede ser causada por la presencia de partículas suspendidas y disueltas de gases, líquidos y sólidos tanto orgánicos como inorgánicos, con un ámbito de tamaños desde el coloidal hasta partículas macroscópicas, dependiendo del grado de turbulencia.

### Vitamina A

Es un alcohol poliénico isoprenoide que se conoce también con otros nombres como retinol. En los alimentos de origen animal, la vitamina A se presenta, en su mayor proporción, en la parte lipídica como retinol esterificado con el ácido palmítico. En los vegetales y en algunos organismos marinos, se encuentran los carotenoides, como el  $\beta$ -caroteno, pigmento amarillo constituido por dos moléculas de retinal unidas en el extremo aldehído de sus cadenas carbonadas.

### Zeínas

Proteínas de reserva del grano de maíz. Estas presentan cuatro tipos estructurales distintos: Alfa, beta, delta y gamma.

Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas, es una obra editada por la Facultad de Química. Se terminó de imprimir en enero de 2011 en los talleres de la Facultad de Química. Se tiraron 200 ejemplares en papel bond de 90 grs. en los interiores y cartulina couché de 250 grs. en la portada. Para la composición del texto se utilizó la fuente Tw Cen MT de 11 puntos.

El cuidado de la edición estuvo a cargo del Departamento de Diseño y Medios Audiovisuales, adscrito a la Coordinación de Comunicación de la Facultad de Química. Sistema de impresión: Offset.

**Publicación aprobada por el Comité Editorial de la FQ.**

Diseño de Interiores y portada: Lic. en DG. Leticia González G.  
Arq. Adrián Raúl Arroyo B.

Enero de 2011.

