

2 Ej. No. 51



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

OCHO PRACTICAS DE LABORATORIO PARA UN
CURSO DE QUIMICA DE ALIMENTOS.

TESIS MANCOMUNADA
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P r e s e n t a n

FLORA ESTELA JACOBO ZEPEDA
GILBERTO PERDON OSTOA SALOMA



México, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	página
I.-INTRODUCCION	1
II.-AGUA	
Práctica 1	5
Isoterma de adsorción	
III.-CARBOHIDRATOS	
Práctica 2	17
Almidón; estudio de algunas propiedades	
IV.-REACCIONES DE OSCURECIMIENTO	
Práctica 3	34
a)Efecto de la actividad de agua en la reacción de Maillard	34
b)Reacción de caramelización	49
c)Oscurecimiento enzimático	65
V.-PECTINAS	
Práctica 4	81
Extracción y uso de pectinas cítricas	
VI.-PROTEINAS	
Práctica 5	96
a)Fraccionamiento de las proteínas de la leche	96
b)Estudio de las propiedades de las proteínas del trigo	107
VII.-VITAMINAS	
Práctica 6	116
Estabilidad de la vitamina C	
VIII.-LIPIDOS	

Práctica 7 133

Estabilidad de las grasas

IX.-COLORANTES

Práctica 8 150

Extracción y estabilidad de antocianinas

X.-CONCLUSIONES 162

INTRODUCCION

En la Facultad de Química de la UNAM, se imparte actualmente la carrera de Q.F.B. Orientación Alimentos, cuyos egresados reciben una preparación especializada en los últimos tres años de los estudios. Debido al requerimiento constante que tiene el país de recursos humanos capacitados en esta área tan prioritaria, la Facultad estableció una comisión avocada a determinar el programa de estudios más adecuado para la implementación de una carrera de alimentos integrada totalmente desde sus inicios e independiente de la de Q.F.B. Dentro de este nuevo programa se contempla la materia de Química de Alimentos con su respectivo laboratorio; cabe mencionar que en la actualidad no se cursa dicho laboratorio.

En el cuadro 1 se muestra el programa de teoría empleado para la impartición de esta materia en la nueva carrera de alimentos.

La química de Alimentos es fundamental y sirve de base para la mayoría de las otras materias que se cursan en la carrera, ya que permite al alumno conocer los diferentes componentes de los alimentos, así como su distribución, las interacciones entre ellos y el efecto que tienen algunas variables como el pH, la temperatura, el oxígeno, etc. en su estabilidad. Por esto, se considera de suma importancia contar con un programa de prácticas de laboratorio para poder comprender mejor los principios que se revisan en este curso.

De acuerdo con lo anterior, el principal objetivo de este trabajo es la elaboración de algunos protocolos de laboratorio,

para poderlos emplear como parte del curso práctico de esta materia. Con estas prácticas el alumno podrá comprobar en el laboratorio, varias de las principales reacciones que le suceden a los constituyentes de los alimentos, así como el efecto de ciertos parámetros (pH, temperatura, etc.) sobre la estabilidad de éstos. Además, será capaz de entender mejor los cambios físicos y químicos que se producen en los alimentos durante los diferentes procesos a los que se someten como parte de su industrialización, dentro de la cadena alimenticia.

Para la realización de estos protocolos se han elegido las reacciones químicas y físicas más importantes de los principales componentes de los alimentos: agua, hidratos de carbono, proteínas, lípidos, enzimas, vitaminas y pigmentos. No se pretende estudiar todas las reacciones ya que resultaría demasiado extenso, sino solamente ocho que son muy representativas.

Las técnicas de laboratorio empleadas para este fin, fueron seleccionadas y en algunos casos modificadas, de acuerdo con la disponibilidad de material y de instrumentos con los que se cuenta en los laboratorios de alimentos de la División de Estudios Profesionales; esto se hizo para que el costo de las prácticas fuera el menor posible.

Cada protocolo consta de un objetivo, generalidades, el material y los reactivos necesarios, la muestra problema, el método, un sistema de evaluación o cuestionario que el maestro de laboratorio puede modificar para que no sea repetitivo, y finalmente, las referencias correspondientes.

Se considera que, de preferencia, el alumno antes del ejercicio del laboratorio haya cursado la parte correspondiente de -

la teoría, ya que las generalidades en los protocolos solo contribuyen brevemente a conocer el tema de las prácticas y tiene la finalidad de enfatizar algunos conceptos que previamente fueron explicados en clase.

Al final de cada práctica se incluyen los resultados obtenidos durante el desarrollo experimental, con el objeto de que sean utilizados como datos de referencia para evaluar al estudiante.

Cuadro 1.

Programa de teoría de la materia Química de Alimentos.

Unidad	Tema
1	Introducción y generalidades.
2	Macrocomponentes y microcomponentes de los alimentos, dietas balanceadas.
3	Agua.
4	Glúcidos: Azúcares.
5	Glúcidos: Homopolisacáridos.
6	Glúcidos: Heteropolisacáridos.
7	Oscurecimiento de los alimentos.
8	Lípidos simples.
9	Lípidos complejos.
10	Insaponificable.
11	Tecnología de grasas y enranciamiento.
12	Protidos: Generalidades y aminoácidos.
13	Proteínas.
14	Proteínas Vegetales: Glúten y Soya.
15	Leche y derivados lácteos.
16	Carne y cárnicos, peces y mariscos.
17	Huevos.
18	Frutas y hortalizas.
19	Carácteres organolépticos.
20	Aditivos.

PRACTICA 1. ISOTERMA DE ADSORCION

OBJETIVO

Elaborar la isoterma de adsorción de un alimento deshidratado y observar la influencia que tiene la actividad de agua sobre la estabilidad del mismo, tanto química como microbiológicamente.

GENERALIDADES

Todos los alimentos contienen una cierta cantidad de agua la cual desempeña un papel muy importante que se refleja en la estabilidad química, física y microbiológica del producto durante las distintas fases de producción, procesamiento y conservación a que se somete.

Para entender la forma en que el agua se encuentra en los alimentos es necesario primero conocer el concepto de actividad de agua (Aa). Este término es una medida de la disponibilidad del agua de un alimento para llevar a cabo diferentes reacciones y está relacionado con la humedad relativa (HR) de la siguiente manera:

$$Aa = \frac{HR}{100} \quad ; \quad \text{o bien:} \quad (1)$$

$$Aa = \frac{\text{moles de agua}}{\text{moles de agua} + \text{moles de soluto}} = \frac{\frac{g}{PM} \text{ agua}}{\frac{g}{PM} \text{ agua} + \frac{g}{PM} \text{ soluto}} \quad (2)$$

Es decir, la escala de la Aa es de 0-1, mientras que la de humedad relativa es de 0-100 %.

El agua se encuentra en los alimentos por lo menos en dos de las tres formas propuestas por Rockland (1969):

A.- Monocapa, es agua fuertemente unida a grupos iónicos polares tales como COO^- y NH_3^+ de proteínas, carboxilos de pectinas y otros ácidos poliurónicos. El valor máximo que tiene de Aa es de aproximadamente 0.25 y se le conoce como monocapa B.E.T. Esta porción de agua de un alimento es la más difícil de eliminar con los procesos tradicionales de secado; de hecho, nunca se pierde totalmente y aún los productos deshidratados la conservan.

B.- Multicapa, es agua unida a grupos iónicos polares como NH_3^+ y OH^- de proteínas y polímeros de carbohidratos (almidón, pectina, celulosa, hemicelulosa). Su eliminación proporciona una mayor estabilidad al producto. El valor de Aa esta comprendido en el intervalo de 0.25-0.75.

C.- Agua libre, se encuentra en poros intersticiales y como disolvente de la materia orgánica, se considera como no unida y es la que más influye en la Aa de los alimentos. Es el agua que se pierde primeramente durante cualquier proceso de deshidratación, ya que como su nombre lo indica, es agua libre y requiere poca energía para su eliminación.

Estas tres formas se pueden notar en la isoterma de adsorción de la Fig. 1, en la que se observa la relación que existe entre la actividad de agua de un alimento, con el contenido de agua del mismo. Esto es, para cada Aa existe un contenido de agua en equilibrio, por lo que un alimento se puede hidratar de acuerdo con la humedad relativa del medio ambiente hasta alcanzar el equilibrio establecido en la curva de adsorción. Lo contrario también sucede durante la deshidratación, en donde el alimento pierde agua de acuerdo con su curva de desorción.

Por otra parte, la actividad de agua influye determinante-
mente en la estabilidad de los alimentos; esto se puede verifi-
car en la Fig. 2, que muestra la velocidad de muchas reacciones
químicas, enzimáticas y microbiológicas en función de la activi-
dad de agua del mismo.

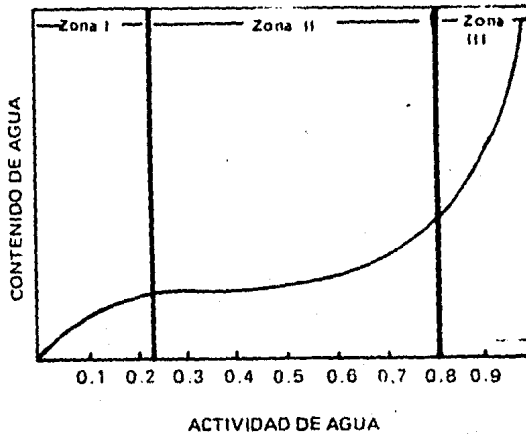


Fig. 1 Isotherma de adsorción; a) Zona I o monocapa, b) Zona II
o multicapa y c) Zona III o agua libre (Labuza, 1977).

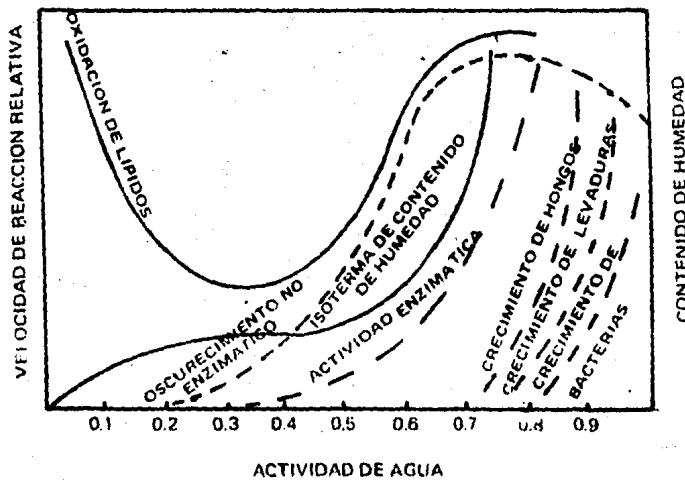


Fig. 2 Estabilidad de los alimentos como función de la acti-
vidad de agua (Labuza, 1977).

Puede deducirse con relación a la gráfica anterior, Fig. 2, que disminuyendo la cantidad de agua disponible en los alimentos, ya sea por la adición de solutos o por deshidratación, se aumenta la estabilidad de los mismos durante el almacenamiento. Se observa también que la mayoría de las reacciones químicas se aceleran a valores de 0.25-0.75 que corresponde a la zona II, - en la que se encuentran los alimentos llamados de humedad intermedia. En la zona III, con valores mayores de 0.75 se encuentra la suficiente agua disponible para el óptimo crecimiento de microorganismos (hongos, levaduras y bacterias). Es importante notar que el alimento sufrirá algunas de las reacciones indicadas en la Fig. 2, en función con el valor de Aa que presente.

De acuerdo con lo anterior, es necesario conocer las curvas de adsorción y desorción de un alimento para poder predecir el tipo de comportamiento que tendrá ante ciertas condiciones de humedad relativa, presentes en diferentes zonas geográficas. Para simular algunas condiciones de humedad relativa se pueden emplear varias sales, que en estado de solución saturada generen una HR conocida en el medio ambiente que las rodea (cuadro 1), que van desde áridas hasta muy húmedas.

La práctica consiste en la elaboración de una curva de adsorción de un alimento deshidratado (como leche descremada) y observar la influencia de la Aa en su estabilidad.

Cuadro 1

Humedad relativa de soluciones saturadas con respecto a la temperatura. (Rockland, 1980).

Temperatura (° C)	% de Humedad Relativa							
	5	10	15	20	25	30	35	40
Sal								
Acetato de potasio	25	24	24	23	23	23	23	23
Cloruro de magnesio	33	33	33	33	33	32	32	31
Carbonato de potasio	-	47	45	44	43	42	41	40
Nitrito de sodio	-	-	-	-	-	63	-	62
Yoduro de potasio	-	-	-	-	-	-	-	67
Cloruro de potasio	88	87	87	86	86	84	84	83
Sulfato de zinc	95	93	92	90	88	86	85	84
Sulfato de amonio	81	80	79	79	79	79	79	79
Fosfato disódico	98	98	98	98	97	96	93	91
Sulfato de potasio	98	97	97	97	97	97	96	96

MATERIAL

- Balanza analítica (1)
- Cajas de petri (5)
- Desecadores (5)
- Espátula (1)
- Estufa (1)
- Pesafiltro (5)
- Vasos de precipitado de 500 ml (5)

REACTIVOS

Soluciones saturadas de cuatro sales a escoger, por ejemplo:

- i) Acetato de potasio.
- ii) Carbonato de potasio.
- iii) Sulfato de amonio.
- iv) Sulfato de potasio.

MUESTRA PROBLEMA

- a) Leche descremada y deshidratada 20 g

PROCEDIMIENTO

- I.- Preparar soluciones saturadas de cuatro de las sales seleccionadas del cuadro 1, de tal forma que comprenda una escala de Aa lo más amplia posible. Llenar la parte inferior de los desecadores con dichas soluciones hasta una altura tal que no moje la placa soporte de porcelana.
- II.- Pesar de 5-10 g de leche deshidratada en cada una de las cajas petri previamente taradas y colocarlas sobre el soporte de porcelana de cada uno de los desecadores; taparlos y mantenerlos a una temperatura constante de 35-40^o C con ayuda de una estufa o un cuarto, dependiendo de las instrucciones que se tengan.
- III.- Al cabo de 10 días, determinar el contenido de humedad de cada una de las muestras por el método de secado en estufa como se indica a continuación:
 - a) Pesar con precisión de 1 mg, de 2-10 g de la muestra en -

un pesafiltro tarado y puesto a peso constante.

b) Secar la muestra en la estufa a 100°C por 2-3 horas.

c) Llevar el pesafiltro al desecador, tapar y dejar enfriar.

d) Pesar nuevamente.

e) Repetir la operación desde b, hasta que no varien en la segunda cifra decimal las dos últimas pesadas.

f) Expresar el porcentaje de peso perdido como contenido de agua.

IV.- Observar las características físicas del alimento, como su aspecto, color y crecimiento microbiano.

V.- Calcular la cantidad de agua adsorbida en cada caso.

VI.- Gráficar el contenido de humedad de las muestras contra la λ_a de sus respectivos desecadores.

VII.- Con los resultados encontrados y con el apoyo de lo explicado en teoría, proceda a contestar el cuestionario.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos al desarrollar la técnica descrita utilizando leche descremada y deshidratada se enuncian a continuación:

1.-Para obtener un intervalo de humedad relativa, que asemeje condiciones de diversas zonas del país, se utilizarón soluciones saturadas de las siguientes sales.

Sales	Humedad relativa $T-40^{\circ}\text{C}$
i) Acetato de potasio	23 %
ii) Carbonato de potasio	40 %
iii) Sulfato de amonio	79 %
iv) Sulfato de potasio	96 %

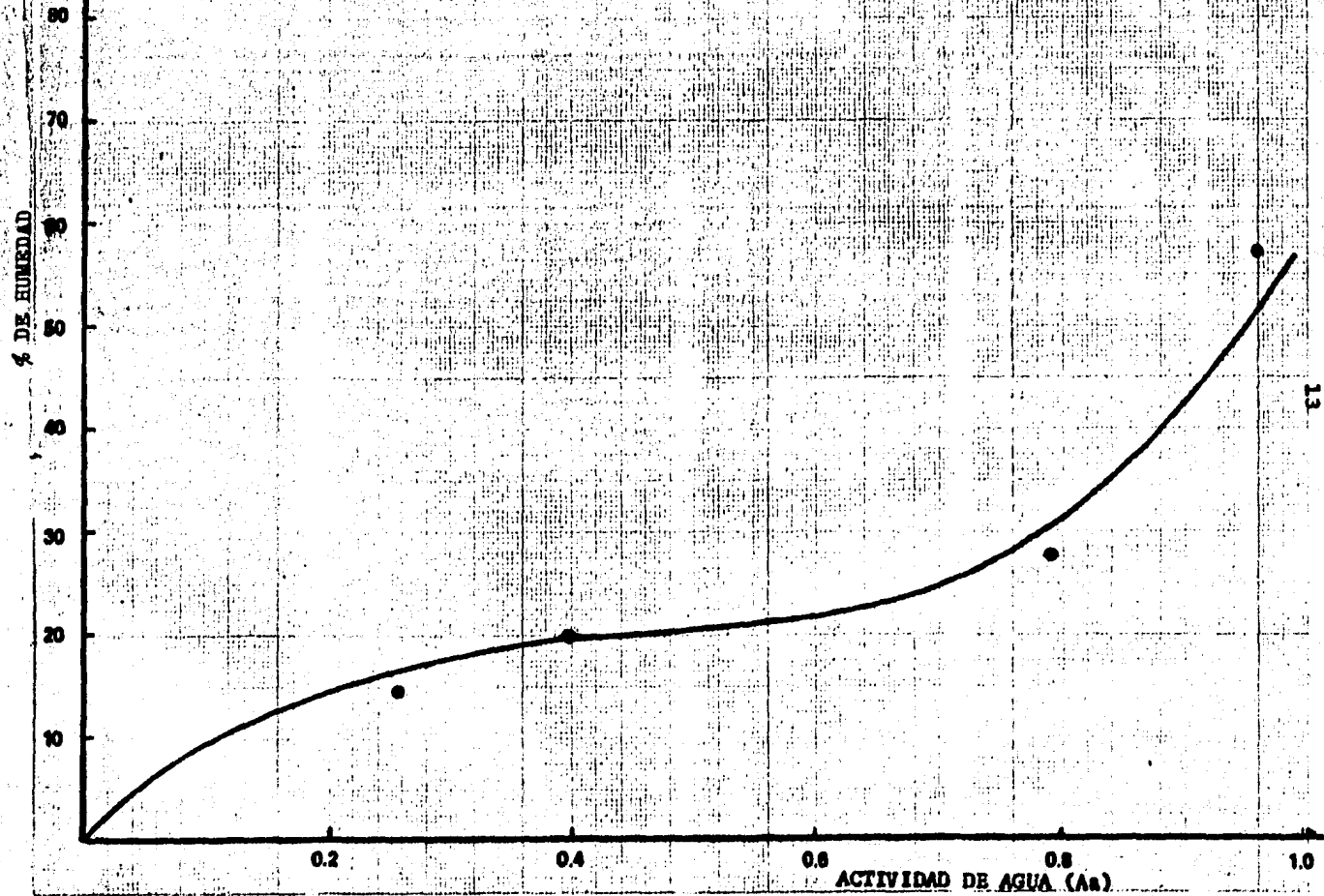
2.-Determinación del contenido de humedad, después de 10 días de almacenamiento a diferente humedad relativa.

Humedad relativa (%)	Peso de la muestra húmeda	Peso de la muestra seca	Contenido de agua	% de humedad
23	0.3527 g	0.3018 g	0.0509 g	14.43
40	0.5203 g	0.4189 g	0.1014 g	19.48
79	0.9879 g	0.7209 g	0.2670 g	27.02
96	0.8908 g	0.3902 g	0.5006 g	56.19

3.-A una Aa de 0,96 se observó un crecimiento de microorganismos, causado posiblemente por hongos y un crecimiento debido a la reacción de Maillard. Las otras muestras no desarrollaron ninguna de estas reacciones.

4.-La gráfica No. 1, muestra la curva de adsorción de leche en polvo descremada.

GRÁFICA No. 1
ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE LECHE EN POLVO DESCREMADA
TEMPERATURA 40°C



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Con base en los resultados puede observarse que a Aa altas - se presentan reacciones de deterioro, ya que se favorece un medio ambiente apropiado para el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) y de esta forma se provocan cambios en el producto, como son la producción de malos olores. Estos estudios son importantes porque permiten comprobar la estabilidad de los alimentos en distintas condiciones y con diferentes materiales de empaque.

CUESTIONARIO

- 1.-¿A que se llama Aa y como se calcula?
- 2.-¿Con base en sus resultados, mencione a que Aa el alimento conservó sus características originales? ¿Por qué?
- 3.-¿A que se deben los cambios producidos en el sistema con una Aa comprendida entre 0.7-0.96?
- 4.-¿Qué es histéresis?
- 5.-¿Por qué es importante controlar la Aa en un alimento?
- 6.-¿Qué efecto tiene el uso de solutos como el NaCl en la Aa?
- 7.-¿Qué efecto tiene la temperatura en las curvas de adsorción?
- 8.-¿Cree usted que a nivel industrial sea útil esta práctica?
¿Por qué?
- 9.-Dé tres ejemplos de alimentos que por su Aa son más susceptibles al deterioro, tanto químico como microbiológico.
- 10.-¿Qué son los alimentos de humedad intermedia y como se logra su estabilidad?
- 11.-¿Cómo elaboraría una curva de desorción?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Acker J.W. "Water Activity and Enzyme Activity" Food Technol. 23 (10) 27 (1969).
- 2.-Eichner K. and Karel M. "The Influence of Water Content and Under Various Conditions" J. Agr. Food Chem. 20 (2) 218 (1972).
- 3.-Karmas E. "Techniques for Measurement of Moisture Content of Food" Food Technol. 34 (4) 52 (1980).
- 4.-Labuza T.P. "The Effect of Water Activity on Reaction Kinetics of Food Deterioration" Food Technol. 34 (4) 36 (1980).
- 5.-Labuza T.P. "The Properties of Water in Relationship to Water Binding in Foods: A Review" J. of Food Processing and Preservation 1 167 (1977).
- 6.-Labuza T.P., Cassil S. and Sinski A.J. "Stability of Intermediate Moisture Foods 2. Microbiology" J. of Food Sci. 37 160 (1972).
- 7.-Labuza T.P. and Chou H.E. "Decrease of Linoleate Oxidation Rate Due to Water at Intermediate Water Activity" J. of Food-Sci. 39 112 (1974).
- 8.-Rockland L.B. "Saturated Salt Solutions for Static of Relative Humidity between 5^o and 40^o C" Anal. Chem. 32 (10) 1375 (1980).
- 9.-Rockland L.B. "Water Activity and Storage Stability" Food Technol. 23 1241 (1969).
- 10.-Rockland L.B. and Nishi S.K. "Influence of Water Activity on Food Product Quality and Stability" Food Technol. 34 (4) 42 (1980).

- 11.-Shwimmer S. "Influence of Water Activity on Enzyme Reactivity and Stability" Food Technol. 34 (5) 64 (1980).
- 12.-Troller J.A. "Influence of Water Activity on Microorganims in Foods" Food Technol. 34 (5) 76 (1980).

PRACTICA 2. ALMIDON; ESTUDIO DE ALGUNAS PROPIEDADES

OBJETIVO

Estudiar algunas características de diferentes tipos de almidón como son; a) su identificación de acuerdo con la estructura microscópica, b) la temperatura de gelatinización, y c) los factores que afectan la formación de su correspondiente gel.

GENERALIDADES

El almidón es un polisacárido que constituye la reserva energética de las plantas y está formado por dos polímeros de D (+) glucosa; a) la amilosa, una estructura lineal con enlaces α D (1-4) en forma de espiral, y b) la amilopectina, que posee ramificaciones semejantes a la amilosa, unidas por enlaces α D (1-6) a un tronco central. Ambos polímeros se encuentran distribuidos dentro de pequeñas partículas llamadas gránulos cuyo examen microscópico permite reconocer su origen, ya que su forma y tamaño son característicos para cada tipo de almidón.

En presencia de agua los gránulos se hinchan ligeramente, pero conforme se incrementa la temperatura hasta 50° - 60° C, aumenta su volumen (dependiendo del origen del almidón), dispersándose la amilosa de bajo peso molecular fuera del gránulo con aumento en la viscosidad. Si el tratamiento térmico es mayor se alcanza la temperatura llamada de gelatinización, en la cual los puentes de hidrógeno disminuyen entre los constituyentes del almidón. Los gránulos se hinchan a tal extremo que se rompen, difundiéndose la amilosa y la amilopectina; cuando disminuye la temperatura las moléculas de agua se encuentran entre los dos polímeros a los cuales se unen, aumentando de esta manera el tamaño de la red, lo que trae como consecuencia la formación de un gel.

La temperatura de gelatinización se puede determinar visualmente, con ayuda del microscopio, calentando los gránulos en presencia de agua a diferentes temperaturas y observar su rompimiento. Generalmente esta determinación se realiza con el microscopio Kofler, de luz polarizada, que posee una placa caliente, en la que se lleva a cabo la gelatinización a temperatura controlada. Debido a que no se cuenta con el equipo apropiado, en este protocolo se intentara determinar dicha temperatura con un microscopio visible, como una forma aproximada de esta medición.

El proceso de gelatinización es influenciado por varios factores, como son; A) el origen del almidón, B) la concentración de azúcares, C) el pH y D) agua. A continuación se hace referencia a cada uno de ellos.

A) Efecto del origen del almidón, esta es una característica que permite diferenciar almidones de distintos orígenes, aunque esta determinación puede resultar difícil ya que se requiere experiencia para este fin. En general, los de alto contenido de amilosa son más resistentes al hinchamiento, debido a que se forman fuertes puentes de hidrógeno entre moléculas alineadas paralelamente en el gránulo, que requieren de mayor energía para su ruptura y así poder absorber agua. En el cuadro 1, se observa el contenido de amilosa de diferentes almidones, así como sus respectivas temperaturas de gelatinización.

B) Efecto de la concentración de azúcares, por su carácter hidrófilo, los azúcares compiten por el agua con el almidón, disminuyendo la velocidad de gelatinización y la viscosidad del gel formado.

C) Efecto del pH, a valores menores de pH 5 o mayores de 7, se reduce la temperatura de gelatinización e inclusive en condiciones muy ácidas, se puede hidrolizar los enlaces glucosídicos

del almidón, perdiéndose la capacidad de formar geles.

D) Efecto del agua, es el factor más importante que afecta el -- proceso de gelatinización ya que el grado de hinchamiento del -- gránulo depende de la presencia del agua disponible para tal -- efecto.

Cuadro 1

Características de algunos almidones usados en la industria alimentaria, (Badui, 1981).

Tipo	Amilopectina (%)	Amilosa (%)	Temperatura de gelatinización
Maíz	73	27	62 ^o -72 ^o C
Maíz rico en amilosa	20-45	55-80	67 ^o -80 ^o C
Papa	78	22	58 ^o -67 ^o C
Arroz	83	17	62 ^o -78 ^o C
Tapioca	82	18	51 ^o -65 ^o C
Maíz céreo	99-100	0-1	63 ^o -72 ^o C
Sorgo céreo	99-100	0-1	67 ^o -74 ^o C
Trigo	76	24	58 ^o -64 ^o C

MATERIAL

- Balanza granataria	(1)
- Cubreobjetos	(16)
- Matraz aforado de 100 ml	(1)
- Mechero	(1)
- Microscopio	(1)
- Molino	(1)
- Pipeta graduada de 10 ml	(1)
- Portaobjetos	(16)
- Recipiente para baño maría	(1)
- Tamices (# 20, 40, 60, 80 y 100)	(5)
- Tela de asbesto	(1)
- Termómetro (-10 a 150 °C)	(1)
- Tripie	(1)
- Tubos de ensayo	(8)
- Vasos de precipitado de 50 ml	(6)
- Vasos de precipitado de 250 ml	(6)
- Varilla de vidrio	(1)

REACTIVOS

i) Sacarosa	30 g
ii) Acido clorhídrico 0.01 N	20 ml
iii) Acido clorhídrico 3.2×10^{-5} N	20 ml

MUESTRA PROBLEMA

a) Almidón de:

- trigo	125 g
---------------	-------

- arroz 2 g
- maíz 2 g
- centeno 2 g

b) En caso de no contar con una fuente adecuada de almidón, obtener una harina que para efectos de la práctica produce buenos resultados, de la siguiente manera:

- Pesar 100 g del grano (de trigo, maíz, arroz o centeno), - previamente descascarillado.
- Molienda.
- Tamizado; con mallas del número 20, 40, 60, 80 y 100.
- La harina empleada sera la de malla 100.

PROCEDIMIENTO

- I.- Determinación de la estructura microscópica del almidón.
- a) Mezclar en un tubo de ensayo 0.5 g de cada una de las diferentes harinas con 10 ml de agua destilada.
 - b) Colocar sobre un portaobjetos una gota de la suspensión y taparla con un cubreobjetos, evitando lo más posible la inclusión de burbujas de aire.
 - c) Observar al microscopio las diferentes harinas e identificar su origen, con base en la Fig. 1 (Fennema, 1976). Dibujar las estructuras.
- II.- Determinación de la temperatura de gelatinización del almidón.
- a) Preparar una suspensión con 1 g de cada una de las diferentes harinas en 10 ml de agua destilada.
 - b) Calentar en baño maría a 50 ° C la suspensión, durante 3-

minutos.

c) Observar al microscopio el grado de hinchazón de los granulos y posibles rupturas que pudieran presentarse.

d) Realizar la prueba anterior a 55^o, 60^o, 65^o, 70^o y 75^o C.

e) Determinar la temperatura de gelatinización, que es el - intervalo en el que se observa el máximo hinchamiento y el rompimiento de los gránulos.

f) Dibujar todas sus observaciones.

III.- Identificación de una muestra problema.

a) A cada equipo se le proporcionara una muestra de harina, cuyo origen se tratara de identificar con los datos de su estructura microscópica y temperatura de gelatinización.

IV.- Factores que afectan la formación de un gel.

a) Colocar 20 g de harina de trigo en 6 vasos de precipitado de 250 ml, enumerandolos.

b) Muestra No. 1, añadir 20 ml de agua y calentar durante 2 minutos a 70^o C, con agitación constante.

c) Muestra No. 2 y 3, repetir el procedimiento de la muestra No. 1, pero sustituyendo el agua por 20 ml de una solución de ácido clorhídrico 0.01 N y 3.2×10^{-5} N (aproximadamente pH 2.0 y 4.5), respectivamente.

d) Muestra No. 4, 5 y 6 repetir el procedimiento de la muestra No. 1 pero añadir 5, 10 y 15 g de sacarosa respectivamente, antes de agregar el agua.

e) Vertir cada una de las muestras en un molde hecho de aluminio o vaso de precipitado de 50 ml.

f) Comparar la rigidez, viscosidad y color de los geles, -- cuando esten fríos.

g) Debido a la subjetividad de las mediciones se puede emplear el penetrómetro, cuyo funcionamiento se describe en la práctica 4, "Extracción y Uso de Pectina Cítrica".

h) Gráficar velocidad de penetración contra pH y concentración de azúcar, respectivamente.

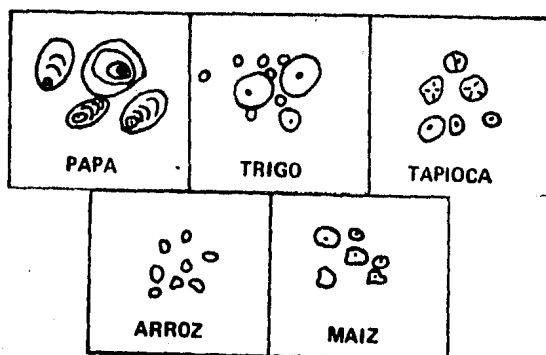


Fig. 1 Esquema del aspecto microscópico de los gránulos de almidón (Pennema, 1976).

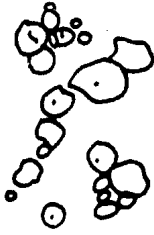
RESULTADOS

Después de haber realizado en el laboratorio el método propuesto, usando harinas de diferentes orígenes (maíz, centeno, -- trigo y arroz), los resultados son los siguientes.

1.-Determinación de la estructura microscópica del almidón.



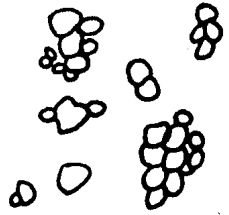
Arroz



Centeno



Maíz

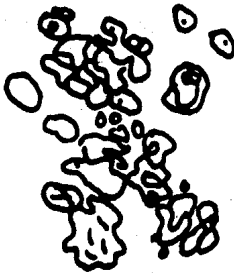


Trigo

2.-Determinación de la temperatura de gelatinización.

a) Observación al microscopio de las harinas a diferentes -
temperaturas (50° , 55° , 60° , 65° y 70° C).

Gránulos de harina de centeno

 50° C 55° C 60° C 65° C 70° C

Gránulos de harina de arroz



50 °C



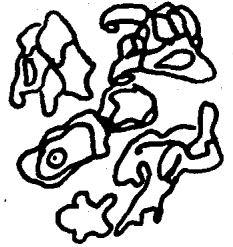
55 °C



60 °C



65 °C

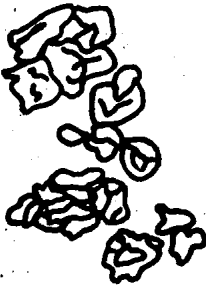


70 °C

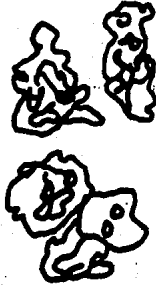
Gránulos de harina de maíz



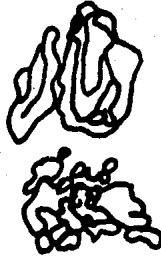
50 °C



55 °C



60 °C

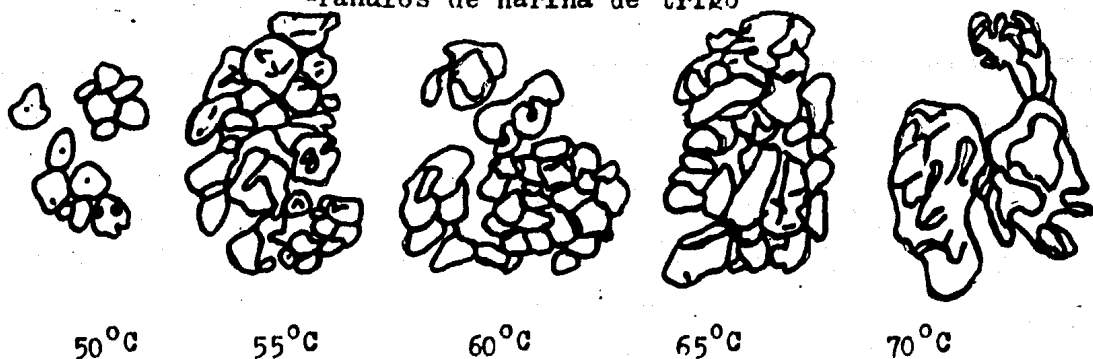


65 °C



70 °C

Gránulos de harina de trigo



b) Determinación de la temperatura de gelatinización.

Harina utilizada	Temperatura aproximada de gelatinización ($^{\circ}\text{C}$)	Valor teórico de la temperatura de gelatinización ($^{\circ}\text{C}$) (Badui, 1981).
1.-Trigo	60-65	58-64
2.-Arroz	55-60	67-78
3.-Maíz	60-65	62-72
4.-Centeno	55-60	60-70

Como se muestra en los resultados, en una forma aproximada se puede confirmar que a medida que se incrementa la temperatura, aumenta el hinchamiento hasta que los gránulos se rompen, lo que indica que se ha alcanzado la temperatura de gelatinización.

3.-Factores que afectan la formación de un gel.

a) Determinación de la viscosidad, rigidez y color de los geles formados a diferentes condiciones de acidez y concentración de azúcar.

Muestra	Viscosidad	Rígidez	Color
No.1, harina + agua	muy viscoso	pasta muy rígida	ligeramente amarillo
No.2, harina + sol. de HCl, pH = 2.	viscoso	pasta poco rígida; pegajosa	ligeramente amarillo
No.3, harina + sol. de HCl, pH = 4.5.	muy viscoso	pasta rígida	ligeramente amarillo
No.4, harina + 5 g de sacarosa + agua	muy viscoso	pasta rígida y pegajosa	amarillo pálido
No.5, harina + 10 g de sacarosa + agua	viscoso	pasta poco rígida	amarillo brillante, tenue
No.6, harina + 15 g de sacarosa + agua.	poco viscoso	poco rígida	amarillo brillante, tenue

4.-Resultados obtenidos con el penetrómetro. *

Muestra	Distancia recorrida en mm.	Tiempo (seg)	Velocidad (mm/seg)
No.1, harina + agua	1.5	10	0.15
No.2, harina + sol. de HCl, pH = 2.	5.8	10	0.58
No.3, harina + sol. de HCl, pH = 4.5.	2.8	10	0.28
No.4, harina + 5 g de sacarosa + agua.	1.15	4	0.287
No.5, harina + 10 g de sacarosa + agua.	10.5	4	2.625
No.6, harina + 15 g de sacarosa + agua.	22.7	4	5.675

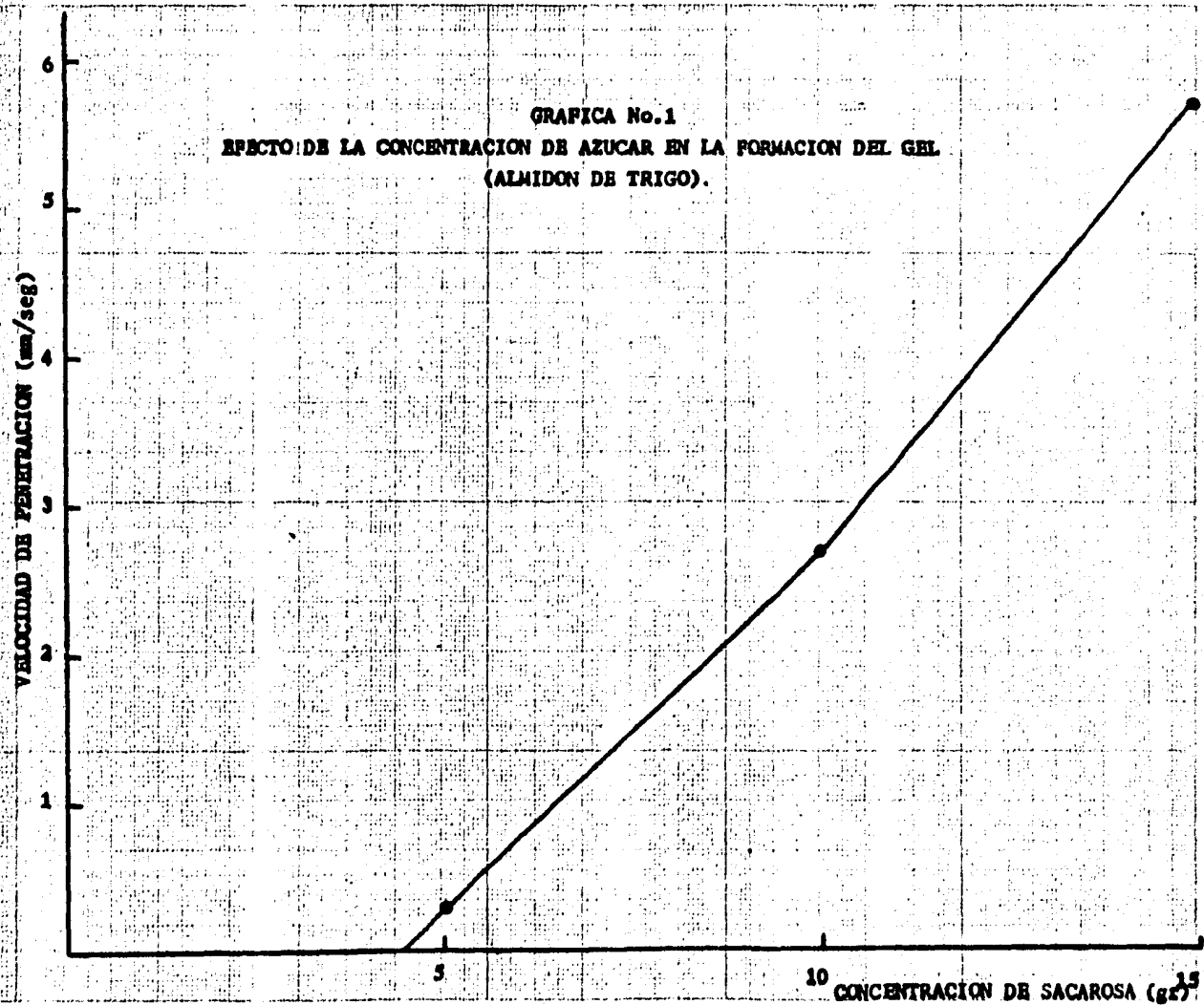
5.- Tanto el pH, como la concentración de azúcar son factores que afectan la formación de un gel, por lo que se deben considerar durante la manufactura de los alimentos. En las gráficas No. 1 y 2, se observa dicha influencia.

Nota 1

*Al penetrómetro se le cambió la punta original por otra que ofreciera una mayor superficie de contacto y de esta manera obtener datos más consistentes y reproducibles. Para ésto se adaptó a un clavo un tapón de plástico #100, - cumpliendo las necesidades requeridas.

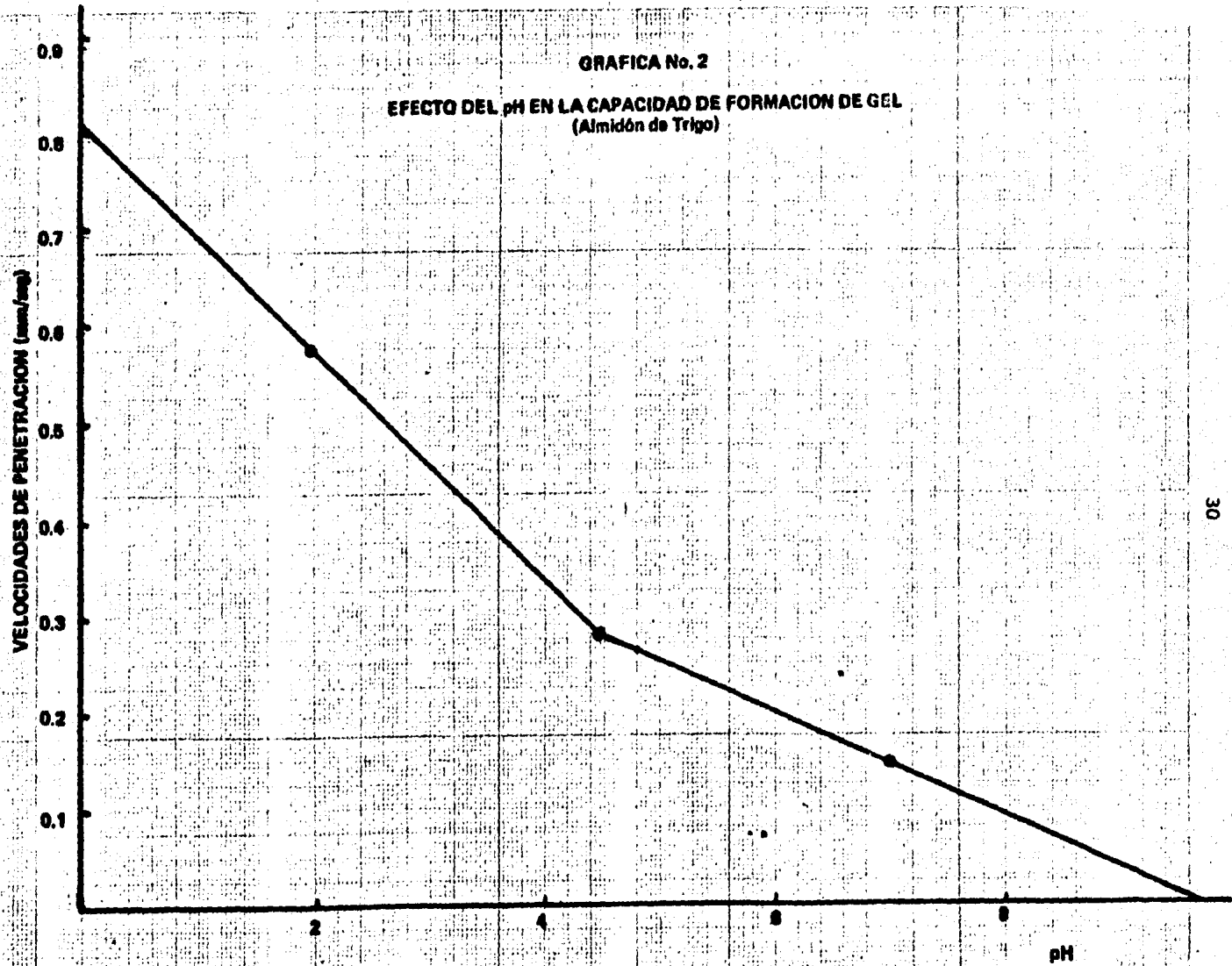
Nota 2

-Si se tiene un microscopio de luz polarizada se puede obtener la temperatura de gelatinización que en la práctica se determino en forma aproximada debido a que no se cuenta con él.



GRAFICA No. 2

EFFECTO DEL pH EN LA CAPACIDAD DE FORMACION DE GEL
(Almidón de Trigo)



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Como se observa en los resultados, es posible conocer el origen de los gránulos de almidón y en forma aproximada, su temperatura de gelatinización, mediante su exámen microscópico. Asimismo, en las gráficas No.1 y 2 se puede observar la disminución de la capacidad de formación del gel al a) aumentar la concentración de sacarosa, (ya que existe una mayor competencia por el agua con el almidón) y b) al disminuir el pH, (puesto que se produce hidrólisis de los enlaces que forman dicha estructura).

CUESTIONARIO

- 1.-¿Por qué no es recomendable utilizar harinas comerciales en la práctica?
- 2.-¿Qué cambios estructurales sufre el almidón cuando se calienta en una solución: a) de HCl concentrado, b) pH = 2 y c) pH = 4.5?
- 3.-Mencione que otros factores afectan la temperatura de gelatinización.
- 4.-Si en la práctica en lugar de sacarosa se hubiera empleado glucosa; a) se formaría o no el gel, b) que características presentaría el producto final y c) ¿Por qué?
- 5.-¿Qué es la birrefringencia del almidón?
- 6.-¿Por qué varía la temperatura de gelatinización en almidones de diferente origen?
- 7.-¿Qué es la retrogradación del almidón?
- 8.-¿Por qué la temperatura de gelatinización se considera un intervalo?

9.-¿Qué es un gel?

10.-¿Si se le proporciona una harina cuyo origen se desea conocer, que haría para su identificación?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Badui Dergal S. "Química de los Alimentos" (Ed) Alhambra, S.A. México, (1981).
- 2.-Hodge J.E. and Osman E.M. "Carbohydrates" O.R. Fennema (Ed) Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York, (1976).
- 3.-Greenwod C.T. "Aspects of the Physical Chemistry of Starch" Adv. Carboh. Chem. Biochem. 11 335 (1956).
- 4.-John T. "The Fraccionation of Starch" Adv. Carboh. Chem. Bio - chem. 1 247 (1945).
- 5.-Miller B.S. and Trimbo H.B. "Gelatinization of Starch and White Layer Cake Quality" Food Technol. 19 35 (1965).
- 6.-Osman E.M. "Interaction of Starch with other Components of Food Systems" Food Technol. 29 (4) 30 (1975).
- 7.-Schoch T.J. and Maywald E.C. "Microscopic Examination of Modified Starches" Anal. Chem. 28 (3) 382 (1956).

PRACTICA 3. REACCIONES DE OSCURECIMIENTO

Existen tres tipos principales de reacciones de oscurecimiento; caramelización, Maillard y oxidativa (en la que interviene el complejo enzimático polifenol oxidasa). En las dos primeras son formados pigmentos similares llamados melanoidinas, pero por diferentes mecanismos, en el oscurecimiento enzimático, debido a la conversión de compuestos fenólicos a quinonas o hidroquinonas, se forman las melaninas, responsables del color oscuro en algunos frutos y vegetales, cuando son pelados, cortados o mayugados.

A) Efecto de la actividad de agua en la reacción de Maillard.

OBJETIVO

Determinar mediante una técnica espectrofotométrica el efecto que tiene la actividad de agua (A_w) en la formación de pigmentos durante la reacción de Maillard.

GENERALIDADES

Este mecanismo establecido en 1912 por el químico francés-Maillard, comprende una serie de reacciones consecutivas complejas que al presentarse en los alimentos trae como consecuencia una pérdida en el valor nutritivo y un oscurecimiento que puede ser indeseable. Se fundamenta en la interacción de un grupo amino (de aminoácidos libres o aminoácidos de proteína) y el grupo carbonilo reductor de un azúcar, formando una base de Schiff.

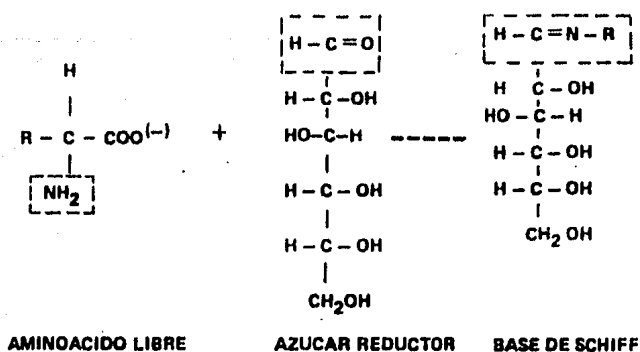


Fig. 1 Condensación del grupo amino y el azúcar reductor.

Los productos finales de la reacción de Maillard son polímeros de alto peso molecular conocidos como melanoidinas, producidos principalmente por derivados del furfural cuyo proceso de -- formación involucra tres etapas:

A) Estado inicial, no hay producción de color.

- a) Condensación azúcar-amina (base de Schiff).
- b) Rearreglo de Amadori.

B) Estado intermedio, absorción cerca del U.V.

- c) Deshidratación del azúcar.
- d) Fragmentación del azúcar.
- e) Degradación de aminoácidos.

C) Estado final, formación de aromas y pigmentos.

- f) Condensación alcohólica.
- g) Polimerización aldehído-amina.

La Fig. 2, muestra los diferentes caminos que puede seguir esta reacción.

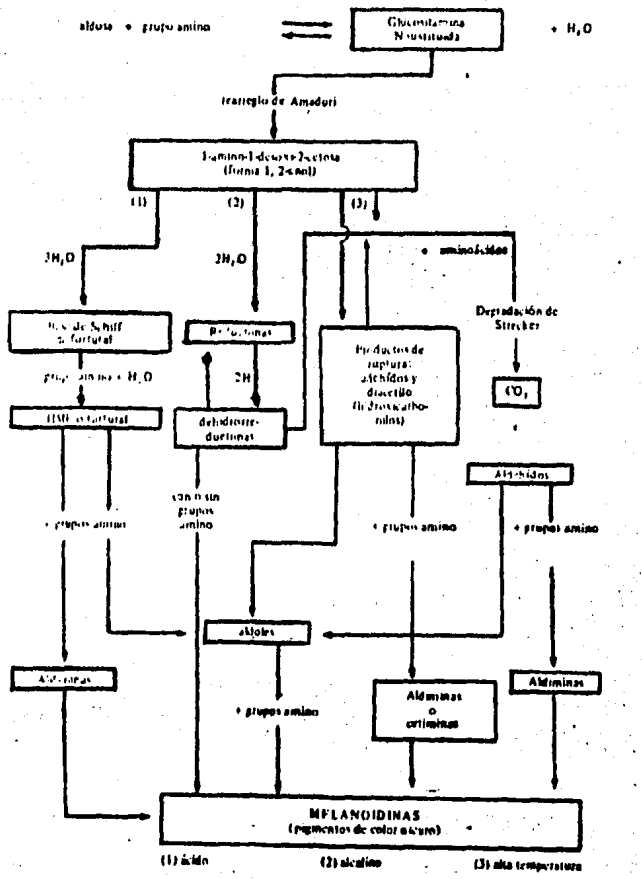


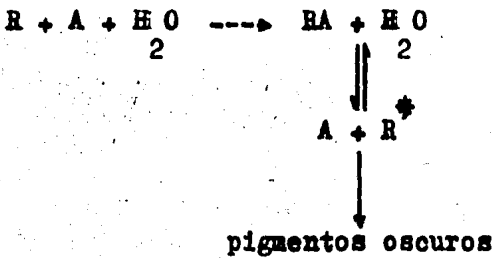
Fig. 2 Reacción de oscurecimiento de Maillard (Labuza, 1977).

Para el estudio de esta reacción se utilizan sistemas modelo consistentes en un azúcar reductor y un aminoácido que interactúan bajo condiciones que sean fácilmente controladas, de esta manera se ha observado que la velocidad de reacción es alterada por diferentes factores como son: Aa, concentración de reactivos, pH, temperatura y otros, por lo que se discute brevemente la influencia de algunos de ellos.

A.-Efecto de la actividad de agua, Labuza, 1977 hace referencia a cuatro mecanismos que afectan la velocidad y que dependiendo de la Aa del sistema pueden influir en diferentes estados de la reacción:

- a) Incremento de la viscosidad por reducción de la Aa.
- b) Inhibición por la propia agua generada durante la reacción (Ley de Acción de Masas).
- c) Dilución de los reactivos por aumento considerable de la Aa.
- d) Disminución de la viscosidad por aumento de la Aa.

Estos mecanismos, en forma combinada y por sus interacciones con el sistema, afectan la velocidad de reacción y para entender mejor esta influencia se propone el siguiente modelo cinético:



donde:

R = azúcar reductor

A = aminoácido

RA = intermediarios

R = reductores intermediarios

T = tiempo.

$$\frac{dR}{dT} = K (R)^a (A)^b \text{-----(2)}$$

$$\text{donde; } K = \frac{1}{\eta} \text{-----(3)}$$

a = b = 1, por estequiometría de la reacción, Fig. 1.

η = viscosidad.

$$\text{y como } \eta = \frac{1}{(H_2O)^2} \text{-----(4)}$$

la ecuación (2) queda de la siguiente forma:

$$\frac{dR^*}{dT} \approx \frac{(H_2O)(A)(R)}{2} \text{-----} \quad (5)$$

Por lo tanto se puede observar que la velocidad de reacción expresada en la Ec. 5, depende directamente de:

- a.- Cantidad de agua disponible.
- b.- Concentración relativa de los reactivos con respecto a la del agua disponible.

A su vez, estos dos factores dependen de los cuatro mencionados anteriormente. En la Fig. 2 de la Práctica 1, se observa que la velocidad aumenta hasta una A_a de aproximadamente 0.8 debido a que disminuye la viscosidad por incremento del contenido de agua. A partir de este valor se presenta un efecto de dilución e inhibición de la reacción por la Ley de Acción de Masas con la que la velocidad tiende a reducirse.

Este comportamiento varía con la inclusión de materiales -- deshidratantes como el glicerol, carboximetilcelulosa, hemicelulosa y otros con capacidad de retener agua, provocando que dicha agua no esté disponible para la reacción; es decir, la deshidratación parcial del sistema provoca que la concentración relativa de los reactivos aumente con el consiguiente incremento en la velocidad de reacción. Esto puede verificarse en la fórmula 5, donde el factor agua disminuye, pero (A) y (R) aumentan por lo que a bajos valores de A_a la velocidad alcanza su valor máximo. Esta influencia puede observarse en la Fig. 3, que corresponde a un sistema glucosa-glicina-glicerol a diferentes A_a (Eichner, 1972).

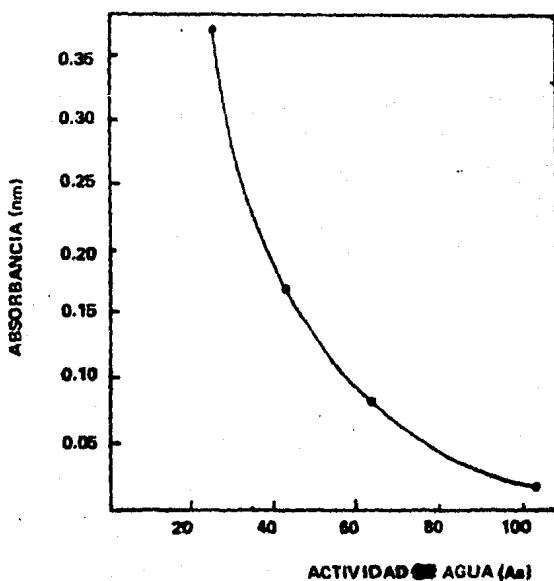


Fig. 3 Influencia de la Aa en la velocidad de reacción (Eichner, 1972).

En esta práctica se utilizará el sistema mencionado anteriormente y se cuantificará el efecto que tiene la Aa en la reacción de Maillard a temperatura constante; para provocar variaciones en la Aa se empleará glicerol y de esta forma se trazará una isoterma de adsorción para el sistema y otra curva que corresponda al efecto estudiado de la Aa en la reacción de Maillard.

MATERIAL

- Balanza analítica	(1)
- Espectrofotómetro	(1)
- Gradilla	(1)
- Pinzas para tubo de ensayo	(1)
- Pipeta graduada de 5 ml	(2)
- Pipeta graduada de 10 ml	(1)
- Recipiente para baño maría	(1)
- Tapones de plástico	(9)
- Tubos de ensayo	(18)

REACTIVOS

i) Glicerol	32 ml
-------------------	-------

MUESTRA PROBLEMA

a) Glucosa	4.5 g
b) Glicina	4.5 g

PROCEDIMIENTO

I.- Determinación de la longitud de onda de máxima absorción - del pigmento.

- a) Pesar en un tubo de ensayo 0.1 g de glucosa y 0.1 g de glicina, añadir 10 ml de agua destilada; tapar el tubo.
- b) Someterlo en baño maría a ebullición, durante 1 hora, - dejar enfriar.
- c) Diluir si el pigmento está oscuro.

d) Con la solución obtenida llenar las celdas del espectro fotómetro.

e) Si se tiene un sistema de barrido en el espectrofotómetro, operarlo desde 900 nm hasta 370 nm (región del visible) y desde 370 nm hasta 190 nm (región del ultravioleta). En caso de no tener dicho sistema, opere el espectrofotómetro manualmente, con intervalos de longitud de onda de 50 nm, empezando desde 900 nm. El pico más alto en la carta representa la longitud de onda de máxima absorción.

II.- Efecto de la Aa en la reacción de Maillard.

a) Pesar 0.5 g de glucosa y 0.5 g de glicina en 8 tubos de ensayo y adicionar agua y glicerol en las cantidades que se muestran en la siguiente tabla:

Tubo	Glicerol	Agua
1	0	10
2	1	9
3	2	8
4	3	7
5	4	6
6	5	5
7	8	2
8	9	1

b) Tapar los tubos y colocarlos a baño maría en ebullición, durante 1 hora, para que se produzca la reacción.

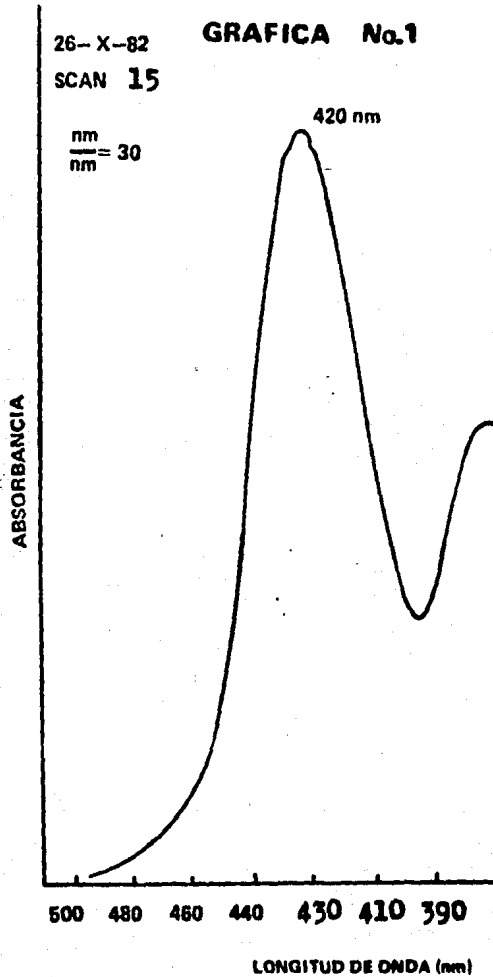
c) Pipetear 5 ml de cada tubo y diluir con otros 5 ml de agua.

d) Leer en el espectrofotómetro cada tubo a la longitud de onda de máxima absorción previamente encontrada.

e) Determinar la Aa usando la fórmula 2, de la práctica 1, y graficar por una parte absorbancia contra Aa y por otra Aa contra contenido de humedad para obtener la isoterma de adsorción.

RESULTADOS

1.-La longitud de onda de máxima absorción del pigmento utilizando el sistema de barrido fue 420 nm, gráfica No. 1.



2.-Efecto de la Aa en la reacción de Maillard.

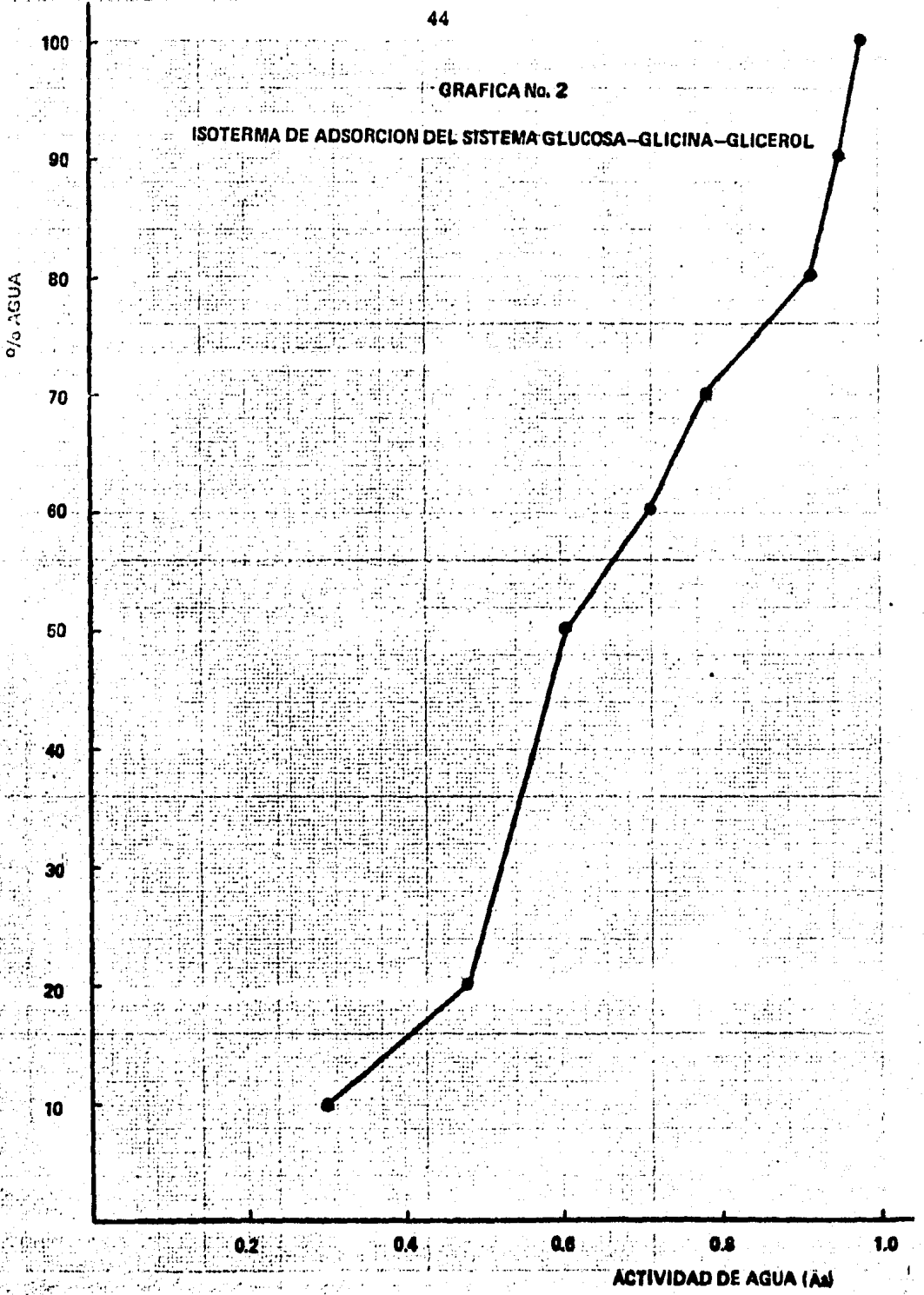
Se ordenó una serie de 8 tubos, en los cuales se determino la Aa por medio de la fórmula 2 de la práctica 1. -- Los valores de absorbancia, % de humedad y de Aa se muestran a continuación.

Tubos	% agua	Moles totales	Moles de agua	Absorbancia	Aa
1	100	0.5650	0.555	0.07	0.98
2	90	0.5230	0.5	0.08	0.95
3	80	0.4815	0.445	0.06	0.92
4	70	0.4385	0.39	0.09	0.78
5	60	0.3947	0.334	0.15	0.71
6	50	0.3545	0.278	0.26	0.61
7	20	0.229	0.111	0.49	0.48
8	10	0.1867	0.055	1.30	0.30

3.-Con estos datos se procedio a elaborar la curva de adsorción, gráfica No.2. La influencia de la Aa en la reacción de Maillard se puede observar en la gráfica No.3, -- que está acorde a lo reportado en la literatura.

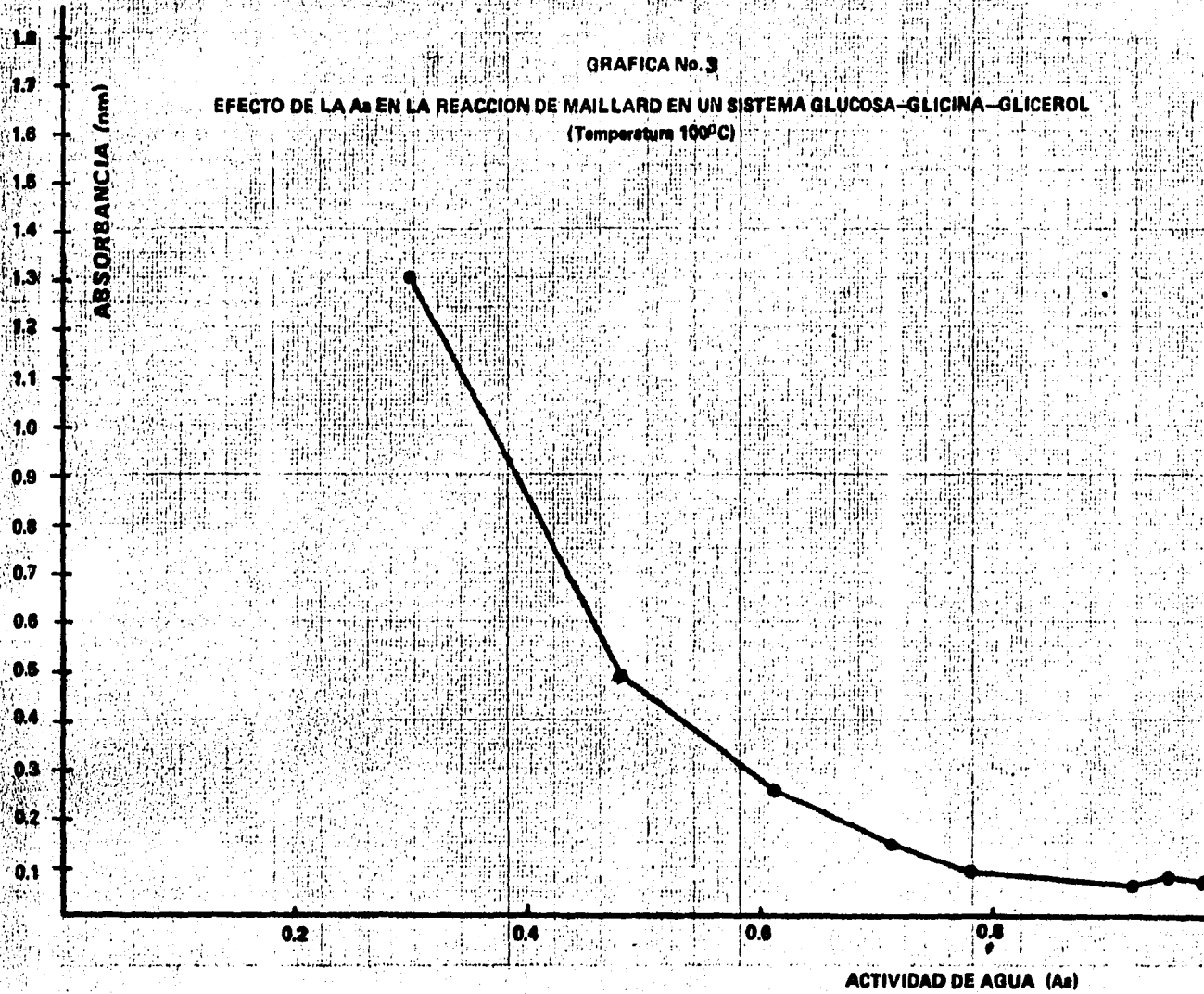
GRAFICA No. 2

ISOTERMA DE ADSORCION DEL SISTEMA GLUCOSA-GLICINA-GLICEROL



GRAFICA No. 3

EFEECTO DE LA A_w EN LA REACCION DE MAILLARD EN UN SISTEMA GLUCOSA-GLICINA-GLICEROL
(Temperatura 100°C)



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La reacción de Maillard en un sistema modelo glucosa - glicina - glicerol (como el propuesto en la práctica) muestra una mayor concentración del pigmento en condiciones de Aa bajas, -- debido principalmente al efecto deshidratante del glicerol; esto es, se ocasiona un aumento considerable en la concentración de reactivo lo que provoca el efecto ya mencionado. Conforme a la fórmula 5 de la práctica, podemos observar que si la cantidad de agua disminuye, la velocidad tiende a comportarse en -- forma similar, este efecto no neutraliza el producido por el -- aumento en la concentración de reactivos en conjunto con la -- Ley de Acción de Masas, por lo que el resultado no es el esperado, de acuerdo con Labuza, 1977. Fig. 2 de la práctica 1.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Qué influencia tiene el glicerol en la reacción de Maillard?
- 2.-Dé acuerdo con sus resultados; ¿Qué efecto tiene la Aa en la reacción?
- 3.-¿Qué efecto tiene la adición de sulfitos en un sistema igual al que se empleo en la práctica?
- 4.-¿Los productos de la reacción de Maillard son iguales a los de caramelización? ¿Por qué?
- 5.-¿Qué efecto tiene el pH y la temperatura en la reacción?
- 6.-¿Cuales son los productos responsables del aroma y sabor en la reacción de Maillard y de donde provienen?
- 7.-¿Qué aminoácidos pueden intervenir con más frecuencia en la reacción de Maillard?

- 8.-¿Como se puede inhibir la reacción de Maillard?
- 9.-Explique si sus resultados coinciden con los reportados en la literatura.
- 10.-¿Por qué al aumentar el contenido de agua disminuye la velocidad de oscurecimiento?
- 11.-¿Cómo influye la viscosidad en la velocidad de reacción?
- 12.-¿Qué consecuencias tiene en el valor nutritivo este tipo de oscurecimiento?
- 13.-¿Por qué el agua generada durante la reacción, produce inhibición de la reacción?
- 14.-¿Por qué un aumento considerable en la Aa reduce la velocidad de oscurecimiento?
- 15.-¿Por qué la reacción se inhibe a pH abajo del punto isoélectrico de los aminoácidos?
- 16.-Mencione tres alimentos que sufran la reacción de Maillard durante su procesamiento.
- 17.-¿En qué sistemas de los propuestos a continuación, es más susceptible de llevarse a cabo la reacción de Maillard? ¿Por qué?
 - a) almidón + caseína
 - b) sacarosa + caseína
 - c) lactosa + caseína

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Eichner K. and Karel M. "The Influence of Water Content and Water Activity on the Sugar-Amino, Browning Reaction in Model Systems Under Various Conditions" J. Agr. Food Chem. 20 (2) 218 (1972).
- 2.-Ellis C.P. "The Maillard Reaction" Adv. Carboh. Chem. Biochem. 14 63 (1959).
- 3.-Foster A.B. and Horton D. "Aspects of the Chemistry of the Amino Sugars" Adv. Carboh. Chem. Biochem. 14 214 (1959).
- 4.-Labuza T.P., Nally L. Mc., Gallagher D., Hawkes J. and Hurtado F. "Stability of Intermediate Moisture Foods. 1. Lipid -- Oxidation" J. Food Sci. 37 154 (1972).
- 5.-Labuza T.P., Cassil S. and Sinske J. "Stability of Intermediate Moisture Foods. 2. Microbiology" J. Food Sci. 37 160 -- (1972).
- 6.-Labuza T.P., Warren R.M. and Warmbier H.C. "The Physical Aspects with Respect to Water and Non-Enzymatic Browning" Adv.-Exp. Med. Biol. 86B 25 (1977).
- 7.-Reynolds T.M. "Chemistry of Nonenzymic Browning" Adv. in Food of Res. 14 168 (1965).
- 8.-Warmbier H.C., Schnikels R.A. and Labuza T.P. "Effect of Glycerol on Non-Enzymatic Browning in a Solid Intermediate Moisture Model Food System" J. Food Sci. 41 528 (1976).

B) Reacción de caramelización .

OBJETIVO

Observar los cambios que le suceden a los carbohidratos - al ser sometidos a temperaturas elevadas y medir tal efecto -- por la formación de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) por una técnica espectrofotométrica.

GENERALIDADES

Al someter los azúcares en estado cristalino o como jarabes a temperaturas superiores a su punto de fusión o ebullición, se generan, por una serie de reacciones complejas, pigmentos similares a los desarrollados en la reacción de Maillard, pero con diferentes mecanismos para su formación. Dichos mecanismos involucran principalmente reacciones de: A) hidrólisis, B) deshidratación, C) fragmentación y D) polimerización que a continuación se discuten.

A) Hidrólisis, se lleva a cabo en sacarosa, en oligo y polisacáridos empleados para la fabricación de caramelos. En los inicios de la reacción, una mínima parte de la sacarosa se transforma en H_2O y CO_2 ; esta agua permite que otra porción de sacarosa se hidrolice produciendo monosacáridos cuyo destino final será la formación de 5-HMF y productos aromáticos. Por otro lado, si las condiciones del sistema son ácidas, es más probable que la reacción se lleve a cabo; como ejemplo podría citarse los alimentos enlatados donde se emplea como vehículo los jarabes.

bes de sacarosa y las condiciones son ligeramente ácidas, lo que favorece la reacción.

A su vez, los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de la sacarosa, también sufren reacciones de deshidratación y fragmentación durante el transcurso del tratamiento térmico.

B) Deshidratación, a 200 °C la deshidratación de la sacarosa se efectúa en 4 pasos con producción de 9 moléculas de H₂O; la primera deshidratación induce la formación de isosacarosanos (Lee, 1980). Estos, al permanecer más tiempo a la misma temperatura, se condensan, produciendo caramelanos con pérdida de dos moléculas de agua, que a su vez forman los caramelenos a través de reacciones de deshidratación. En la última etapa del calentamiento, se forma una masa oscura de alto peso molecular llamada caramelino o sustancia húmica (Guenther, 1936) con fórmula condensada $C_{125}H_{188}O_{80}$ comúnmente conocido como caramelo.

Por otro lado, a partir de los monosacáridos provenientes de la hidrólisis de los oligosacáridos, se obtienen a) de glucosa, glucosanos y levoglucosanos, y b) de fructosa, levulosanos y fructosa dianhídrica (producto conocido como reversión). Estas sustancias por subsecuentes deshidrataciones forman furfural y/o sus derivados. El siguiente diagrama muestra en forma condensada las reacciones mencionadas anteriormente y que son válidas bajo condiciones de alta concentración o en ausencia de agua, Fig. 1.

Cuando los monosacáridos se encuentran en un medio acuoso y a bajas concentraciones, el primer cambio que sufren es la apertura del anillo hemiacetalico y la formación de los isóme-

ros α y β , alcanzando los tres el equilibrio, fenómeno conocido con el nombre de mutarrotación.

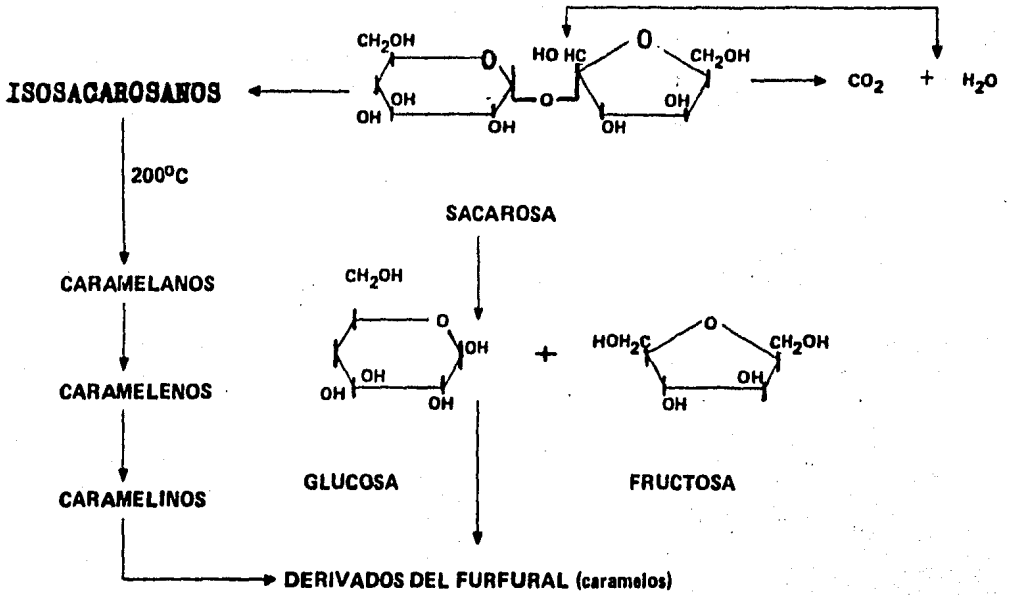


Fig. 1 Deshidratación de la sacarosa.

Si se somete esta solución a temperaturas elevadas, se efectuara la enolización de la forma acíclica, siendo más favorecida en condiciones ligeramente alcalinas o neutras, Fig. 2.

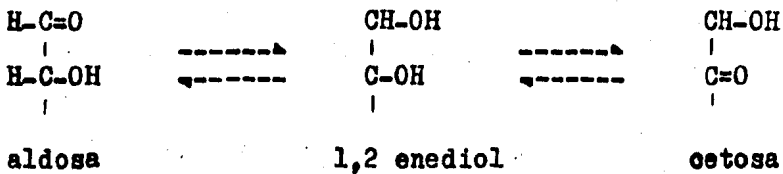
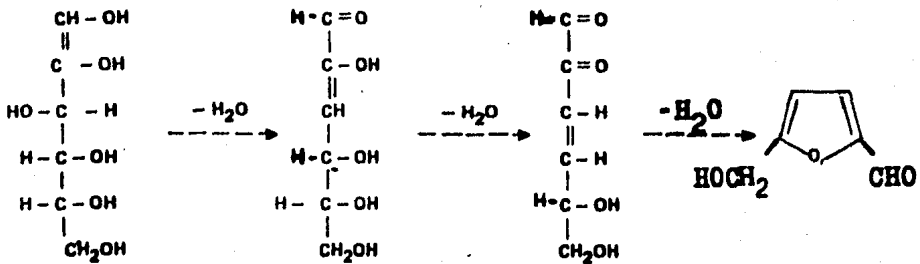


Fig. 2 Reacciones de isomerización de aldehídos y cetonas en medio alcalino (Hodge, 1976).

Esta interconversión se conoce con el nombre de transformación de Lobry-Alberda Van Eckenstein. Si se eleva la temperatura, se efectuaran reacciones de deshidratación formandose el 5-HMF, - como se muestra en el siguiente esquema, Fig. 3.



1,2 enediol

Fig. 3 Formación de derivados del furfural a partir de hexosas (Eskin, 1971).

C) Fragmentación, los productos de fragmentación son los que dan aroma característico al caramelo durante su manufactura y se generan por descomposición de 5-HMF y otros compuestos. Por análisis cromatográfico se han reconocido hasta 15 productos volátiles que se forman al tratar la fructosa en solución acuosa a pH 11, (Priestley, 1979) pero tan sólo algunos de ellos son responsables de olor a caramelo.

D) Polimerización, la condensación de 5-HMF o de sus derivados - produce polímeros de alto peso molecular (mencionados anteriormente) cuya formación se ve favorecida a pH ácido.

Las reacciones de caramelización son importantes para la -- producción de los caramelos comerciales que se emplean en la --- manufactura de distintos alimentos y de acuerdo con las condicio nes de fabricación tendrán características propias de color y sa bor que son requeridos para diferentes productos.

En esta práctica se determinará el efecto que tiene la tem peratura en la manufactura del caramelo, así como también el -- efecto del pH en la intensidad del pigmento y en la producción - de aromas.

MATERIAL

- Agitador (1)
- Balanza granataria (1)
- Espectrofotómetro (1)
- Gradilla (1)
- Matraz aforado de 100 ml (1)
- Mechero (1)
- Pipeta graduada de 1 ml (1)
- Pipeta graduada de 10 ml (1)
- Pinzas para tubo de ensayo (1)
- Recipiente para baño maría (1)
- Tela de asbesto (1)
- Tubos de ensayo (27)
- Termómetro (-10 a 400 °C) (1)

REACTIVOS

- i) Acido clorhídrico 1×10^{-2} N 1 ml
- ii) Acido clorhídrico 1×10^{-4} N 1 ml
- iii) Hidróxido de sodio 1×10^{-4} N 1 ml
- iv) Hidróxido de sodio 1×10^{-6} N 1 ml

MUESTRA PROBLEMA

- a) Sacarosa 67 g
- b) Mieles incristalizables 5 ml

PROCEDIMIENTO

I.- Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del pigmento.

- a) Pesar 5 g de sacarosa en un tubo de ensayo.
- b) Calentar el tubo en un baño de nujol a 200 °C, durante 3 minutos.
- c) Adicionar 10 ml de agua (de preferencia caliente) y con ayuda de un agitador disolver el caramelo formado.
- d) Tomar 1 ml de esta solución y diluir a 100 ml.
- e) Con la solución anterior llenar las celdas del espectrofotómetro y operar el sistema de barrido como se indica en la práctica de la reacción de Maillard.

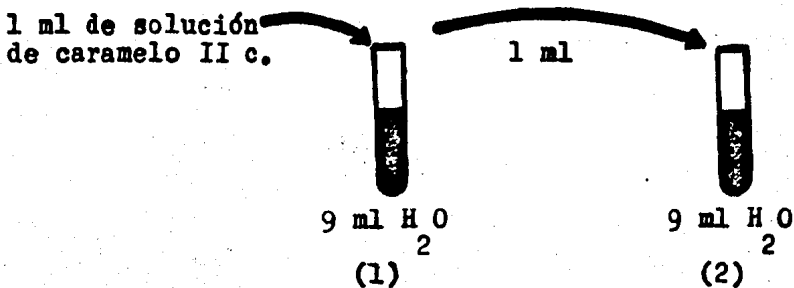
II.- Efecto de la temperatura en la reacción de caramelización.

- a) Formar una serie de 7 tubos de ensayo y pesar en cada uno 5 g de sacarosa.
- b) Colocar los tubos en un recipiente para baño maría que contenga nujol (también se puede utilizar aceite de automóvil) a la temperatura que se indica a continuación; teniendo precaución de que estén secos, así como también evitar el contacto con el agua.

Tubo	Temperatura (°C)	Tiempo de permanencia a la temperatura indicada, en el baño de nujol
1	190	3 min.
2	200	3 min.
3	210	3 min.
4	220	3 min.
5	230	3 min.
6	240	3 min.
7	250	3 min.

c) Después de haber retirado el tubo del baño de nujol, -
adicionar con mucho cuidado 10 ml de agua y disolver el -
caramelo con ayuda de un agitador. Realizar esta opera --
ción para cada uno de los tubos.

d) Diluir 1 ml de cada solución con 100 ml de agua, o --
bien preparar dos tubos con 9 ml de agua c/u y realizar -
diluciones con 1 ml de la solución, como se indica en la-
siguiente figura.



III.- Efecto del pH.

a) Preparar las siguientes soluciones; 10^{-2} N y 10^{-4} N de HCl; 10^{-4} N y 10^{-6} N de NaOH, cuyo pH corresponde a un valor aproximado de 2, 4, 10 y 8 respectivamente.

b) Colocar en 5 tubos de ensayo 5 g de azúcar y adicionar a cada uno 1 ml de una de las soluciones preparadas, utilizar agua destilada en calidad de la solución a pH 7, como se indica a continuación:

Tubo	ml de solución	pH
1	1	2
2	1	4
3	1	7
4	1	8
5	1	10

c) Colocar los tubos en un baño de nujol a 200° C, durante 3 minutos.

d) Posteriormente retirar los tubos del nujol y con mucho cuidado adicionar 10 ml de agua y disolver el caramelo, en cada uno de los tubos.

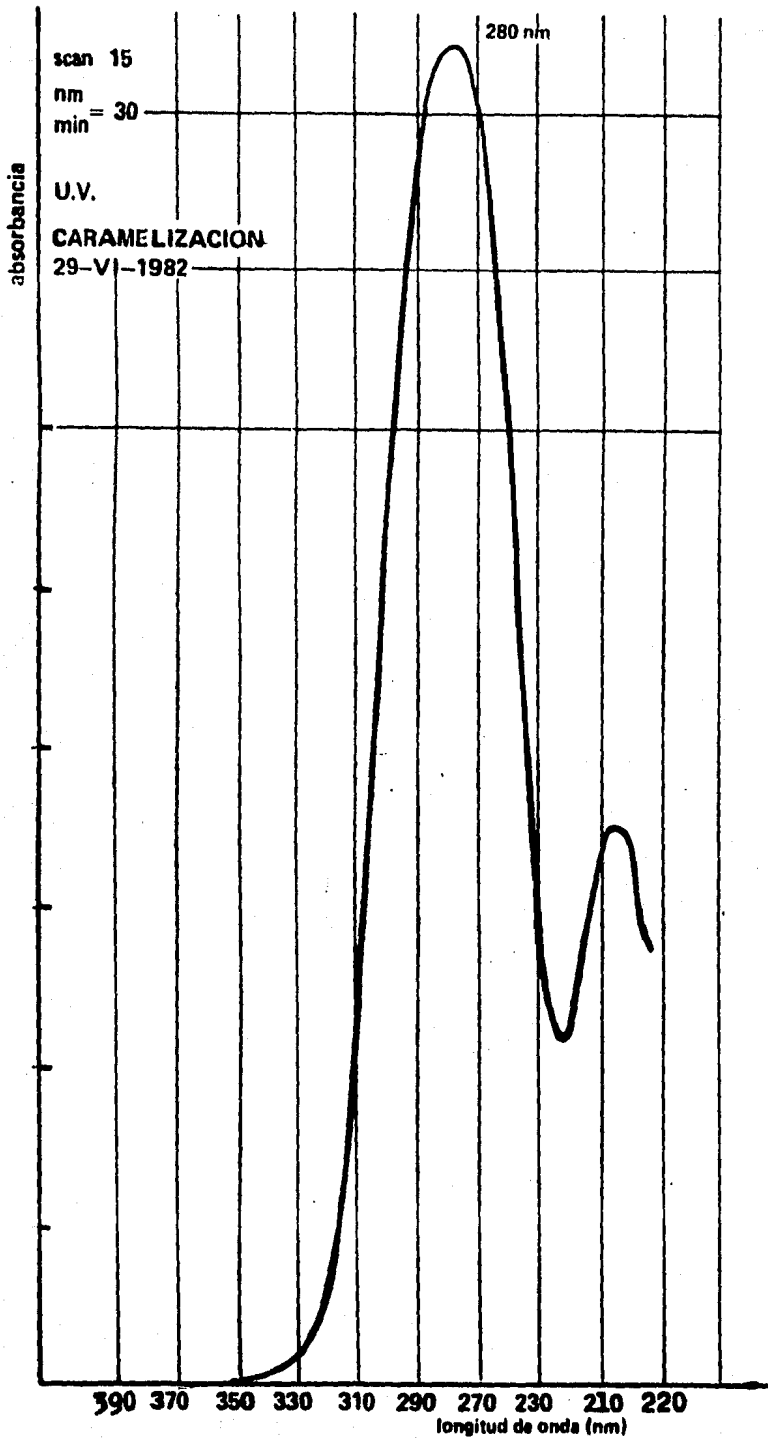
e) Diluir las soluciones como se indica en la sección IIId.

f) Verificar si existen cambios en el aroma, colocando 2 g de sacarosa en un tubo de ensayo y calentar directamente al mechero hasta caramelizarlo y posteriormente comparar su aroma con el de las mieles incristalizables.

IV.- Leer los tubos de la sección II y III en el espectrófotometro a la longitud de onda previamente encontrada y realizar las siguientes gráficas:

- absorbancia v.s. temperatura.
- absorbancia v.s. pH.

GRAFICA No. 1



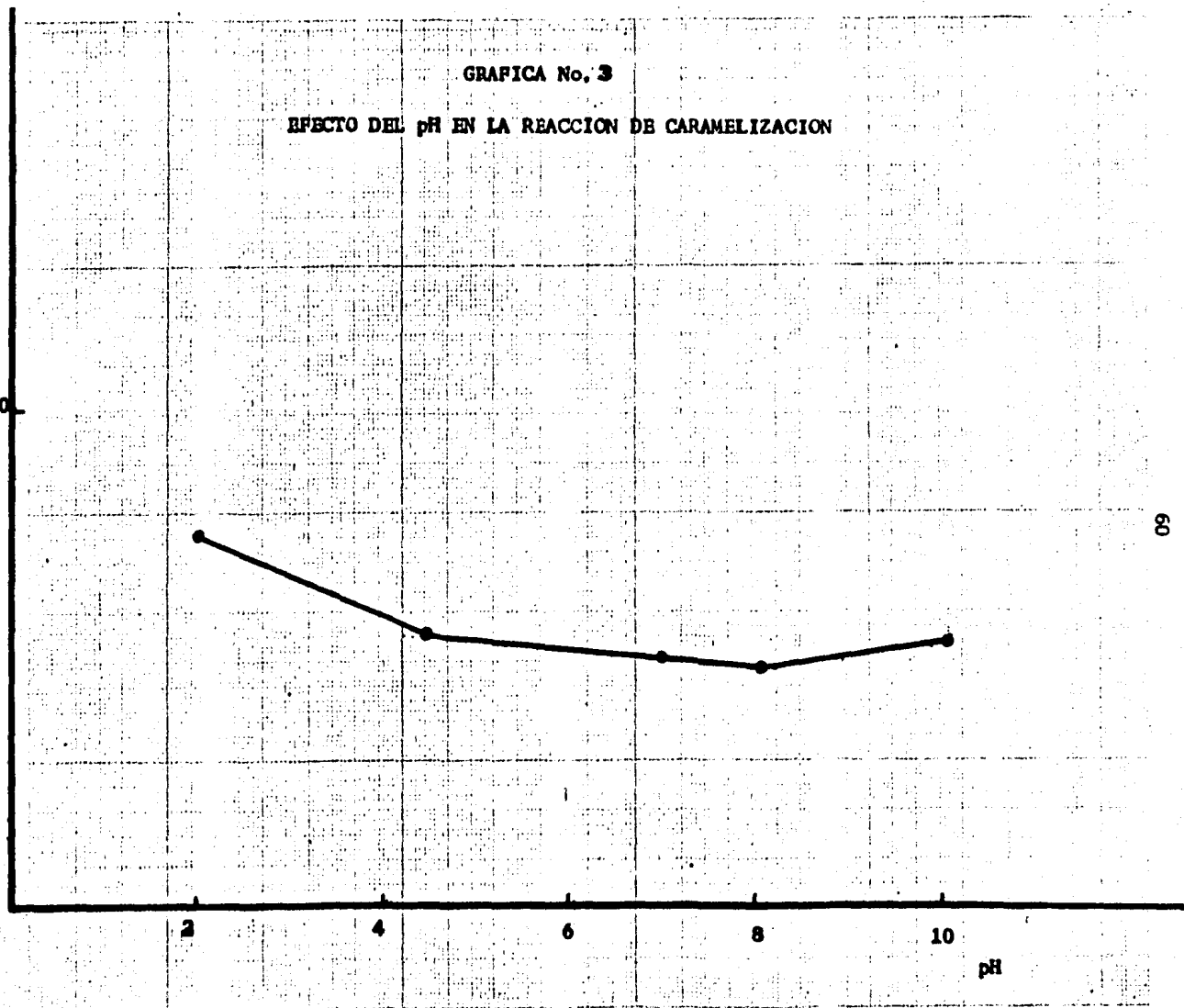
Longitud de onda de máxima absorción del pigmento es de 280 nm.

GRAFICA No. 3

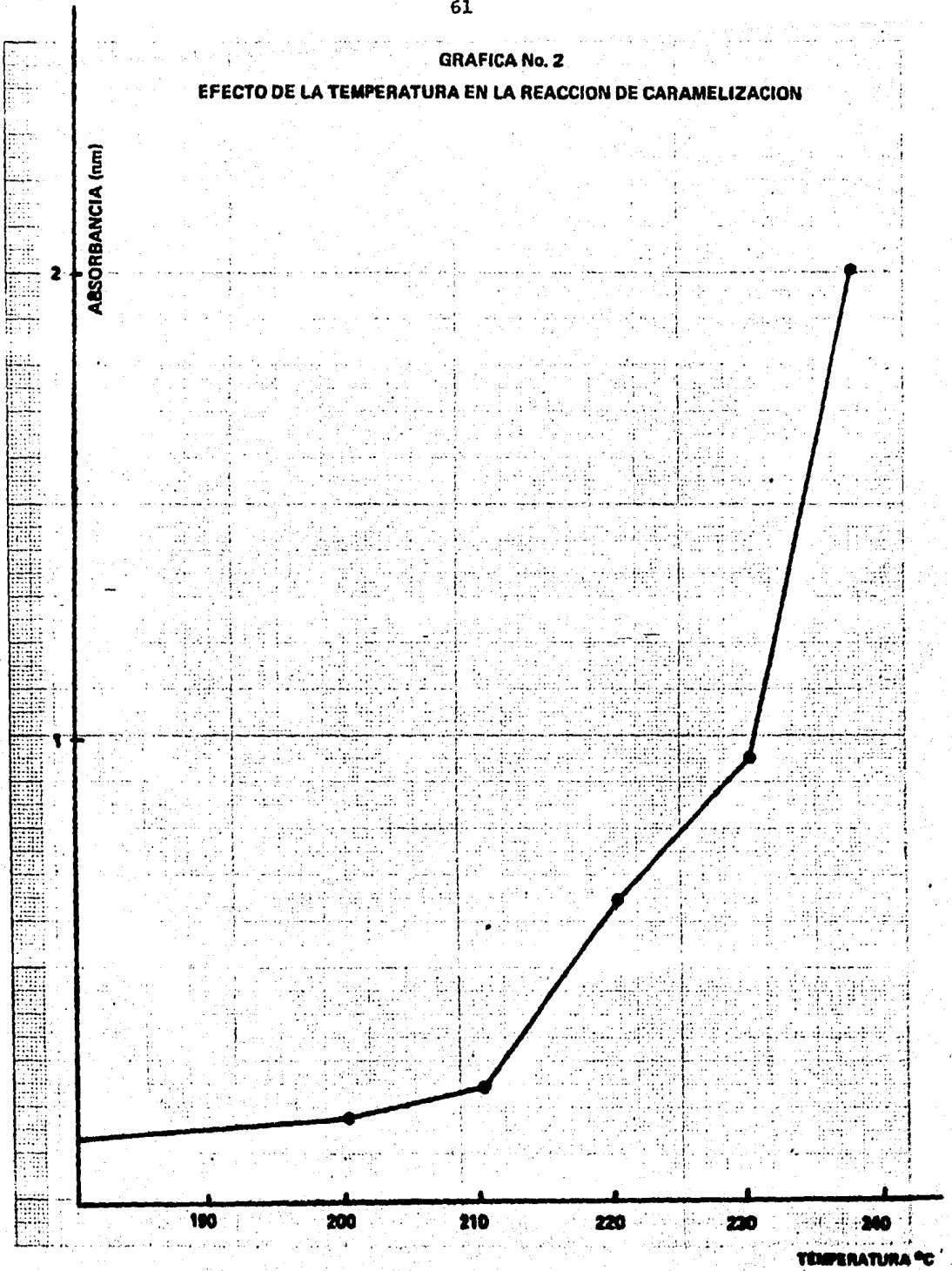
EFFECTO DEL pH EN LA REACCION DE CAMELIZACION

ABSORBANCIA (m)

1.0



GRAFICA No. 2
EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACCION DE CAMELIZACION



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Puede observarse que la formación de 5-hidroximetilfurfural se ve favorecida a medida que aumenta la temperatura, teniendo un comportamiento de tipo lineal hasta 210^o C, para posteriormente adoptar uno de tipo logarítmico. No se distingue diferencia en la producción de aroma debido probablemente a la cantidad de azúcar o bien a que el nujol enmascara el olor al quemarse, pero si se observan cambios de concentración del pigmento a diferentes pH, mostrando que la producción de éste se favorece a pH ácido.

CUESTIONARIO

- 1.-Mencione que reacciones se llevan a cabo a los pH empleados en la práctica.
- 2.-¿A qué pH se favorece la formación del pigmento oscuro?
¿Por qué?
- 3.-¿Qué cambios estructurales sufre la sacarosa conforme se incrementa la temperatura?
- 4.-Dé tres ejemplos de alimentos en los cuales es deseable la formación de caramelo.
- 5.-Si usted desea un aroma y un sabor más intenso para su producto, que haría. ¿Por qué?
- 6.-¿Qué son las melanoidinas?
- 7.-Si en lugar de sacarosa se hubiera usado maltosa ¿Se obtendrían los mismos productos? ¿Por qué?
- 8.-¿Por qué es importante controlar el pH y la temperatura en la elaboración de caramelo?

- 9.-¿Qué compuestos son responsables del aroma a caramelo?
- 10.-¿Cuales son los principales productos de descomposición -- que se producen durante la reacción de caramelización?
- 11.-Diga en que paso de la reacción de caramelización es probable que se formen los caramelinós.
- 12.-¿Cuales son los principales productos de descomposición en la reacción de caramelización?
- 13.-¿Qué diferencia existe entre un caramelo elaborado a un pH 2 y uno elaborado a pH 8?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Badui Dergal S. "Química de los Alimentos" (Ed) Alhambra, S.A. México, (1981).
- 2.-Hodge J.E. and Osman E.M. "Carbohydrates" O.R. Fennema (Ed) - Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York, (1976).
- 3.-Lee A.F. "Browning Reactions" Food Chem. (Ed). Avi Publishing Co., Westport, Conn, (1980).
- 4.-Newth F.H. "Formation of Furan from Hexosas" Adv. Carboh. -- Chem. Biochem. 6 83 (1951).
- 5.-Plunguian M. and Hibbert H. "Studies on Lignin and Related -- Compounds XI. The Nature of Lignite Humic Acid and of the so Called Humic Acid from Sucrose" J. Am. Chem. Soc. 57 528 -- (1935).
- 6.-Priestley R.J. "Effects of Heating on Foodstuffs" Applied Science Publishers LTD London (1979).
- 7.-Scallet B.L. and Gradner J.H. "Formation of 5-Hydroxymethyl - furfural from D-Glucose in Aqueous Solution" J. Am. Chem. Soc. 67 1934 (1945).
- 8.-Von Elbe G. "The Nature of Sucrose Caramel" J. Am. Chem. Soc.- 58 600 (1945).

C) Oscurecimiento enzimático

OBJETIVO

Conocer las condiciones en las que se lleva a cabo el oscurecimiento enzimático, así como también el efecto que tienen ciertos factores (pH, temperatura y concentración de sulfitos) en la actividad de la enzima.

GENERALIDADES

Dentro de las reacciones de oscurecimiento de los alimentos, se considera de gran importancia las de naturaleza enzimática, debido a que se llevan a cabo en muchos frutos y vegetales, produciendo cambios en su sabor y apariencia, ocasionando un rechazo por parte del consumidor; sin embargo, en algunos casos es deseable, como en el tostado del café o en la elaboración de jugo de manzana, donde se requiere cierta tonalidad oscura para exaltar las características sensoriales del producto.

Las enzimas responsables de este tipo de oscurecimiento se nombran genericamente como complejo polifenol oxidasa (E C 1.10.3.1), llamado así por presentar dos tipos de actividad; A) de fenol hidrolasa y B) de polifenol oxidasa. La primera interviene en la hidroxilación de algunos monofenoles y la segunda lleva a cabo la oxidación de Q - dihidroxifenoles a quinonas, como se muestra en la figura 1. Puede asimismo observarse que para la formación de pigmentos se requiere de: a) enzima, b) sustrato y c) oxígeno, todos ellos en forma conjunta, por lo-

que la ausencia de alguno de éstos factores evita la producción de melaninas (productos finales de la actividad enzimática).

Los métodos para evitar la reacción se fundamentan en la--eliminación o inhibición de alguno de los factores mencionados--anteriormente ya sea por medios físicos o químicos, ofreciéndose--se una breve descripción de estos a continuación.

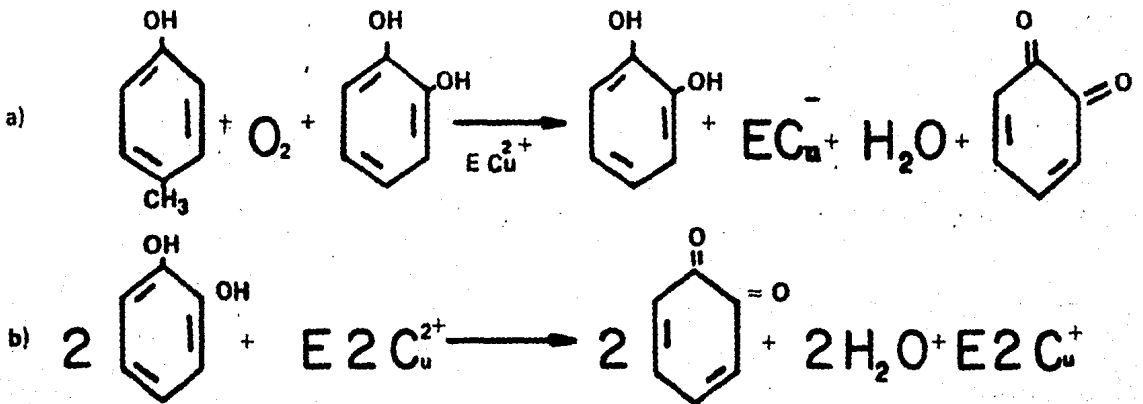
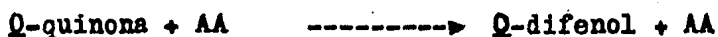
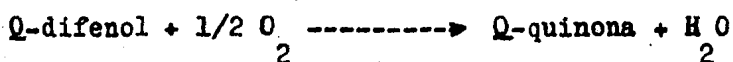


Fig. 1 Acción del complejo polifenol oxidasa; a) actividad cresolasa y b) actividad catecolasa.

A.-Efecto de la temperatura, al someter los frutos y vegetales a temperaturas de 90-95 °C se está efectuando un escaldado. Esta operación tiene como finalidad inactivar las enzimas presentes en el alimento y de esta forma evitar daños posibles que puedan presentarse durante su posterior manipulación por acción de estos catalizadores biológicos. La polifenol oxidasa presenta una temperatura óptima de 25 - 30 °C, por lo que en el escaldado esta enzima queda inactivada totalmente. El comportamiento que presenta la enzima por acción de la temperatura pueda observarse en la Fig. 2.

B.-Efecto del pH, el pH óptimo de la fenolhidrolasa se encuentra en el intervalo de 6-7 por lo que el empleo de acidulantes afecta su actividad, siendo los más usados el málico, el ascórbico, el cítrico y el fosfórico. Estos ácidos además de disminuir el pH tienen la capacidad de actuar como agentes quelantes, es decir secuestran iones metálicos como el Cu^{+2} y Fe^{+2} o bien actúan como reductores en los sistemas enzimáticos. Este último comportamiento puede observarse en la siguiente reacción.



AA = ácido ascórbico.

La Fig. 3 muestra como afecta el pH en la actividad enzimática y a que valores se lleva a cabo su inactivación.

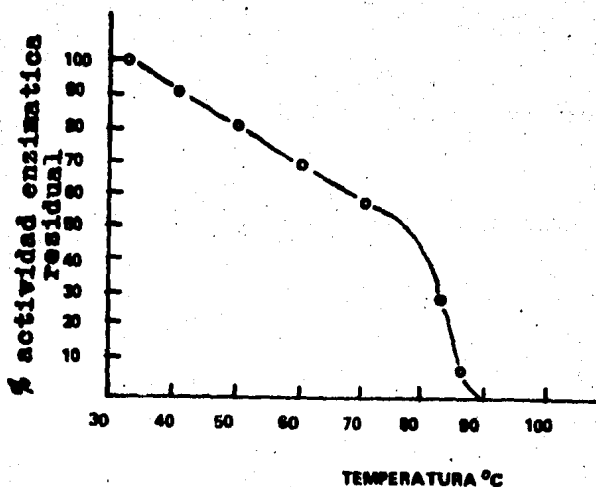


Fig.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad fenolasa (Eskin, 1971).

C.-Efecto de la concentración de sulfitos, el agente químico más utilizado para prevenir el oscurecimiento es el dióxido de azufre (en estado gaseoso o en forma de ácido sulfuroso); su adición se hace necesaria en los casos en que la aplicación -- del escaldado produce un cambio desfavorable en la textura del fruto o vegetal. Su modo de acción no se conoce, pero existen varias teorías que tratan de explicarlo, siendo la más aceptada la de Embs y Markakis (Eskin, 1971) que sugiere que el dióxido de azufre inhibe la reacción porque interactúa con las -- quinonas no permitiendo su polimerización.

La Fig. 4, muestra como afecta la concentración de sulfitos la velocidad de reacción; las ventajas que presenta el SO_2 es que tiene propiedades antisepticas y previene la oxidación de la vitamina C, aunque su uso puede provocar olores desagradables y en algunos casos, corrosión de latas.

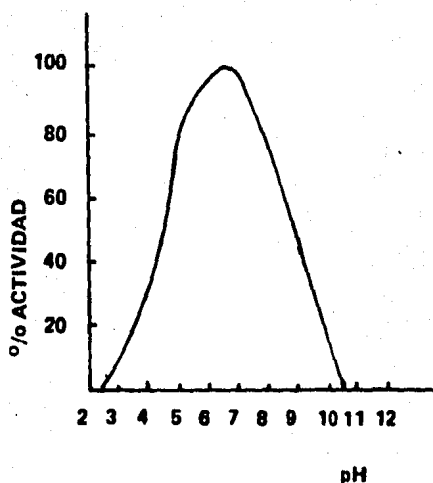


Fig. 3 Efecto del pH sobre la actividad fenolasa (Eskin, 1971).

D.-Efecto de la Aa, Acker (1969) siguió la oxidación del catecol (sustrato de la enzima) por acción de la polifenol oxidasa en un sistema modelo polifenol oxidasa-celulosa-catecol, con -cluyendo que a medida que aumenta la Aa la actividad enzimática también se incrementa.

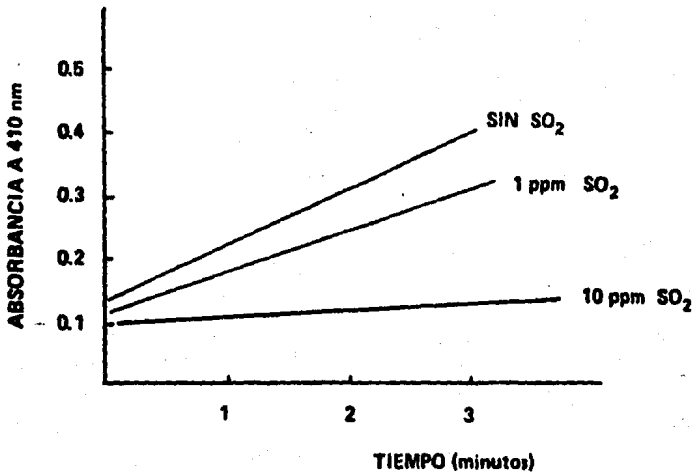


Fig. 4 Efecto del dióxido de azufre sobre la actividad fenolasa. (Eskin, 1971).

Los pigmentos formados tienen una absorbancia máxima a -- 410-420 nm, que es muy semejante a la encontrada para las melanoidinas producidas por la reacción de Maillard; sin embargo, su determinación espectroscópica resulta en este caso más complicada y laboriosa, por lo que se procedera a determinar el oscurecimiento en forma totalmente subjetiva. Este es un método poco preciso, pero resulta ser el más adecuado.

Para lograr un mejor resultado, el alumno podrá usar una escala arbitraria de valores de 0-10, en la que el 0 represen-

ta el color del fruto fresco sin pigmentación y el 10, el color del fruto en su estado máximo de oscurecimiento.

MATERIAL

- Cronómetro (1)
- Cuchillo (1)
- Estufa (de 0 a 200 C) (1)
- Matraz aforado de 100 ml (2)
- Mechero (1)
- Refrigerador (1)
- Tripie (1)
- Termómetro (-10 a 250 C) (1)
- Tela de asbesto (1)
- Vasos de precipitado de 250 ml (2)
- Vasos de poliuretano de 50 ml (47)

REACTIVOS

- i) NaHSO₃0.5 g
- ii) Acido cítrico0.5 g
- iii) Solución de HCl 1 N1 ml

MUESTRA PROBLEMA

- a) Papa o aguacate, medianamente maduro.

PROCEDIMIENTO

- I.- Cortar la papa o aguacate en 29 fracciones y colocarlas -

en un vaso de precipitado con agua, (para evitar su oscurecimiento, mientras son utilizadas).

II.- Efecto del oxígeno.

- a) Tomar una fracción de la sección I y colocarla en un vaso de poliuretano.
- b) Observar la coloración de la muestra, cada 10 minutos (hasta 1 hora).
- c) Reportar los cambios producidos en la coloración de la muestra.

III.- Efecto del SO_2 .

- a) Preparar 25 ml de solución de NaHSO_3 a las siguientes concentraciones: 0, 50, 100, 150, 200 y 300 ppm.
- b) Numerar 6 vasos de poliuretano y etiquetarlos con cada una de las concentraciones anteriores.
- c) Adicionar 25 ml de cada solución al vaso respectivo y una fracción de papa o aguacate de la sección I.
- d) Esperar 10 minutos y retirar la fracción, colocarla en otro vaso y aguardar 10 minutos.
- e) Comparar cada fracción con la de concentración 0 y reportar a que concentración de NaHSO_3 es inhibido el oscurecimiento enzimático.

IV.- Efecto del ácido cítrico.

- a) Preparar 25 ml de solución de ácido cítrico a las siguientes concentraciones; 0, 50, 100, 150, 200 y 300 ppm.
- b) Seguir la metodología descrita en la sección III b, c y d.
- c) Observar la coloración de cada una de las muestras y reportar la concentración de ácido cítrico que evita el

oscurecimiento en mayor grado.

V.- Efecto del pH.

a) Preparar las siguientes soluciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} N de HCl y 10^{-5} N de NaOH, cuyo pH corresponde a un valor aproximado de 2, 3, 4, 5 y 9, respectivamente. Utilizar agua destilada como solución a pH 7.

b) Seguir el mismo procedimiento que en la sección III b, c y d.

c) Comparar la coloración de cada una de las muestras y reportar el pH en el que se evita el oscurecimiento en mayor grado.

VI.- Efecto de la temperatura y escaldado.

a) Tomar 3 fracciones de la sección I y colocar una en el refrigerador, otra en la estufa a 40° C y el restante a temperatura ambiente, durante 10 minutos.

b) Observar en cual se produce un mayor oscurecimiento.

c) Para llevar a cabo el escaldado, colocar las 7 fracciones restantes en un vaso de precipitado con 150 ml de agua y aplicar el siguiente tratamiento térmico:

Fracción	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo de permanencia a la temperatura indicada.
1	30	5 min.
2	40	5 min.
3	50	5 min.
4	60	5 min.
5	70	5 min.
6	80	5 min.
7	90	5 min.

II.-Efecto del oxígeno.

- a) Tomar una fracción de la sección I y colocarla en un -- vaso de poliuretano.
- b) Observar la coloración de la muestra, cada 10 minutos - (hasta 1 hora).
- c) Reportar los cambios producidos en la coloración de la - muestra.

III.-Efecto del SO

- a) Preparar 25² ml de solución de NaHSO₃ a las siguientes - concentraciones; 0, 50, 100, 150, 200 y 300³ ppm.
- b) Numerar 6 vasos de poliuretano y etiquetarlos con cada- una de las concentraciones anteriores.
- c) Adicionar 25 ml de cada solución al vaso respectivo y - una fracción de papa o aguacate de la sección I.
- d) Esperar 10 minutos y retirar la fracción, colocarla en otro vaso y aguardar 10 minutos.
- e) Comparar cada fracción con la de concentración 0 y re - portar a que concentración de NaHSO₃ es inhibido el oscu - recimiento enzimático.

IV.-Efecto del ácido cítrico.

- a) Preparar 25 ml de solución de ácido cítrico a las si--- guientes concentraciones; 0, 50, 100, 150, 200 y 300 ppm.
- b) Seguir la metodología descrita en la sección III b,c y d.
- c) Observar la coloración de cada una de las muestras y.- reportar la concentración de ácido cítrico que evita el os curecimiento en mayor grado.

V.-Efecto del pH.

- a) Preparar las siguientes soluciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} N de HCl y 10^{-5} N de NaOH, cuyo pH corresponde a un valor aproximado de 2, 3, 4, 5 y 9, respectivamente. Utilizar agua destilada como solución a pH 7.
- b) Seguir el mismo procedimiento que en la sección III b, c y d.
- c) Comparar la coloración de cada una de las muestras y reportar el pH en el que se evita el oscurecimiento en mayor grado.

VI.-Efecto de la temperatura y escaldado.

- a) Tomar 3 fracciones de la sección I y colocar una en el refrigerador, otra en la estufa a 40°C y el restante a temperatura ambiente, durante 10 minutos.
- b) Observar en cual se produce un mayor oscurecimiento.
- c) Para llevar a cabo el escaldado, colocar las 7 fracciones restantes en un vaso de precipitado con 150 ml de agua y aplicar el siguiente tratamiento térmico:

Fracción	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo de permanencia a la temperatura indicada.
1	30	5 min.
2	40	5 min.
3	50	5 min.
4	60	5 min.
5	70	5 min.
6	80	5 min.
7	90	5 min.

d) Después de permanecer a la temperatura indicada durante 5 minutos, extraer la fracción y colocarla en un vaso de poliuretano.

e) Esperar 10 minutos y observar la coloración de la muestra, reportar la temperatura a la que es inhibido el oscurecimiento enzimático.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos después de realizar las pruebas correspondientes a esta práctica, utilizando papa y aguacate -- son los siguientes.

1.-Efecto del oxígeno.

Muestra	Temperatura ° (°C)	Tiempo (min.)	Observación de la coloración
papa	ambiente	10	no se aprecia coloración
papa	ambiente	20	coloración oscura, muy ligera
papa	ambiente	30	ligeramente amarillo oscuro
papa	ambiente	40	escasos puntos cafés.
papa	ambiente	50	coloración café
papa	ambiente	60	coloración café intensa.

2.-Efecto de la concentración del SO₂.

2

Muestra	Concentración de SO ₂	Observaciones
papa	50 ppm	1
papa	100 ppm	1
papa	150 ppm	2
papa	200 ppm	2
papa	300 ppm	2
aguacate	50 ppm	1
aguacate	100 ppm	1
aguacate	150 ppm	2
aguacate	200 ppm	2
aguacate	300 ppm	2

3.-Efecto del ácido cítrico.

Muestra	Concentración de ácido cítrico.	Observaciones
papa	50 ppm	1
papa	100 ppm	1
papa	150 ppm	2
papa	200 ppm	2
papa	300 ppm	2
aguacate	50 ppm	1
aguacate	100 ppm	1
aguacate	150 ppm	2
aguacate	200 ppm	2
aguacate	300 ppm	2

4.-Efecto del pH.

Muestra	pH	Observaciones
papa	2	2
papa	3	2
papa	4	2
papa	5	1
papa	7	1
papa	9	2
aguacate	2	2
aguacate	3	2
aguacate	4	2
aguacate	5	1
aguacate	7	1
aguacate	9	2

5.-Efecto de la temperatura y escaldado.

Muestra	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)	Observaciones
papa	40	10	1
papa	ambiente	10	1
papa	congelación	10	2
aguacate	40	10	1
aguacate	ambiente	10	1
aguacate	congelación	10	2

b) Escaldado.

Muestra	Temperatura (°C)	Observaciones
papa	30	1
papa	40	1
papa	50	1
papa	60	2
papa	70	2
papa	80	2
papa	90	2

1 = no es inhibida la enzima.

2 = es inhibida la enzima.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Las condiciones óptimas para la enzima fuerón: pH 5-7 y -- una temperatura de 30-40 ° C en presencia de oxígeno, siendo --- inhibida por la adición de sulfitos, por el ácido cítrico en -- concentración mayor de 150 ppm, a temperaturas superiores de -- 40 ° C y a valores de pH menores de 4 y mayores de 7. La congela ción es otra forma de prevenir el oscurecimiento, por que al no existir movilidad de los reactivos disminuye la velocidad de -- reacción.

Conociendo estos factores se pueden utilizar, en forma aig lada o combinada, para prevenir el oscurecimiento, el cual es - indeseable en los alimentos porque les imparte un aspecto y -- olor indeseable.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Por qué la muestra que se conserva a temperatura de congelación no presenta oscurecimiento?
- 2.-¿Qué es el escaldado y para que productos es recomendable?
- 3.-¿Qué son las melaninas y cual es su diferencia con las melanoidinas?
- 4.-¿Por qué no se produce oscurecimiento en el alimento intacto sin pelar?
- 5.-¿Como evitaría el oscurecimiento, sin variar el pH, la temperatura y los sulfitos?
- 6.-¿Como actúan los sulfitos y sus derivados para inactivar la enzima?
- 7.-¿Qué consecuencias tiene el oscurecimiento en el valor nutritivo del alimento?
- 8.-¿Como actúa el ácido cítrico para inactivar la enzima?
- 9.-¿Qué proporción de sulfitos y derivados se permite utilizar en México de acuerdo con los reglamentos de la SSA?
- 10.-Con base en sus resultados, cuales son las condiciones óptimas de la enzima y en que condiciones se inactiva.

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Acker L.W. "Water Activity on Activity Enzyme" Food Technol. - 23 (10) 27 (1969).
- 2.-Eskin N.A.M., Henderson H.M. and Townsend R.J. Biochemistry of Foods, Academic Press, Nueva York, 1971.
- 3.-Lee C.Y. and Smith N.L. "Blanching Effect on Polyphenol Oxidase Activity in Table Beets" J. Food Sci. 44 82 (1979).
- 4.-Schultz H.W. "Food Enzyme" Avi. Publishing Co., Westport, Conn (1960).
- 5.-Schwimmer Sigmund "Influence of Water Activity on Enzyme Reactivity and Stability" 34 (5) 64 (1980).
- 6.-Weaver C. and Charley H. "Enzymatic Browning of Ripening Bananas" J. Food Sci. 39 1200 (1974).

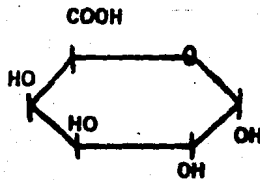
PRACTICA 4. EXTRACCION Y USO DE
PECTINAS CITRICAS

OBJETIVO

Obtener pectinas por precipitación con etanol, de un extracto ácido de cáscara de cítrico y elaborar con ella un gel.

GENERALIDADES

Al hablar de sustancias pécticas se hace referencia a un variado grupo de polisacáridos en donde el ácido galacturónico es el principal componente.



ácido galacturónico

Hasta 1949, existía una confusión en su nomenclatura, por lo que un comité de la Sociedad de Química de Estados Unidos las clasificó de la siguiente forma:

A.-Sustancias pécticas, polímero de ácido galacturónico en donde el grupo carboxilo puede estar parcialmente esterificado con grupos metilo y neutralizado por una o más bases, Fig. 1.

B.-Protopectina, sustancias pécticas insolubles que por hidrólisis producen ácidos pectínicos o pectinas.

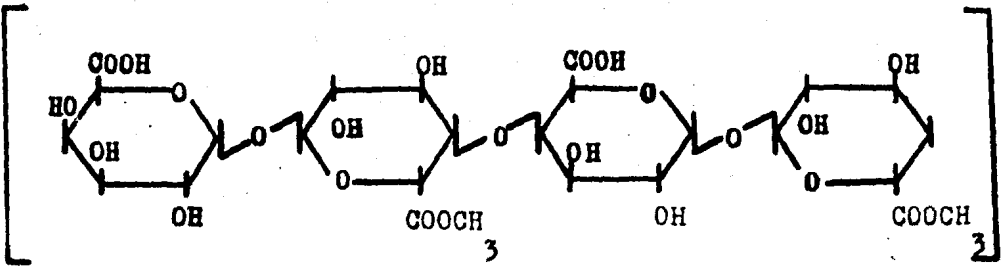


Fig.1 Polímero del ácido galacturónico parcialmente esterificado (Hodge, 1976).

C.-Ácidos pectínicos, polímero de ácido galacturónico que contienen una considerable proporción de ésteres metílicos; pueden formar geles con azúcar y ácido, o si el contenido de metoxilos es bajo, lo hacen con iones metálicos. Sus sales son los pectinatos.

D.-Pectina, ácidos pectínicos solubles con un grado de esterificación variable, clasificándose en función de esto en; a) pectinas de alto metoxilo (75 % grado de esterificación) y b) pectinas de bajo metoxilo (25 % grado de esterificación), son capaces de formar geles con azúcar y ácido en condiciones apropiadas.

E.-Ácidos pectínicos, sustancias pécticas que no poseen radicales metoxilo y a sus sales se les conoce como pectatos.

Las sustancias pécticas aparecen en todas las plantas, -- principalmente en frutos y tejidos jóvenes, en forma soluble -- (pectina) o insoluble (protopectina) y cuya concentración relativa depende del estado de madurez. La forma insoluble se en --

cuentra como sal de calcio y magnesio o unida a polisacáridos - de alto peso molecular como celulosa, la cual por reacciones enzimáticas que suceden durante la maduración se transforma a pectina permitiendo que el fruto aumente su tamaño y modifique su textura, haciéndose más blando, (Kramer, 1970).

Las pectinas son solubles en agua y su amplio uso en la industria alimentaria se basa en la propiedad de formar geles, cuya viscosidad depende en gran medida de los siguientes factores:

A) Efecto del pH, en condiciones alcalinas y a temperaturas bajas, los grupos éster son saponificables, pero al aumentar la temperatura se provoca ruptura del enlace glucosídico entre unidades de ácido galacturónico. Por esta razón los pectatos son más estables a temperaturas elevadas que los pectinatos, Fig. 2.

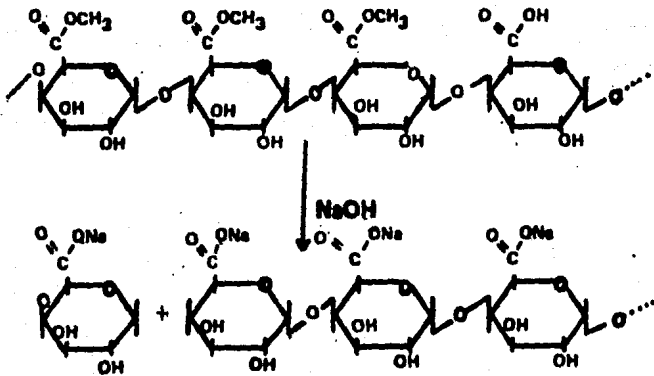


Fig. 2 Degradación por álcali de la pectina (Hodge, 1976).

El intervalo de pH en el cual se alcanza la mejor gelificación es de 2.8-4.0 a temperatura ambiente; en estas condiciones se produce una hidrólisis parcial del enlace éster con muy poca

degradación del polímero. Cabe mencionar que esta reacción en forma controlada es usada para preparar pectinas de bajo metoxilo. Si se eleva la temperatura, se hidroliza el enlace éster y el glucosídico, provocando reacciones de oscurecimiento tipo caramelización, dependiendo de la temperatura que se alcance.

B) Efecto de la fuerza iónica, la adición de sales formadas por iones divalentes (principalmente calcio), aumentan la viscosidad del sistema generalmente en pectinas de bajo metoxilo, en las cuales los radicales carboxilo interaccionan por fuerzas electrostáticas con los iones divalentes que actúan como puentes de unión entre los polisacáridos. Este efecto se favorece a pH alcalino (8.6), Fig. 3.

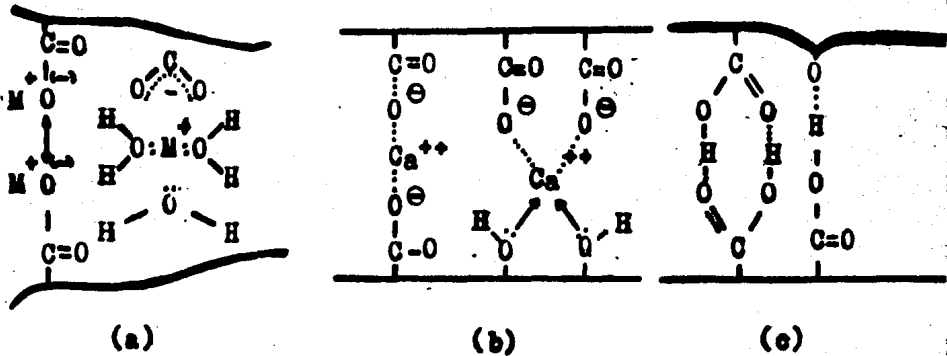


Fig. 3 Tipos de interacciones entre los grupos aniónicos de los polisacáridos en un medio: a) neutro, b) con sales (cationes polivalentes) y c) ácido (pH 3) (Hodge, 1976).

C) Efecto de la cantidad de azúcar, el azúcar es un componente importante para la manufactura de jaleas o mermeladas y constituye el 60-70 % en peso de estos productos. Su modo de acción no se conoce totalmente, sin embargo la teoría más aceptada se fundamenta en la deshidratación del polímero por parte del azú-

car, (efecto que aumenta por incrementos de temperatura) quedando esta atrapada en la red tridimensional formada por la pectina, lo que ocasiona interacciones entre los OH⁻ de la pectina con los OH⁻ del azúcar. Esta situación provoca que el sistema gelifique al enfriarse debido a que la pectina no tiene el medio dispersante (agua) suficiente, por esta razón, dependiendo del grado de esterificación de la pectina, se usará una determinada concentración de azúcar, como es el caso de las mermeladas dietéticas, en donde se emplean pectinas con un bajo contenido de metoxiésteres agregándose como inductor de la gelificación iones divalentes y la cantidad necesaria de azúcar o bien un edulcorante artificial para dar el sabor dulce característico de este tipo de productos.

En general, las pectinas comerciales empleadas en la industria son mezclas de polímeros de ácido galacturónico con diferente grado de esterificación, extraídos principalmente del albedo de los cítricos. Por esta razón en la práctica se obtendrán pectinas del albedo de naranja y se determinará su calidad midiendo su capacidad de formar geles mediante el empleo de un penetrómetro. Este aparato se fundamenta en que la textura de un alimento puede ser medida en base al grado de penetración que ocasiona la punta del instrumento, sobre la superficie del material a prueba en un tiempo que está determinado por el usuario (Kramer, 1970). El instrumento en general está constituido por tres partes:

- a) escala (unidades en 1/10 mm)
- b) parte móvil
- c) aguja de penetración.

MATERIAL

- Balanza analítica	(1)
- Campana	(1)
- Cuchillo	(1)
- Desecador	(1)
- Embudo	(1)
- Estufa (0 a 200 °C)	(1)
- Gasa	(1)
- Matraz aforado de 100 ml	(1)
- Penetrómetro	(1)
- Pesafiltro	(1)
- Pipeta graduada de 10 ml	(1)
- Tela de asbesto	(1)
- Termómetro (-10 a 200 °C)	(1)
- Tripie	(1)
- Varilla de vidrio	(1)
- Vaso de precipitado de 50 ml	(4)
- Vaso de precipitado de 500 ml	(2)

REACTIVOS

i) Acido cítrico	0.9 g
ii) Sacarosa	185 g
iii) Acido clorhídrico 0,025 N	270 ml
iv) Etanol	500 ml

MUESTRA PROBLEMA

a) Naranjas	5
-------------------	---

PROCEDIMIENTO

I.-Extracción de pectina.

- a) Preparar una solución de HCl, pH = 1.6.
- b) Calentar agua a ebullición (500 ml).
- c) Obtener el albedo de 5 naranjas, pesarlo y cortarlo en pequeños trozos.
- d) Agregar al albedo agua caliente y lavar hasta que el agua aparezca incolora. Exprimir con la gasa.
- e) Transferir el albedo a un vaso de precipitado de 500 ml y añadir el HCl en proporción de 1.5 ml de ácido por gramo de albedo.
- f) Calentar a fuego directo con agitación hasta 95^o C, durante 30 minutos.
- g) Pasado ese tiempo, filtrar en la gasa, recibiendo el filtrado en un vaso de precipitado de 500 ml; si no se obtiene transparente la solución, filtrar de nuevo, pero ahora dando un doble a la gasa.
- h) Enfriar la solución a temperatura ambiente.
- i) Adicionar etanol hasta obtener un precipitado en el fondo del vaso; este precipitado es la pectina.
- j) Separar la pectina por decantación.
- k) Calentar a baño maría para eliminar todo el alcohol.
- l) Pesar la pectina obtenida (base húmeda). Este producto se llama pectina cruda.
- m) Determinar la humedad utilizando la técnica que se emplea en la práctica. 1.
- n) La pectina purificada se obtiene al disolver la cruda -

en agua y precipitar posteriormente con alcohol; para efectos prácticos es suficiente hacer esta operación sólo dos veces.

II.-Influencia del ácido cítrico y el azúcar en la elaboración de un gel.

a) Preparar un gel con la pectina cruda y purificada.
 b) Hacer un cálculo del contenido de pectina anhidra en - ambos tipos de pectina, tomando como base su determinación de humedad.

c) Los ingredientes en por ciento para la elaboración de un gel son los siguientes:

- ácido cítrico	0.3 %
- agua	36.7 %
- azúcar	61.5 %
- pectina	1.5 %

d) Con base en la pectina anhidra, calcular la cantidad en gramos de los ingredientes.

e) Mezclar la pectina con el ácido cítrico y calentar a ^o 80 C en baño maría.

f) Adicionar lentamente y con agitación el azúcar en pequeñas cantidades, a intervalos de tiempo que están dados por lo que tarde el azúcar en disolverse en la mezcla.

g) Posteriormente enfriar la mezcla.

h) Siguiendo el mismo procedimiento, preparar otros 2 ge - les con la pectina cruda, pero uno sin adicionar ácido cítrico y otro sin añadir azúcar.

g) Una vez formados los geles, se procedera a determinar - su capacidad de gelificación.

Más adelante se hablará del manejo del instrumento; a continuación se muestra una figura del mismo, (Fig. 4).

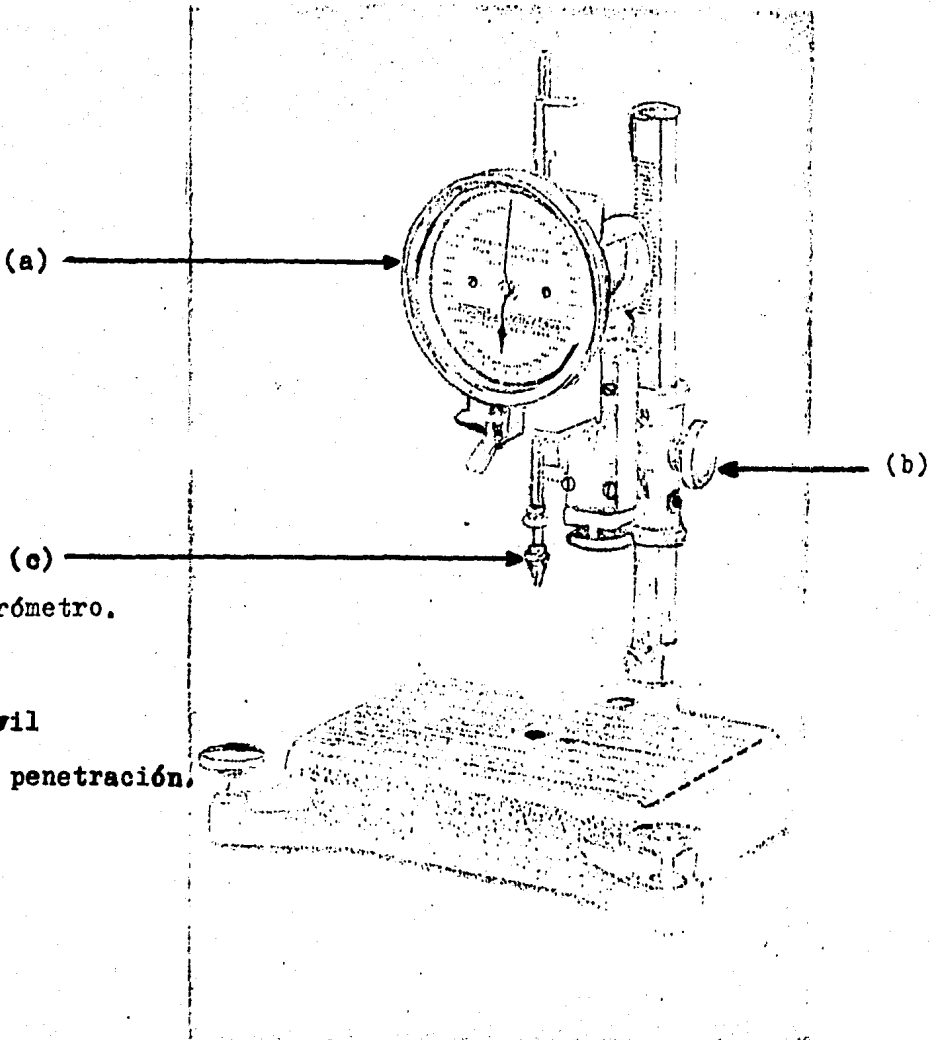


Fig. 4 Penetrómetro.

(a) escala

(b) parte móvil

(c) aguja de penetración.

III.-Evaluación de la capacidad de formación de un gel.

- a) Agregar por separado en 4 vasos de precipitado de 50 ml los geles formados.
- b) Cambiar la punta del instrumento por otra que ofrezca mayor superficie de contacto (puede ser un clavo con un tapón de plástico).
- c) Girar el tornillo hasta que la punta del instrumento toque ligeramente el gel.
- d) Ajustar la escala al valor de cero.
- e) Presionar en "c" (representado en la Fig. 4) y tomar a la vez el tiempo que tarda la punta en penetrar la distancia que juzgue necesaria.
- f) Realizar tres mediciones por muestra, cada una con el mismo intervalo de tiempo.
- g) Comparar los resultados obtenidos, y reportar la influencia del ácido cítrico y el azúcar en la formación de un gel.

RESULTADOS

1.-Determinación de humedad de la pectina cruda, por el método de la estufa, práctica 1.

$$\% \text{ humedad} = \frac{M_h - M_s}{M_h} \times 100$$

donde;

M_h = peso de la muestra húmeda.

M_s = peso de la muestra seca.

Peso de la muestra húmeda	Peso de la muestra seca	% humedad
2.0110 g	0.3016 g	85.0024

2.-Cálculos del rendimiento de la extracción.

a) Porcentaje teórico de pectina en la naranja 1-2 % (Martínez, 1973).

b) Cálculo del peso de la pectina anhidra:

$$P_a = P_c - P_c (\% \text{ humedad})$$

donde;

P_a = peso de la pectina anhidra.

P_c = peso de la pectina cruda.

c) Cálculo del rendimiento de la extracción.

$$P_o = \frac{C_n \times P_t}{100}$$

$$\% \text{ Extracción} = \frac{P_a \times 100}{P_o}$$

donde;

P_o = peso de la pectina que se debió obtener.

Cn = peso del albedo de la naranja.

Pt = porcentaje teórico de pectina en la naranja.

Pectina cruda (g)	Pectina anhidra (g)	Peso del albedo de naranja (g)	Rendimiento de la extracción
15.33	2.290	180	84.8148 %

3.-Evaluación de la capacidad de la pectina de formar un -
gel.

Pectina	Azúcar	Acido cítrico	Velocidad de penetración (mm/seg)
purificada	+	+	0.448
cruda	+	+	0.515
cruda	-	+	6.010
cruda	+	-	3.698

+, con los ingredientes indicados.

-, sin los ingredientes indicados.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La calidad que presenta la pectina cruda es buena y como lo reportan los resultados de penetración, conforme se purifica el producto adquiere una mejor consistencia, mejorando esta a medida que se disminuye la temperatura. La adición de iones divalentes durante la purificación de la pectina, muestra que se trata de una pectina de alto metoxilo, al no existir precipitación por acción de estos iones. Asimismo se puede observar que tanto el ácido cítrico como la azúcar son necesarios para la formación del gel, ya que su ausencia disminuye la capacidad de gelificación.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Por qué precipitan con etanol las pectinas?
- 2.-¿Qué relación hay entre el grado de madurez y contenido de pectina en un fruto?
- 3.-¿Qué función tiene el HCl, durante la extracción?
- 4.-¿Por qué se obtienen geles de mejor consistencia con la pectina purificada?
- 5.-¿Para la elaboración de que productos es recomendable utilizar pectinas de bajo metoxilo?
- 6.-¿Qué efecto tiene el azúcar, el ácido y el agua en la formación del gel?
- 7.-¿Por qué se adicionan cationes polivalentes como el calcio en la elaboración de mermeladas?
- 8.-¿Como haría para reducir la cantidad de azúcar durante la manufactura de mermeladas, sin variar la cantidad de pectina?
- 9.-¿Como eliminaría las sustancias pecticas en un vino que quie

re clarificar?

10.-¿Como determinaría si la pectina es de buena calidad?

11.-¿Como se compara el rendimiento de la extracción con el contenido de pectina de la cáscara?

12.-¿Qué otros métodos conoce para la extracción de pectinas a nivel industrial?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Baier W.E. and Wilson C.W. "Citrus Pectates, Properties, Manufacture and Uses" Ind. Eng. Chem. 33 (3) 287 (1941).
- 2.-Hodge J.E. and Osman E.M. "Carbohydrates" O.R. Fennema (Ed) - Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York (1976).
- 3.-Fogarty W.M. and Ward C.P. "Pectinases and Pectic Polysacharides" Prog. Ind. Microbiol. 13 59 (1974).
- 4.-Hirst E.L. and Jones J.K.N. "The Chemistry of Pectic Materials" Adv. Carboh. Chem. Biochem. 2 235 (1946).
- 5.-Joslyn M.A. "The Chemistry of Protopectin a Critical Review of Historical Data and Recent Developments" Adv. Food Res. 11 1 (1962).
- 6.-Kramer A. and Twigg B.A. "Quality Control for the Food Industry" Avi Publishing, Westport, Conn, (1970).
- 7.-Miller E.V. "Fisiología Vegetal" Centro Regional de Ayuda Técnica, México D.F. (1967).
- 8.-Palmer K.J. and Hartzag M.B. "An X Ray Diffraction Investigation of Sodium Pectate" J. Am. Chem. Soc. 67 2122 (1945).
- 9.-Reyes Canann L.C. "Obtención de Pectinas a Partir de Bagazo de Manzana" Tesis, Fac. de Química, UNAM (1981).
- 10.-Rouse A.H. and Crandall P.G. "Pectin Content of Lime and Lemon Peel as Extracted by Nitril Acid" J. Food Sci. 43 72 (1978).
- 11.-Martínez Garrido M.D. "Aprovechamiento Optimo de la Naranja" Tesis, Fac. de Química, UNAM (1973).

PRACTICA 5. ESTUDIO DE LAS PROTEINAS

Las proteínas son estructuras complejas de elevado peso molecular, constituidas por una secuencia heterógena pero específica de aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico. Poseen propiedades y funciones biológicas diferentes, por lo que se encuentran en los alimentos interactuando con otros constituyentes formando sistemas cuya estabilidad depende en gran parte de estas macromoléculas.

a) Fraccionamiento de las proteínas de la leche.

OBJETIVO

Realizar el fraccionamiento de las proteínas de la leche y observar el efecto que tienen las enzimas, la temperatura y la fuerza iónica en la estabilidad de las mismas.

GENERALIDADES

De acuerdo con su estructura y propiedades químicas, las proteínas de la leche se han clasificado en un complejo llamado caseínas y proteínas del suero, que en conjunto forman una suspensión coloidal conocida como sol. Su comportamiento se ve afectado por variaciones en el pH, fuerza iónica, adición de proteasas y calor; parámetros que son utilizados para su fraccionamiento.

Para explicar su estabilidad existen dos teorías; a) una se basa en las cargas que presenta el polipeptido y la otra b) en su capacidad de hidratación. La primera se refiere al gran contenido de sustituyentes ionizables polares en la proteína y al efecto en la orientación de sus grupos hidrófobos e hidrófilos: como en el caso de las micelas de la leche cuya carga negativa la proporcionan los ácidos glutámico y aspártico, así como grupos fosfato que forman parte de las caseínas, lo que favorece la repulsión entre micelas adyacentes distribuyéndose por el sistema en forma estable. Si estas micelas se neutralizan por la adición de ácido se produce una agrupación de las mismas por atracciones electrostáticas con la consiguiente precipitación; es decir, este sistema es muy sensible al pH y poco al efecto de la temperatura.

La segunda teoría se presenta cuando se hidratan los grupos sustituyentes de los aminoácidos por la formación de puentes de hidrógeno con el agua, siendo los grupos $-COOH$, $-NH_2$, $-OH$ (alifáticos y fenólicos), $C=O$ y $-NH-$ de los aminoácidos polares los que retienen en mayor cantidad el agua, la cual no está fuertemente unida y puede eliminarse fácilmente. Este tipo de estabilidad se encuentra influenciada por dos factores; la temperatura y la fuerza iónica.

A) Efecto de la temperatura, al aplicar calor en un intervalo de $70 - 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, las proteínas experimentan el proceso de desnaturalización (pérdida de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) al cual le sigue una agregación de unas con otras y finalmente una precipitación; un ejemplo claro lo presentan las proteínas del suero que son sensibles a los tratamientos térmi-

cos y se desnaturalizan, debido a que pierden su conformación globular y adquieren una conformación al azar.

B) Efecto de la fuerza iónica, la adición de bajas concentraciones de sales permite una mayor solubilidad de las proteínas fenómeno conocido como solubilización por salado, en el cual las sales disminuyen el grado de interacción del soluto, permitiendo un mayor contacto entre este y el disolvente. Por el contrario, si la concentración de sales es alta se presenta la precipitación por salado. Esto se logra por la acción deshidratante de los iones sobre el agua que rodea a la proteína, permitiendo que estas interactúen produciendo el efecto ya mencionado.

Efecto de las enzimas.

Otra forma de hacer precipitar las caseínas es mediante la adición de enzimas proteolíticas como la renina, cuyo sustrato específico es la caseína K. Se ha establecido que el enlace peptídico hidrolizado por la renina se localiza entre los aminoácidos fenilalanina y metionina en la posición 105-106 respectivamente, produciendo una fracción llamada paracaseína que es sensible a los iones Ca de la leche lo mismo que la α y β lo que hace que precipiten formando un gel y un glucopéptido soluble en el suero.

En esta práctica se realizara el fraccionamiento de las proteínas de la leche y se separaran en sus fracciones más importantes identificando su presencia por medio de ácido tricloroacético.

MATERIAL

- Centrifuga de 5000 rpm	(1)
- Matraz Erlenmeyer de 125 ml	(2)
- Mechero	(1)
- Pipeta graduada de 5 ml	(1)
- Pipeta graduada de 10 ml	(2)
- Probeta de 100 ml	(1)
- Tela de asbesto	(1)
- Tripie	(1)
- Tubos de ensayo	(4)
- Vasos de precipitado de 250 ml	(3)

REACTIVOS

i) Solución de renina 1:1	2 ml
ii) Sulfato de amonio	10 g
iii) Solución de ácido tricloroacético al 12 %	15 ml

MUESTRA PROBLEMA

a) Leche fluida	100 ml
-----------------------	--------

PROCEDIMIENTO

I.- Fraccionamiento de las proteínas de la leche (ver Fig. 1).

a) Calentar 100 ml de leche hasta 41°C y adicionar 2 ml de solución de renina.

b) Formado el precipitado No.1, separar el sobrenadante, -- por filtración o centrifugación a 5000 rpm, 5 minutos y --

etiquetarlo con el No.1.

c) Colocar en un tubo de ensayo 10 ml del sobrenadante -- No.1.

d) Adicionar por gotas solución de ácido tricloroacético-- hasta precipitación.

e) Calentar a ebullición el sobrenadante No.1 restante -- hasta observar de nuevo un precipitado.

f) Separar nuevamente el sobrenadante por filtración o -- centrifugación a 5000 rpm, 5 minutos y etiquetarlo como - No.2.

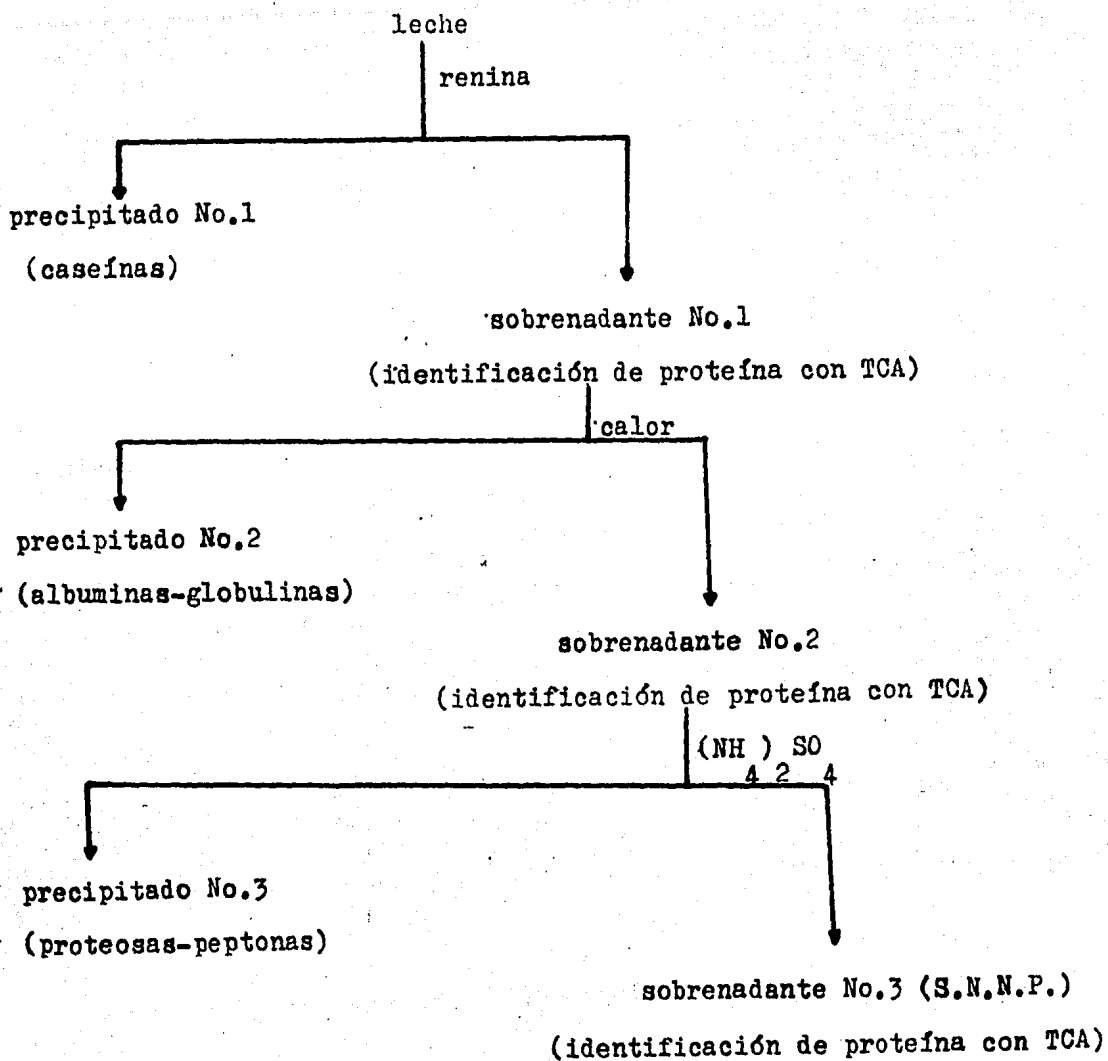
g) Identificar proteína con ácido tricloroacético en el - sobrenadante No.2, como se menciona en "c" y "d".

h) Al sobrenadante No.2 restante adicionar sulfato de amonio hasta formar un precipitado.

i) Separar el sobrenadante, filtrando o centrifugando a - 5000 rpm, 5 minutos y etiquetarlo con el No.3.

j) Identificar proteína con ácido tricloroacético en el - sobrenadante No.3, como se menciona en "c" y "d".

k) Reportar cual es la fracción proteica separada en cada uno de los pasos anteriores.



TCA = ácido tricloroacético.

S.N.N.P. = sustancias nitrógenadas no proteicas.

Fig. 1 Fraccionamiento de las proteínas de la leche.

RESULTADOS

1.- Identificación de proteína con TCA.

	Precipitación con TCA
sobrenadante No.1	si
sobrenadante No.2	si
sobrenadante No.3	no

2.- Tipo de proteína en cada fracción.

Fracción	Agente precipitante	Tipo de proteína
precipitado No.1	renina	caseínas
precipitado No.2	calor	albuminas-globulinas
precipitado No.3	(NH) SO 4 2 4	proteosas peptonas
sobrenadante No.3	-	S.N.N.P.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

De acuerdo con los resultados es posible fraccionar las proteínas de la leche en base a su solubilidad por adición de enzimas, sales, ácidos y calor. Asimismo fue posible identificar proteína sólo en los dos primeros sobrenadantes, ya que en el último no se identifican porque solamente quedan sustancias nitrogenadas no proteicas.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué tipo de proteínas se encuentran presentes en cada fracción separada?
- 2.- ¿Si al agregar calcio a la leche existe una precipitación, - que tipo de estabilidad se esta alterando y que proteínas -- precipitan?
- 3.- ¿Qué otros métodos son utilizados para la identificación de proteína
- 4.-¿Que efecto tiene la temperatura y el pH en la actividad de - la renina?
- 5.- ¿A que se debe que la B - lactoglobulina precipite por efecto del calor?
- 6.- ¿Por qué precipitan las proteínas con la adición de sales?
- 7.- ¿Qué diferencias existen en la precipitación de las caseínas variando el pH a 4.6 y utilizando renina?
- 8.- Defina punto isoelectrico de un aminoácido y de una proteína.
- 9.-¿Qué otras enzimas pueden ser utilizadas para la coagulación - de la leche?
- 10.-¿A que se debe el sabor a cocido en la leche?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.- Alais Charles "Ciencia de la Leche" Continental S.A. México (1980).
- 2.- Chou H.D. and Morr V.Ch. "Symposium Functionality of Proteins: Protein Water Interactions and Functional Properties" J. Am. Oil Chem. Soc. 56 53A (1979).
- 3.- Ciurlizza G.A. y Méndez C.G. "Cinética de Precipitación de Lactoalbumina del Suero de la Leche" Rev. Tecnología de Alimentos (Méx.) 10 194 (1975).
- 4.- Dyson Rose "Protein Stability Problems" J. Dairy Sci. 48 139 (1965).
- 5.- Farrell M.H. "Models for Casein Micelle Formation" J. Dairy Sci. 56 1195 (1973).
- 6.- Garnier J. and Dumas R.B. "Structure of the Casein Micelle a Proposed, Model" J. Dairy Resch 37 493 (1970).
- 7.- Hosney C.R. "Dough Forming Properties" J. Am. Oil Chem. Soc. 56 78A (1979).
- 8.- Kastens L.M. and Baldanski A.F. "Chemical from Milk" Ind. and Eng. Chem. 44 (6) 1257 (1952).
- 9.- Kuntz D.I. "Hydration of Macromolecules III. Hydration of Polypeptides" J. Am. Chem. Soc. 93 (2) 514 (1971).
- 10.-Morr V.C. "Symposium : Milk Proteins in Dairy and Food Processing Chemistry of Milk Proteins in Food Processing" J. Dairy Sci. 58 977 (1974).
- 11.-Parry M.R. "Milk Coagulation and Protein Denaturation" Fundamentals of Dairy Chem. Chapter 11 603 (19).

- 12.- Shem L.J. and Morr C.V. "Physicochemical Aspects of Texturization: Fiber Formation from Globular Proteins" J. Am. Oil - Chem. Soc. 56 63A (1979).
- 13.- Waugh D.F., Creamer K.L., Statterly W. Ch. and Dresdner W.G. - "Core Polymers of Casein Micelles" Biochem. 9 (4) 786 -- (1970).

b) Composición proteica del trigo.

OBJETIVO

Confirmar la composición proteica del trigo y comprobar las propiedades del gluten.

GENERALIDADES

Como en todos los seres vivos, en los cereales uno de los componentes principales son las proteínas, encontrándose en una proporción del 6-20 % y distribuidas en todo el grano, siendo mayor su concentración en el embrión, escutelo y capa de aleurona así en el endospermo. Debido a su deficiencia en aminoácidos esenciales no poseen un gran valor nutritivo, pero en la cantidad en que son consumidos contribuyen con un mayor contenido de proteína en la dieta.

Estudios realizados por Osborne en 1907 mostrarán que las proteínas de los cereales se pueden clasificar en base a su solubilidad de la siguiente forma:

- a) Albuminas, soluble en agua y coagulables por calor.
- b) Globulinas, solubles en soluciones salinas.
- c) Proteosas, fracción indefinida, soluble en agua.
- d) Glutelinas, soluble en alcalis y ácidos diluidos.
- e) Prolaminas, solubles en alcohol al 70 %.

Hoy en día se han desarrollado técnicas de sedimentación -- ultracentrifugación, electroforesis y difusión con las que ha sido posible conocer que cada una de estas proteínas es un sistema

heterogéneo formado por varias fracciones proteicas individuales.

Durante la extracción del gluten de trigo con agua, la porción soluble la constituyen las albuminas y globulinas formadas por 3 y 6 subunidades proteicas respectivamente. La proporción en que se encuentran es del 15-20% de la proteína total. Ambas están relacionadas con las diferencias que se presentan en la elaboración de pan con distintas harinas.

En la porción insoluble se encuentran las proteínas del gluten, llamadas gliadina y glutenina en una proporción 1:1. La primera contiene 8 subunidades proteicas diferentes unidas por enlaces disulfuro intramoleculares, su peso molecular es mucho menor que el de la glutenina que es una proteína formada por varias cadenas polipeptídicas unidas por enlaces disulfuro intermoleculares y intramoleculares. Estas proteínas se caracterizan por su elevado contenido de glutamina y por no tener una estructura en helice dado su alto contenido de prolina.

En panaderia las proteínas del gluten son muy importantes ya que la gliadina al mezclarse con agua produce que la masa formada sea suficientemente extensible mientras que la glutenina hace que sea elástica y de esta forma pueda retener el CO₂ formado durante la fermentación por la levadura o Na₂CO₃ y el pan esponje. Estas propiedades son debidas principalmente a los puentes disulfuro, que son los que sirven de unión entre las proteínas formando una red tridimensional necesaria para que el producto posea las características mencionadas anteriormente.

En esta práctica se extraera el gluten de la harina de trigo y se observaran sus propiedades antes y después de ser secado en

la estufa. Asimismo se fraccionaran las proteínas que lo componen en base a su solubilidad, como fue propuesto por Osborne en 1907.

MATERIAL

- Agitador mecánico (1)
- Balanza analítica (1)
- Balanza granataria (1)
- Cápsula de porcelana (1)
- Centrifuga (1)
- Estufa (1)
- Matraz aforado de 100 ml (1)
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml (2)
- Mortero (1)
- Pesafiltro (1)
- Pipeta graduada de 10 ml (1)
- Tapón para el matraz Erlenmeyer (2)

REACTIVOS

- i) Solución de alcohol al 70 % 100 ml
- ii) Solución de KSO₄ al 5 % 100 ml

MUESTRA PROBLEMA

- a) Harina de trigo 30 g

PROCEDIMIENTO

I.- Extracción del gluten.

- a) Colocar 30 g de harina de trigo en una cápsula de porcelana,
- b) Adicionar gota a gota de 10-15 ml de agua.
- c) Mezclar perfectamente hasta formar una masa pilular.
- d) Situar la masa sobre la palma de la mano.
- e) Dejar gotear sobre ella agua de la llave, presionando poco a poco, cuidando que no se caiga.
- f) Continuar con este procedimiento hasta eliminar todo el almidón (hasta que el agua de enjuague se vea clara).
- g) Transferir la masa a un pesafiltro previamente tarado y secar en la estufa a 100 ° C, durante 15 minutos.
- h) Pesar el gluten obtenido y calcular humedad como se menciona en la práctica 1.
- i) Calcular % de gluten obtenido.

II.- Fraccionamiento de las proteínas del gluten.

- a) Moler perfectamente el gluten seco en el mortero.
- b) Pesar exactamente alrededor de 0.5 g y colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- c) Adicionar 100 ml de etanol al 70 %.
- d) Agitar durante 6 horas, utilizando el agitador mecánico.
- e) Separar el sobrenadante, por filtración o centrifugación a 5000 rpm, 5 minutos.
- f) Evaporar el alcohol de la proteína insoluble en baño maría y secar en la estufa a 100 ° C.
- g) Obtener por diferencia en peso de gluten y glutenina, - el % de gliadina.

h) Para separar las gluteninas se sigue el mismo procedimiento pero en lugar de utilizar alcohol en "c" se usa --

KSO al 5 %.

2 4

RESULTADOS

1.- Propiedades del gluten.

Gluten	Propiedades
Humedo	masa extensible, pegajosa y elástica de color amarillo claro.
Seco	masa dura, color amarillo oscuro, quebradiza.

2.- Determinación de humedad.

Peso de la muestra humeda	Peso de la muestra seca	% de humedad
9.2 g	3.0 g	67.39 %

3.- Contenido de gluten en la harina de trigo.

Peso de la muestra (harina de trigo) 30 g
 Peso del gluten seco 3 g
 % teórico de proteína en la harina 6-14 %
 % teórico de gluten del total de proteínas 78-85 %
 % de gluten del total de proteína en la muestra problema.. 80 %

4.- Fraccionamiento de las proteínas del gluten.

Proteína	Propiedades
gliadina	soluble en alcohol al 70 %.
glutenina	soluble en solución de K_2SO_4 al 5 %.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El gluten al secarlo perdio sus propiedades originales, obteniendose una estructura rígida, debido posiblemente a que durante el calentamiento la proteína se agrega formando una red -- que es deshidratada, confirmandose que el agua es un factor importante. También se ratificó que las proteínas del gluten pueden ser separadas de acuerdo con su solubilidad como propuso --- Osborne (1907), que es un método muy simple pero para los requerimientos de la práctica es adecuado. Por lo que respecta a la extracción esta fue buena puesto que el rendimiento fue del 80% de gluten del total de proteína, lo que indica que la masa formada con esta harina sera extencible y elástica adecuada para la elaboración de pan.

QUESTIONARIO

- 1.- ¿Por qué pierde su extensibilidad y elasticidad el gluten cuando es secado.
- 2.-¿A que se debe que el pan esponje?
- 3.-¿Una harina de cualquier cereal puede ser utilizada en panadería? ¿Por qué?
- 4.-¿Las proteínas son una medida de calidad de la harina de trigo? ¿Por qué?
- 5.-¿Qué otro método existe para determinar en los cereales?
- 6.-¿Por qué la adición de sustancias como el dióxido de cloro y ácido ascórbico a la harina modifican las propiedades del gluten?
- 7.-¿Como determina el contenido de gliadina y glutenina en el gluten?
- 8.-¿Que diferencias existen entre la gliadina y gluteninas?
- 9.-¿Que le indica el % de gluten obtenido?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Anglemier F.A. and Montgomery W.M. "Amino Acids, Peptides and Proteins" en O.R. Fennema (Ed) Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York (1976).
- 2.- Eliasson C. and Hegg O. "Thermal Stability of Wheat Gluten" Cereal Chem. 57 (6) 436 (1980).
- 3.-Kent L.N. "Technology of Cereals" Pergamon Press LTD Oxford, - Inglaterra (1971).
- 4.-Kobrehel and Bushuk W. "Studies of Glutenin X Effect of Fatty Acids and their Sodium Salts on Solubility in Water" Cereal - Chem. 54 (4) 833 (1977).
- 5.-Meyer H. L. "Food Chemistry" The AVI Publishing, Company I.N.C. Westport, Connecticut
- 6.-Winton L.A. and Winton B.K. "The Analysis of Foods" New York, John Wiley & Sons, INC. Chapman & Hall. LTD London (1947).

PRACTICA 6. ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C

OBJETIVO

Determinar mediante una técnica espectrofotométrica, la destrucción del ácido ascórbico en un jugo de cítrico por la acción de la temperatura, de la luz y del oxígeno.

GENERALIDADES

El término vitamina C involucra el equilibrio químico existente entre los ácidos ascórbico y dehidroascórbico, lo que permite que este sistema se comporte como un agente oxidante o un agente reductor, propiedad que se utiliza en varios métodos para su determinación (Freed, 1966). Desde el punto de vista nutricional la importancia de esta vitamina es múltiple ya que actúa como coenzima en diversos sistemas enzimáticos, por lo que su ausencia en el hombre provoca la enfermedad conocida como escorbuto; por otro lado, su oxidación produce un oscurecimiento de tipo no enzimático en los alimentos y un aspecto indeseable al presentarse una pigmentación causada por las melanoidinas.

Por esta razón es muy importante conocer el tipo de proceso y las condiciones a las que se someten los alimentos, ya que de esto dependerá que se alteren o no los nutrimentos del mismo, principalmente las vitaminas por ser demasiado lábiles. Esto afecta en gran medida el ácido ascórbico, por lo que se puede considerar como un índice para establecer la intensidad del tratamiento térmico, así como también las condiciones de almacena-

miento.

La estabilidad de la vitamina se ve influenciada por diversos factores como son: pH, temperatura, Aa, metales, enzimas -- (ascórbico oxidasa) y otros. A continuación se hace referencia de ellos:

A.-Efecto de la temperatura, Sherman (1968) reporta que al aumentar la temperatura el porcentaje de destrucción de vitamina -- también se incrementa, Fig. 1; esto lo observó en jugo de tomate existiendo un comportamiento similar para el jugo de toronja (Smoot, 1978).

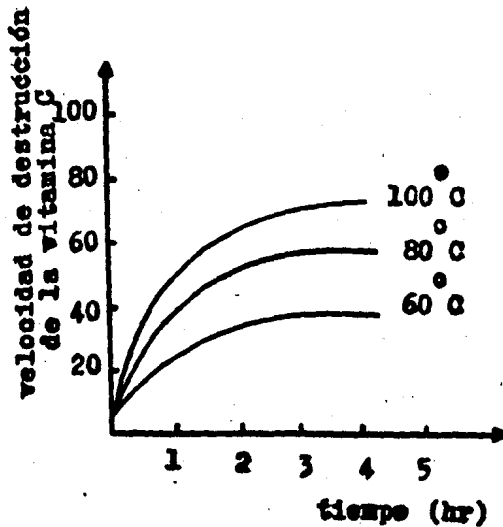


Fig. 1 Velocidad de destrucción de vitamina C a diferentes temperaturas en jugo de tomate (Sherman, 1968).

La aplicación de altas temperaturas sobre la vitamina trae consigo la formación de melanoidinas (Kurata, 1966). Una revisión hecha por Priestley (1979) sugiere que la descomposición -- se lleva a cabo a través de dos rutas, una para la formación de derivados del furfural y otra para la formación de otros produ

tos de estos últimos se han encontrado 49 conteniendo entre uno y diez átomos de carbono. Durante el enlatado, las pérdidas de ácido ascórbico son menores a las producidas por procesos preliminares como son blanqueado, despulpado, lavado, etc. (Flores, 1981) alcanzando hasta un 65 % dependiendo del tipo de lata que se use. Sander (1970) reporta que hay mayor destrucción en latas no barnizadas, efecto debido a la acción directa de metales como el Fe.

B.-Efecto del oxígeno, en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico es degradado hasta ácido dehidroascórbico y posteriormente a dicetogulónico, este último no es biológicamente activo. La reacción es catalizada por metales como el fierro y cobre por formación de un complejo metal-ascorbato-oxígeno, Fig. 2.

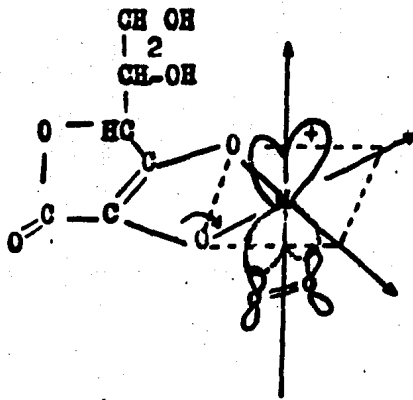


Fig. 2 Complejo metal-ascorbato-oxígeno (Taqui Khan, 1967).

C.-Efecto del pH, el pH en el cual es más estable la vitamina en jugos de frutas y concentrados esta en el intervalo de 2 a 3.5 (Eskin, 1971), pero en general puede considerarse que la vitamina C es estable a pH ácido, como se muestra en el cuadro 1.

cuadro 1.

Cuadro 1

Estabilidad de las vitaminas a diferentes condiciones.

Vitamina	Condición E estable ; I inestable					
	pH 7	Acido	Alcalino	Aire	Luz	Calor
Vitamina A	E	I	E	I	I	I
Vitamina D	E		I	I	I	I
Vitamina E	E	E	E	I	I	I
Vitamina K	E	I	I	E	I	E
Vitamina C	I	E	I	I	I	I
Vitamina B ₁	I	E	I	I	E	I
Vitamina B ₂	I	E	I	E	I	I
Vitamina B ₆	E	E	E	E	I	E
Vitamina B ₁₂	E	E	E	I	I	E

D.-Efecto de la Aa, Labuza (1978) reporta que un aumento en la Aa incrementa la velocidad de descomposición como puede observarse en la Fig. 3.

Laing (1978) estudió el efecto de la Aa con respecto a la temperatura (en un intervalo de 6l-105 °C), encontrando resultados similares a los de Labuza.

En esta práctica se determinará el efecto que producen los cambios de temperatura y la presencia de oxígeno en la estabilidad de la vitamina C, cuantificandose tales efectos por medio de una técnica espectrofotométrica (diclorofenolindofenol).

- tripie (1)
- Tubos de ensayo (12)

REACTIVOS

- i) Acido ascórbico 10.0 mg
 - ii) Acido cítrico 29.4 g
 - iii) Acido metafosforico (HPO) 30.0 g
 - iv) 2,6-Diclorofenolindofenol 0.1 g
 - v) Bicarbonato de sodio (NaHCO) 0.021 g
 - vi) Solución de sosa (NaOH) 2 N 150.0 ml
 - vii) Solución A, preparar 500 ml de una solución de HPO al 6 %.
 - viii) Solución B, (buffer de citrato), disolver 29.4 g de ácido cítrico en 140 ml de NaOH 2 N y aforar a 250 ml con agua destilada.
 - ix) Solución C, preparar 100 ml de una solución de diclorofenolindofenol al 0.1 % utilizando 75 ml de agua con teniendó 21 mg de NaHCO y completando los 25 ml restantes con agua destilada.
 - x) Solución D, tomar 2 ml de la solución C y aforar con agua destilada a 100 ml.
- (Estas dos últimas soluciones deben mantenerse en refrigeración cuando no se usen).

MUESTRA PROBLEMA

- a) Jugo de 1 limón

PROCEDIMIENTO

I.- Curva patrón de ácido ascórbico.

- a) Pesar 10 mg de ácido ascórbico y aforar a 100 ml con la solución A. Esta solución se etiquetara como solución patrón.
- b) Numerar 4 tubos y adicionar a cada uno las soluciones siguientes en cantidades y orden establecidos.

Tubo	Solución patrón (ml)	Solución B (ml)	Agua (ml)	Solución A (ml)	Solución D (ml)
1	0.2	4.9	1.4	2.5	1
2	0.4	4.9	1.2	2.5	1
3	0.6	4.9	1.0	2.5	1
4	0.8	4.9	0.8	2.5	1

- c) Leer cada tubo en el espectrofotómetro a 520 nm.
- d) Realizar una curva patrón graficando absorbancia v.s. - concentración de ácido ascórbico.

II.- Efecto de la luz, oxígeno y temperatura en la estabilidad de la vitamina C en jugo de limón.

- a) Agregar 10 ml de la solución A a una probeta.
- b) Cortar el cítrico, extraer el jugo y añadirlo inmediatamente a la probeta. Medir el volumen.
- c) Determinar el volumen de jugo restando al volumen total los 10 ml iniciales de solución A.
- d) Con el volumen ya conocido de jugo, diluirlo en una proporción 1:4, utilizando la solución A como disolvente y -- tomando en cuenta los primeros 10 ml. Esta solución sera - la solución problema.
- e) Formar una serie de 12 tubos con la siguiente composición:

- solución buffer 5 ml
- agua 3 ml
- solución problema 1 ml

f) Separar 7 de los tubos. En ellos se observará el efecto que tiene la luz y el oxígeno en la estabilidad del ácido ascórbico.

g) Someterlos al siguiente tratamiento bajo condiciones -- ambientales.

Tubo	Tiempo transcurrido (min.)	Solución D (ml)
1	0	1
2	15	1
3	30	1
4	45	1
5	60	1
6	75	1
7	90	1

h) Con los 5 tubos restantes se apreciara el efecto de la temperatura en la estabilidad del ácido ascórbico aplicando a cada tubo la temperatura correspondiente:

Tubo	Temperatura (°C)	Tiempo
8	25	5 min.
9	30	5 min.
10	45	5 min.
11	60	5 min.
12	75	5 min.

i) La temperatura deberá aplicarse como se indica en la reacción de caramelización, es decir, con ayuda de un baño de nujol siguiendo los mismos pasos que se describen en dicha práctica.

d) Determinar la absorbancia a cada tubo a 520 nm y con los datos obtenidos realizar las siguientes gráficas:

- absorbancia v.s. tiempo
- absorbancia v.s. temperatura.

RESULTADOS

Con el modelo experimental propuesto se obtuvieron los siguientes resultados:

1.-Curva patrón de ácido ascórbico. (Gráfica No.1)

Concentración de ácido ascórbico (g/ml)	Absorbancia (nm)
2×10^{-6}	0.017
4×10^{-6}	0.026
6×10^{-6}	0.033
8×10^{-6}	0.044

2.-Efecto de la temperatura en la estabilidad de la vitamina C.(Gráfica No. 2)

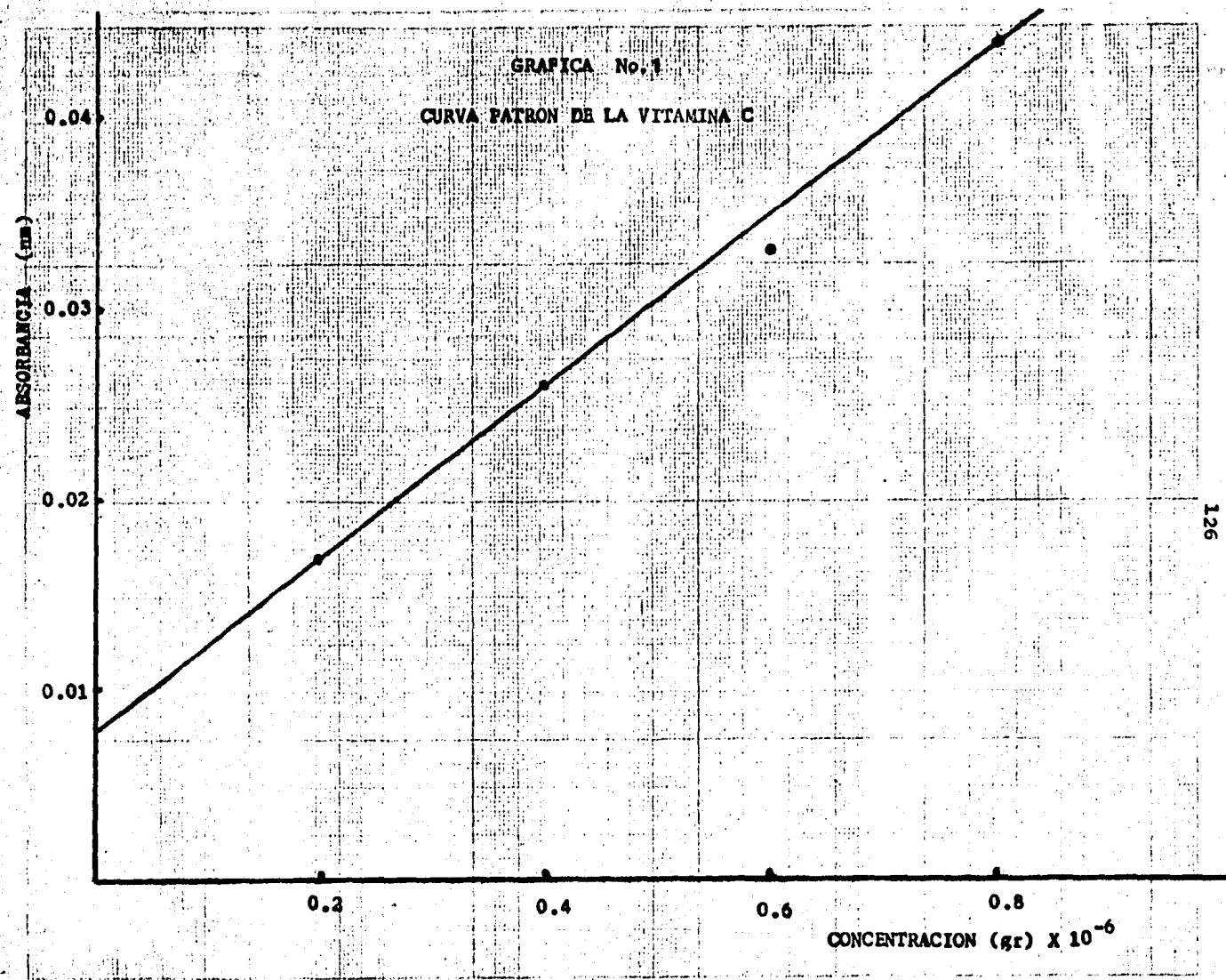
Tubo	Temperatura (°C)	Absorbancia (nm)	Concentración (g/ml)
1	25	-	-
2	30	0.033	5.9×10^{-6}
3	45	0.029	4.4×10^{-6}
4	60	0.024	3.7×10^{-6}
5	75	0.021	3.1×10^{-6}

3.-Efecto del oxígeno y luz en la estabilidad de la vitamina C. (Gráfica No. 3)

Tubo	Tiempo (min.)	Absorbancia (nm)	Concentración (g/ml)
1	0	-	-
2	15	-	-
3	30	0.0520	1.02×10^{-5}
4	45	0.0270	4.30×10^{-5}
5	60	0.0100	6.20×10^{-5}
6	75	-	-
7	90	-	-

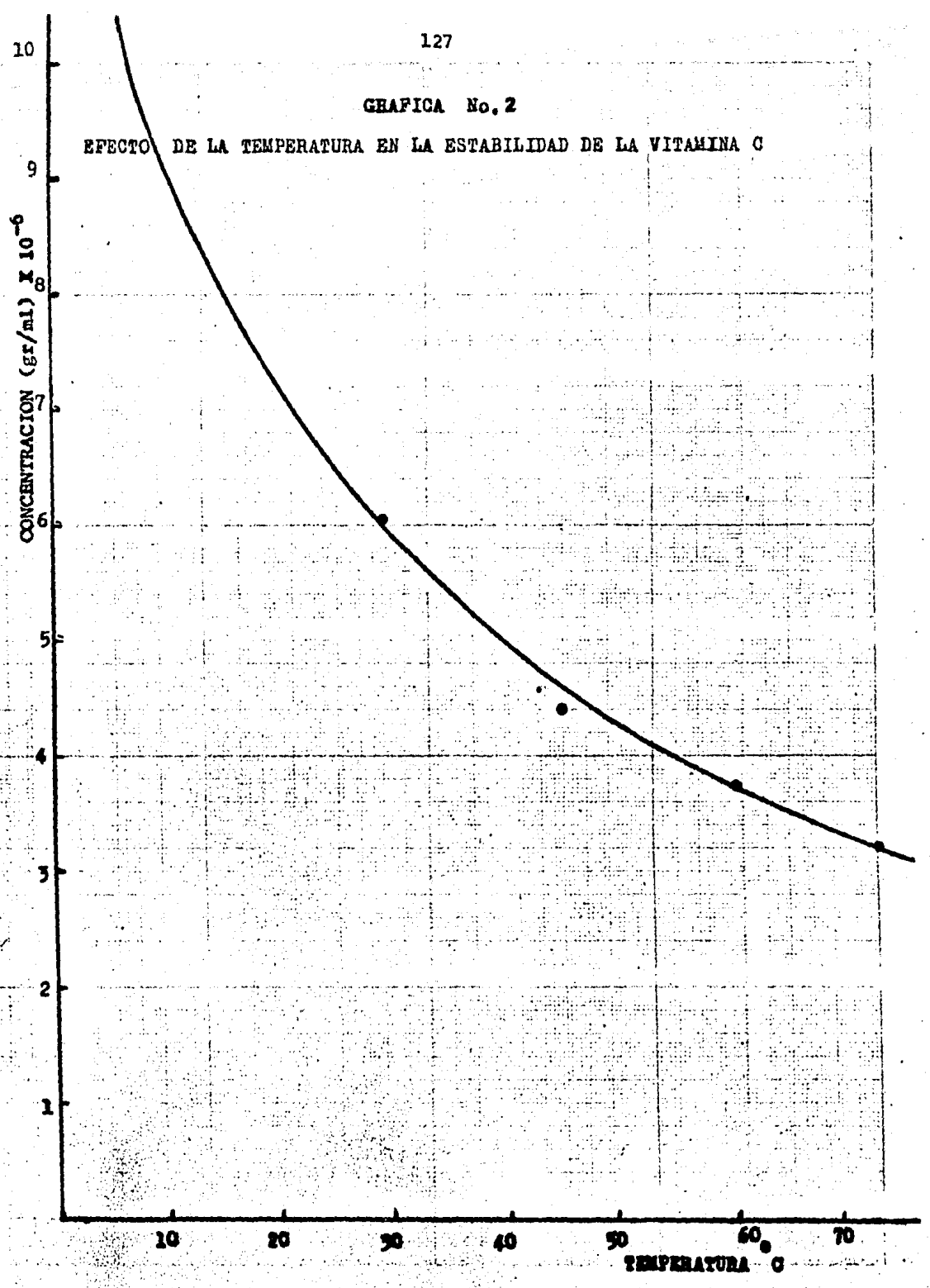
GRAFICA No. 1

CURVA PATRON DE LA VITAMINA C



GRAFICA No. 2

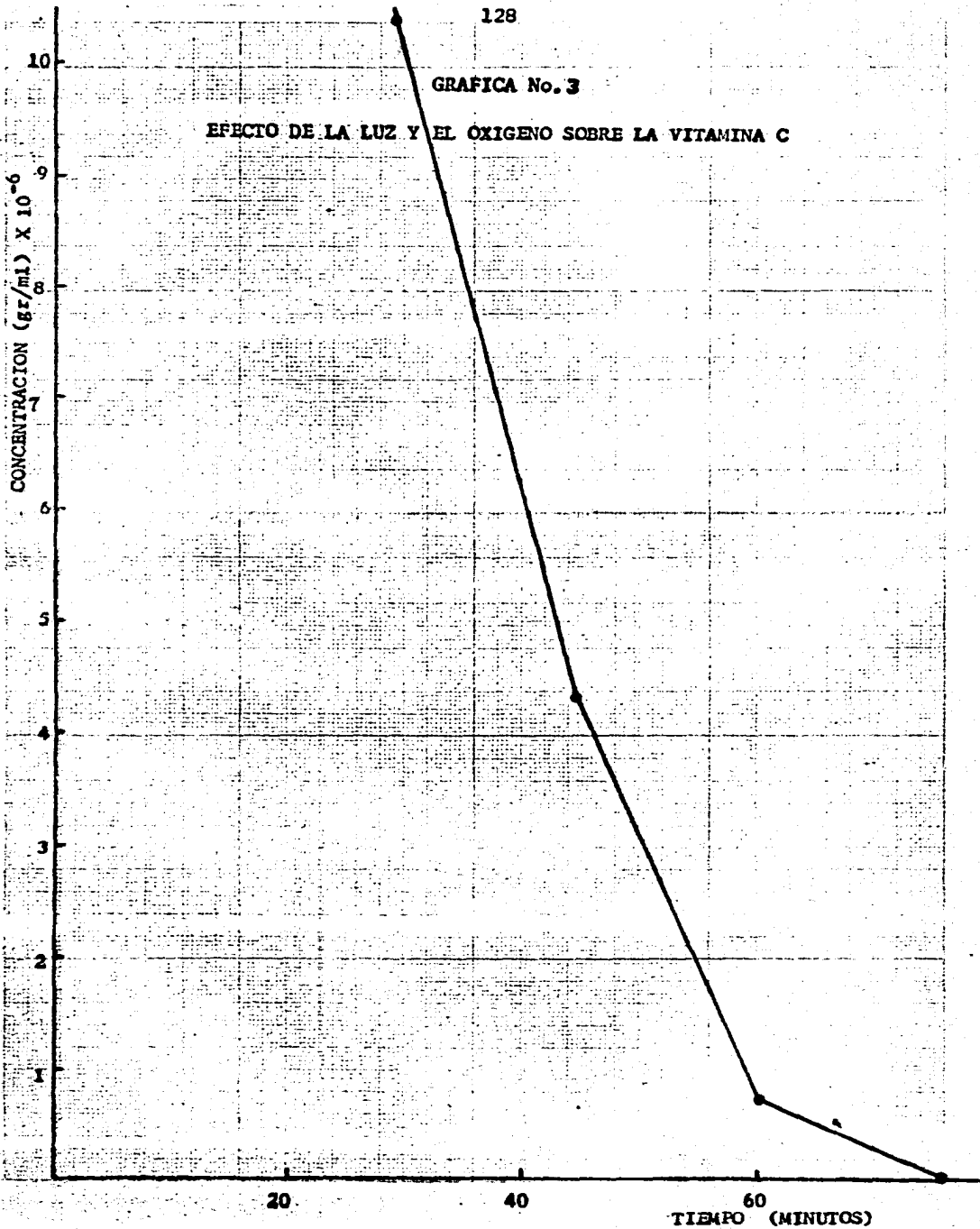
EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C



128

GRAFICA No. 3

EFFECTO DE LA LUZ Y EL OXIGENO SOBRE LA VITAMINA C



DISCUSION DE LOS RESULTADOS

La disminución de vitamina C por efecto de las condiciones ambientales se observó pasados 30 minutos, debido a que -- antes de ese tiempo la concentración en que se encontraba la -- vitamina era muy alta para ser cuantificada en el espectrofotómetro, a los 75 minutos no se detecta la presencia de esta vitamina. Las pérdidas por efecto de la temperatura muestran un resultado semejante a lo reportado por Sherman (encontrándose concentraciones altas no cuantificadas por el método, los primeros 25 °C disminuyendo en una forma rápida los primeros 5 °C, para posteriormente permanecer invariable hasta los 75 °C, ver gráfica No. 2.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Por qué se utiliza ácido fosfórico en la práctica?
- 2.-¿Cual fue el valor de pH en donde se pudo apreciar un mayor contenido de vitamina C? ¿Por qué?
- 3.-¿Cual fue el efecto de la temperatura en la estabilidad de la vitamina?
- 4.-¿Qué factores influyen en el mecanismo de degradación de la vitamina C?
- 5.-¿Por qué se considera la vitamina C como la más inestable de todas las vitaminas?
- 6.-¿Qué objetivo tiene adicionar el 2,6 diclorofenolindofenol a la muestra utilizada?
- 7.-¿Que relación existe entre la degradación oxidativa de la vitamina C y la presencia de pigmentos oscuros en los alimentos?

8.-¿Como se podría evitar la oxidación del ácido ascórbico?

9.-¿Qué importancia biológica tiene la vitamina C?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Bender A. "Effects of Processes", Chapter 7, Food Sci. and Nutrition" A.C. London, New York (1979).
- 2.-Bender A. "Vitamins" Chapter 3, Food Sci. and Nutrition, A.C. - London, New York (1979).
- 3.-Flores V.T., Hernández C.F. y Montés M.G. "Acido Ascórbico -- Importancia Nutricional e Industrial"
- 4.-Freed "Methods of Vitamin Assay" Chapter 14, Intrscience Pu -- blishers (1966)
- 5.-Koenig R.A., Schiefelbusch T.L. and Johnson C.R. "Chromagenic Reagent for Vitamin C Determinations" Ind. Eng. Chem. 15 (3) 181 (1954).
- 6.-Kurata T. and Sakurai Y. "Degradation of L-Ascorbic Acid and Mechanism of Nonenzymic Browning Reaction" J. Agr. Biol. Chem. 31 (2) 170 (1967).
- 7.-Laing B.M., Schlueter D.L. and Labuza T.P. "Degradation Kinetics of Ascorbic Acid at High Temperature and Water Activity" J. Food Sci. 43 (5) 1440 (1978).
- 8.-Malkin R. "The Copper-Containing Oxidases" Chapter 21, Inorg. Biochem. (Ed) Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1973).
- 9.-Priestley R.J. "Effects of Heating on Foodstuffs" Applied Science Publishers, LTD London (1979).
- 10.-Schmall M., Pifer Ch. W. and Wollish E.G. "Determination of - Ascorbic Acid by a New Colorimetric Reaction" Anal. Chem. 25 1486 (1953).
- 11.-Smoot J.M. and Nagy S. "The Effects of Storage Temperatures - and Durations on Total Vitamin C Contents of Canned Single-Strength Grapefruit Juice" J. Agr. Food Chem.

- 12.-Tannenbaum R.S. "Vitamins and Minerals" O.R. Fennema (Ed) -
Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York (1976).
- 13.-Taqi Khan M.M. and Martell A.E. "Metal Ion and Metal Chelate
Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen I. -
Cupric and Ferric Ion Catalyzed Oxidation" J. Am. Chem. Soc.
89 4176 (1967).

PRACTICA 7. ESTABILIDAD DE LAS GRASAS

OBJETIVO

Evaluar la estabilidad de un aceite comercial al inducir su oxidación por la técnica del oxígeno activo, midiendo las variaciones por el método del índice de peróxidos.

GENERALIDADES

Se han definido a los lípidos como sustancias solubles en disolventes no polares que constituyen; junto con las proteínas y los carbohidratos, la estructura celular. El organismo los utiliza para transportar vitaminas liposolubles y como reserva energética, siendo esta última su función más importante puesto que su aporte calórico es aproximadamente 9 calorías por gramo de lípido (más del doble del que se genera por carbohidratos y proteínas).

Dependiendo de su origen, los lípidos pueden clasificarse en aceites y grasas, siendo generalmente los primeros provenientes de fuentes vegetales y los segundos de animales, con excepción del aceite de coco, la manteca de cacao, el aceite de pescado, etc.. Químicamente los aceites se diferencian de las grasas por que comúnmente poseen un mayor número de insaturaciones, lo que los hace más susceptibles a la oxidación; este fenómeno es debido a la acción directa del oxígeno sobre los sitios donde se encuentran las dobles ligaduras en la molécula del glicérido, teniendo como consecuencia, la producción de aromas propios de la rancidez. Esta serie de reacciones se efectúa en --

tres periodos

A) Periodo de iniciación, este paso involucra la formación de un diradical por acción del oxígeno sobre la molécula insaturada - Fig. 1.

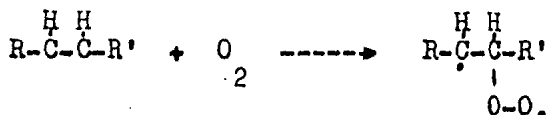
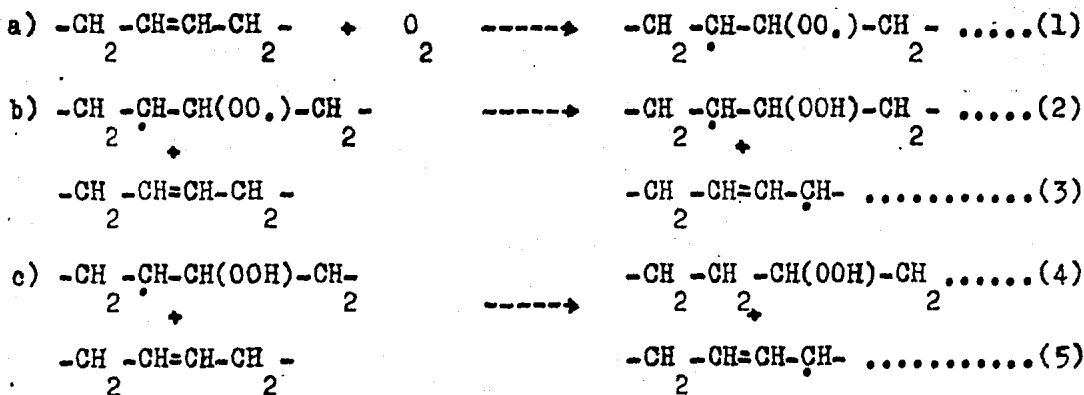


Fig. 1 Periodo de iniciación (Dugan, 1976).

B) Periodo de propagación, existe una desprotonación en el carbón metilénico del ácido graso, Fig. 2.



los intermediarios 3 y 5 son susceptibles a reaccionar con el oxígeno y formar hidroperóxidos (representados en 4). (Dugan, 1976).

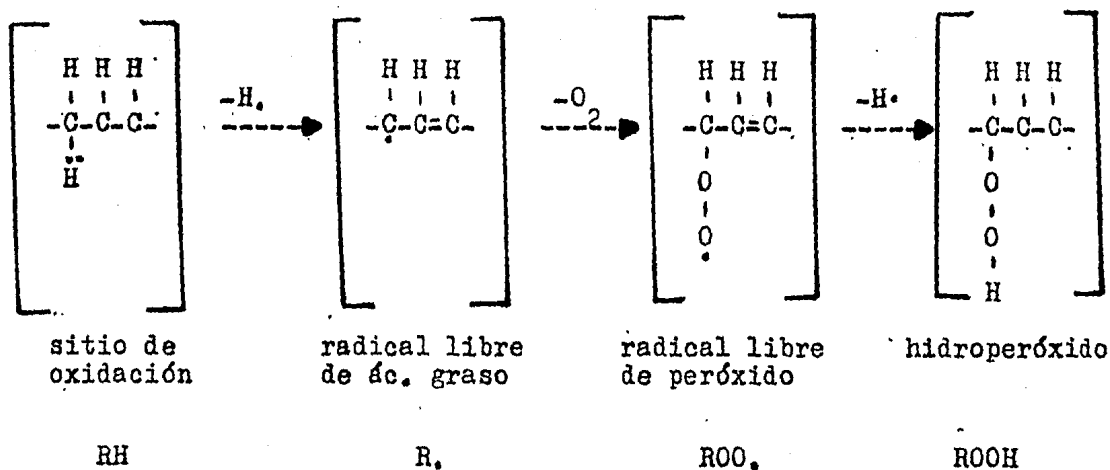
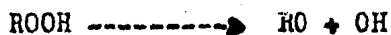


Fig. 2 Mecanismo de oxidación de lípidos (Sherwin, 1976).

Los hidroperóxidos formados en la fase de propagación son descompuestos fácilmente por la acción de metales prooxidantes, por la temperatura y por energía radiante. Cuando la concentración de hidroperóxidos es alta su descomposición se produce preferentemente de la siguiente forma (Dugan, 1976).



y cuando es baja;



Estos productos dan como resultado compuestos volátiles como aldehídos, cetonas y alcoholes, que son responsables de los olores a rancidez en los alimentos.

C) Periodo de terminación, al no existir radicales libres activos que prosigan la reacción, los radicales formados anteriormente -

se condensan en compuestos muy estables (cíclicos o polimerizados).

Estos compuestos se forman durante el sobrecalentamiento de los aceites, siendo más tóxicos los de naturaleza cíclica y de acuerdo a lo reportado por Alexander, 1977 y Chang, 1978, -- tienen relación con ciertos daños como son:

- a) Irritación del tracto intestinal y diarrea. En este paso el índice de peróxidos es mayor que 100.
- b) Disminución del crecimiento (I.P. mayor que 1200)
- c) Producción de tejido cancerígeno que causa alteraciones en el organismo ocasionando la muerte (I.P. mayor que 1200).

a y b han sido observados en animales de laboratorio, principalmente en ratones (Vidaurri, 1983) trabajando con una dieta de 10 % de grasa sobrecalentada.

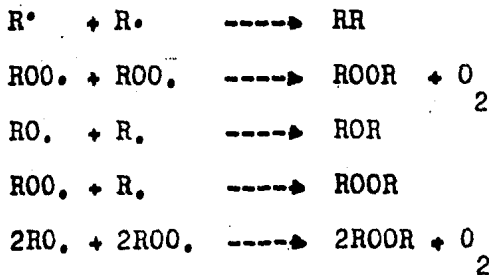


Fig. Periodo de terminación (Dugan, 1976).

Uno de los métodos utilizados para la determinación de la intensidad de oxidación de los lípidos es el índice de peróxidos, que es una medida del grado de oxidación de un aceite o grasa y se basa en un análisis yodométrico; se hace interactuar la muestra oxidada con una solución saturada de yoduro de pota-

sio, con la consiguiente liberación del yodo (por la acción oxidante del peróxido) y se titula con una solución de tiosulfato de sodio. Este método es muy relativo, por que se limita a las primeras etapas de oxidación no evaluando la totalidad de peróxidos formados, ya que muchos de ellos se descomponen, como se menciono anteriormente, en aldehídos, cetonas y alcoholes.

Para evitar la formación de los productos que provocan el olor a rancidez, se utilizan principalmente compuestos de naturaleza fenólica conocidos como antioxidantes, estos actúan al inicio de la reacción de oxidación evitando la formación de radicales libres, Fig.4.

Para aumentar la efectividad de los antioxidantes, es común usar una combinación de 2 o más de ellos, ya que presentan ayuda recíproca, efecto conocido como sinergismo, Fig. 5.

En esta práctica se evaluara la estabilidad de un aceite comercial (índice de calidad) por el método de oxígeno activo modificado, que consiste en burbujear aire a un matraz que contiene el aceite de prueba a temperatura de 100°C . El resultado se expresa en horas requeridas para que la muestra alcance un índice de peróxido de 100 meq/Kg.

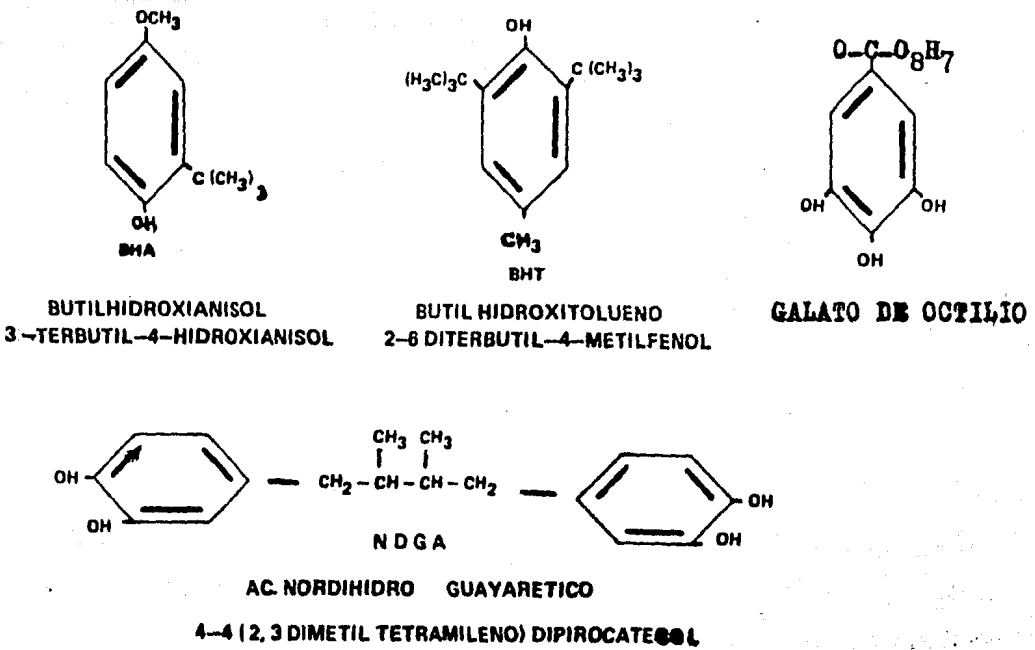


Fig. 4 Fórmulas de los antioxidantes usados en la industria alimentaria (Sherwin, 1976).

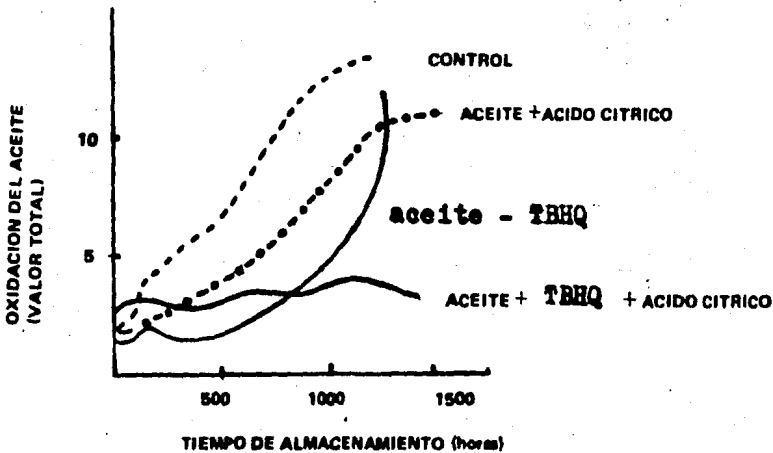


Fig.5 Inhibición de la oxidación del aceite de palma utilizando el antioxidante TBHQ y el ácido cítrico (Sherwin, 1978).

MATERIAL

- Bomba de aire tipo pecera (1)
- Bureta de 50 ml (1)
- Caja petri (1)
- Estufa (0 a 200 C) (1)
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml (1)
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado.. (1)
- Pipeta graduada de 1 ml (1)
- Pipeta graduada de 5 ml (1)
- Pinzas de tres dedos con nuez (1)
- Probeta de 100 ml (1)
- Termómetro (-10 a 250 C) (1)
- Tapón de plástico con tres perforaciones (1)
- Soporte universal (1)

REACTIVOS

- i) Solución saturada de yoduro de potasio (preparada recientemente) 10 ml
- ii) Solución de tiosulfato de sodio 0.1 N 400 ml
- iii) Solución de almidón 1 % 5 ml
- iv) Disolvente cloroformo-ácido acético (1:3) 1000 ml

MUESTRA PROBLEMA

- a) Aceite comercial 115 ml

PROCEDIMIENTO

I.- Índice de peróxidos.

- a) Pesar 5 g de aceite en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón esmerilado.
- b) Añadir 30 ml del disolvente cloroformo-ácido acético y agitar por rotación para disolver la muestra.
- c) Adicionar 0.5 ml de la solución de KI, esperar exactamente 1 minuto, agitar de vez en cuando y agregar 30 ml de agua.
- d) Titular el yodo liberado con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N, dejando caer la solución gota a gota mientras se agita vigorosamente, hasta la casi total desaparición del color amarillo del yodo; añadir entonces 0.5 ml de la solución de almidón al 1 % y continuar la titulación, hasta que desaparezca el color azul.
- e) Llevar a cabo una determinación patrón con los reactivos, el título del patrón no debe pasar de 0.5 ml de tiosulfato de sodio.
- f) El índice de peróxidos (miliequivalentes de peróxido/Kg) se calcula como:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{S \times N \times 1000}{\text{g de la muestra}}$$

donde;

S = ml del título corregido

N = normalidad de la solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

II.-Oxidación inducida (método modificado de oxígeno activo).

- a) Agregar 80 ml de aceite comercial al matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- b) Adaptar al tapón un termómetro, una pipeta y un capilar conectado a la bomba de aire, procurando que tengan contacto con el aceite. En la Fig. 6, se muestra el sistema a utilizar.
- c) Colocar el sistema en la estufa a 100°C , burbujeando aire en el aceite.
- d) Tomar muestras de 5 g cada 2 horas y determinar índice de peróxidos, hasta alcanzar un valor de 100 meq/Kg. Realizar cada prueba por duplicado.
- e) Gráficar índice de peróxidos v.s. tiempo.

III.-Oxidación en condiciones ambientales.

- a) Adicionar 35 ml de aceite comercial en una caja petri manteniendola destapada en condiciones ambientales durante un tiempo mínimo de 12 días.
- b) Tomar muestras cada 2 días y determinar el índice de peróxidos.
- c) Gráficar índice de peróxidos v.s. tiempo.
- d) Obtener una equivalencia entre el valor máximo del índice de peróxidos a los 12 días en condiciones ambientales y el tiempo que tarda en alcanzar dicho valor la oxidación inducida, es decir, "X" días a condiciones ambien

tales equivalen a "Y" horas bajo condiciones de oxidación inducida.

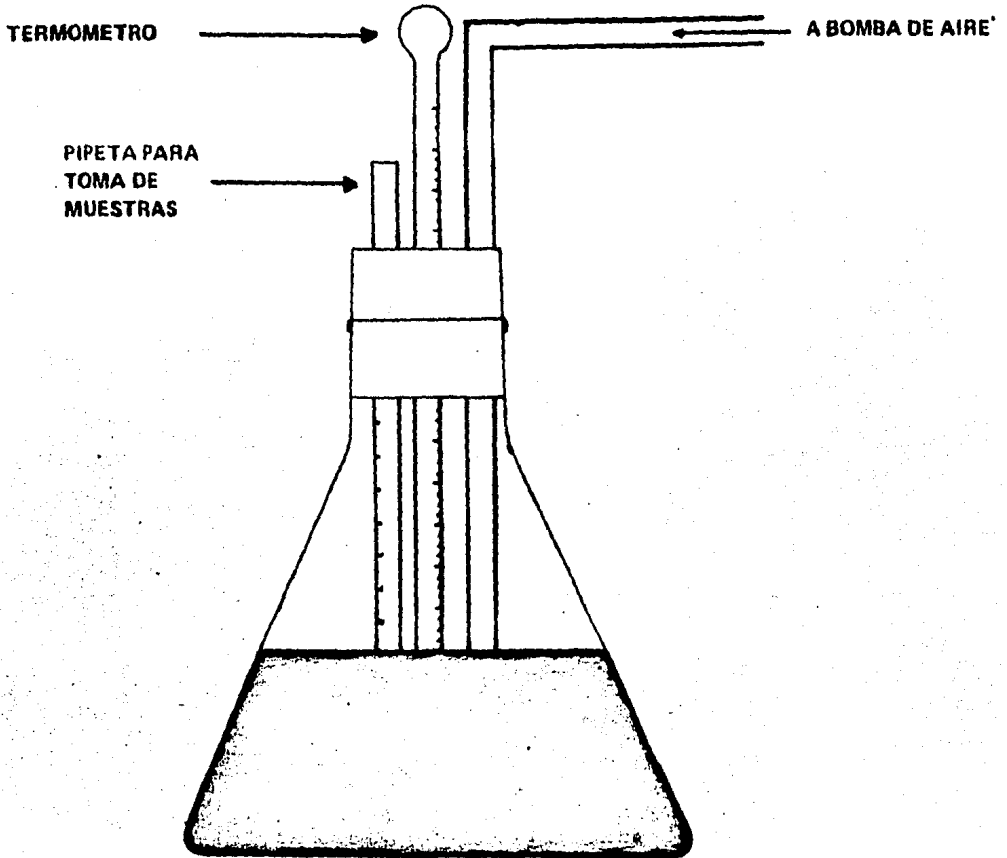


Fig. 6 Sistema para la realización del método modificado del oxígeno activo.

RESULTADOS

1.-Resultados obtenidos por la técnica de oxígeno activo mg_o difificada (aceite comercial a 100 °C), gráfica No. 1.

Tiempo (hr)	Indice de peróxidos (meq/Kg)	Olor
0	-	-
2	-	-
4	3.2	1
6	12.0	-
8	38.13	2
10	77.80	-
12	109.86	3
14	288.30	-
16	350.14	4
18	189.50	4

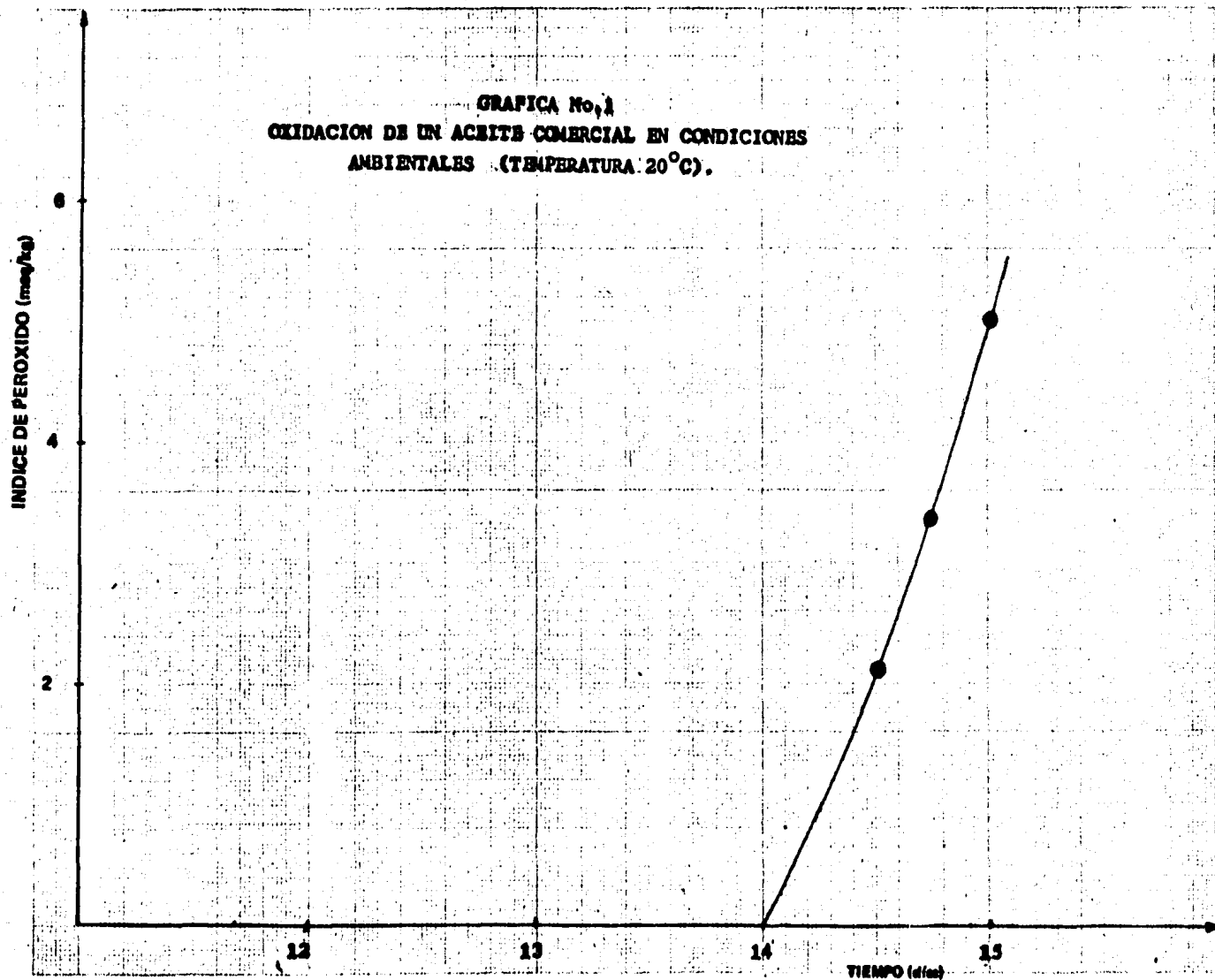
Calificación del olor del aceite

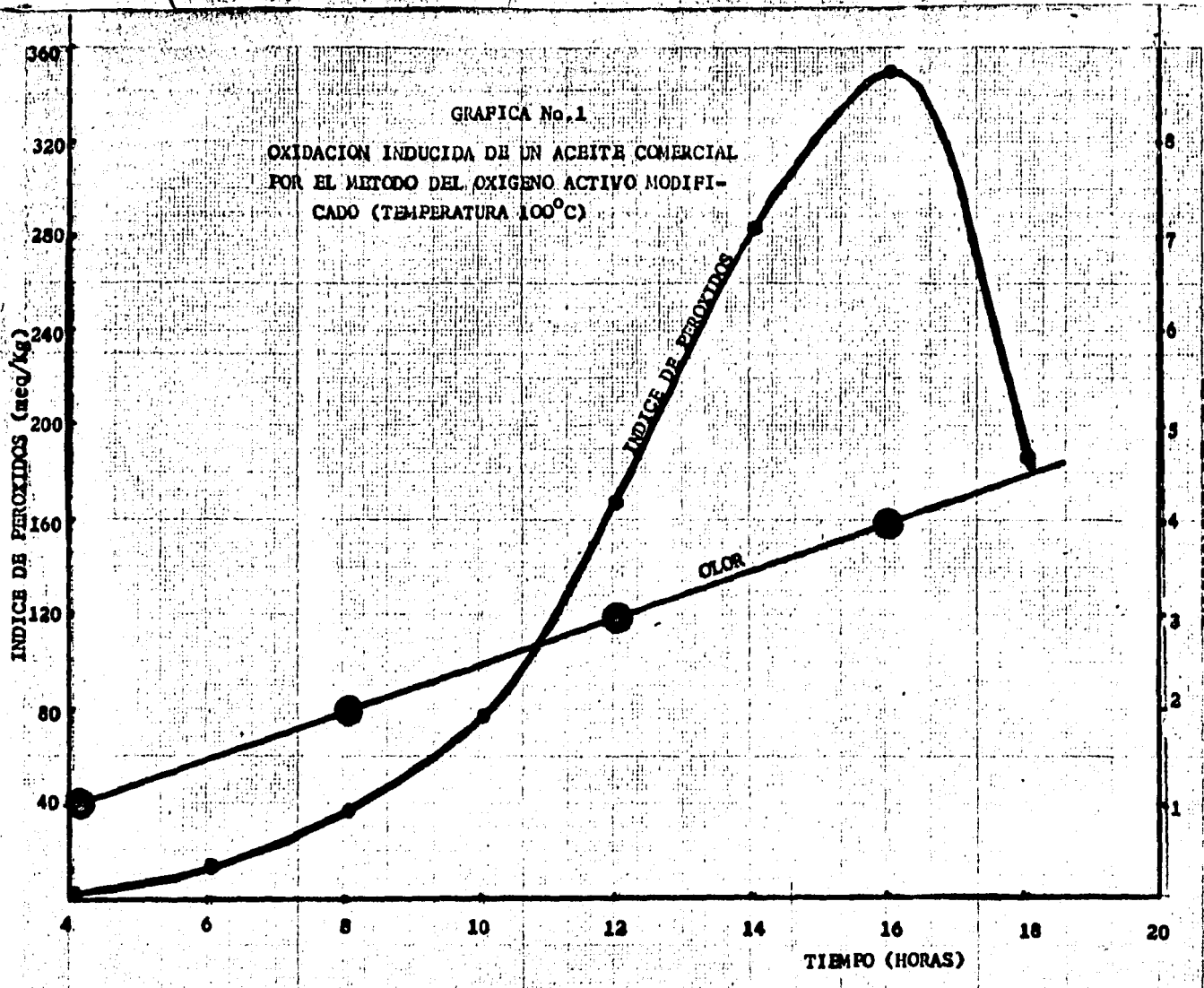
Calificación	Descripción
1	ligeramente rancio
2	rancio
3	muy rancio
4	extremadamente rancio.

2.-Estabilidad del aceite en condiciones ambientales, gráfica No. 2.

Tiempo (días)	Indice de peróxidos (Meq/Kg)	Olor
0	-	-
1	-	-
2	-	-
3	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	2.13	-
18	5.06	-

GRAFICA No. 1
OXIDACION DE UN ACEITE COMERCIAL EN CONDICIONES
AMBIENTALES (TEMPERATURA: 20°C).





CALIFICACION DEL OLOR

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Los resultados muestran que el valor de índice de peróxido alcanzado en 5 horas bajo condiciones de oxidación inducida del aceite por el método modificado del oxígeno activo equivalen a 8 días a condiciones ambientales, lo que indica buena estabilidad del aceite, debido probablemente a la presencia de antioxidantes. El comportamiento experimental que se obtuvo fue como el citado por Meyer (1978).

La importancia de esta técnica, es que nos ofrece una medida para evaluar la estabilidad de un aceite en una forma más rápida, pero con sus limitaciones, como es el caso de la técnica del índice de peróxidos, ya mencionada en la introducción.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Por qué son más susceptibles al enranciamiento los aceites que las grasas?
- 2.-¿Qué otros métodos existen para determinar la estabilidad de un aceite?
- 3.-¿Cuál es el fundamento del método del oxígeno activo empleado en la práctica?
- 4.-¿Qué compuestos son los responsables del olor y sabor rancios?
- 5.-Explique como actúan los antioxidantes y que características deben de reunir. Dé tres ejemplos de ellos.

- 6.-¿Considera que el aceite usado en la práctica contenía antioxidantes? ¿Por qué?
- 7.-Explique brevemente el mecanismo de oxidación.
- 8.-¿Que otros tipos de deterioro de lípidos conoce?
- 9.-¿Cuales son los factores que afectan la oxidación de los lípidos?
- 10.-¿Qué efecto tiene la rancidez en el valor nutritivo de los lípidos?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Alexander J.C. "Biological Effects Due to Changes in Fats - During Heating" J. Am. Oil Chem. Soc. 55 711 (1978).
- 2.-Chang S.S., Peterson R.J. and Chi-Tang Ho. "Chemical Reactions Involved in the Deep-Fat Frying of Foods" J. Am Oil Chem. Soc. 55 718 (1978).
- 3.-Dugan Le R. Jr. "Lipids" en O.R. Fennema (Ed) Food Chemistry, Marcel Dekker, Nueva York, 1976.
- 4.-Ikeda N. and Fukuzumi K. "Synergistic Antioxidant Effect of Nucleic Acid and Tocopherols" J. Am. Oil Chem. Soc. 54 -- 360 (1977).
- 5.-Kummerow F.A. "Current Studies on Relation of Fat to Health" J. Am. Oil Chem. Soc. 51 255 (1974).
- 6.-Richard J.J. "Role of Dietary Fat in Health" J. Am. Oil Chem. Soc. 51 251 (1974).
- 7.-Sherwin E.R. "Antioxidants for Vegetable Oil" J. Am. Oil Chem. Soc. 53 53 (1976).
- 8.-Sherwin E.R. "Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing" J. Am. Oil Chem. Soc. 55 809 (1978).
- 9.-Vidaurri G.A. "Cambios en las Características Químicas de la Mantequilla de Cerdo Sobrecalentada y Posibles Implicaciones Toxicológicas" Tesis, Fac. de Química, UNAM (1983).

PRACTICA 8. EXTRACCION Y ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS

OBJETIVO

Se extraerán las antocianinas del orujo de uva (desecho -- vitivinícola) y se observara su estabilidad en diferentes condiciones de pH, de concentración de sales y de temperatura.

GENERALIDADES

El color es de las principales características que deben exaltarse en los alimentos debido a su gran influencia como medida de aceptabilidad por parte del consumidor. Los compuestos encargados de llevar a cabo estas funciones son conocidos como pigmentos, los cuales se han clasificado para su estudio en:

A) Tetrapirroles

a) Hemos

b) Clorofilas

B) CarotenoidesC) Flavonoides

a) Antocianinas

D) Betalainas

De esta serie, el grupo de los flavonoides ha sido el más estudiado por estar presente en la mayoría de los frutos y vegetales, además de incluir la gama de colores intermedios que se encuentran entre el color rojo y azul en la región visible del espectro.

Aproximadamente existen 140 antocianinas reportadas que aparecen en forma de glucosido, en donde el aglucón lo forma la antocianidina (Fig. 1), y la parte reductora la glucosa, la manosa, la ramnosa o en algunos casos ciertas pentosas. Su estructura es muy reactiva, por lo que el color que presente dependerá de A) pH en que se encuentre, B) las sales con las que interaccione, C) temperatura a la que se somete el alimento, -- D) la presencia de sulfitos y E) el oxígeno.

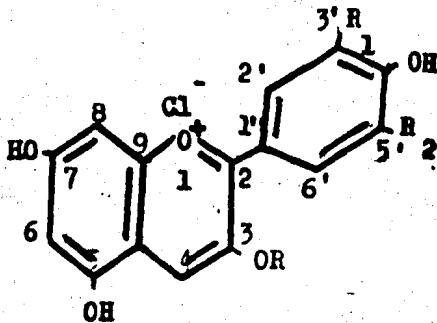


Fig. 1 Estructura de las antocianinas (Guadarrama, 1983).

A) Efecto del pH, las antocianinas presentan un color más intenso a pH 1, valor en el cual no se encuentran ionizadas, por lo que a valores superiores, principalmente de 4.5 en adelante, -- existe pérdida de color, ocasionando que su uso se vea restringido en alimentos que posean un pH de 3.5, como son los jugos de frutas y conservas. Las modificaciones estructurales del -- pigmento en función del pH se muestran en la Fig. 2.

B) Efecto de la temperatura, a medida que aumenta la temperatura, disminuye el color, por lo que es recomendable efectuar -- los procesos a los que se somete el alimento, a temperaturas --

lo más bajo posible, en especial las condiciones de almacenamiento, ya que es aquí donde existe más pérdida del color, -

Fig. 3.

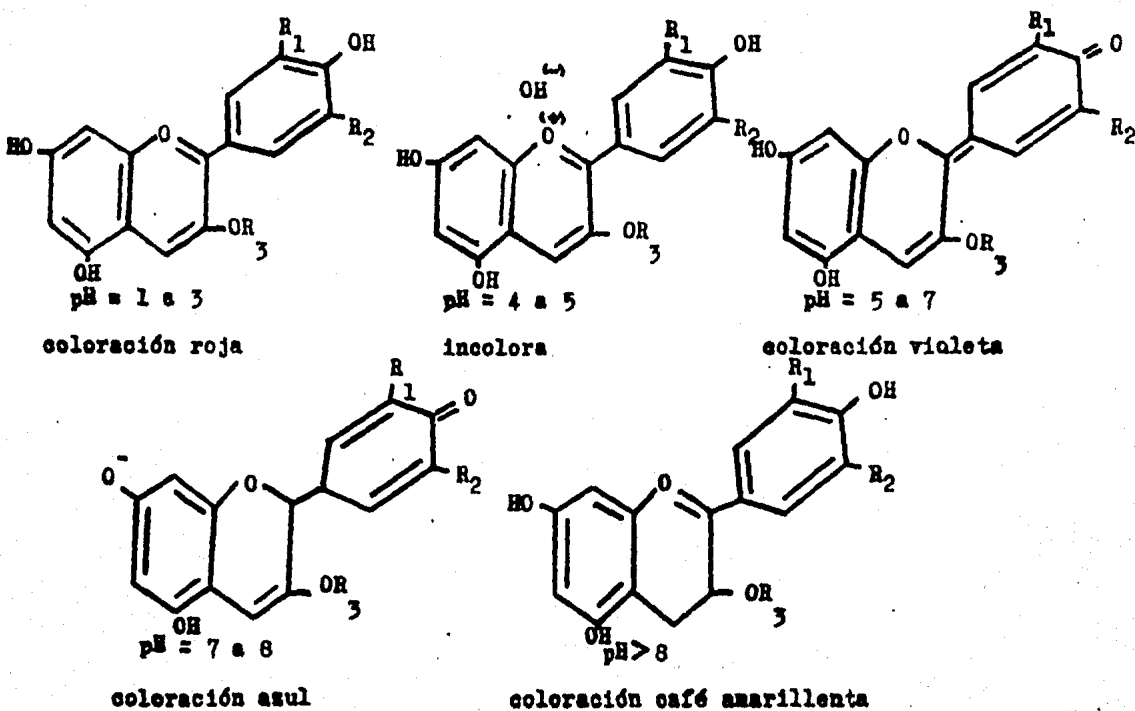


Fig. 2 Efecto del pH en la estabilidad de las antocianinas. (Guadarrama, 1983).

C) Efecto de las sales presentes, debido a que las antocianinas interaccionan con iones como el sodio, potasio, magnesio y calcio formando la sal correspondiente, se producen los cambios en la coloración limitando su uso.

D) Efecto de los sulfitos, puesto que las antocianinas son atacadas fácilmente por los sulfitos o el dióxido de azufre, conforme se incrementa la concentración de estos es mayor la pérdida del color, el cual se regenera si los sulfitos son elimi-

nados.

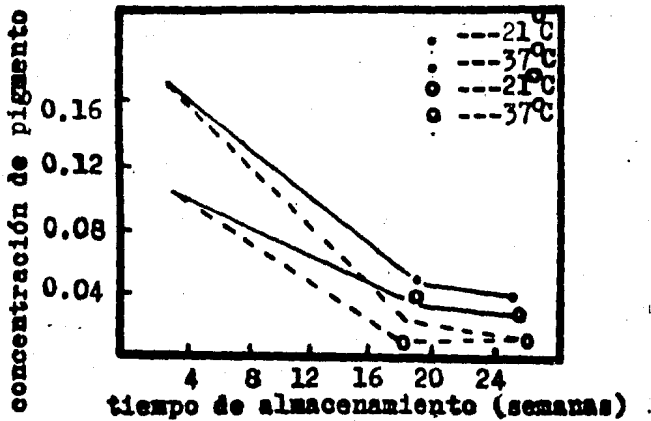


Fig. 3 Efecto del almacenamiento y temperatura en la disminución del color de las antocianinas (Abers, 1979).

E) Efecto del oxígeno, la pérdida de color durante el calentamiento es superior en presencia de oxígeno: esto se ha observado en un sistema modelo en el que se hace reaccionar pelargonidin 3 -- glucosido, produciendo un precipitado café. En condiciones anaeróbicas la muestra alcanza un color amarillo pálido (Priestley, 1979), Fig 4.

Por otra parte el orujo de uva es un desecho vitivinícola - que ha suscitado gran interés al igual que la tuna, el arandano y el betabel por ser una alternativa para sustituir los colorantes prohibidos como son los rojos F.D. & C. No. 4 y 2, debido a que en México sólo es permitido el rojo No. 3 F.D. & C.

Esta práctica tiene como finalidad extraer antocianinas del

orujos de la uva y determinar las condiciones en las cuales es más estable.

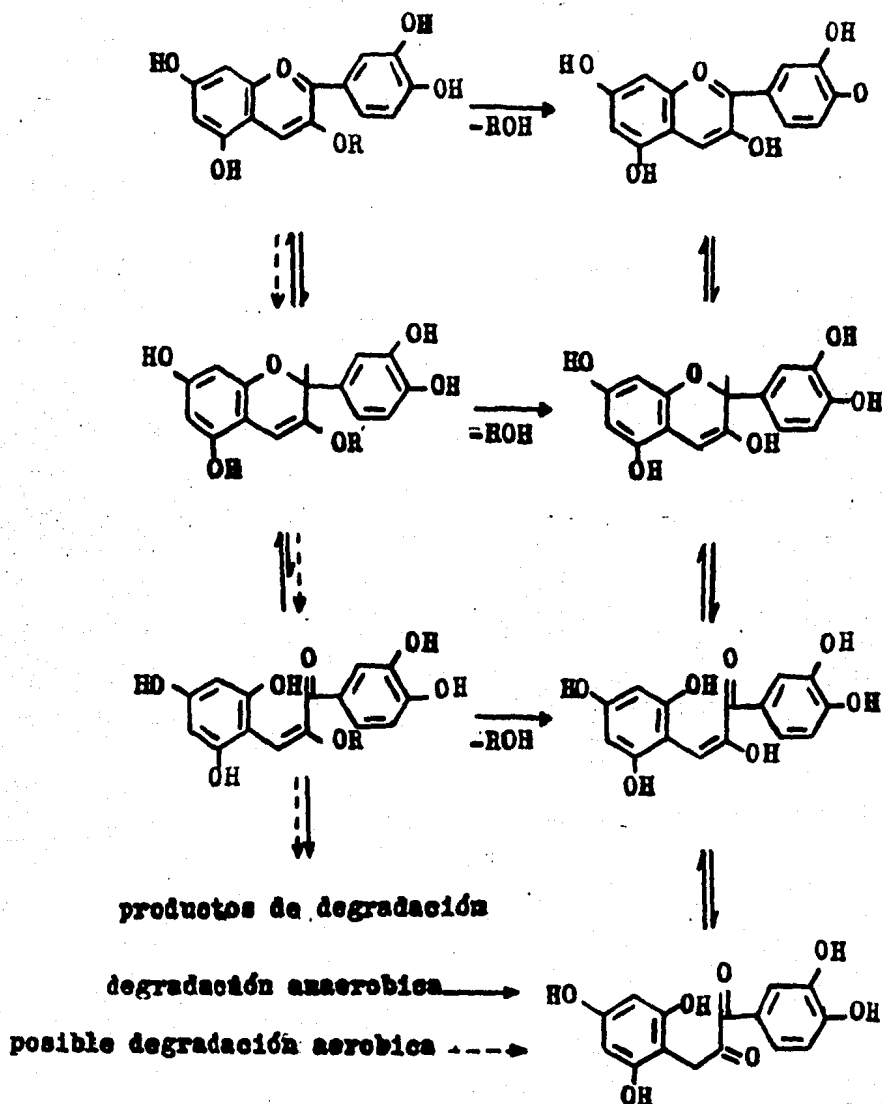


Fig. 4 Mecanismo propuesto para la degradación de antocianinas.

MATERIAL

- Balanza granataria	(1)
- Embudo	(1)
- Espátula	(1)
- Matraz aforado de 100 ml	(1)
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml	(1)
- Parrilla	(1)
- Pipeta graduada de 1 ml	(1)
- Pipeta graduada de 10 ml	(1)
← Probeta de 100 ml	(1)
- Recipiente para baño maría	(1)
- Termómetro (-10 a 200 ^o C)	(1)
- Tubos de ensayo	(18)

REACTIVOS

i) Etanol al 95 %, acidificado con una solución de ácido cítrico 0.1 %	100 ml
ii) Bisulfito de sodio (NaHSO ₃)	2 g
iii) Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 ⁻⁶ N..	2 ml
iv) Solución de ácido clorhídrico (HCl) 1 N	2 ml
v) Solución de ácido clorhídrico (HCl) 10 ⁻³ N	2 ml
vi) Solución de ácido clorhídrico (HCl) 10 ⁻⁶ N	2 ml
vii) Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0.5 g
viii) Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.5 g
ix) Oxido de aluminio (Al ₂ O ₃)	0.5 g
x) Glicina	0.5 g
xi) Glucosa	0.5 g

xii) Sulfato de potasio (K_2SO_4)	0.5 g
xiii) Carbonato de potasio (K_2CO_3)	0.5 g
xiv) Fenol	0.5 g

MUESTRA PROBLEMA

a) Orujo de uva (roja)	40 g
------------------------------	------

PROCEDIMIENTO

I.- Extracción de antocianinas.

a) Pesar 40 g de orujo de uva (roja), en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.

b) Adicionar 50 ml de etanol al 95 %, acidificado con una solución de ácido cítrico 0.1 % hasta pH 3.5 (de preferencia ajustar con el potenciómetro).

c) Colocar el matraz en baño maría a $60^{\circ}C$, durante 10 minutos.

d) Dejar enfriar y filtrar con algodón. Con la solución obtenida realizar las siguientes pruebas:

II.- Efecto del SO_2

a) Preparar 10 ml de solución de $NaHSO_3$ en las siguientes concentraciones; 100, 200, 300, 400 y 500 partes por millón (ppm).

b) Colocar en 6 tubos 3 ml del extracto de antocianinas y 3 ml de la solución de $NaHSO_3$, como se indica a continuación:

Tubo	Solución de NaHSO ₃ (ml)	NaHSO ₃ (ppm)	Extracto de antocia ninas (ml)
1	-	0	3
2	3	100	3
3	3	200	3
4	3	300	3
5	3	400	3
6	3	500	3

c) Observar como afectan al color la concentración de sulfitos, visualmente.

III.- Efecto del pH.

a) Preparar las siguientes soluciones: 10^{-3} N, 1 N, 10^{-6} N de HCl y 10^{-6} N de NaOH, cuyo pH corresponde a un valor aproximado de 1, 3, 6 y 8 respectivamente.

b) Agregar en 5 tubos de ensayo 2 ml del extracto de antocianinas y adicionar a cada uno 1 ml de una de las soluciones preparadas, usando agua destilada como solución correspondiente a pH 7.

c) Observar el efecto que tiene el pH sobre el color, visualmente.

IV.- Efecto que tienen algunas sustancias presentes en el medio.

a) Colocar 2 ml del extracto de antocianinas en 8 tubos de ensayo y agregar a cada uno 0.5 g de las siguientes sustancias:

Tubo	Extracto de antocianinas (ml)	Sustancias	Concentración (g)
1	2	FeSO ₄	0.5
2	2	MgSO ₄	0.5
3	2	Al ₂ O ₃	0.5
4	2	K ₂ SO ₄	0.5
5	2	K ₂ CO ₃	0.5
6	2	glicina	0.5
7	2	glucosa	0.5
8	2	fenol	0.5

b) Observar el efecto que tienen las sustancias anteriores en el color.

RESULTADOS

1.-Efecto del SO₂

No. Tubo	Concentración de NaHSO ₃	Color
1	0	rojo
2	100 ppm	naranja
3	200 ppm	↓
4	300 ppm	
5	400 ppm	
6	500 ppm	

2.-Efecto del pH

No. Tubo	pH	Cambios producidos en el color.
1	-	coloración roja
2	1	coloración naranja
3	3	no se producen cambios
4	5	coloración ligeramente naranja
5	7	coloración naranja
6	8	coloración verde.

3.-Efecto que tienen las sales presentes en el medio.

No. Tubo	Sales	Cambios producidos en el color
1	FeSO ₄	intensifica el color rojo
2	MgSO ₄	coloración café oscura.
3	Al ₂ O ₃	coloración naranja
4	K ₂ SO ₃	coloración rojo claro
5	glicina	coloración naranja
6	glucosa	coloración naranja
7	fenol	intensifica el color rojo
8	K ₂ CO ₃	coloración verde.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

A valores de pH mayores de 3, las antocianinas sufren cambios estructurales por lo que se producen alteraciones en el color, Asimismo, conforme aumenta la concentración de sulfitos disminuye la intensidad del color, debido a que las antocianinas son atacadas fácilmente por este compuesto. Los iones fierro, aluminio, potasio, sodio también afectan la coloración -- del pigmento, puesto que se forma la sal correspondiente de -- las antocianinas.

CUESTIONARIO

- 1.-¿Qué cambios estructurales sufren las antocianinas a los valores de pH empleados en la práctica?
- 2.-¿Por qué las antocianinas no son muy utilizadas en la industria como colorantes?
- 3.-¿Qué ventajas tiene el uso de colorantes naturales?
- 4.-¿Por qué las sales presentes en el medio afectan la estabilidad del color?
- 5.-¿Cual es el efecto de los sulfitos en el color?
- 6.-¿Qué finalidad tiene acidificar con ácido cítrico el alcohol durante la extracción de las antocianinas?
- 7.-¿Por qué es recomendable utilizar latas barnizadas para alímentos que poseen estos pigmentos?
- 8.-¿Por qué es importante controlar la temperatura durante la extracción del pigmento?
- 9.-¿Qué otros factores afectan la estabilidad del color, que no sean los mencionados en la práctica?

REFERENCIAS DE CONSULTA GENERAL

- 1.-Abers J.E. and Wrolstad R.E. "Causative Factors of Color Deterioration in Strawberry Preserves During Processing and -- Storage" J. Food Sci. 44 (1) 75 (1979).
- 2.-Badui Dergal S. "Química de los Alimentos" (Ed) Alhambra, - S.A., México (1981).
- 3.-Clydesdale F.M. "Instrumental Techniques for Color Measurement of Food" Food Technol. 30 (10) 52 (1976).
- 4.-Clydesdale F.M., Main J.H., Francis F.J. and Damonjr K.A. - "Concord Grape Pigments as Colorants for Beverages and Gelatin Desserts" J. Food Sci. 43 1687 (1978).
- 5.-Guadarrama Galán Ma. B. "Industrialización de Desechos de la Vinificación y Evaluación Sensorial de Vinos Cosechas 76"- 81 Tesis, Fac. de Química, UNAM (1983).
- 6.-Joslyn M.A. "Color Retention in Fruit Products" Ind. Eng. Chem. 33 (3) 308 (1941).
- 7.-Priestley R.J. "Effects of Heating on Foodstuffs" Applied -- Science Publishers LTD London, (1979).
- 8.-Von Elbe J.H. "Stability of Betalaines as Food Colors" Food - Technol. 29 (5) 42 (1975).
- 9.-Williams M. and Hrazdina G. "Anthocyanins as Food Colorants: Effect of pH on the Formation of Anthocyanin-rutin Complexes" J. Food Sci. 44 66 (1979).

CONCLUSIONES

Se consiguio establecer 8 prácticas que tienen la finalidad de auxiliar a los maestros de teoría de la materia de Química de Alimentos y principalmente a nuestros compañeros, para que en conjunto las desarrollen en el laboratorio y de esta forma amplien y consoliden sus conocimientos en el area de alimentos, tratando de elevar un poco más el nivel alcanzado en la licenciatura.

Para la selección de algunas de las principales reacciones que suceden en los alimentos, se puso especial énfasis en la parte teorica ofreciendo conceptos que afirman lo visto en clase, pretendiendo crear en los alumnos la inquietud de adentrarse a conocer más acerca de esta ciencia.

Asimismo consideramos, que estos protocolos no son del todo perfectos para los requerimientos de la universidad (principalmente por falta de instrumentos de medición), pero dan una pauta para establecer otros o en su caso modificarlos y contribuir a establecer un curso teórico-práctico de Química de Alimentos.