



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION Y APLICACION DE TECNICAS
ANALITICAS EN EL AREA ALIMENTARIA



T E S I S

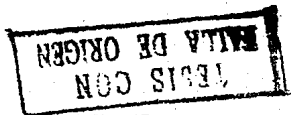
Que para obtener el título de

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

p r e s e n t a

LEONORA MONDRAGON JAIMES



México, D. F.

1989



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 está 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

INDICE.....	3
INTRODUCCION	4
PROTEINAS	8
DETERMINACION DE AMINOACIDOS	7
DETERMINACION DE PROTEINAS	12
DETERMINACION DE NITRGENO TOTAL	22
HIDROLISIS DE PROTEINA	25
DISCUSION	28
CARBOHIDRATOS	30
DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS SENCILLOS.....	37

CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA	
DE ALTA PRESION	48
DETERMINACION DE POLISACARIDOS ASIMILABLES.....	50
DETERMINACION DE POLISACARIDOS	53
DISCUSION	59
LIPIDOS	61
EXTRACCION POR DIFERENTES SOLVENTES	64
CUANTIFICACION DEL EXTRACAO LIPIDICO.....	66
CARACTERIZACION DEL EXTRACAO LIPIDICO.....	71
DETERMINACION DE LIPIDOS POR CROMATOGRAFIA	
DE GASES	75
INDICE DE LA CALIDAD DE LIPIDOS	76
DISCUSION	83

VITAMINAS	84
DETERMINACION DE VITAMINA A	87
DETERMINACION DE VITAMINA E	89
DETERMINACION DE VITAMINA C	92
DETERMINACION DE NIACINA	93
DISCUSION	96
MINERALES	97
MINERALES POR ABSORCION ATOMICA	98
DISCUSION	106
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFIA	109

INTRODUCCION

En la Industria Alimentaria se llevan a cabo una serie de metodologías para la determinación de macrocomponentes (Proteínas, Carbohidratos y Lípidos) y microcomponentes (Vitaminas y Minerales). Esto con la principal finalidad de establecer su calidad, seguridad y composición o naturaleza química.

En la actualidad existe una amplia información de técnicas o procedimientos que se pueden aplicar para evaluar la calidad o la composición de un alimento. De estas metodologías se pueden mencionar entre las más importantes, las técnicas Oficiales, que son ampliamente utilizadas sobre todo en la verificación de la calidad, y que son establecidas por Organismos de Normalización o por Asociaciones Oficiales; dentro de estas metodologías predominan las Volumétricas, Gravimétricas y Espectrofotométricas. Por otro lado, también se han venido estableciendo metodologías más novedosas donde básicamente se recurre al análisis instrumental. Cabe señalar dentro de las más importantes a la Cromatografía de Gases, la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), la Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) y de Infrarrojo.

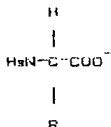
Esto ha evolucionado en una forma tan rápida que el trabajo para cuantificar o caracterizar un alimento ha sido sustancialmente facilitado en los últimos años.

Ante este amplio panorama de posibilidades, el Químico Analista puede encontrarse en la disyuntiva de elegir o seleccionar la metodología de acuerdo a sus necesidades y factores como la naturaleza, la solubilidad del macro o microcomponente que será cuantificado, la sensibilidad que requiere, la exactitud, la especificidad del análisis, la rapidez en el desarrollo de la metodología, la accesibilidad y la reproductibilidad, al igual que la precisión, factores muy importantes.

Con base en estos antecedentes, los objetivos principales de este trabajo son los de llevar a cabo una revisión general de las técnicas analíticas más utilizadas en el Área alimentaria, analizar los principios químicos en los que mencionadas metodologías se fundamentan y desarrollan, así como la Accesibilidad, Sensibilidad, Precisión y Exactitud de los mismos. Llevar a cabo una comparación de los métodos disponibles para una elección adecuada de la metodología a seguir.

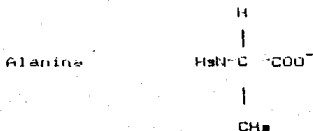
PROTEINAS

Las Proteínas son polipéptidos de peso molecular elevado. Un péptido consiste en la unión de dos o más residuos de aminoácidos por medio de un enlace peptídico. Los aminoácidos son moléculas sencillas formadas por un grupo amino, un carboxilo, un grupo funcional R y un hidrógeno libre, insertados en un carbono alfa.



Las reacciones más importantes de los aminoácidos son la formación de enlaces peptídicos, que involucran la eliminación de una mol de agua entre el grupo alfa amino del aminoácido y el grupo carboxilo de un segundo aminoácido, para así formar dipéptidos, polipéptidos y hasta proteínas. Se han propuesto varios métodos para clasificar a los aminoácidos sobre las base de su grupo R; siendo el más significativo el que se fundamenta en la polaridad de los mencionados grupos:

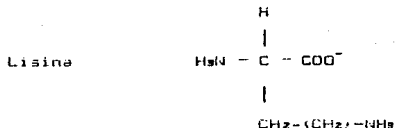
1).- R no polar o hidrófilo (p.e.)



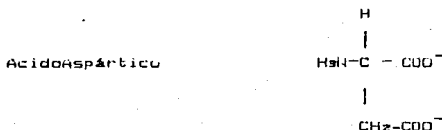
2).- R sin carga (p.e.)



3).- R con carga positiva (p.e.)



4).- R cargado negativamente (a pH 6.0 - 7.0 que es la zona del pH intracelular), (p.e.)



También encontramos aminoácidos aromáticos debido a sus grupos R, por ejemplo triptofano, tirosina, histidina y fenilalanina, que son importantes de mencionar dentro de su clase debido a la reacción diferente que presentan respecto a los demás al llevarse a cabo la absorción en el espectro Ultravioleta.

Los grupos carboxilo y amino de los aminoácidos muestran todas las reacciones que se pueden esperar de estas funciones, así como el comportamiento ácido o básico, formación de sales, descarboxilación, desaminación oxidativa, esterificación y acilación.

Debido al enlace peptídico se pueden identificar cualitativamente y cuantitativamente a determinados aminoácidos; en muchos casos estas reacciones de coloración pueden ser usadas para polipéptidos y proteínas.

Por otro lado, tenemos que las proteínas que contienen únicamente aminoácidos se llaman proteínas Simples y aquellas que contienen otros grupos son las proteínas Complejas o Conjugadas.

Las proteínas presentan un gran número de propiedades comunes como

su elevado peso molecular, sus características antiósmóticas y estructuras poliméricas de secuencias definidas y conformaciones tridimensionales.

En lo que respecta a su clasificación, ningún sistema resulta altamente satisfactorio. Entre los más útiles para los fines que se persiguen en este capítulo es el que se basa en la solubilidad de las proteínas. [4,28,31,32]

Albuminas. - Solubles en agua y soluciones moderadamente salinas.

Globulinas. - Escasamente solubles en agua (teuglobulinas). Solubles en soluciones francamente salinas (seudoglobulinas).

Proteínas. - Solubles en Etanol al 70-80%, pero insolubles en agua y etanol absoluto. Generalmente ricas en Arginina.

Histonas. - Solubles en soluciones salinas. Generalmente ricas en lisina.

Glutelinas. - Insolubles en todos los solventes mencionados pero solubles en Ácidos o bases.

Escleroproteínas. - Insolubles en agua o en soluciones salinas. Generalmente ricas en glicina, alanina y prolina.

DETERMINACION DE AMINOACIDOS

La determinación de aminoácidos se puede llevar a cabo por metodologías Espectrofotométricas:

1. Reacción con Fenol.
2. Reacción con Ninhidrina.
3. Reacción con Sal de Cobre.
4. Microanálisis con Sal de Cobre.

1. REACCION CON FENOL.

FUNDAMENTO:

Cuantificar el complejo colorido formado básicamente por los aminoácidos tirosina y triptofano con el reactivo fenol (fosfotungstico-fosfomolibdico). [41,52]

VENTAJAS:

- El complejo colorido alcanza su máximo desarrollo de color en 5 min.

DESVENTAJAS:

- La reacción no es específica para tirosina y triptofano.
- El fenol y agentes reductores reaccionan con el reactivo de

fenol produciendo el mismo color azul del complejo.
 El color varia conforme transcurre el tiempo, por lo que las lecturas deben realizarse a un tiempo determinado.

REACTIVOS:

- Reactivo de fenol: Pesar 1000 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, en 700 ml. de agua, 50 ml de H_2SO_4 al 85 % y 100 ml. de HCl conc., se llevan a un matraz de 1.5-2.0 l. y refrijar por 10 hrs. Enfriar y adicionar 174 g de $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 ml. de agua desionizada y unas gotas de agua de bromo. Llevar a ebullición por 15 min., Enfriar y diluir a l l..
- Para utilizarse este reactivo debe diluirse previamente con 2 volúmenes de H_2O desionizada.
- Na_2CO_3 2.8 N.
- Tirosina R.N., Realizar una curva patrón de 0.02 - 0.24 mg/5 ml.

METODOLOGIA:

Mezclar 5 ml. de solución problema con 10 ml. de Na_2CO_3 , 3 ml. de reactivo diluido de fenol. Agitar constante.

↓
 ↓
 Reposar por 5 min.

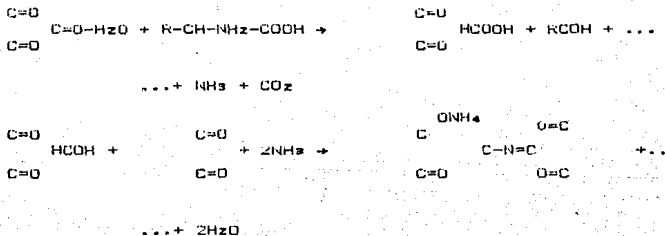
↓
 ↓
 Realizar una curva estándar de tirosina 0.02 - 0.24 mg./5 ml..

↓
 ↓
 Leer el espectrofotómetro a 690 nm., calibrando con un blanco de agua y reactivos.

2.- REACCION CON NINHIDRINA.

FUNDAMENTO:

La reacción de la Ninhidrina con los alta aminoácidos produce CO_2 , NH_3 y un aldehído. La Ninhidrina ya reducida, reacciona con el amoniaco liberado formando un complejo colorido (azul) que absorbe a un máximo de longitud de onda de 570 nm.. Cabe señalar que los aminoácidos prolina e hidroxiprolina dan un color amarillo con una máxima absorbancia a 440 nm.[4,11,41,52]



VENTAJAS:

- Determina cuantitativamente a aminoácidos traza.
- Es útil para la determinación de péptidos.
- El color es estable por una hora.
- La sensibilidad y confiabilidad de este análisis es tal que 0.01 micromoles del aminoácido dan complejo colorido.

DESVENTAJAS:

- El complejo colorido es inestable, oxidándose fácilmente por la luz y el aire, puede evitarse por la acción de agentes condensantes y reductores, como el cloruro estannoso o cianuro de potasio y ácido ascórbico.
- Muy sensible a los cambios de pH.
- Se obtiene complejo colorido con aminas primarias y el ión amonio. Este último debe ser tomado en cuenta por aproximación en el ajuste con el blanco.
- La falta de especificidad puede ser una desventaja en el trabajo con sistemas biológicos conocidos.

REACTIVOS:

- Ninhidrina recristalizada. Pesar 1000 g de ninhidrina y disolver en 250 ml. de agua caliente. La solución caliente se decolora con carbón activado y se filtra. Almacenar el filtrado a 4°C por toda la noche. Lavar los cristales con 20 ml. de agua fría. Secar y almacenar en frascos ámbar.
- Solución de ninhidrina. Disolver en 500 ml. de buffer de citrato, 0.80 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 20 g de ninhidrina previamente disuelta en 500 mililitros de metilcellosolve. Almacenar este reactivo en ausencia de oxígeno.
- Buffer de citrato 0.2 M. a pH 5.0. Disolver 21 g de ácido cítrico R.A. en 200 ml. de NaOH y diluir a 500 ml.
- Metilcellosolve. Volúmenes iguales con agua.
- Solución estándar de aminoácidos de 1.6-2.0 mM.

METODOLOGÍA:

Mezclar 0.1 ml. de sol. problema con 0.1 ml. de ninhidrina, tapar el tubo con aluminio para evitar evaporación.

↓

Calentar en baño de agua hirviendo por 20 min..

↓

Adicionar 5 ml. de mezcla de solventes (agua-propanol), mezclar perfectamente.

↓

Realizar una curva estándar de leucina 0.1 ml. de 0.5-2.0 mM..

↓

Leer en el espectrofotómetro a 570 nm.. Para prolina e hidroxiprolina leer a 440 nm. Ajustar el aparato con un blanco de reactivos.

3. REACCION CON SAL DE COBRE.

FUNDAMENTO:

Cuantificar el complejo colorido formado por la interacción de la sal cúprica con los aminoácidos y péptidos. [137]

VENTAJAS:

- Las sales de cobre de los aminoácidos son convertidos a sales de alanina para eliminar la variación en niveles de color de concentraciones equimolares de sales de cobre de otros aminoácidos.
- No presenta interferencias con el amonio en solución.

DESVENTAJAS:

- La cisteína, fenilalanina, metionina, leucina y triptofano por ser parcialmente solubles o bien insolubles en los reactivos que se mencionarán, son convertidos a sales mixtas con glicina y sales de cobre.
- Presenta desviación con el aminoácido histidina.

REACTIVOS:

- Solución de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. disolver 28 g / l de agua desionizada.
- Solución de fosfato de sodio. Disolver 68.5 g de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ R.A. por litro de agua desionizada.
- Buffer de borato de sodio, pH 7.1-7.2. Disolver 40.2 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ R.A. anhidro en 4 l. filtrar la solución. Disolver 0.9 g de NaCl por cada 100 ml. de buffer. Ajustar el pH con NaOH .
- Solución de $\text{CuS}(\text{PO}_4)_2$. Preparación a 40 ml. de solución de fosfato de sodio se añaden 20 ml. de CuCl_2 con agitación. La suspensión se centrifuga por 5 min.. Lavar el precipitado por dos ocasiones, resuspendiendo en 50 ml. de buffer y centrifugar. El precipitado lavado es suspendido en 100 ml. de buffer. El fosfato de cobre de un máximo de absorbancia después de 4 días de almacenamiento, pero presenta decremento después de 10 días.
- Alanina recristalizada.

METODOLOGIA:

Mezclar 5 ml. de solución problema con 5 ml. de suspensión de fosfato cúprico. Agitar ocasionalmente por 5 min..

↓

Centrifugar por 5 min. y decantar cuidadosamente el sobrenadante azul en 200 mg. de alanina.

↓

Disolver perfectamente y leer en el espectrofotómetro a 620 nm.. Preparar el blanco requerido con 5 ml. de buffer, 5 ml. de agua y 200 mg. de alanina.

↓

Para blancos de hidrolizados proteicos prepararlo con 5 ml. de buffer, 5 ml. de hidrolizado diluido. Centrifugar y decantar el sobrenadante azul en 200 mg. de alanina.

↓

Realizar una curva estándar de 5-40 mM. de alanina.

4. MICROANALISIS CON SAL DE COBRE.

FUNDAMENTO:

El método está basado en la medición de la absorción máxima que produce la sal de cobre con los aminoácidos. [27]

VENTAJAS:

- La sal de cobre de cisteína, fenilalanina, metionina, leucina y triptofano son solubles en los reactivos para el análisis, sin que sea necesario la formación de la doble sal de glicina como se lleva a cabo en el método analítico de Sal de Cobre a 230 nm.
- Es útil en el estudio de análisis de proteínas.
- No presenta interferencias por el ión amonio en solución.

DESVENTAJAS:

- Debe excluirse la presencia de cobre en el agua, material y reactivos.
- La absorción en el U.V. de la unión de las sales de cobre es relativamente inestable en presencia de un exceso de sales de cloruro de sodio y cobre.

REACTIVOS:

- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 N. Disolver 8.52 g del reactivo en 1 l de agua desionizada.
- Buffer de borato de sodio, pH 9.1-9.2. Disolver 49.3 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ anhidro, en 4 l de agua desionizada y filtrar.
- Solución de NaCl. Disolver 6.0 g en 100 ml. de solución de borato.

METODOLOGIA:

Mezclar 5 ml. de buffer, 5 ml. de solución problema con 1-10 ml. de CuCl_2 .

↓
Agitar y reposar por 10 min. a temperatura ambiente.

↓
Centrifugar por 5 min. y decantar con cuidado.

↓
Realizar una curva Estándar de alanina Q.P. 50-500 micromoles preparar el blanco con 5 ml. de buffer y 5 ml. de solución problema.

↓
Leer en el espectrofotómetro a 230 nm.

DETERMINACION DE PROTEINAS.

1.- Métodos Espectrofotométricos en el U.V. y Visible (Directos).

- 1.1.- Estimación de proteínas por absorción en el U.V.
- 1.2.- Turbidimétrico.

2.- Métodos Químicos (Indirectos).

- 2.1.- Prueba de detección cualitativa.

3.- Espectrofotométricos en el visible.

- 3.1.- Biuret.

- 3.2.- Lowry.

3.2.1.- Modificación de Lowry.

- 3.3.- Ove-Bindina (teñido).

- 3.4.- Métodos alternos para proteínas insolubles.

Estos Métodos se originan de establecer la gran cantidad de reacciones coloridas que representan las proteínas y los aminoácidos y que pueden ser utilizadas para determinar la presencia de enlaces peptídicos o de aminoácidos específicos.

1.- METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS EN EL U.V. Y VISIBLE (DIRECTOS).

1.1.- ESTIMACION DE PROTEINAS POR ABSORCION EN EL U.V.

FUNDAMENTOS:

Las proteínas en solución absorben en la región ultravioleta (180-380 nm.), viéndose involucrados los enlaces peptídicos que absorben a 200 nm. y los aminoácidos tirosina, triptofano y fenilalanina que absorben a 250 - 280 nm..

VENTAJAS:

- Específico para aminoácidos tirosina, triptofano y fenilalanina.
- No presenta interferencia para sales o disolventes que se usan en el fraccionamiento de proteínas.

DESVENTAJAS:

- Presentan interferencia por ácidos nucleicos que absorben a 280 nm..

METODOLOGIA:

Solubilizar la proteína en solventes adecuados o en buffers, a una concentración conocida. Solubilizar la muestra y si es necesario precipitar a la proteína si es insoluble.

↓

Ajustar el Espectrofotómetro con el solvente utilizado o el buffer requerido a 260 y 280 nm.

↓

Realizar cálculos de concentración de proteínas.

CALLULUS:

$$\text{mg./ml.} = F * 1/d * \text{D.O. (280 nm.)}$$

d = diámetro de la celda (cm.).

F = relación del coeficiente de extinción y % de proteína.

$$F = 2.303 / 280 * \% \text{ proteína} / 100$$

el mismo F puede encontrarse por medio de la relación de absorción 280 / 260.

1.2 TURBIDIMETRICO.

FUNDAMENTO:

Se utilizan tres diferentes reactivos que precipitan a la proteína en bajas concentraciones, cuantificándose espectrofotométricamente (A).

VENTAJAS:

- Métodos rápidos.
- Sensibilidad (0.5 - 1.5 mg./ml.).
- Los reactivos ferrocianuro, ácido acético y ácido sulfosalicílico son más estables que el ácido tricloroacético (TCA).
- En 10 min. desarrolla el complejo colorido.

DESVENTAJAS:

- No hay diferencia entre proteínas y componentes insolubles ácidos.
- Producen diferentes niveles de color con diferentes proteínas.
- La turbidez con TCA es menos estable en comparación con los dos reactivos anteriores.

REACTIVOS:

- Solución muestra (0.5 - 1.5 mg./ml.).
- TCA al 1.25 %.
- Ferrocianuro de potasio al 0.75 %.
- Ácido sulfosalicílico al 2.5 %.

METODOLOGIA:

Mezclar 1 ml. de solución problema con 4 ml. de: TCA o ferrocianuro de potasio con una gota de ácido acético glacial, o 4 ml. de ácido sulfosalicílico, haciendo una mezcla total de 5 ml..

↓

Reposar 10 min.

↓

Realizar una curva estándar de una proteína precipitada y seca de 0.5 - 1.5 mg./ml..

↓

Leer en el espectrofotómetro a 600 nm.. Ajustar con un blanco de reactivos.

2. METODOS QUIMICOS INDIRECTOS).

2.1 PRUEBA DE DETECCION CUALITATIVA.

2.1.1 PRUEBA DE DETECCION CON REACTIVO DE MILLON.

FUNDAMENTO:

Es una reacción que se lleva a cabo por la interacción entre la proteína y el mercurio (como nitrato de mercurio en ácido nítrico conc.) formando así un nitroderivado colorido si la proteína contiene el grupo hidroxifenil.[41]

VENTAJAS:

- Detección cualitativa rápida, indicando la presencia de tirosina.

DESVENTAJAS:

- No es una reacción cuantitativa.
- La presencia de soluciones salinas o la orina que contenga iones cloruro, precipitan al mercurio impidiendo la formación del nitroderivado.
- Esta reacción no se lleva a cabo en medio alcalino.
- Presenta interferencias por la presencia de reactivos que contienen al grupo hidroxifenil: Fenol, salicilaldehído, catecol y otros hidroxifenil derivados, por lo que se concluye que esta reacción es específica para este grupo.
- No es específica para tirosina.

REACTIVOS:

- HNO_3 concentrado.
- Mercurio metálico.

METODOLOGIA:

Preparar una solución proteínica y hacerla reaccionar con Mg metálico y HNO_3 .

↓

Agitar cuidadosamente y la formación de un color rojo ladrillo nos indica la presencia de tirosina.

2.1.2 REACCION XANTOPROTEICA.

FUNDAMENTO:

Formación de un nitro derivado de la proteína por la acción del ácido nítrico y el grupo fenilo presente en los aminoácidos.[41.A]

VENTAJAS:

- Detección cualitativa rápida.
- Se detectan aminoácidos como tirosina y triptófano.

DESVENTAJAS:

- No es cuantitativa.
- No es específica para tirosina y triptófano, ya que también se detectan diiodotirosina y tirosina, así como compuestos que contienen el grupo fenilo.

METODOLOGIA:

Preparar una solución proteínica y hacerla reaccionar con HNO_3 conc.

↓

Agitar cuidadosamente y calentar lentamente. La formación de un color amarillo intenso indica nitración de residuos de aminoácidos aromáticos.

2.1.3 DETECCIÓN CUALITATIVA CON ACIDO SULFURICO.

FUNDAMENTO:

Detección de proteínas en solución por el desarrollo de una reacción colorida que involucra al aminoácido triptofano por contener al grupo indol.(A)

VENTAJAS:

- Detección cualitativa rápida.
- Entre los aminoácidos esta reacción colorida es específica para triptofano.
- Esta prueba puede ser utilizada para proteínas sólidas o en solución.

DESVENTAJAS:

- Compuestos que contengan al grupo indol darán también esta prueba.
- No es cuantitativa.

METODOLOGIA:

Preparar una solución proteínica y hacerla reaccionar con H_2SO_4 conc. y formaldehído.

↓

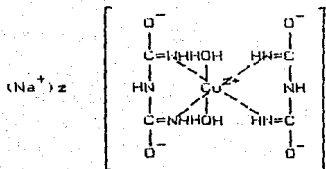
Agitar cuidadosamente la presencia de un color violeta indica la presencia de triptofano.

3. ESPECTROFOTOMETRICOS EN EL VISIBLE.

3.1 BIURET.

FUNDAMENTO:

Se basa en la cuantificación de enlaces peptídicos y su interacción con la sal cúprica formando un complejo colorido, el cual tiene un máximo de absorción de 540 - 560 nm.(15)



VENTAJAS:

- De complejos coloridos específicos de acuerdo a la sustancia. Por ejemplo para proteínas se obtiene un color violeta; proteosas y peptonas dan un color rosa; los péptidos dan un color debilmente rosa y la gelatina un tono ligeramente azul.
- Presenta menos desviación que los métodos Folin-Ciocalteu. Absorbión en el U.V. y el turbidímetro. Además los reactivos son reutilizados.

DESVENTAJAS:

- Este método presenta las siguientes interferencias:
Las sales de amonio reaccionan con el reactivo disminuyendo la interacción de los enlaces peptídicos de la proteína con el ión cobre.
- La presencia de H_2SO_4 forma el H_2OHz que interfiere en la reacción.
- El péptido glicil-glicina no reacciona con el reactivo de Biuret.
- El Buffer Tris interfiere reaccionando con el reactivo. El glicerol interfiere en el desarrollo de la reacción.

REACTIVOS:

- Reactivo de Biuret.- Disolver 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.0 g de Lactato de sodio en 500 ml. de H_2O . Añadir con agitación constante 500 ml. de NaOH 10 % libre de carbonatos. Diluir a 1 l y almacenar en frasco Amber.
La adición de KI al 0.1 % previene la reducción del reactivo y no tiene efectos sobre el color desarrollado.
Descartar el reactivo de Biuret si este presenta un precipitado verde o negro.

METODOLOGIA:

Concentración de la solución problema 1-10mg. de proteína/ml. de solución.

↓

Tomar 1 ml. de solución problema y mezclar con 4 ml. de reactivo de Biuret.

↓

Reposar 30 min. a temperatura ambiente.

↓

Leer en el espectrofotómetro a 540-560 nm.

↓

Realizar una curva estándar de 1-10 mg. de proteína/ml. de solución.

3.2 LOWRY (FOLIN-CIOCALTEU). [30,41]

FUNDAMENTO:

Cuantificación de proteínas a partir de dos reacciones:

- Reacción de Biuret (interacción de proteínas con el reactivo cúprico en medio alcalino).
- Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por tirosina y triptofano presentes en la proteína-cobre (donador de

electrones).

VENTAJAS:

- Más sensible que la reacción de ninhidrina.
- Es 10 a 20 veces más sensible que la reacción de absorción en el U.V.
- Es 100 veces más sensible que la reacción del método de Biuret.
- Aplicable tanto en productos secos como proteínas en solución.

DESVENTAJAS:

- El color desarrollado no es estrictamente proporcional a la concentración en diferentes proteínas.
- El color de la proteína continúa desarrollándose conforme transcurre el tiempo.
- Es menos constante en el desarrollo del color e intensidad con respecto al método de Biuret.
- Presenta las siguientes interferencias:
Los iones F^- , PO_4^{3-} y Cl^- a 12 mg/100 concentraciones mayores, forman un precipitado que puede separarse por centrifugación después del desarrollo del color.

Algunas bases nitrogenadas deben eliminarse ya que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu aumentando hasta un 50% la absorción.

El $(NH_4)_2SO_4$ disminuye hasta un 0.2% de la absorberancia.

Se pueden aproximar las interferencias con blancos que contengan a estos reactivos.

- No presenta interferencia para las siguientes sustancias:

Urea, guanidina, sulfato de sodio, ICA, éter y acetona.

REACTIVOS:

- Reactivo A.- Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N..
- Reactivo B.- $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ al 0.5% en tartato doble de sodio y potasio al 1%.
- Reactivo C.- Solución de cobre alcalino. Mezclar 50 ml. de A con 1 ml. de B, descartarlo después de 24 hrs..
- Reactivo D.- Mezclar 50 ml. de Na_2CO_3 al 2% con 1 ml. de B. Descartarlo después de 24 hrs..
- Reactivo E.- Reactivo de Folin diluido, titulado con NaOH 1 N. y fenolftaleína.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu: obtenido comercialmente o preparado como se indica:

Reflujar por 10 hrs. 100 g de tungstato de sodio ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$), 25 g de molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$), 100 ml. de H_2O , 50 ml. de ácido fosfórico 85% y 100 ml. de HCl conc..

↓

Añadir 150 g de Li_2SO_4 , 50 ml. de H_2O y unas gotas de agua de bromo (de una solución saturada de bromuro, tomar 2-3 ml. y llevarlos a un frasco ámbar que contenga 100 ml. de agua desionizada y fría). (C)

↓

Hervir la mezcla 15 min. sin reflujar para remover el exceso de bromo.

↓

Enfriar y almacenar en frasco ámbar.

METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA:

Preparar la solución muestra para un rango de 5-100 microgramos de proteína/ml.

↓

Tomar 0.2 ml. de la solución problema y mezclar con 3 ml. de solución C y reposar a temperatura ambiente por 10 min..

↓

Adicionar 0.3 ml. del reactivo E, mezclar y reposar a temperatura ambiente por 3 min..

↓

↓

Leer en el espectrofotómetro a 750 nm.

↓

Curva estándar de albúmina o de la proteína adecuada de 0-100 microgramos/ml.

3.2.1. MODIFICACION DE LOWRY.

FUNDAMENTO:

El mismo que el de Lowry. Se presenta aceleración de la reacción por calentamiento.

VENTAJAS:

- Es útil para un rango de concentración mayor de proteína (40 - 200 mc/ml.).
- El color se desarrolla de 1 - 10 min.. en menor tiempo que Lowry.
- Las ya mencionadas de Lowry.

DESVENTAJAS:

- Las mencionadas de Lowry.

REACTIVOS:

Tomar 1 ml. del reactivo C (el mismo de Lowry), 10 partes de Na₂CO₃ al 10 % en NaOH 0.5 N y una parte de reactivo B.

METODOLOGIA:

Mezclar 1 ml. de sol. problema, 1 ml. de reactivo C y 3 ml. de Folin-Ciocalteu diluido 1:2.

↓

Calentar a 50°C por 1 - 10 min. en baño de agua.

↓

Enfriar a temperatura ambiente y leer en el espectrofotómetro a 540 - 750 nm..

↓

Preparar un blanco con 1 ml. de agua desionizada, 1 ml. del reactivo C y 3 ml. de Folin-Ciocalteu. Ajustar a 540 o 750 nm..

3.3 DYE-BINDING (TERMINO).

FUNDAMENTO:

Se basa en el cambio que sufre el Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) de su forma leuco en medio Ácido (PCA 3%, HCL 1 N o H₂SO₄ 2N) a la forma azul brillante. Debido a la unión con la proteína en cuestión. Esta unión colorida se cuantifica en un máximo de absorción de 465 - 595 nm. (8,9,10,42,48)

VENTAJAS:

- Preciso.
- Rápido y reproducible.
- El complejo colorido alcanza su máximo de desarrollo de color en 2 min. y estable por 1 hora.
- Es 4 veces más estable que el método de Lowry.
- Se ajusta a Microanálisis.
- Puede ser útil para semicuantificar aminoácidos libres y residuos solubles de proteínas.

DESVENTAJAS:

- La proporción del grupo amino varía ocasionalmente para algunas proteínas, por lo que se debe tomar en cuenta al realizar la curva estándar de proteína, es decir, que la cantidad desarrollada de color varía de una proteína a otra por la proporción de sus grupos amino.
- No habrá desarrollo de color si el colorante CBB-G250 no se encuentra en su forma leuco, ya que el cambio de color parece ser primeramente una función de la concentración de iones H⁺. esto se logra con la adición de PCA al 3% o HCL 1 N o H₂SO₄ 2 N.
- Se observa una disminución del coeficiente de extinción cuando se usan reactivos con más de dos semanas de almacenamiento.
- Presenta interferencias con Carbohidratos, los que es conveniente eliminar.

METODOLOGIA:

Pesar 100 mg. de CBB-G250 y disolverlos en 50 ml. de etanol al 95%. Adicionar 100 ml. del ácido fosfórico al 85 %.

Diluir a 1 lit., siendo la concentración final de 0.01 % (w/v) del CBB-G250. 4.7 % para etanol y 8.5 % para ácido fosfórico.

Preparar un buffer por medio de la mezcla proveniente de una solución salina (NaCl 0.1 M) y la solución del colorante CBB-G250 en una proporción de 1:1.

Disolver la muestra problema en el buffer anteriormente mencionado.

Mezclar en tubos de ensayo 0.1 ml. de la solución problema y 5 ml. del reactivo Azul Coomassie,

Reposar por 2 min. Preparar un blanco con 0.1 ml. de buffer y 5 ml. del reactivo Azul Coomassie.

Calibrar el espectrofotómetro a 595 nm. con el blanco y leer los problemas.

Quantificar en una curva estándar de cualquier proteína en una concentración de 10-100 mg./0.1 ml., disueltos en el buffer salino.

3.4 METODOS ALTERNOS PARA PROTEINAS INSOLUBLES.

FUNDAMENTO:

Se basan en la solubilidad de proteínas en medios alcalis y la cuantificación de ellas por medio de la reacción del enlace peptídico y el reactivo cuprico (Folin-Ciocalteu), reducido al complejo fosfomolibdico-fosfotungstico. (14)

METODOLOGIA:

A:

Generalmente es útil para proteínas que han sido precipitadas con TCA o ácido perclórico.

Disolver el precipitado en NaOH 1 N utilizando el mínimo de volumen que sea posible.

Agitar hasta disolver, si fuera necesario calentar lentamente en un baño de agua por 30 min.

Llevar a un tubo de ensaye 0.1 ml de la sol. disuelta y adicionar 1 ml de sol. de carbonato-cobre (50 ml de Na_2CO_3 al 2 %, 1 ml. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 5 % en $\text{NaK-C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ al 1 %).

Agitar y reposar por 10 min.

Adicionar el reactivo de Folin ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en H_3PO_4), tomando exactamente 0.3 ml.

Realizar una curva estándar tratando a la proteína de igual manera que a la muestra en un intervalo de 5-100 mg/ml.

Ajustar el espectrofotómetro a 750 nm con un blanco de reactivos leer la solución problema.

B:

Para proteínas precipitadas con TCA ó PCA disolver en álcali 1 N a temperatura ambiente hasta por 30 min.

Añadir 1 ml. de reactivo D (ver el método de Lowry) Folin-Ciocalteu y reposar 10 min.

Mezclar con 0.1 ml. del reactivo E (ver L-F-C), reposar por 30 min. a temperatura ambiente.

Leer en el espectrofotómetro ajustando con un blanco de reactivos. Realizar una curva estándar con la proteína igualmente tratada de 0-100 mgr./ml..

C:

Para precipitados difíciles de disolver, calentar con álcali 1 N por 10 min. tratando igualmente al blanco y la proteína utilizadas para la curva estándar de 0-100 mgr./ml..

DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL.

METODO DE KJELDAHL.

FUNDAMENTO:

Determinación de nitrógeno total, orgánico (nitrógeno amino, amido y aminoácidos) y no proteico (bases, nitrógeno inorgánico) por la oxidación de proteínas y materia orgánica con H_2SO_4 , fijándose en nitrógeno con sulfato de amonio. El cual se cuantifica por su desprendimiento en forma de amoniaco al reaccionar con una base fuerte. (1, 23, 24, 25, 26)

VENTAJAS:

- Método común de comparación y oficial del AOAC.
- Determina todo el contenido de nitrógeno en una muestra alimenticia.
- El nitrógeno no proteico puede analizarse después de precipitar la proteína con TCA.

DESVENTAJAS:

- Puede haber pérdida de nitrógeno.
- El contenido de nitrógeno puede variar con la proteína.
- Presenta factores que afectan a la determinación si no son controlados:

Efecto de la temperatura durante la digestión.- La recuperación cuantitativa de nitrógeno depende de la temperatura, siendo la óptima $500^{\circ}C$.

Influencia del catalizador.- Debe ser eficaz en la descomposición del material, el óxido de mercurio causa menos pérdidas que los reactivos de selenio y cobre. Recientemente se encontró que el titanio puede sustituir al de mercurio, el cual no es tóxico y es de menor costo.

Causas de pérdidas en la digestión.- Cuando una muestra tiene una baja concentración de nitrógeno, grandes cantidades de carbohidratos, grasas y otras sustancias dificultan la digestión. Además si el álcali no es suficiente para liberar todo el amoniaco habrá pérdidas de nitrógeno.

- Presenta factores que afectan a la determinación general: Cantidad de ácido y de muestra, facilidad de descomposición, velocidad de calentamiento, tiempo de digestión y tiempo de aclaramiento.

REACTIVOS:

- H_2SO_4 93-98 % libre de nitrógeno.
- K_2SO_4 ó Na_2SO_4 anhídrido libre de nitrógeno R.A..
- $NaOH$ 450 g disueltos en H_2O desionizada diluidos a 1 l d=1.36.
- Zinc en polvo y zinc granular.
- Solú de metilo 1 g en 200 ml. de alcohol.
- HCl 0.5 N ó 0.1 N.
- $NaOH$ 0.1 N.
- H_2O ó Hg metálico.

HELIUMOLÓGIA:

Pesar 0.7 - 2.2 g de muestra molida malla num. 40 y seca, llevarlos a un matraz Kjeldahl de 500-800 ml.

↓
Adicionar 0.7 g de HgO ó 0.85 g de Hg metálico, 15 g de K₂SO₄ y 25 ml. de H₂SO₄. Si se tiene una cantidad mayor de 2.2 g de muestra adicional, 10 ml. más de H₂SO₄ por cada g de más.

↓
Adicionar 25 ml. de sol. de tiosulfato y mezclar para precipitar el mercurio. 80 g de Na₂S₂O₃·5H₂O en 1 l de agua.

↓
Agregar zinc granular para evitar proyecciones dentro del matraz, adicionar lentamente y con cuidado NaOH d=1.36, estratificando (esto se logra con 15 °C de la sosa 1:1).

↓
Conectar al digestor inmediatamente, agitar el matraz y destilar aproximadamente 200 ml., recibiendo en 500 ml. de HCl 0.1 N valorado, conteniendo 4-7 gotas de fenolftaleína.

↓
Titular el exceso de HCl con una solución valorada o estándar de NaOH 0.1 N.

CALCULOS:

$$\%N = \frac{\text{Cml. del std. HCl} * N \text{ HCl} - \text{ml. del std. NaOH} * N \text{ NaOH} * 1.4007}{\text{g de muestra.}}$$

METODO DE MICROKJELDHAL.

FUNDAMENTO:

Cuantificar el contenido total de Nitrógeno en una muestra la cual contiene un porcentaje pequeño de proteína, por medio de la oxidación de proteínas y materia orgánica con H₂SO₄, fijando el nitrógeno como sulfato de amonio; el que es liberado en medio alcalino, destilado y después cuantificado volumétricamente. (1)

REACTIVOS:

- H₂SO₄ concentrado.
- Óxido de mercurio R.A..
- Sulfato de potasio R.A..
- Indicador A: Prepararlo con 100 mg. de fenolftaleína atorado a 100 ml. con alcohol etílico.
- Indicador B: Prepararlo con 33 mg. de verde de bromocresol y 66 mg. de rojo de metilo atorado a 100 ml. con alcohol etílico.
- NaOH 1:1.
- HCl 0.01 N.

- Acido bórico con indicadores A y B.
Pesar 5 g de ácido bórico y colocarlo en un matraz aforado de 1 l

↓
Adicionar agua desionizada hasta disolver y agregar 35 ml. del indicador A y 10 ml. del indicador B.

↓
Ajustar el color a un tono rojizo con ácido o base según se requiera, aforar a 1 l

METODOLOGIA:

Pesar 50-100 mg. de muestra molida (malla de num. 40) y seca, e introduciría cuidadosamente a un matraz microkjeldahl.

↓
Adicionar 1 g. de sulfato de potasio, 40 mg. de óxido de mercurio y 3 ml. de H₂SO₄ conc., para evitar proyecciones es recomendable poner unas perlas de vidrio.

↓
Llevar a cabo al mismo tiempo un blanco de reactivos.

↓
Colocar los matraces en el digestor y calentar hasta la total destrucción de la materia orgánica y que la solución esté completamente clara.

↓
Entriar y disolver el residuo en la menor cantidad de agua desionizada posible (5-10 ml.).

↓
Pasar el aparato de destilación enjuagando el matraz dos veces con la mínima cantidad de agua y añadir los lavados al aparato de destilación.

↓
Colocar un vaso de precipitados en la salida del condensador del destilador con 50 ml. de ácido bórico.

↓
Añadir 20 ml. de NaOH 1:1 por la copa de adición del microdestilador, cuidadosamente se abre la llave de adición para liberar el amoniaco de la mezcla de reacción.

↓
Continuar la destilación hasta obtener 50 ml. del destilado, por último retirar el vaso del dispositivo y abrir la llave de succión para sacar el residuo de la mezcla de reacción.

↓
Pasar el contenido del vaso a un matraz erlenmeyer y titular con una solución valorada de HCl 0.01 N hasta un punto final rojo-fresa.

CALCULOS:

$XN = \frac{ICml. \text{ de HCl en el problema} - ml. \text{ de HCl en el blanco}}{N \text{ HCl} * 0.14 * 1000 / g \text{ de muestra.}}$

$X \text{ de proteínas} = XN * 6.25.$

HIDROLISIS DE PROTEINAS

Los enlaces peptídicos se hidrolizan con facilidad por calentamiento, ya sea con un ácido o una base. El calentamiento de los polipeptidos con exceso de HCl o N, entre 100-200°C durante 10-24 hrs. en un tubo cerrado constituye el procedimiento más frecuente para llevar a cabo la hidrólisis completa. En estas condiciones se produce la racemización de los aminoácidos, pero no todos los aminoácidos pueden recuperarse después de una hidrólisis ácida; el triptófano generalmente se destruye por este tratamiento lo que provoca también la pérdida de cierta cantidad de serina y treonina.

También los grupos amida de la asparagina y la glutamina sufren hidrólisis completas transformándose en ácidos y iones amonio libres, el tiempo es de mayor cuidado ya que se ha observado que a mayor tiempo de calentamiento mayor destrucción de los aminoácidos.

Los polipeptidos pueden hidrolizarse también por ebullición con disoluciones de NaOH, pero esta hidrólisis provoca la destrucción de la cistina, cisteína, serina y treonina junto con la racemización de todos los aminoácidos. La hidrólisis alcalina se utiliza normalmente, solo para la valoración por separado del triptófano, que es inestable frente a los ácidos, pero estable en álcalis. [25, 34]

HIDROLISIS ACIDA.**FUNDAMENTO:**

Fragmentación de la proteína por medio ácido y calentamiento, logrando la hidrólisis de los enlaces polipeptídicos.

VENTAJAS:

- Usada comúnmente para la determinación de la mayoría de los aminoácidos.

DESVENTAJAS:

- Destruye completamente al triptófano.

REACTIVOS:

- H₂SO₄ 8 N o HCl 6 N.

- Ba(OH)₂ sólido.

- Muestra problema desengrasada. Desengrasar si la muestra contiene un porcentaje mayor al 3 %.

METODOLOGIA:

Pesar 0.5 g de proteína o muestra desengrasada malla num. 40 y mezclar con 5.0 ml. de H_2SO_4 8 N o HCl 6 N.

↓
Tapar perfectamente el tubo o el matraz.

↓
Calentar en autoclave por 5 hrs. a 15 lb./inch.² de presión.

↓
Enfriar a temperatura ambiente. Neutralizar con $BA(OH)_2$ y calentar ligeramente. Utilizar tira pH.

↓
Obtener el precipitado por filtración en caliente o centrifugar por 5 min.

↓
Lavar con dos porciones de agua hirviendo descartando el precipitado aforar a un volumen de 25 ml.

↓
El precipitado se utiliza para análisis posteriores o se almacena a temperatura de refrigeración.

HIDROLISIS ALCALINA

FUNDAMENTO:

Fragmentación de la proteína en medio alcalino por rompimiento de enlaces peptídicos, sin la destrucción del aminoácido triptofano. En la actualidad esta hidrólisis ha quedado clasificada para la cuantificación del triptofano y la tirosina.(1,2,3,4)

VENTAJAS:

- Cuantificar triptofano ya que no se destruye por ser estable en medio alcalino.
- Para obtener buenos resultados en análisis de muestras alimenticias se recomienda utilizar hidróxido de litio $LiOH$.

DESVENTAJAS:

Provoca la destrucción de los aminoácidos cistina, cisteína, serina y treonina.

REACTIVOS:

- $BA(OH)_2 \cdot 8H_2O$.
- H_2SO_4 16 N.
- Preparación de la muestra. Desengrasar si contiene más del 5 % de grasas y tamizar por malla del num. 40.

METODOLOGIA:

Pesar 0.5 g de proteína o muestra alimenticia, mezclar con 10 ml. de agua hirviente. Agregar 0.3 g de $BaCO_3$ o su equivalente en LiOH.

↓

Tapar el tubo o matraz perfectamente y calentar hasta disolución completa.

↓

Calentar en autoclave por 5 hrs. a 15 lb./inch.² de presión.

↓

Enfriar y añadir 2.5 ml. de H_2SO_4 16 N lentamente y con agitación hasta obtener la neutralidad, utilizar tira pH.

↓

Filtrar y lavar con dos porciones de 5 ml. de agua hirviente. Llevar el filtrado a un aforo de 25 ml. y almacenar en refrigeración para análisis posteriores.

DISCUSION PARA AMINOACIDOS Y PROTEINAS

Generalmente, el alimento o muestra a analizar se somete a un pretratamiento si así lo requiere antes de llevarse a cabo el análisis. Por ejemplo, es recomendable que la muestra tenga un bajo contenido de humedad, tamaño pequeño de partícula y dependiendo de la cantidad de grasa, que la muestra sea desgrasada.

Para el análisis de aminoácidos y proteínas, la muestra a presión reducida para evitar el deterioro de aquellos que son termolábiles. El alimento o muestra se someterá a una molienda (malla del 40), si así se requiere y la extracción de la grasa se recomienda hacerla con el solvente adecuado, sin calentamiento y evaporación en la muestra a presión reducida.

Para la cuantificación de la muestra por los métodos espectrofotométricos revisados, es recomendable que la muestra se encuentre en forma homogénea, de tal forma que la solubilidad sea adecuada en soluciones acuosas, salinas o buffers. De encontrarse en forma no homogénea, emulsionada, (en tejidos por ejemplo) el procedimiento sería precipitar a la proteína y disolverla posteriormente para la cuantificación espectrofotométrica.

Si se requiere de una cuantificación no tan específica como son los métodos espectrofotométricos, el alimento se analiza entonces por la técnica de Kjeldhal, ya que cuantifica el contenido de Nitrógeno total en el alimento. Para esto se recomienda tomar en cuenta el origen de la muestra, si es de bajo contenido proteico o rico en proteínas, en el primer caso es recomendable llevar a cabo un MacroKjeldhal en cambio el microkjeldhal es muy útil en la determinación de nitrógeno total en alimentos o muestras con alto contenido de éste, ya que pequeñas cantidades (30-50 mg de muestra) son suficientes para la determinación.

Por lo que respecta a las metodologías revisadas, en general, los métodos turbidimétricos son rápidos y eficientes cuando se requiere de una identificación previa a la cuantificación, o la caracterización del aminoácido o de la proteína. Estos métodos son poco exactos y sensibles al compararse con los métodos espectrofotométricos, de los cuales se hace un breve análisis, tomando en cuenta su sensibilidad, exactitud y especificidad.

PARA AMINOACIDOS:

Se revisaron los métodos de reacción con fenol, con ninhidrina, sal de cobre y microanálisis de sal de cobre.

Al referirse a la mínima sensibilidad en el análisis, el método más recomendable es el de ninhidrina, que proporciona un rango de 6.5-26 microgramos de leucina/ 0.1 ml. de solución. Los métodos de fenol y microanálisis de sal de cobre también proporcionan buena

sensibilidad y tienen la ventaja sobre el de ninhidrina que el rango de detección es mayor. Por lo que respecta al método de sal de cobre, éste es útil para soluciones más concentradas ya que su mínima cantidad de detección es de 2.25 mg. de alanina hasta un máximo de 17.5 mg. por cada 5 ml. de solución problema.

PARA PROTEINAS:

Se revisaron los métodos de O.V. Lowry (Folin-Ciocalteu), y su modificación y por último el método de Dye-Binding (teñido).

Tomando en cuenta primeramente la sensibilidad, se observa que el método de Lowry Folin-Ciocalteu, es el más sensible (0-100 microgramos de proteína/ml. de solución) detectando cantidades muy pequeñas en una muestra alimenticia y en procesos enzimáticos de interés. Además es el método más exacto, verificando esto con el uso de estándares internos.

Las metodologías por Dye-Binding (teñido) proporcionan una buena sensibilidad pero es menor comparándose al de Folin-Ciocalteu, una gran ventaja sobre éste es la estabilidad que proporciona el complejo colorido del Coomassie Brilliant Blue G-250.

Por lo que respecta al método de Biuret, es satisfactorio por ser el más específico y muy útil cuando el objetivo principal es cuantificar determinadas proteínas (proteosas y pentonas, péptidos y gelatina), contando además con buena exactitud siempre y cuando la sensibilidad que se requiera sea en el rango de 1-10 mg. de proteína/ml. de solución.

CARBOHIDRATOS

A los carbohidratos se les puede clasificar considerando su disponibilidad o digestibilidad en: [6,16]

CARBOHIDRATOS DIGERIBLES	}	Azúcares	[Monosacaridos, Alditoles, Pentosas, Disacáridos, Hexosas.
		Dextrinas	
		Almidones	
CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES	}	Hemicelulosa	
		Celulosa	
		Lignina	
		Goma	

CARBOHIDRATOS DIGERIBLES

AZUCARES.

MONOSACARIDOS:

Son Azúcares simples con un grupo aldehído o cetona. Polihidroxilados llamados aldosas o cetonas, ejemplos de éstos son glucosa, manosa, fructuosa, xilosa, etc..

Los monosacaridos tales como hidroxialdehídos e hidroxicetonas de cadena abierta son muy reactivos y las reacciones más comunes e importantes involucran a los grupos carbonilo e hidroxilo. Así pueden sufrir reacciones de: [5,32,36]

- 1.- Enolización en medio Alcalino.
- 1.1.- Reacción con el reactivo de Fehling.
- 1.2.- Reacción con el reactivo de Benedict.
- 1.3.- Reacción con el reactivo de Tollens.
- 2.- Reacción de deshidratación.
- 2.1.- En medio Acido.

El fundamento de estas reacciones son utilizados para llevar a cabo la identificación de ciertos azúcares además de su cuantificación.

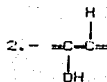
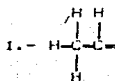
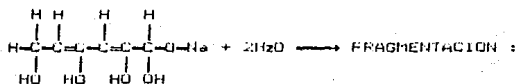
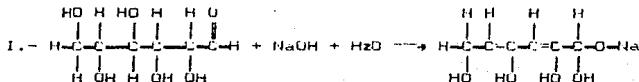
1. ENOLIZACIÓN EN MEDIO ALCALINO.

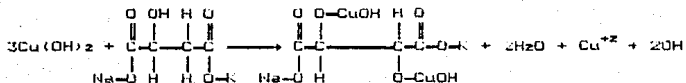
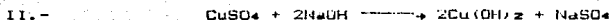
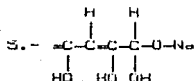
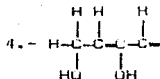
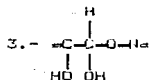
Un azúcar reductor se equilibra en varias formas estructurales diferentes sin perder su identidad en soluciones acuosas, a pH 3-7 y a temperatura ambiente. Sin embargo, si la solución se calienta fuertemente, o si se lleva el pH a valores fuera de ese rango, cabe esperar la enolización de la forma acíclica. Las bases son catalizadores muy efectivos para llevar a cabo la enolización. [5]

1.1. REACCIÓN CON EL REACTIVO DE FEHLING.

Las aldosas reducen a la solución de Fehling, lo que corresponde al comportamiento de un aldehído o un grupo carbonilo simple. El reactivo de Fehling corresponde a una solución alcalina de ión cúprico completado con el ión tartrato, el cual es reducido por la respectiva oxidación de la aldosa. El Alcali enoliza a los azúcares con la posterior degradación a fragmentos altamente reactivos, de tal forma que son rápidamente oxidados y el ión cúprico es reducido a ión cuproso. [35,45]

Reacciones que se llevan a cabo:



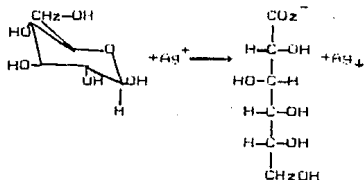


1.2.- REACCION CON EL REACTIVO DE BENEDIC.

Al igual que el reactivo de Fehling, este reactivo enoliza a los azúcares y se reduce en presencia de las aldosas con grupo carbonilo libre, solo difieren en el medio acompañante ya que el Fehling utiliza tartratos como acompañante y el Benedicto citratos. Sin embargo, los citratos causan un decremento en el poder reductor de los azúcares. Las reacciones que se llevan a cabo son similares. [36,43]

1.3. REACCION CON EL REACTIVO DE TOLLENS.

Las aldosas reducen al reactivo de Tollens, lo que corresponde al comportamiento de la enolización de azúcares reductores, este reactivo contiene un ión diamino plata que lleva a cabo la oxidación del aldehído, reduciendo el ión plata a plata metálica en forma de espejo que se deposita en las paredes del tubo de ensayo, siempre y cuando las condiciones de alcalinidad sean las adecuadas. [36,43]

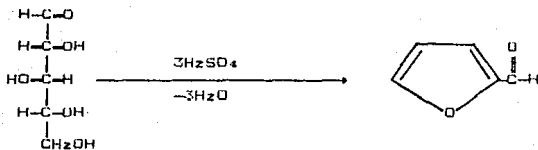


2. REACCIONES DE DESHIDRATACION.

2.1. EN MEDIO ACIDO.

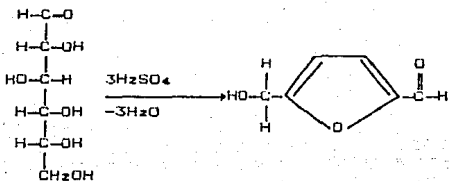
La acción de ácidos fuertes sobre soluciones de monosacáridos y oligosacáridos ocasiona deshidratación de la molécula formando un anillo con dobles enlaces, las exosas reductoras se convierten en parte en hidroximetil furfural (HMF) y las pentosas producen furfuraldehído.

Las cetoexosas reaccionan más rápidamente con ácidos que las aldohexosas, proporcionando un mejor promedio de producto final (S-HMF) que el obtenido por la aldohexosa (alrededor del 54 %)[43], estos productos son formas coloridas que pueden ser cuantificadas en el espectro visible.



ALDOPENTOSA

FURFURALDEHIDO



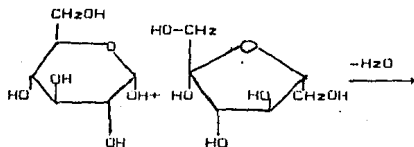
D-GLUCOSA

5-HIDROXIMETILFURFURAL

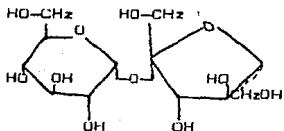
DISACARIDOS:

Son azúcares que resultan de la unión de dos monosacáridos por medio de un enlace glucosídico. Pudiendo ser dos monosacáridos iguales o una aldosa con una cetosa.

Como se observa en la siguiente estructura se puede afirmar de la existencia de disacáridos sin grupo carbonilo libre por lo que no presenta carácter reductor y se cuantifica por la acción de enzimas específicas y la posterior detección de azúcares reductores. Otra alternativa es cuantificar por métodos espectrofotométricos y cromatográficos, es importante hacer mención del disacárido lactosa ya que es una excepción de azúcar no reductor en los disacáridos y éste puede ser evaluado por los métodos de azúcares reductores.



ALFA-D-GLUCOSA BETA-D-FRUCTOSA



SACAROSA

ALMIDON Y DEXTRINA:

El almidón es un polisacárido que constituye una reserva energética al igual que el glucógeno y ciertas gomas. Por otra parte, estos polisacáridos pueden absorber agua, hinchándose inmediatamente, formando así soluciones coloidales. Son susceptibles a ataques químicos y a la hidrólisis de enzimas aminolíticas específicas.

El almidón es una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina, la primera presenta enlaces glucosídicos alfa 1,4 y la segunda además ramificaciones con enlaces alfa 1,6.

El almidón se detecta y cuantifica por medio de la interacción que tiene con el yodo, el cual se asocia con la amilosa produciendo un fuerte color azul debido al complejo formado por la inclusión de una molécula de yodo a la hélice de la amilosa.

Las dextrinas son moléculas de almidón parcialmente hidrolizadas al azar por medios enzimáticos o químicos. Por lo que se pueden detectar en forma semejante al del almidón. [15,36,43]

CARBOHIDRATOS NO DIGERIBLES.

HEMICELULOSA:

Es un polisacárido que constituye el tejido estructural en las plantas; son insolubles en agua pero solubles en álcalis y se encuentran asociados a las pectinas, celulosa y otros polímeros como mahanos, galactanos, ácidos úricos y otros. Su estructura química son unidades de pentosa, como la D-xilopiranosas, unidas por enlaces beta-D-1,4.

CELULOSA:

La parte de los alimentos que no es digerible se conoce como fibra Cruda, constituida básicamente por celulosa, por lo que no se utiliza como alimento humano. Esta constituida por cadenas de unidades de D-glucopiranosas con un grado de polimerización muy alto, lo que se refleja en su alta resistencia física. Es poco soluble en la mayoría de los disolventes con excepción de los ácidos minerales concentrados, es higroscópica pero no se disuelve en agua. Puede ser hidrolizada a moléculas de D-glucosa a través de agentes químicos o enzimáticos al igual que la hemicelulosa.

LIGNINA:

A diferencia de lo que ocurre con la celulosa, no hay un acuerdo general respecto a la estructura exacta de la lignina, debido posiblemente a que carece de la regularidad estructural de la celulosa.

La madera debe su firmeza a la presencia de lignina que se caracteriza por su alto grado de polimerización de enlace cruzado que reúne en una masa rígida las fibras de celulosa.

GOMAS:

Estos polímeros se han utilizado al referirse al grupo de polisacáridos que tienen propiedades gelificantes y espesantes. No contribuyen al valor nutritivo del alimento ya que el humano no las metaboliza, la mayoría de estas gomas son exudados obtenidos de árboles, algas marinas y semillas. [16,16,43]

RECOMENDACION Y BREVE DESCRIPCION PARA LA PREPARACION DE
UNA MUESTRA EN EL ANALISIS DE CARBOHIDRATOS.

I. CON BASE EN SU COMPOSICION.

a) Si la muestra presenta gases disueltos, se deben remover mediante la aplicacion de una presión reducida o del cambio de un recipiente a otro.[43]

b) Si la muestra es colorida, debe llevarse a cabo una clarificación para evitar interferencias en las determinaciones posteriores. Llevándose a cabo por la adición de carbón activado o con soluciones saturadas de acetato de plomo y oxalato de potasio, cloruro de zinc y ferrocianuro de potasio.[43]

c) Para desproteínizar a la muestra se pueden utilizar solventes orgánicos como etanol, acetona o cloroformo en concentración de 70 % (v/v) en la cual la mayoría de las proteínas presentes en los alimentos precipitan, separándose después por filtración o decantación.[43]

II. EXTRACCION DE AZUCARES POR EL METODO DE SUXHLET.

Se utiliza etanol al 80 % (v/v) durante 6-8 hrs. La agitación y el calentamiento deben ser moderados para evitar en lo posible las reacciones de oscurecimiento.[43]

III. EXTRACCION POR METANOL.

Se lleva a cabo con metanol al 85 % (v/v) calentando suavemente a reflujo o extrayendo en repetidas ocasiones con pequeñas cantidades de muestra (5 g). A esta concentración y temperatura el metanol disuelve ciertos lípidos que se separan por enfriamiento, la filtración es usualmente rápida.[43]

IV. RECOMENDACIONES PRELIMINARES.

Para las posteriores determinaciones de azúcares, es necesario eliminar el exceso de alcohol mediante un calentamiento suave a presión reducida para evitar las reacciones de oscurecimiento.

Debe ajustarse el pH a la neutralización si es necesario por la adición de carbonato de sodio para evitar hidrólisis química.[43]

MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR MONOSACÁRIDOS.

Puede llevarse a cabo una clasificación de los métodos analíticos para la cuantificación de monosacáridos tomando en cuenta la reacción que llevan a cabo los azúcares o bien por sus propiedades químicas.

I. Métodos analíticos para azúcares reductores.

I.1 Oxidación por sales metálicas en soluciones alcalinas.

- a) Reacción con el reactivo de Fehling.
- b) Método de Nelson-Somogyi.

II. Métodos espectrofotométricos.

- a) Reacción con trifeniltetrazolio.
- b) Reacción con Fenol-Sulfúrico.
- c) Reacción con Antrona.
- d) Reacción con Resorcinol.
- e) Reacción con Orcinol.
- f) Reacción con Acido Dinitrosalicílico (DNS).
- g) Reacción con Carbazol.

I.1 OXIDACIÓN DE SALES METÁLICAS EN SOLUCIONES ALCALINAS.

a) REACTIVO DE FEHLING.

FUNDAMENTO:

Se basa en el poder reductor que presentan los azúcares con un grupo carbonilo libre, siendo capaces de reducir a sales metálicas en medio alcalino como el cobre (Cu^{2+}) a (Cu^+), oxidándose el carbonilo libre de la osa. [35]

VENTAJAS:

- Método general para la determinación de azúcares reductores.

DESVENTAJAS:

- No es específico para la cuantificación de un azúcar de interés particular.
- Debe determinarse el factor de Fehling para la cuantificación del azúcar.
- El óxido de cobre (I) sufre reoxidación por la acción del oxígeno atmosférico.
- Es menos exacto en comparación de los métodos espectrofotométricos.

REACTIVOS:

- Solución A: Disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua, aforar a 500 ml. y filtrar después de 24 hrs. de reposo.
- Solución B: Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio, 50 g de hidróxido de sodio en agua destilada y aforar a 500 ml., dejar en reposo 2 días y filtrar.
- Solución estándar de azúcar (glucosa, sacarosa, etc.): Pesar 1.9

y de sacarosa 0.5% y disolver en un matraz aforado a 100 ml. con 60 ml. de agua. Calentar a 65°C en un baño de agua, adicionar 5 ml. de HCl concn. Reposar mínimo una hora para lograr la hidrólisis, enfriar, aforar y mezclar perfectamente. Neutralizar 25 ml. de esta solución en un matraz aforado de 500 ml. adicionando NaOH 5 N. aprox., utilizando papel Ph. Enfriar, aforar y mezclar.

Un mililitro de esta solución equivale a 0.001 g de azúcar invertido.

- Indicador: Solución acuosa de azul de metileno al 0.2%.

METODOLOGIA:

TITULACION DEL REACTIVO DE FEHLING:

Mezclar en un matraz 2.5 ml. de sol. A y 2.5 ml. de sol. B (medidos con bureta de preferencia), adicionar 50 ml. de agua destilada.

↓

Calentar a ebullición, adicionar con bureta la sol. estándar de azúcar invertido.

↓

Mantener la ebullición moderada por 2 min., adicionar el indicador.

↓

Continuar con la adición de la sol. de azúcar gota a gota hasta decoloración del indicador, y la aparición del precipitado rojo del óxido cúprico.

Recomendaciones: tanto la solución estándar y la solución problema a analizar, deberán tener concentraciones tales que se requieran de 15-50 ml. de azúcar invertido para reducir todo el cobre del reactivo de Fehling.

Realizar la titulación por triplicado para veracidad del análisis.
Factor = ml. gastados de la solución estándar * concentración en g

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS:

Mezclar en un matraz 2.5 ml. de sol. A y 2.5 de sol. B, adicionar 50 ml. de agua destilada.

↓

Proceder de igual forma que en la titulación del reactivo, con una sol. de 5-10 gr. de muestra en un volumen conocido.

CALCULOS PARA AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS:

$$\frac{\text{Factor}}{\text{ml. gastados}} * \frac{\text{Dilución}}{100} * \frac{100}{\text{g de m}} = \text{g/100 g de azúcares reductores directos}$$

DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES:

Hacer una sol. de 5-10 g de muestra en un vol. conocido, tomar una alícuota y llevarla a un matraz aforado.

↓

Adicionar agua, calentar en un baño de agua a 65 C° y añadir 5-10 ml. de HCl conc.. Mantener la temperatura por espacio de 1 hr.

↓

Enfriar, neutralizar con NaOH y mezclar perfectamente.

↓

Mezclar en un matraz 2.5 ml. de sol. A y 2.5 ml. de sol. B con 50 ml. de agua. Proceder de igual forma que en la titulación del reactivo de Fehling.

CALCULOS PARA AZUCARES REDUCTORES DIRECTOS:

$$\frac{\text{Factor}}{\text{ml. gastados}} \times \text{Dilución} \times \frac{100}{\text{g de m}} = \text{g/100 g de azúcares reductores totales}$$

b). METODO DE NELSON-SOMOGYI.

FUNDAMENTO:

Basado en la oxidación que sufren los azúcares en presencia de sales metálicas en medio alcalino. (43.46)

VENTAJAS:

- Método más exacto que el reactivo de Fehling.

DESVENTAJAS:

- El cobre puede ser reoxidado por el oxígeno atmosférico.

REACTIVOS:

- Sulfato de cobre:

Disolver 28 g de Na_2HPO_4 anhidro en 4 g de tartrato de sodio y potasio en 700 ml. de agua y 100 ml. de NaOH 1 N agitando constantemente.

↓

Añadir 80 ml. de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 10 % (w/v), mezclar con 180 g de Na_2SO_4 anhidro y diluir a 1 l.

↓

Reposar por 24 hrs. y filtrar.

- Arsenomolibdato

Disolver 25 gr. de molibdato de amonio en 450 ml. de agua,
agregar 21 ml. de H_2SO_4 conc. mezclado con cuidado.

↓

Adicionar 3 gr. de $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ disolviendo en 25 ml. de H_2O
calentar a $37^\circ C$ por 24-48 hrs.

↓

Enfriar y almacenar en un frasco ámbar.

- Curva Estíndar de Glucosa

Disolver 0.8 g de glucosa anhidra R.A. en solución de ácido
benzoico al 0.2 %, aforar a 500 ml..

METODOLOGÍA:

Colocar en tubos de ensaye 2 ml. de solución problema de reactivo
cúprico y calentar en un baño de agua hirviente por 10 min..
Evitar la evaporación.

↓

Enfriar por 5 min., añadir 1 ml. de arsenomolibdato y mezclar
perfectamente.

↓

Diluir de 10 - 25 ml. con agua y leer en el espectrofotómetro de
500 - 520 nm. Ajustar con un blanco de reactivos y agua.

11. METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

11.a. TRIFENILTETRAZOLIO.

FUNDAMENTO:

El ión trifeniltetrazolio es incoloro en solución, pero cuando es
reducido por azúcares reductores forma un precipitado insoluble en
color rojo, el cual es soluble en solventes orgánicos como el
isopropanol. [36,43]

VENTAJAS:

- Método más sensible que los utilizados en azúcares reductores.
- Sensibilidad de 10 - 100 $\mu g./ml.$
- El complejo colorido se desarrolla en 3 min..

REACTIVOS:

- 2,3,5 trifeniltetrazolio al 0.3 % (w/v).
- $NaOH$ 2 N..
- Acido ascórbico 2.1 N..

METODOLOGIA:

Mezclar en tubos de ensayo 1 ml. del tetrazolio, 1 ml. de NaOH 2 N. y 2 ml. de sol. problema.

↓

Calentar los tubos al igual que el blanco en un baño de agua hirviente por 3 min.

↓

Acidificar inmediatamente con 1 ml. de ácido acético 2.1 N.
Diluir la mezcla con isopropanol o etanol a 25 ml..

↓

Leer en el espectrofotómetro ajustando con el blanco, igualmente tratado a 485 nm. Curva estándar de monosacáridos 10-100 mg./ml..

II.b. METODO DE FENOL-SULFURICO.

FUNDAMENTO:

Se basa en la oxidación de los azúcares en presencia de sustancias ácidas como la mezcla de ácido sulfúrico-fenol, formando anillos furánicos coloridos cuantificables en el espectrofotómetro. [14,43]

VENTAJAS:

- Es útil para la determinación de hexosas a 490 nm. y pentosas a 480 nm..
- Es un método simple, rápido con resultados reproducibles.
- No requiere de especial atención en el control de las condiciones.
- Puede ser utilizado para microdeterminación de azúcares, los metilderivados, oligosacáridos y polisacáridos.
- La intensidad del color desarrollado es función de la cantidad de fenol añadido, la cual debe ser constante, lo que nos indica menor o mayor concentración de azúcar.
- El color producido es estable por varias horas.

DESVENTAJAS:

- Si se varía la concentración de fenol entre una y otra determinación, afecta la intensidad del color desarrollado.

REACTIVOS:

- Fenol: Disolver 50 g de fenol en agua y aforar a 1 l. Destilar.
- Ácido sulfúrico concentrado R.A..

METODOLOGIA:

Mezclar en tubos de ensayo 1 ml. de sol. problema con 1 ml. de fenol y 5 ml. de H₂SO₄. (10 - 100 µg./ml.).

↓

Agitar cuidadosamente y con uniformidad. Reposar por 10 min..

↓

Agitar nuevamente y calentar en un baño de agua de 25 a 30 °C por 20 min..

↓

Enfriar y leer en el espectrofotómetro a 490 nm. si se trata de hexosas y hexosas metiladas; y a 480 nm. si se trata de pentosas, ácidos úricos y derivados metilados.

11.C. REACCION CON ANTRONA.

FUNDAMENTO:

La formación de productos coloridos por la acción de azúcares y carbazol o antrona en medio ácido fuerte, puede ser utilizada para la determinación de estas hexosas, cuantificándolas como derivados furánicos. [36,43,47]

VENTAJAS:

- Método específico para la determinación de hexosas y azúcares libres.

DESVENTAJAS:

- No es útil para la cuantificación de azúcares provenientes de cromatografía de Partición, pues los solventes orgánicos utilizados interfieren en el desarrollo del complejo colorido.
- No es útil para la cuantificación de azúcares metilados y pentosas.

REACTIVOS:

- Antrona/tiourea.

Preparar H_2SO_4 al 66 % en 1 l cuidadosamente y enfriar

↓

Disolver 10 g de tiourea y 0.5 g de antrona (9,10 dihidro, 9 oxoantraceno) en 1 l del ácido sulfúrico, calentando la mezcla de 80 - 90 °C. Almacenar a 4 °C.

- Curva estándar de la hexosa en un rango de 25 - 200 mg./ml.

METODOLOGIA:

Mezclar en tubos de ensayo 1 ml. de muestra problema con 10 ml. del reactivo antrona.

↓

Agitar cuidadosamente y reposar en un baño de agua a temperatura ambiente.

↓

Calentar los tubos mediante un baño de agua hirviente por 15 min..

↓

Enfriar a temperatura ambiente en un cuarto oscuro por 20 - 30 min..

↓

Ajustar el espectrofotómetro con un blanco de reactivos y agua a 620 nm..

↓

Leer en el espectro las soluciones problemas y cuantificarlas mediante la curva estándar.

11.d METODO DE RESORCINOL.

FUNDAMENTO:

El resorcinol es un derivado de la familia de los fenóles, al igual que el orcinol. En presencia de ácidos fuertes y azúcares causan la oxidación de las cetohechosas específicamente, formando un derivado furánico colorido cuantificable en el espectrofotómetro. [36,43,47]

VENTAJAS:

- El complejo colorido desarrollado es estable por 5 hrs. sin exponerse a luz brillante.

DESVENTAJAS:

- Tiene un rango pequeño de detección del mencionado azúcar.
- Este método no es recomendable para la cuantificación exacta de aldosas.
- Requiere de mayor tiempo en el desarrollo de color en comparación a los métodos que no utilizan derivados fenólicos.

REACTIVOS:

- Resorcinol al 0.5 % (w/v) R.A. en etanol absoluto.
- Sulfato férrico amonio 0.216 g en 1 l de HCl conc..
- Curva estándar de la cetohecosa 5-50 μ g/ml..

METODOLOGIA:

Mezclar en tubos de ensaye 2 ml. de sol. problema con 3 ml. de resorcinol y 3 ml. del reactivo de sulfato férrico.

↓
Calentar por 40 min. en un baño de agua a $80 \pm 5^\circ\text{C}$.

↓
Enfriar en agua-hielo por 1.5 min.

↓
Ajustar el espectrofotómetro a 480 nm. con un blanco de reactivos y agua.

↓
Leer los problemas y cuantificar con la curva estándar.

11e. METODO DE ORCINOL.

FUNDAMENTO:

El orcinol es un derivado fenólico que en medio fuertemente ácido oxida a los azúcares formando un complejo furánico colorido con un máximo de absorción a 670 nm. [36,43,47]

VENTAJAS:

- Método específico para pentosas, por dar mayor promedio en el complejo colorido en comparación con las hexosas.

DESVENTAJAS:

- Presenta un rango pequeño de detección para el mencionado tipo de azúcar.
- No es recomendable para la detección exacta de aldosas.
- Requiere de mayor tiempo en desarrollo del complejo colorido (al igual que los métodos que utilizan derivados fenólicos) que los mencionados anteriormente.

REACTIVOS:

- Orcinol al 10 % (w/v) en etanol, reactivo A.
- Cloruro férrico al 0.1 % (w/v) anhidro en HCl conc., reactivo B.
- Los reactivos A y B son mezclados en proporción 1:10, antes de ser utilizados, reactivo C.
- Curva estándar en pentosa 5-50 µg/ml..

METODOLOGIA:

Mezclar en tubos de ensayo 3 ml. de sol. problema con 3 ml. del reactivo C.

↓

Calentar en un baño de agua hirviente por 45 min..

↓

Enfriar y leer en un espectrofotómetro a 670 nm., ajustando con un blanco de reactivos y agua.

11. REACCION CON ACIDO DINITROSALICILICO (DNS).**FUNDAMENTO:**

Se basa en la reducción del ácido DNS por los azúcares reductores, formando un compuesto nitroaminado colorido cuya intensidad de color se mide espectrofotométricamente a 540 nm. [3,49,50,51]

VENTAJAS:

- Método preciso y rápido en comparación con los que utilizan derivados fenólicos.
- Util en la determinación de azúcares reductores en solución y en hidrolizados que contengan pequeñas cantidades de levaduras.

DESVENTAJAS:

- La presencia de polifenoles ocasiona reducción en el reactivo.

REACTIVOS:

- Disolver 1 g de 3,5 ácido dinitrosalicílico en 20 ml. de NaOH 2 N y 50 ml. de H₂O con 30 g de tartrato doble de sodio y potasio, aforar a 100 ml.
- Curva estándar de glucosa 0.2-2 mg./ml. preservada en tolueno.

METODOLOGIA:

Preparar una solución de 1 mg./ml. y llevar 1 ml. de esta solución o bien tomar 1 ml. de hidrolizado en un tubo de ensaye.

↓

Adicionar 1 ml. de DNS y calentar por 5 min. en un baño de agua hirviente.

↓

Enfriar y diluir con 10 ml. de agua.

↓

Ajustar el espectrofotómetro con un blanco de reactivos y agua igualmente tratado que en la muestra a 540 nm.

↓

Cuantificar los problemas en la curva estándar.

II.g. CARBAZOL.

FUNDAMENTO:

Se basa en la cuantificación de los ácidos úricos, por medio de la reacción con carbazol, formando complejos coloridos entre las pentosas y el reactivo. [36,43,47]

VENTAJAS:

- Util para la cuantificación de ácidos galacturónico, glucorónico y otros.

DESVENTAJAS:

- Presenta interferencia por iones cloruro y muchas sustancias orgánicas que dan un color inespecífico con el ácido. Esto se debe corregir con muestras leídas con y sin carbazol al mismo tiempo.

REACTIVOS:

- Tetraborato de sodio en ácido sulfúrico. Solución de tetraborato de sodio. 10 H₂O 0.25 ml. en H₂SO₄ conc..

- Carbazol al 0.125 % (w/v) en etanol absoluto. Almacenar en refrigeración.

- Solución estándar de ácido úrico. Galactouronolactona es recomendable al 1 % (w/v) en ácido benzoico saturado. Diluir para dar estándares de 4 a 40 µg./ml..

METODOLOGIA:

Tomar 5 ml. de la solución de borato para cada tubo y enfriar a 4 °C.

↓

Adicionar 1 ml. de la solución problema y mezclar perfectamente.

↓

Calentar el tubo problema con los estándares igualmente tratados en un baño de agua hirviente por 10 min.. Enfriar a temperatura ambiente.

↓

Añadir 0,2 ml. de carbazol y agitar en Vortex.

↓

Calibrar el espectrofotómetro con un blanco de reactivos igualmente tratados a 530 nm. y leer los estándares junto con el problema.

METODO ENZIMATICO PARA DETERMINAR MONOSACARIDOS.

INVERTASA.

FUNDAMENTO:

Se basa en la conversión de la sacarosa en sus componentes glucosa y fructosa, detectando la presencia de estos azúcares mediante el método DNS para azúcares reductores. [311A]

VENTAJAS:

- Método de hidrólisis enzimático muy útil en el área alimenticia.
- Es específico para la sacarosa, obteniéndose jarabes glucosados y fructosados.

DESVENTAJAS:

- Por ser un método enzimático requiere de condiciones específicas de temperatura, pH y ausencia de inhibidores enzimáticos como el yoduro, cobre, mercurio, plata, iodo-acetato, ferricianuro, alcohol 20-80 % y ciertos colorantes como rojo congo, fuchina y safranina.

REACTIVOS:

- Buffer de citratos 0.01 M., pH=5.
- Invertasa Maxi Invert 200,000 0.5041 g/30 ml..
- Sacarosa.
- Reactivo DNS: Pesar 1 g de ácido dinitrosalísílico y 30 g de tartrato doble de sodio y potasio en 20 ml. de NaOH 2 N. y 50 ml. de H₂O desionizada, aforar a 100 ml.

METODOLOGÍA:

Mezclar en un matraz 10 ml. de la solución enzimática 1/200 con 10 ml. de buffer y 2 g de sacarosa. Mantener a 40 °C.

↓

Tomar alícuotas de 1 ml. del hidrolizado al 1, 3, 5, 7, y 10 min. o tiempos mayores. Adicionar a cada mililitro, 1 ml. de DNS y calentar por 5 min..

↓

Enfriar y adicionar 10 ml. de agua.

↓

Calibrar el espectrofotómetro con un blanco de: 0.5 ml. de sacarosa 10 % y 0.5 ml. de H₂O desionizada, tratado igualmente como al hidrolizado a una longitud de onda de 540 nm.

↓

Cuantificar con una curva estándar de 0.2 - 2.0 mg. de glucosa-fructosa/ml. de solución.

ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS POR CROMATOGRAFÍA DE ALTA PRESIÓN.

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación, en el que los componentes serán separados y distribuidos entre dos fases, una de ellas estacionaria y la otra fluye a través de la estacionaria. El proceso de cromatografía ocurre como resultado de la adsorción y desorción durante el flujo de los componentes de la muestra en la fase estacionaria y la separación se debe a los diferentes coeficientes de distribución.

En la cromatografía líquida, esta fase móvil fluye a través del soporte de la columna que para la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), éstas son de diámetro muy reducido (aproximadamente 2mm.). Este tipo de columnas son muy eficaces, pero ofrecen una gran resistencia al flujo de la fase móvil, o sea una gran caída de presión. Por otra parte, es necesario emplear sistemas de bombeo de alta presión (hasta 400 atm. aprox. 3880 lb./in²) que hagan fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. [17]

MECANISMOS DE SEPARACION

Hay 3 formas de realizar la separación en HPLC, cada una basada en diferentes mecanismos, mediante un cambio de columna es posible utilizar cada uno de ellos.

1. LIQUIDO-LIQUIDO:

Se basa en la diferente solubilidad que presenta una molécula en la fase móvil y en la estacionaria, las más solubles en la fase estacionaria serán retenidas selectivamente y las menos solubles son transportadas más rápidamente por la fase móvil. Es útil para compuestos medianamente polares. Los compuestos se determinan en función del tiempo de elución o retención.

2. FASE QUÍMICA UNIDA:

En la columna utilizada para este tipo de separación se varía la naturaleza de los grupos funcionales de la fase estacionaria obteniendo diferentes tipos de selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar como amino (-NH₂) y grupo nitrilo (-CN) en el caso de la cromatografía normal. En cambio, la cromatografía en fase inversa, utiliza grupos no polares como el grupo octilo (-C₈H₁₇), fenilo (-C₆H₅), etc. [17]

3. POR EXCLUSIÓN:

Se efectúa por la separación de acuerdo con el tamaño de la partícula. [17]

4. POR ADSORCIÓN:

Se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil o disolvente, por ocupar sitios activos en la superficie de un sólido. Algunos de los sólidos más utilizados son la alumina, gel de sílice, etc. [17]

5. POR INTERCAMBIO IÓNICO:

Se basa en la competencia entre la fase móvil y la muestra iónica (disuelta) por los sitios o grupos activos de una resina intercambiadora de iones. Se aplica para compuestos con un peso molecular muy diverso. [17]

DETECTORES

Para HPLC pueden utilizarse tres diferentes detectores como el de U.V., fluorescencia y para el propósito de carbohidratos se utiliza el detector de índice de refracción (IR).

DETECTOR IR:

Mide la diferencia entre los índices de refracción del sistema eluyente puro (referencia), y el de la muestra que sale por la de esta manera proporciona un registro continuo lo que permite obtener un cromatograma similar a los obtenidos en Cromatografía de Gases, detectándose así cualquier cambio en la composición. [17,58]

IDENTIFICACION

Se lleva a cabo mediante la comparación entre el tiempo de retención del problema con los estándares previamente conocidos. Al coincidir éstos, se conoce de que compuesto se trata.

CUANTIFICACION

Se obtiene por la elaboración de curvas que involucren la relación entre la concentración del estándar y la altura o % de área correspondiente. En la curva estándar se interpolan las alturas o % de área de los picos problema, lográndose cuantificar el componente en la muestra.

VENTAJAS:

- Método reproducible y estable.
- Versátil.
- Alta resolución.
- Buena sensibilidad.
- Automatización.
- Amplio espectro de aplicación.
- Separación en muy poco tiempo (min.).

DESVENTAJAS:

- Instrumento costoso.
- Personal capacitado.

ANÁLISIS DE MONOSACARIDOS Y DISACARIDOS POR HPLC

REACTIVOS:

- Para fase normal, preparar una solución eluyente de acetonitrilo grado HPLC con agua desionizada (filtrada por filtro Millipore y

desgasificada) en una relación 75:25 según el volumen que se requiera.

- Curva estándar de: glucosa, fructuosa, maltosa y sacarosa anhidras R.A. de 0-5 % en la solución eluyente.

- Condiciones del cromatógrafo en fase normal:

Columna de Lichrosorb (Aminada -NH₂).

Detector de índice de refracción (I.R.).

Flujo 0.6 ml./min..

Velocidad de la carta 5 mm./min..

Atenuación y rango optimizados, referencia acetonitrilo: Agua (75:25).

Inyección de la muestra según la capacidad 10-20 microlitros.

REACTIVOS:

- Para fase inversa, la solución eluyente es agua desionizada (filtrada por Millipore y desgasificada).

- Curva estándar de: glucosa, fructuosa, maltosa y sacarosa anhidras R.A. de 0-5 % en el eluyente.

- Condiciones del cromatógrafo en fase inversa:

Columna de C18.

Detector de índice de refracción (I.R.).

Flujo 1 ml./min..

Velocidad de la carta 5 mm./min..

Atenuación y rango optimizados, referencia agua (el eluyente).

Inyección de la muestra según la capacidad 10-20 microlitros.

PULISACARIDOS ASIMILABLES

ALMIDON

El almidón puede ser fraccionado en sus dos componentes principales con diferentes propiedades físicas. Se han designado a estas diferentes fracciones como amilosa y amilopectina.

FUNDAMENTO:

Se basa en las diferentes solubilidades de la amilosa y amilopectina, siendo la primera soluble en agua y formando soluciones viscosas y la segunda es insoluble dando soluciones muy viscosas y opalescentes. Los granulos de almidón disueltos en agua a 60-80 °C difunden la amilosa que puede ser separada por centrifugación. [A]

VENTAJAS:

- Método gravimétrico útil en la determinación del tipo de almidón.

DESVENTAJAS:

- Metodología laboriosa y prolongada.
- Poco exacta.

REACTIVOS:

- Etanol al 95 %.
- Metanol al 20 %.

METODOLOGIA:

Se hace una mezcla del almidón de 5 g y se disuelve en 5 ml. de agua fría

↓

La mezcla se añade lentamente y con constante agitación a 30 ml. de agua a 80 °C. La temperatura desciende entonces a 70 °C aprox. y se mantiene por 5 min.

↓

La pasta se lleva a 240 ml. de agua desionizada a 60 °C y se agita muy lentamente a esta temperatura durante 4 hrs. manteniendo el volumen constante.

↓

Enfriar y centrifugar a 10 000 rpm por 10 min. en tubos de centrifuga previamente tarados. Decantar con mucho cuidado y lentamente. El depósito gelatinoso corresponde a amilopectina cruda, y el sobrenadante a la amilosa.

↓

Tratar el depósito, gelatinoso con etanol al 95 % (5 ml.), centrifugar en las mismas condiciones.

↓

Decantar cuidadosamente y secar en estufa a 50 °C y presión reducida. Enfriar y pesar. El peso obtenido es de amilopectina en el almidón utilizado.

↓

La solución decantada de amilosa se trata con metanol hasta obtener una solución alcohólica al 20 %. Reposar por 12 hrs. en refrigeración.

↓

Centrifugar en tubos previamente tarados a las mismas condiciones.

↓

Decantar cuidadosamente y tratar el precipitado con 5 ml. de etanol al 95 %.

↓

Centrifugar, decantar y secar en estufa a las mismas condiciones que para la amilopectina.

↓

El peso obtenido es de amilosa presente en el almidón de la muestra.

Calculos: $\% \text{ de amilosa} = \frac{\text{peso de la amilosa} * 100}{\text{peso del almidón (m)}}$

$$\% \text{ de amilosa} = \frac{\text{peso de la amilosa} * 100}{\text{peso del almidón (m)}}$$

$$\% \text{ de amilopectina} = \frac{\text{peso de amilopectina} * 100}{\text{peso del almidón (m)}}$$

IDENTIFICACION DEL ALMIDON POR CUANTIFICACION DE AMILOSA Y AMILOPECTINA

La composición de los almidones con respecto a las proporciones que contienen de amilosa y amilopectina los hacen característicos y les imparten propiedades fisicoquímicas diferentes. Por lo que un almidón se puede caracterizar mediante la composición de amilosa y amilopectina mediante la cuantificación espectrofotométrica del color formado entre los azúcares y una solución de yodo-yoduro. [A]

REACTIVOS:

- NaOH al 10 %
- HCl 6 N (aprox. 5 ml.)
- Solución de yodo-yoduro I₂ al 0.2 % y KI al 2 %.

METODOLOGIA:

Pesar 0.1 g de almidón (seco) y llevarlos a un matraz aforado de 100 ml. Adicionar 1 ml. de agua caliente, estando previamente la muestra disuelta en 2 ml. de NaOH al 10 % calentando en un baño de agua caliente, hasta obtener una solución clara.

↓

Tomar con una pipeta volumétrica 5 ml. de solución alcalina (5 mg aprox.) y llevarlos a un matraz aforado de 500 ml.

↓

Agitar fuertemente y añadir 5 ml. de solución de yodo. Aforar inmediatamente.

↓

Ajustar el espectrofotómetro con un blanco de reactivos (agua desionizada y solución de iodo), a una long. de onda de 640-700 nm y leer los problemas del aforo de 500 ml.

Para la identificación del tipo de almidón se recomienda consultar la curva de composición de amilosa y amilopectina vs. absorbancia.

CARBOHIDRATOS NO ASIMILABLES

Los carbohidratos no asimilables para el hombre son los que conforman pared celular de los vegetales verdes, y pocos animales son capaces de metabolizarlos, las bacterias y los hongos.

Más aun los grandes componentes estructurales, la celulosa, hemicelulosa y lignina que en conjunto se determinan como fibra cruda, sin embargo en ocasiones se hace necesario separar y cuantificar los carbohidratos no asimilables, para lo cual se requiere de un tratamiento especial de la muestra llevando a cabo la degradación de los componentes lignoceluloseicos.

En el análisis de alimentos es poco usual llevar a cabo la determinación de los componentes de la fibra cruda, siendo suficiente con la evaluación de fibra cruda y recientemente de fibra detergente ácida y fibra detergente neutra, en la cual se cuantifican todos los constituyentes de la pared celular. (2,34,43)

MÉTODOS ENZIMÁTICOS PARA LA EVALUACIÓN DE CARBOHIDRATOS NO ASIMILABLES

1. FIBRA CRUDA.

FUNDAMENTO:

Se basa en la cuantificación de materia insoluble después del tratamiento ácido y alcalino en condiciones específicas para los componentes de la pared celular vegetal. (2,34,43)

VENTAJAS:

- Es un método tradicional, en el que la cuantificación mayoritaria es para celulosa y carbohidratos no asimilables.

DESVENTAJAS:

- Control adecuado de temperatura y tiempo.
- La filtración debe efectuarse a temperaturas cercanas a la ebullición del agua para arrastrar el material soluble y grasas en pequeñas cantidades.
- Requiere de un aparato especial (digestor).
- La muestra a analizar debe contener menos de 1 % de grasa.

Preparación de la muestra:

- Moler la muestra y tamizar por malla de num. 40.
- Desengrasar si el contenido de grasa es mayor del 1 %.

REACTIVOS:

- H_2SO_4 0.225 N. Diluir 1.25 g en 100 ml.
- NaOH 0.313 N. Disolver 1.25 g de NaOH en 100 ml. libre de carbonatos.
- Asbesto preparado:

Calcinar el asbesto en una cápsula de porcelana en la mufla a 600 °C por 16 hrs..

↓

Hervir con H_2SO_4 1.25 % durante 30 min., filtrar y lavar con agua hirviendo hasta un pH cercano a 8.

Hervir con NaOH 1.25 %, filtrar y lavar con agua hirviendo y H_2SO_4 1.25 %.

Secar y calcinar a 600 °C.

METODOLOGIA:

Transferir aprox. 1 g de muestra desengrasada a un vaso digestor de 600 ml. con 1 g de asbesto preparado.

Añadir 200 ml. de H_2SO_4 1.25 % hirviendo y calentar en el digestor por 30 min. a ebullición.

Filtrar el contenido del vaso y lavar con agua hirviendo de 50-70 ml., continuar los lavados hasta remover todo el ácido.

Regresar el filtrado al vaso y adicionar 200 ml. de NaOH 1.25 % hirviendo y calentar a ebullición por 10 min.

Filtrar y lavar con 250 ml. de H_2SO_4 1.25 % hirviendo. Lavar con 50 ml. de agua hirviendo y 25 ml. de alcohol.

Secar por succión y transferir el residuo a un gooch con asbesto y secar por 2 hrs. en estufa a 130 ± 2 °C.

Enfriar en desecador y pesar. Calcinar el gooch en la mufla a 600 °C por 30 min. . Enfriar en desecador y pesar.

CALCULOS:

$$\% \text{ de Fibra Cruda} = \frac{\text{pérdida de peso después de secado} - \text{pérdida de peso en calcinación}}{\text{peso muestra}}$$

2. FIBRA DETERGENTE NEUTRA.

FUNDAMENTO:

Se basa en la disolución en detergentes de sales cuaternarias de amonio en diferentes buffers y tiempos establecidos, proporcionando una buena medida del material componente de la pared celular. (2,34,43)

VENTAJAS:

- No requiere de lavados con agua hirviendo para remover el ácido como en el método de fibra cruda.
- Solo se lleva a cabo una digestión.

DESVENTAJAS:

- Requiere de más reactivos en comparación del método de fibra cruda.

REACTIVOS:

- Preparación de la muestra: Igual que en fibra cruda.
- Disolver en un matraz aforado de 1 l, 18.61 g de EDTA, 8.81 g de borato de sodio decahidratado y calentar en un baño de agua hasta disolución completa.

↓

Añadir 30 g de Lauril sulfato de sodio y 10 ml. de 2-etoxietanol.

↓

Disolver separadamente el fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) 4.58 g con un poco de agua destilada y disolverlo en la sol. anterior.

↓

Aforar a 1 l ajustando el pH de 6.9 - 7.1.

- Decahidronaftaleno R.A..
- Acetona sin residuos coloridos después de su evaporación.
- Sulfito de sodio anhidro R.A..
- Asbesto lavado con agua y ácido, secar y llevar a la mufla a 800 °C.

METODOLOGIA:

Pesar de 0.5 - 1.0 g de muestra y llevarla al vaso digestor, adicionando 100 ml. de SLS a temperatura ambiente, 2 ml. de decahidronaftaleno y 0.5 g de sulfito de sodio.

↓

Calentar a ebullición 5 - 10 min. Mantener la temperatura por 60 min. en sistema de reflujo.

↓

Filtrar a través de un gooch ayudándose con un poco de succión.

↓

Lavar el contenido del gooch con acetona y secar a 100 °C por 8 hrs. Enfriar y pesar.

↓

La diferencia entre el peso del gooch y el gooch con fibra cruda, nos indica el porcentaje de fibra cruda.

FIBRA DEITERGENTE ACIDA.

FUNDAMENTO:

Los detergentes de sales cuaternarias de amonio disuelven a los carbohidratos en diferentes buffers y a tiempos establecidos por lo que se utilizan para cuantificar a la fibra cruda presente en los alimentos. [34,43]

VENTAJAS:

- Se determina más fibra en comparación al método de fibra cruda.
- Es más rápido que el método de fibra cruda.
- Las condiciones son fáciles de controlar.

DESVENTAJAS:

- Tiende a arrastrar materia inorgánica como sílica que cuantifica como fibra, por lo que se recomienda realizar un blanco.

REACTIVOS:

- Preparación de la muestra: igual que en fibra cruda.
- Disolver 20 g de cetil trimetil bromuro de sodio en 1 l de H_2SO_4 1 N.

METODOLOGIA:

Pesar 1 g de muestra y llevarla al vaso digestor, añadir 100 ml. del reactivo ácido detergente a temperatura ambiente y 2 ml. de decahidronaftaleno

↓

Calentar a ebullición 5 - 10 min. Mantener a temperatura de ebullición por 50 min. en reflujo.

↓

Filtrar en un gooch previamente tarado con poca succión, lavar el residuo con agua hirviendo.

↓

Finalmente lavar con acetona hasta no obtener color. Secar el residuo por 8 hrs. a 100 °C.

↓

Enfriar en desecador y pesar. La diferencia de peso * 100 nos proporciona el % de fibra cruda.

Una vez que se obtiene la fibra cruda de cualquier modo obtenida, se procede a la determinación de sus componentes: Hemicelulosa, celulosa y lignina.

HEMICELULOSA

FUNDAMENTO:

La hemicelulosa es fácilmente hidrolizada en condiciones ácidas y calentamiento, por lo que se puede cuantificar por su composición de pentosas libres, además de las hexosas que puedan presentarse. [2, 34, 43]

VENTAJAS:

- Es útil la determinación de hemicelulosa tomando en cuenta sus propiedades de ser hidrolizada en condiciones específicas sin la degradación de celulosa y lignina que requieren condiciones ácidas también pero con otros parámetros de tiempo y temperatura de calentamiento.

DESVENTAJAS:

- Deben manejarse exactamente los parámetros de tiempo, temperatura y concentración del ácido, pues de lo contrario se

puede dañar a los componentes restantes y cuantificar de más en la hemicelulosa.

METODOLOGIA:

Transferir la fibra cruda a un tubo de ensaye y añadir 3 ml. de H_2SO_4 1 N. y calentar en baño de agua a ebullición durante 30 min..

↓

Enfriar a chorro de agua y centrifugar por 10 min.. En la solución se encuentra un hidrolizado de la hemicelulosa.

↓

Cuantificar la hemicelulosa por medición de pentosas y hexosas según el método a elegir; si es necesario se diluye el hidrolizado.

Para cuantificar realmente la hemicelulosa, el precipitado es lavado con 10 ml. de agua destilada agitando, por 5 min.:

Centrifugar por 10 min. y el sobrenadante se somete a cuantificación de pentosas y hexosas.

CELULOSA [2,34,43]

METODOLOGIA:

Al precipitado obtenido en el paso anterior se le agregan con agitación 10 ml. de H_2SO_4 al 67 % (v/v). Reposar 1 hr. a temperatura ambiente, agitar cada 15 min..

↓

Centrifugar a 5000 rpm durante 20 min.

↓

En el sobrenadante se determinan pentosas y hexosas. Considerando en este caso a las hexosas como celulosa únicamente.

Las pentosas determinadas en la fracción de celulosa se suman a la fracción de hemicelulosa.

LIGNINA

FUNDAMENTO:

El material lignoceluloso tratado con ácido fuerte permite la hidrólisis de los carbohidratos y por lo tanto su solubilización, dejando un residuo insoluble que por definición es la lignina, la cual puede ser determinada gravimétricamente. [2,34,43]

METODOLOGIA:

Pesar 2 g de material lignoceluloseico seco y llevarlo a un matraza de 1 l. Adicionar 20 ml. de H₂SO₄ al 72 %, agitar de tal forma que la muestra quede cubierta de ácido.

↓

Reposar una hr. a 28 -30 °C, añadir 560 ml. de agua desionizada.

↓

Tapar el matraz y someterlo a 120 °C y una atm. durante 1 hr..

↓

Filtrar en caliente sobre papel W num. 1 previamente tarado. Desechar la solución y lavar el residuo con agua desionizada hasta un pH 6.

↓

Secar por 8 hrs. en estufa a 70 °C, el peso obtenido es el % de lignina aparente.

↓

Determinar la lignina real por medio de la cuantificación de proteínas y cenizas insolubles que quedan retenidas en la lignina aparente.

↓

Tomar 0.04-0.06 g de lignina aparente y determinar proteína por el método de Keldhal.

↓

Tomar un gramo de lignina aparente para la determinación de cenizas.

CALCULOS:

peso lignina * 100

$$\% \text{ Lignina Aparente} = \frac{\text{peso lignina} * 100}{\text{peso muestra}}$$

$$\% \text{ Lignina Real} = \text{lignina aparente} - (\% \text{ de cenizas} + \% \text{ prote#nas})$$

DISCUSION PARA CARBOHIDRATOS.

Los métodos volumétricos para azúcares reductores por oxidación de sales metálicas en solución alcalina, han sido ampliamente utilizados por su rapidez y facilidad para llevarse a cabo en el laboratorio. Estos métodos, Fehling y Nelson-Somogyi son reemplazados por los métodos espectrofotométricos ya que éstos son más sensibles, exactos y específicos.

Analizando los métodos para Azúcares Reductores tenemos que el método que presenta mayor sensibilidad es el trifeniltetrazolio (10 - 100 microgramos de azúcar/ ml. de solución), además éste cuantifica hexosas y pentosas, resultando útil para evaluar azúcares en soluciones diluidas puras.

Un método alterno es el ácido dinitrosalicílico (DNS) útil para cuantificar azúcares reductores en solución , mieles, jarabes, hidrolizados enzimáticos y químicos, etc. siendo ésta una ventaja del DNS sobre el trifeniltetrazolio ya que éste presenta interferencias por las sustancias disueltas en los hidrolizados. Por otra parte, el DNS es más rápido en comparación a los métodos que cuantifican azúcares reductores como derivados furánicos (antrona, orcinol y resorcinol).

Por lo que respecta al método de fenol-sulfúrico, éste presenta gran exactitud para cuantificar azúcares totales como sacarosa, maltodextrinas, etc.; tanto en productos naturales como en los procesados, éste evaluado a través de la utilización de un estándar interno. Además es útil para derivados metilados de hexosas y pentosas al igual que cuantifica ácidos úricos, cuantificándose pectinas de frutas y de productos que la utilizan para impartir textura como en el caso de mermeladas y jaleas por ejemplo.

Para la utilización de métodos específicos de aldohexosas (glucosa, galactosa, etc.), cetohehexosas (fructosa), pentosas (ribosa) y ácidos úricos (ácido galatutónico); se llevan a cabo los métodos de antrona, resorcinol, orcinol y carbazol respectivamente. Con excepción al método de antrona con sensibilidad de 25 - 200 microgramos de azúcar/ ml. de solución , los métodos restantes no tienen buena sensibilidad (5 - 50 microgramos de azúcar/ ml. de solución), pero como se menciona, son altamente específicos y muy útiles cuando se tienen reacciones químicas o enzimáticas en las cuales el producto intermedio o final es uno de estos azúcares que se está monitoreando por medio de estas reacciones específicas.

Por lo que respecta a los métodos enzimáticos, éstas son altamente específicas y exactas, y prácticamente no hay interferencias durante la hidrólisis, pero requiere de condiciones controladas de la enzima específica y de un método de detección para la cuantificación con los métodos anteriormente mencionados. Las

aplicaciones son muy específicas como en la hidrólisis enzimática en soluciones de almidón de maíz para obtener jerebes con alto contenido de azúcares simples por ejemplo.

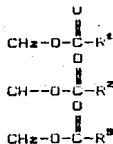
Si se cuenta con equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), lo más recomendable y adecuado es realizar la determinación de carbohidratos por medio de esta técnica, ya que proporciona ventajas sobre el espectrofotométrico por ser más sensible, específico, exacto y rápido. Adicionalmente, si los parámetros de la determinación se tienen establecidos, resulta más sencillo cuantificar por HPLC en comparación al método enzimático.

LIPIDOS

Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en agua, que pueden extraerse de las células y los tejidos mediante disolventes no polares, por ejemplo: éter de petróleo, hexano, mezcla de cloroformo-metanol, etc.. Se han clasificado a los lípidos en diferentes formas, siendo la más común la que se basa en las estructuras de sus esqueletos. [6, 28]

TIPOS DE LIPIDOS	{	Complejos (saponificables)	ESQUELETO Acilglicéridos → Glicerina Fosfoglicéridos → 3-fosfato de glicerilo Esfingolípidos → Esfingosina Ceras → Alcoholes no por peso molecular elevado.
		Simples (insaponificables)	EJEMPLO Terpenos → Vitamina A Esteroides → Colesterol Prostaglandinas → Ciertos reguladores metabólicos

Los lípidos complejos se caracterizan por contener ácidos grasos que desde un punto de vista químico, son Esteres carboxílicos que derivan de un solo alcohol, el glicerol, y se conocen como triacilglicéridos. [11, 32]



Reciben también el nombre de lípidos saponificables porque producen jabones (sales de los ácidos grasos) por hidrólisis alcalina. El grupo de los lípidos sencillos, no contiene ácidos grasos y por lo tanto son insaponificables.

A los lípidos se les puede caracterizar e identificar por sus propiedades físicas, químicas y reacciones específicas.

PROPIEDADES FISICAS.

1. PUNTO DE FUSION:

Los puntos de fusión de las especies puras son precisos, pero la composición variable de los triglicéridos de las grasas naturales crea una amplia zona de intervalo de fusión; por lo que a la temperatura que la última fracción sólida significa normalmente la temperatura de fusión del componente que tenga mayor valor. Esta determinación es útil en grasas animales y transformadas, pero no en las de origen vegetal, puesto que son líquidos la mayoría de ellos a temperatura ambiente. Además el punto de fusión da una idea sobre la composición de la grasa, mayor punto de fusión correspondería a una grasa saturada, y menor punto de fusión a una insaturada. [6.16]

2. DENSIDAD:

Propiedad que establece el valor de la relación sólido-líquido (Índice de grasa sólida o índice de contenido sólido). El conocimiento de la densidad es importante para manejar las grasas y transportarlas a través de maquinaria adecuada a temperatura ambiente. [6.16]

3. INDICE DE REFRACCION:

Esta propiedad de las grasas se encuentra relacionada con el aumento de la longitud de la cadena y con la insaturación en forma ascendente y por ello se correlaciona con el índice de yodo. [6.16]

PROPIEDADES QUIMICAS Y REACCIONES

1. INDICE DE SAPONIFICACION:

Se define como el peso en miligramos de hidróxido de potasio que se requiere para saponificar completamente un gramo de grasa. Los índices de saponificación están relacionados con el peso molecular promedio de los ácidos grasos de la grasa. [5.6.16]

2. RESIDUO ISAPONIFICABLE:

Incluye sustancias de las grasas naturales que no pueden ser saponificables con Alcalis, pero que son solubles en los solventes utilizados comúnmente para extracción, por lo que pueden ser separados de las mezclas de los lípidos después de efectuada la saponificación. [5.6.16]

3. INDICE DE IODO:

Esta definido como el peso de iodo absorbido por 100 partes de una muestra. Puede estar correlacionado con el grado de insaturación de una grasa, ya que se observa que niveles bajos de índice de iodo corresponden a ácidos grasos poliinsaturados. [5.6.16]

4. RANCIDEZ HIDROLITICA O LIPOLISIS:

Esta rancidez se debe a la acción de las lipasas sobre los enlaces éster de los triglicéridos de las grasas y aceites. Cabe señalar, que es frecuente la lipólisis en los alimentos que contienen ácidos grasos volátiles de cadena corta (C₄-C₁₂). Por fortuna la rancidez no es muy grave ya que la mayoría de las grasas y los aceites en los alimentos son ácidos grasos de cadena larga. [5.6.16]

5. RANCIDEZ OXIDATIVA:

Las reacciones de oxidación de los lípidos tienen diversos orígenes:

- a).- Acción directa del oxígeno sobre las dobles ligaduras de los ácidos grasos insaturados.
- b).- Acción enzimática de la lipoxigenasa y de la alcohol-deshidrogenasa.

5.1 AUTOOXIDACION:

Este tipo de oxidación se presenta comúnmente en lípidos con alto contenido de ácidos grasos insaturados presentes en los alimentos, contribuyendo a esta oxidación la vitamina liposoluble A.

Se ha comprobado que la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados es del tipo de reacción en cadena, que consiste en tres etapas: iniciación, Propagación y terminación.

La iniciación es catalizada generalmente por la presencia de metales, oxígeno, luz y temperatura. La unión directa del oxígeno al ácido insaturado produce hidroperóxidos (los cuales han servido para establecer el índice de peróxidos, como una medida de la oxidación y estabilidad de las grasas). Los hidroperóxidos al perder un hidrógeno forman radicales libres, los que reaccionan con nuevas moléculas de ácidos grasos, formando más radicales con lo que se propaga la reacción.

En la última etapa se condensan diferentes radicales formando compuestos muy estables hasta que ya no existan radicales libres activos. Los hidroperóxidos tienen doble función ya que proveen de radicales libres para que se lleve a cabo la reacción y producen diferentes compuestos con los aldehídicos y cetónicos responsables de olores y sabores desagradables. Además existe evidencia de que los peróxidos interactúan con las proteínas con lo que producen el valor nutritivo de los alimentos.

Por otro lado, el malonaldehído es el principal producto de la ruptura de los hidroperóxidos provenientes de la oxidación de los ácidos grasos específicos como el linoleico y el araquidónico o y su cuantificación es la base para algunos métodos analíticos como el índice de grado de oxidación por medio del ácido tiobarbitúrico (TBA). (5,6,16)

5.2. OXIGENACION POR LIPOXIGENASAS:

Estas enzimas efectúan una oxigenación en lugar de una oxidación y sus sustratos específicos son ácidos grasos saturados con una unidad cis-cis 1,4 pentadieno. La enzima no actúa sobre los ácidos grasos con sistemas conjugados de insaturación, ni los ácidos con dobles ligaduras de posición trans.

La lipoxigenasa actúa adicionando dos átomos de oxígeno a cada molécula de ácido graso, formando hidroperóxidos cis-trans ópticamente activos.

Las lipoxigenasas son sensibles al calor y cambios de pH, por lo

que resulta fácil inactivarlas manipulando estos dos primeros parámetros. [5, 6, 13]

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA ANALISIS DE LIPIDOS.

Para obtener un mayor contacto entre la muestra y el solvente, se debe llevar a cabo una molienda y tamización por malla del núm. 40.

El solvente más utilizado es el éter etílico, aunque se debe mencionar que es de suma importancia considerar la naturaleza química del solvente pues de esto dependerá el grado de extracción y la naturaleza de los lípidos. [11]

Para obtener la grasa solubilizada en el éter o cualquier mezcla de solventes se debe separar de la muestra por medio de filtración o decantación. Una vez obtenido en la mezcla orgánica, se procede a evaporar el solvente que en la mayoría de las veces se logra con una simple evaporación con calentamiento suave y disminuyendo el punto de ebullición por presión reducida como es el caso del rotovapor.

EXTRACCION LIPIDOS POR DIFERENTES SOLVENTES.

Casi todos los métodos para determinar la extracción de lípidos estan basados en el hecho de que éstas sustancias o derivados de de ácidos grasos por saponificación, son extensamente separados de otros constituyentes por medio de solventes polares orgánicos, los cuales ejercen una solubilidad preferencial para los compuestos grasos.

El éter de petróleo y el éter etílico son los mejores solventes para este propósito y son utilizados extensivamente en comparación a otros que a continuación mencionaremos. El cloroformo, tetracloruro de carbono y otros solventes incrementan en diferentes grados las sustancias no deseables tales como resinas, alcaloides, materias coloridas y otras sustancias orgánicas. [4, 39]

SOLVENTES ORGANICOS.

ETER DE PETROLEO:

Es una mezcla de hidrocarburos livianos provenientes de la destilación del petróleo, que disuelve fácilmente muchas grasas, aceites, ácidos grasos principalmente. También disuelve otras sustancias como fosfolípidos, ceras y esteroides.

El éter de petróleo disuelve en menor cantidad sustancias no lipídicas en comparación al cloroformo, disulfuro de carbono, acetona, etc..

ETER ETILICO:

Prácticamente todos los lípidos son regularmente solubles en el éter, con excepción de los estingolípidos y los cerebrósidos.

Las grasas son fácilmente solubles. La lecitina es considerada generalmente soluble, pero su extracción en las leguminosas resulta difícil.

El éter etílico es muy utilizado en la extracción de grasas y aceites ya que se evapora fácilmente en un sistema de rotovapor y además se remueve en tal forma que no interfiere en las determinaciones que se realizan en los aceites. Tiene la desventaja de que disuelve ciertos hidrocarburos, aceites esenciales en comparación al éter de petróleo y materia colorida (clorofila, carotenos, flavones libres y flavonoides), muchos alcaloides, ácidos orgánicos, resinas y compuestos relacionados.

TETRACLORURO DE CARBONO:

Tiene la misma capacidad de el éter etílico de disolver compuestos grasos, pero remueve más impurezas que éste, pero en poco tiempo disuelve las sustancias grasas en comparación a otros solventes. No es inflamable.

CLOROFORMO:

Es muy buen disolvente de muchos lípidos, disuelve probablemente más sustancias no lipídicas que el éter etílico.

DISULFURO DE CARBONO:

Es el solvente de mayor poder de resolución para un rango de sustancias, disolviendo fácilmente aceite, grasa, cera, resina y muchas sustancias orgánicas. Pero no es útil en la determinación de lípidos en alimentos ya que es fuente de error todas las sustancias que extrae, además su aroma es molesto y se descompone fácilmente en la extracción de ciertos lípidos.

BENCENO:

Es un buen disolvente de grasas, aceites, ceras, esteroides y fosfolípidos. Los cerebrósidos son solubles en caliente. Remueve hidrocarburos, ciertas materias coloridas, resinas y compuestos orgánicos. Las trazas de benceno son difícil de quitar del residuo lipídico, por lo que su uso no es recomendable.

ACETONA:

Tiene un amplio rango de poder disolvente para muchas clases de compuestos orgánicos. Las grasas, aceites y ceras son lentamente solubles en frío, pero rápidamente solubles en caliente. Los cerebrósidos y ácidos grasos son solubles, en cambio las lecitinas y cefalinas son prácticamente insolubles. Se recomienda utilizarlo después de una extracción hecha con éter o éter de petróleo en lugar de alcohol.

ALCOHOL:

Es un magnifico solvente de lípidos, carbohidratos, alcaloides, glucósidos, taninos, saponinas, ácidos orgánicos, algunas proteínas, material colorido, etc.. Con respecto a la grasa aceites y ceras, son lentamente solubles en frío y rápidamente

solubles en caliente, por lo que no es muy utilizado para la extracción de lípidos pues es una gran fuente de error. [4,39]

MÉTODOS PARA CUANTIFICAR EL EXTRACCIÓN LÍPIDICO

Los principales métodos involucrados en la extracción de lípidos se clasifican así:

GRUPO A:

Involucra aquellos métodos que se basan en la extracción de los lípidos en los tejidos en condiciones que no se altere en lo posible la muestra. En este grupo podemos mencionar:

A. MÉTODO DE SOXHLET.

FUNDAMENTO:

Se basa en la extracción del material lipídico soluble en éter etílico obteniéndose finalmente un extracto etéreo. [1,22,39]

VENTAJAS:

- Método oficial A.O.A.C..
- Reproducible.

DESVENTAJAS:

- Tener atención principal a la temperatura y el tiempo de calentamiento, ya que tiempos prolongados causan oxidaciones en la grasa que se está obteniendo.

REACTIVOS:

- Éter etílico.
- Preparación de la muestra: Procurar que la muestra sea molida (malla num. 40) y seca, para optimizar la extracción de la grasa.

METODOLOGIA:

Pesar de 2-10 g de muestra molida y seca.

↓

Llevarla a un tubo de porcelana o papel filtro poroso libre de grasa. Tapar con algodón también libre de grasa.

↓

Introducir en el aparato de extracción Soxhlet. Extraer con éter etílico (50-150 ml.) por 4-6 hrs.. Si al cabo de este tiempo el éter que cae del extractor presenta grasa, dejar refluendo hasta la desaparición total de ésta.

↓

Evaporar el solvente. Secar en estufa a 90 °C por 2 hrs..

↓

Enfriar en desecador y pesar inmediatamente.

CALCULOS:

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{\text{peso de grasa cruda}}{\text{peso de muestra seca}} * 100$$

B) MEZCLA DE SOLVENTES.

FUNDAMENTO:

Se basa en la formación de mezclas de solventes mediante un sistema que contiene cloroformo-metanol y agua en la muestra, obteniéndose una solución monofásica primeramente. De ésta se extraen los lípidos que al formarse un sistema difásico por la adición de cloroformo. Las sustancias insaponificables quedan retenidas en la fase metanol-agua. [7]

VENTAJAS:

- Es útil para muestras que contienen un bajo porcentaje de grasa (1-10 %).
- Método eficiente y reproducible.
- Se determinan lípidos totales por la cuantificación de materia insaponificable.

DESVENTAJAS:

- Como la muestra contiene bajo contenido de grasa, se requieren grandes cantidades para la cuantificación (100-200 g.).

REACTIVOS:

- Metanol absoluto R.A..
- Cloroformo R.A..

METODOLOGIA:

Pesar 100 g. de muestra y mezclarla perfectamente con una solución de 100 ml. de cloroformo y 200 ml. de metanol por espacio de 2 min.. Considerar el % de agua en la muestra, alrededor de 80 %.

↓

Añadir a la mezcla 100 ml. de cloroformo y agitar por 30 seg..
Adicionar 100 ml. de agua y continuar la agitación por 30 seg..

↓

Filtrar a través de un papel Whatman num. 1 o sobre un Coors Num. 3 con poca succión, recibiendo en una probeta graduada de 500 ml.

↓

Registrar el volumen de la capa cloroformica después de la completa separación. Retirar de la capa alcohólica con cuidado.

↓

La capa cloroformica contiene los lípidos.

↓
↓
Añadir 100 ml. de cloroformo al residuo retenido en el papel para mayor extracción.

↓
↓
Una porción del extracto lipídico que contenga 100-200 mg. de lípido es evaporado a sequedad en un matraz previamente tarado y se determina por diferencia de peso al residuo lipídico.

↓
↓
La evaporación puede ser facilitada por un sistema de Nitrógeno en un baño de agua de 40-50 °C.

↓
↓
Secar el residuo sobre anhídrido fosfórico en un desecador.

↓
↓
Para separar el posible material lipídico se adicionan 10 ml. de cloroformo. Si hay material insoluble separarlo por filtración lavando con cloroformo.

↓
↓
Evaporar a sequedad y calcular el contenido lipídico de la muestra.

CALCULOS:

peso de lípidos * volúmen de la
en la alícuota * capa cloroformica

Total de lípidos = $\frac{\text{peso de lípidos en la alícuota} * \text{volúmen de la capa cloroformica}}{\text{volúmen de alícuota}}$

C) EXTRACCION POR ROESSE-GÜTLIEB (GRAVIMETRICO).

FUNDAMENTO:

Extracción de la grasa mediante solventes apropiados y la evaporación inmediata de ellos, para obtener un extracto seco que representa la fracción lipídica. [5,19,22]

VENTAJAS:

- Método analítico útil para la extracción y cuantificación de la grasa butírica en derivados lácteos en comparación a los métodos de Babcock y Gerber.

DESVENTAJAS:

- Requiere de una previa hidrólisis en el caso de las harinas y pan.
- En lo que se refiere a lácteos, éstos requieren de mayor tiempo en su desarrollo en comparación a los métodos de Babcock y Gerber.

D) EXTRACCION PARA HARINAS Y PAN.

REACTIVOS:

- Etanol al 95 %.
- HCl (HCl:H₂O 25:11).
- Eter etilico.
- Eter de petróleo.

METODOLOGIA:

Pesar 2 g de harina o producto similar en un matraz erlenmeyer de 50 ml. y mezclar con 2-3 ml. de etanol.

↓

Adicionar 25 ml. de HCl (25:11), mezclar perfectamente y llevar a un baño de agua de 70-80 °C por 30-40 min., agitar frecuentemente.

↓

Agregar 10 ml. de etanol y enfriar.

↓

Transferir la mezcla a un extractor de grasa Mojonnier o adaptar un embudo de separación. Lavar el matraz con tres porciones de 25 ml. de éter etilico y transferirlos al embudo.

↓

Tapar el embudo con tapón de corcho o neopreno u otro tapón sintético que no se afecte con los solventes y agitar vigorosamente por 1 min.

↓

Adicionar 25 ml. de éter de petróleo redestilado y agitar vigorosamente por 1 min.

↓

Reposar hasta que la parte superior esté totalmente clara.

↓

Extraer cuidadosamente la fase etérea, recibiendo en un matraz previamente puesto a peso constante (100 °C por 2 hrs.) y filtrando al mismo tiempo con algodón.

↓

Extraer nuevamente la capa acuosa usando 15 ml. de éter etilico y 15 ml. de éter de petróleo en la secuencia y forma ya mencionada.

↓

Reposar hasta la total separación de las capas y decantar o separar la capa etérea cuidadosamente, recibiendo en el mismo matraz.

↓

Lavar cuantitativamente el embudo separador con una mezcla de igual volumen de los dos éteres utilizados un mínimo volumen.

Transferir los lavados al matraz anteriormente mencionado.

Evaporar los solventes mediante un rotovapor con presión reducida a sequedad.

Llevar a peso constante en una estufa a 100 °C.. Realizar al mismo tiempo un blanco de reactivos.

Para efectuar los cálculos se recomienda expresar los resultados como porcentaje de grasa por hidrólisis ácida.

C.29 EXTRACCIÓN PARA LECHE Y DERIVADOS LÁCTEOS.(1,5,19,22)

- Amoniaco conc..
- Etanol al 95 %.
- Eter etílico.
- Eter de petróleo.
- Agua desionizada.

METODOLOGÍA:

Leche	Crema	Helados
Tomar 10 ml. de leche y llevarlos a un embudo de separación.	Pesar 2 g. de crema llevarlos a un embudo de separación. Adicionar 5 ml. de H ₂ O y 5 ml. más si el contenido de grasa es mayor al 25 %.	Pesar 5 mg. de helado a temperatura ambiente adicionar 5 ml. de H ₂ O.
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓
↓	↓	↓

Agregar 10 ml. de etanol al 95 %, mezclar perfectamente.

Adicionar 25 ml. de éter de petróleo. Tapar y agitar.

Reposar hasta que la fase superior esté totalmente clara o

centrifugar a 600 rpm. por 5 min..

↓

Repetir la extracción de la fase acuosa por dos veces consecutivas utilizando 15 ml. de cada solvente. Para helados utilizar 25 ml.

↓

Decantar en un recipiente de peso conocido. Evaporar cuidadosamente. De preferencia en rotovapor.

↓

Secar en la estufa a 100 °C utilizando vacío. Enfinar en un desecador. Pesar el contenido lipídico.

↓

Determinar por diferencia de peso el % de grasa.

CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS EXTRACTOS LIPIDICOS OBTENIDOS.

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS.

FUNDAMENTO:

Este método volumétrico se basa en las determinaciones de número de saponificación y las extracciones de material insaponificable [1,3,22,34]

VENTAJAS:

- Esta determinación es útil ya que se logra caracterizar completamente a la muestra problema conociéndose: número de saponificación, porción insaponificable (cuantificación del colesterol), equivalente de neutralización y además se obtienen los ácidos grasos libres que pueden ser identificados por cromatografía de gases.

METODOLOGIA:

Pesar 5 g de muestra en un matraz de boca esmerilada y añadir 50 ml. de potasio al 5.0 % o pesar 5 g de extracto lipídico.

↓

Refluxar por 30 min.-1 hr., hasta obtener una solución clara.

↓

Enfriar y titular en una alícuota el exceso de álcali con HCl 0.5 N usando fenolftaleína como indicador. Este valor es útil para determinar el número de saponificación.

↓

Remover el alcohol del resto de la mezcla por medio de un baño de vapor.

↓

↓

Adicionar aproximadamente 20 ml. de agua desionizada para disolver los jabones.

↓

Separar la porción de insaponificable mezclando la solución acuosa con 4-5 porciones de 30 ml. de éter etílico en un embudo de separación. Los extractos se unen para analizar al colesterol.

↓

Acidificar la fase acuosa obtenida de la eliminación de la materia insaponificable, que contiene los ácidos grasos, con la adición gota a gota de HCl conc. a pH 1-2.

↓

Extraer los ácidos grasos con tres porciones de 10 ml de éter etílico, colectando los extractos etéreos.

↓

Colectar una alícuota en un recipiente de peso conocido y evaporar el éter a presión reducida.

↓

Determinar el peso del residuo y lavar la superficie con 10 ml de H₂O para remover el HCl. Adicionar 10 ml de éter al residuo, secar para remover trazas de HCl.

↓

Adicionar 50 ml de alcohol al 95 % tibio y titular con NaOH 0.1 N usando fenolftaleína como indicador. Este valor será utilizado para determinar el equivalente de neutralización de la muestra.

Los ácidos grasos extraídos son tratados químicamente para ser analizados por cromatografía de gases que será analizado posteriormente.

CARACTERIZACION Y CUANTIFICACION DE LIPIDOS.

1. Cuantificación de colesterol y fosfolípidos.
2. Cuantificación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

1. CUANTIFICACION DE COLESTEROL Y FOSFOLIPIDOS.

FUNDAMENTO:

Se basa en la solubilidad del colesterol en acetona separándolo del resto de la muestra, la cual contiene fosfolípidos que no son solubles en dicho solvente. [A]

VENTAJAS:

- Método rápido de extracción y cuantificación para colesterol y fosfolípidos.
- Es directamente aplicable a una muestra alimenticia seca.
- Es aplicable a la fracción insaponificable que resulta de la determinación de ácidos grasos.

METODOLOGIA:

Pesar 100 g de muestra en un matraz y adicionar 40 ml. de acetona.
Homogeneizar y reposar por 5 min.

↓

Filtrar a través de un Buchner, lavando el residuo con 20 ml de acetona.

↓

↓

FILTRADO

↓

Evaporar a sequedad

Los extractos etéreos colectados de la determinación

anterior de ácidos grasos, se lavan con agua destilada hasta reacción negativa con fenoltaleína. Secar con sulfato de sodio anhidro. Evaporar a presión reducida. Disolver en cloroformo. Evaporar a sequedad y continuar

RESIDUO

↓

Extraer 3 veces con 40 ml de éter reposado 5 min. entre cada extracción.

↓

Evaporar los extractos hasta 10 ml.

↓

Vertir el concentrado en 10-40 ml de acetona y agitar

↓

el análisis.

Pesar aprox. 50 mg del material lipídico, disolver con 1 l de cloroformo.

Colocar 0.2 ml. de la sol. de lípidos en un tubo de ensaye y con cuidado adicionar 4 ml. del reactivo acetilante.

Mezclar perfectamente y reposar por 10 min.

Adicionar con cuidado 1 ml de H_2SO_4 conc., mezclar y reposar 10 min.

Preparar un blanco de reactivos y cloroformo.

Leer en el espectrofotómetro - ajustando con el blanco a 620-nm.

Curva estándar de colesterol - en cloroformo de 0.2-2 mg/ml. Tratando 0.2 ml de cada dilución de la misma manera que la muestra

Colectar el precipitado formado por (fosfolípidos y lecitina) por filtración en un Buchner o por centrifugación.

Pesar el residuo, descartar el sobrenadante.

Disolver el residuo en cloroformo, metanol 3:1 y taparlo perfectamente.

Transferir una alícuota que - contenga (1 μM de PO_4 aprox.) a un matraz microKjeldahl, suponiéndose un fosfolípido conocido.

Evaporar el solvente. Adicionar con cuidado 0.5 ml de H_2SO_4 10 N y calentar hasta solución clara.

Adicionar con mucho cuidado 2 ml de agua fría y calentar a ebullición por 10 min..

Preparar un blanco de agua y estándar de fosfatos (0-1 M/ml). Adicionar 2 ml de agua y 0.5 ml. de H_2SO_4 10 N.

A un tubo de ensaye adicionar 1 ml de sol. de molibdato de amonio 2.5 % en H_2SO_4 0.1 N. Agitar.

Agregar 1 ml de sol. bisulfito de sodio al 3 % y Elon al 1 %. Agitar y aforar a 10 ml.

Ajustar con el blanco y leer en el espectro a 660 nm.

CALCULOS PARA FOSFOLIPIDOS:

Obtener con la concentración de fosfato en mg/100 g de muestra a partir de la curva patrón. El contenido de fosfolípidos se obtiene multiplicando la cantidad de fosfato por 25, ya que el contenido promedio de fósforo en los lípidos es de 4 %.

ANALISIS DE LIPIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases es uno de los métodos físicos de separación más eficaces que se conocen; cada componente de una muestra suministra tres unidades de información: posición, altura y anchura de los picos en el cromatograma. [29]

La posición (expresado cuantitativamente como dato de retención) proporciona la información cualitativa.

El gas acarreador primero pasa por un controlador, con el propósito de mantener un flujo constante, después pasa por el inyector en donde acarrea a la muestra vaporizada. El gas acarreador eluye a los componentes a través de la columna en donde se van separando según las propiedades que esta presente.

Al final de la columna se encuentra un detector que en este caso es el detector de ionización de flama (FID), el cual al estar en contacto con el gas acarreador contiene una apreciable concentración de electrones libres resultado de la ionización, dando la flama una conductividad eléctrica.

La conductividad de una flama de hidrógeno es excepcionalmente pequeña, y es registrada continuamente en una carta, observándose una línea continua mientras no haya registro de muestra vaporizada al final de la columna. Al salir el vapor de la muestra la conductividad de la flama del detector se eleva mostrando una deflexión en la línea de base. La línea continua corresponde al gas acarreador puro y las deflexiones del vapor son llamados picos cromatográficos que corresponden a componentes o muestras problemas. [29, 57]

VENTAJAS:

- Método reproducible y estable.
- Versátil.
- Buena Sensibilidad.
- Automatización.
- Amplio espectro de aplicación.

DESVENTAJAS:

- No hay recuperación de la muestra.
- Instrumento costoso.
- Personal capacitado.

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA OBTENER ESTERES DE ACIDOS GRASOS

Los ácidos grasos pueden ser analizados como ácidos grasos libres. Pero interactúan fuertemente entre ellos mismos y con muchos materiales que componen el soporte de la columna, por lo que se producen picos mal definidos. En la mayoría de los casos, los ácidos grasos son transformados a sus ésteres por diferentes reacciones:[53]

a) METANOL-ACIDO CLORHIDRICO:

Para ser metilados los ácidos fueron disueltos en benceno y HCl al 5 % en metanol anhidro. Después de refluxar, se añade H₂O a la mezcla y los ésteres son extraídos con éter de petróleo. El líquido de partición utilizado fue: 1,4 butenediol para ésteres de bajo peso molecular (C₁₄-C₂₂) y dietilén glicosuccinato para ésteres de alto peso molecular (C₁₄-C₂₄).

b) METOXIDO DE SODIO:

Por medio de esta reacción se obtuvieron los ésteres de aceites comerciales: 0.5 ml. de grasa disueltos en 5 ml. de éter reaccionan con 3 ml. de metóxido de sodio. Detener la reacción con agua fría desionizada. Inyectar la fase éterea.

REACTIVOS:

- Metóxido de Sodio.
- Agua desionizada y fría.
- Curva estándar de ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico.

Condiciones en el Cromatógrafo de Gases:

- Columna DEUS al 20 % sobre Supelco HP 80/100; 2 m; 1/8 in.
- Temperatura del detector e inyector 210 °C.
- Temperatura de la columna 90 °C.
- Temperatura de la columna 90 °C 2 min., a 122 °C por 16 °C/min.: a 210 °C por 8 °C/min.; 20 min.
- Flujo N₂ a 20 ml/min.
- Aire a 30 psiq.
- Hidrógeno optimizado.
- Velocidad de la carta 0.5 cm/min.
- Atenuación 64, Rango 100, Graficador 1 mV, Detector FID.
- Inyección 1 µl.

INDICES DE LA CALIDAD DE LOS LIPIDOS

La calidad se define como el conjunto de características que diferencian las unidades y son significativas al determinar el grado de aceptación de esa unidad por parte del consumidor.[20]

Las características de un aceite, particularmente hablando, se transforman en especificaciones dentro de una norma oficial. Estas especificaciones son necesarias e indispensables para considerar al producto de consumo humano.

La norma oficial para la industrialización y comercialización del aceite contiene alrededor de 14 especificaciones, de las cuales se mencionarán las más recurridas para la verificación de la calidad.[33]

I. PRUEBA PARA LA DETERMINACION DEL INDICE DE ACIDEZ.

FUNDAMENTO:

Se basa en la definición del número de mg de hidróxido de potasio requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres en 1 g de muestra. (S.54)

REACTIVOS:

- Eter dietílico.
- Etanol.
- Solución de fenolftaleína al 1 %.
- Solución de KOH 0.1 M o 0.1 N.

METODOLOGIA:

Mezclar 25 ml. de éter dietílico con 25 ml. de etanol y 1 ml. de sol. de fenolftaleína.

↓

Neutralizar cuidadosamente con KOH 0.1 M.

↓

Disolver 1-10 g de muestra en la mezcla de solventes neutralizados y titular con solución acuosa de NaOH 0.1 M, agitando constantemente hasta un color rosa persistente por 15 seg.

CALCULOS:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{\text{vol del titulante} * 5.61}{\text{peso de muestra.}}$$

Los ácidos grasos libres son usualmente calculados como ácido oleico (por ser el más abundantes en los aceites de origen vegetal), teniendo como equivalente 1 ml de NaOH 0.1 M = de ácido oleico, por lo tanto se tiene:

$$\% \text{ de Acido Oleico} = \frac{\text{ml del titulante} * N \text{ NaOH} * 0.282 * 100}{\text{peso de la muestra.}}$$

INTERPRETACION:

Los aceites recién elaborados tienen la característica de no contener ácidos grasos libres en tal concentración, que prácticamente la muestra es cercana a la neutralidad. Conforme transcurre el tiempo, y si las condiciones de almacenamiento no son las óptimas, se llevan a cabo reacciones de las cuales se liberan ácidos grasos que disminuyen el índice de acidez.

Los aceites vegetales comestibles como el de maíz o cártamo, generalmente tienen un índice de acidez de 0.51 % como máximo y 0.05 % como mínimo en ácido oleico, fuera del límite superior, el aceite se encuentra fuera de Norma y debe investigarse el origen de esta anomalía.

II. DETERMINACION DEL INDICE DE IODO:

Es el % de iodo que un aceite fija en forma inespecifica por sus insaturaciones. (5, 34)

REACTIVOS:

- Solución de Wijs;
- Disolver 8 g de I_2 en 200 ml de ácido acético glacial. Disolver 9 g de iodo en 300 ml de CCl_4 . Mezclar las 2 soluciones diluir a 1 l con ácido acético glacial.
- Solución de KI al 10 %.
- Solución de tiosulfato de sodio 0.1 M.
- Tetracloruro de carbono.

METODOLOGIA:

Pesar de 0.2-0.3 g de aceite o 0.5 g de grasa en un matraz de iodo de 250 ml.

↓

Añadir 20 ml de sol. de Wijs, humedeciendo previamente el matraz con la sol. de KI al 10 %. Reposar por 30 min. en la obscuridad.

↓

Adicionar 15 ml de KI 10 % y 100 ml de agua desionizada, mezclar perfectamente y titular con tiosulfato 0.1 M utilizando almidón como indicador un poco antes del punto final.

↓

Realizar un blanco al mismo tiempo con 10 ml de CCl_4 .

CALCULOS:

$$(b - a) * 1.269$$

$$\text{Índice de iodo} = \frac{\text{peso (g) de muestra}}{\text{peso (g) de muestra}}$$

a = ml de tiosulfato

b = ml de tiosulfato para el blanco

si $(b - a)$ es mayor que $b/2$, la prueba debe ser repetida usando menor cantidad de muestra.

INTERPRETACION:

GRUPO	EJEMPLOS	RANGO DE INDICES
Ceras	→	→ Muy pequeño.
Grasas animales	→ Mantequilla, Lardo.	→ 30-20.
Aceites no secantes	→ Aceite de oliva. Aceite de almendras.	→ 80-100.
Aceites Semisecantes	→ Aceite de algodón. soya, sésamo.	→ 80-140.
Aceites Secantes	→ Aceite de linaza.	→ 125-200.

III. INDICE DE PEROXIDOS:

La formación de peróxidos es muy lenta en el periodo de iniciación de esta reacción, que al cabo de pocas semanas o meses según el aceite o grasa, la temperatura, humedad, etc., se propagan y aumentan ocasionando el deterioro del aceite y la presencia de rancidez. [5,19,22]

REACTIVOS:

- Solución de ácido acético/cloroformo (2:1).
- Solución saturada de KI.
- Tiosulfato de sodio 0.1 N.
- Indicador de almidón soluble al 1 %.
- Agua desionizada recientemente hervida y fría.

METODOLOGIA:

Pesar 5.0 ± 0.5 g de aceite o grasa en un matraz de 250 ml y adicionar 30 ml de sol. acético/cloroformo disolviendo perfectamente.

↓

Adicionar 0.5 ml de sol. saturada de KI y reposar 80 s.

↓

Añadir 30 ml de agua desionizada hervida y fría.

↓

Titular lentamente con tiosulfato de sodio 0.1 N. Si se gastan menos de 3 ml. titular con 0.01 N.

↓

Agitar vigorosamente hasta obtener un color amarillo.

↓

Adicionar en este momento 0.5 ml de sol. de almidón soluble al 1 % y continuar la titulación hasta que desaparezca el color azul por 30 s.

CALCULOS:

$$\text{ml de Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * 1000$$

$$\text{mEq de peróxido} = \frac{\text{ml de Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * 1000}{\text{g de muestra}}$$

METODOLOGIA OPCIONAL UTILIZANDO 1 g DE MUESTRA: [34]

Pesar en un tubo de ensaye 1 g de muestra lipídica, 1 g de KI y disolver en una muestra de ácido acético/cloroformo (2:1).

↓
Llevar el tubo a un baño de agua hirviente y permitir la ebullición de la mezcla por 30 s.

↓
Transferir el contenido del tubo a un matraz y disolver con 20 ml de una sol. de KI (5 %) lavar y transferir cuantitativamente con 25 ml de agua desionizada recientemente hervida y fría por dos ocasiones, a un matraz erlenmeyer de 250 ml.

↓
Titular con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 0.002 M usando almidón (1 %) como indicador. Realizar al mismo tiempo un blanco de reactivos.

CALCULOS:

$$\text{ml de Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * 1000$$

$$\text{mEq de peróxido/Kg de} = \frac{\text{ml de Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * N \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_8 * 1000}{\text{Kg de muestra}}$$

INTERPRETACION:

Los aceites recién obtenidos y los que se mantienen en condiciones adecuadas de almacenamiento tienen por lo general abajo de 10 mEq/Kg de muestra para peróxidos, por Norma Oficial Mexicana los aceites deben tener un máximo de 2 ppm de peróxidos.

La determinación del grado de oxidación de una grasa en un alimento es difícil y muchas veces los resultados son dudosos. El índice de peróxidos es útil en la fase inicial de descomposición de los hidroperóxidos. Por otro lado, la determinación de compuestos carbonílicos es útil siempre y cuando las reacciones de tipo secundario y de volatilización no hayan alcanzado gran amplitud, ya que se producen rompimientos de enlaces de diferente tipo ocasionando distintos compuestos de tipo carbonílico. Otros métodos para determinar el grado de oxidación son el para-anicidina y abstrucción en el U.V., el primero no es muy adecuado por ser poco específico y el segundo no relaciona fácilmente el grado de oxidación por lo que este método es más aplicable para detectar cambios relativos en la oxidación de un aceite. [19]

Una alternativa para la medición de la oxidación en los lípidos es la técnica del ácido tiobarbitúrico (TBA) donde se cuantifica al malonaldehído ($\text{HOOC-CH}_2\text{-COH}$), que es uno de los principales productos de la ruptura de los hidroperóxidos provenientes de la oxidación de los ácidos linoléico y araquidónico, por lo que se propone como una técnica alternativa al índice de peróxidos. [44]

NUMERO DE ACIDO TIOBARBITURICO:

FUNDAMENTO:

Cuantificar al cromógeno producido en la reacción de condensación de 2 moléculas de TBA y una de dialdehído malónico con un máximo de absorción a 532 nm. [34]

VENTAJAS:

- Se puede aplicar directamente sin previa extracción de la grasa.

DESVENTAJAS:

- El TBA es inestable en presencia de peróxidos, ácidos y calentamiento.
- Se producen ciertas sustancias que pueden reaccionar con TBA.
- No es muy exacto cuando se aplica a sustratos secos.

REACTIVOS:

- HCl 4 M.
- TBA: Pesar 0.2883 g de ácido tiobarbitúrico, disolverlo en ácido acético glacial al 90 % y aforar en este solvente a 100 ml.

METODOLOGIA:

Macerar 10 g de alimento graso con 50 ml de agua desionizada y lavar la muestra en un matraz para destilación con 47.5 ml de agua desionizada.

↓
Añadir 2.5 ml de HCl 4 M a pH 1.5, adicionar piedras reguladoras de la ebullición.

↓
Calentar en canastilla eléctrica hasta ebullición, destilando 50 ml después de 10 min. de iniciarse la ebullición.

↓
Pipetear 5 ml. del destilado y llevarlos a un tubo y taparlo para evitar la evaporación.

↓
Adicionar 5 ml. de TBA, agitar y calentar en un baño de agua a ebullición por 35 min.

↓
Preparar un blanco usando 5 ml de agua desionizada y 5 ml de TBA.

↓
Enfriar los tubos en agua desionizada por 10 min. Ajustar en el espectrofotómetro con un blanco a 538 nm con celda de 10 mm.

CALCULOS:

Num. de IBA = 7.8 D (como mg de malonaldehído/ Kg de muestra).

IV. INDICE DE SAPONIFICACION:

Es el número de mg de KOH requeridos para neutralizar los ácidos grasos libres de la hidrólisis completa de un g de muestra. Los ésteres de ácidos grasos de bajo peso molecular requieren de mucha cantidad de álcali para su saponificación, por lo que ésta es inversamente proporcional al peso molecular. [1,22,34]

REACTIVOS:

- Hidróxido de potasio alcohólico: Hacer 40 g de KOH con 45 g de CaO y disolver perfectamente con 100-150 ml de alcohol al 95 % y diluir a 1 l.
- HCl 0.5 N.
- Fenoftaleína como indicador.

METODOLOGIA:

Pesar aproximadamente 2.5 g de muestra en un matraz de boca esmerilada. Añadir 25 ml de KOH alcohólica exactamente.

↓
↓
Conectar en un refrigerante y calentar a reflujo por 30 min.

↓
↓
Enfriar y titular los ácidos grasos libres con HCl 0.5 N usando fenoftaleína como indicador.

↓
↓
Realizar un blanco al mismo tiempo con la sol. de potasa y reflujar al mismo tiempo para la muestra. Enfriar y titular en las mismas condiciones.

CALCULOS:

(ml de blanco - ml de muestra en
titulación) * N HCl * 56.1

Índice de saponificación
(mg de KOH/g de muestra) =

—————
peso de muestra (g)

INTERPRETACION:

El índice de saponificación para un aceite dentro de la norma debe ser 187 mg KOH/ g de aceite como mínimo y 193 de KOH/ g de aceite como máximo.

V. MATERIA INSAPONIFICABLE:

Es el residuo que se obtiene después de la saponificación con álcali y la extracción incluye hidrocarburos, alcoholes de alto peso molecular (colesteroles, fitosterol). Muchos aceites y grasas puros, contienen normalmente menos del 2 % de materia insaponificable. [1,22,34]

REACTIVOS:

- HCl 0.5 M.
- Eter dietílico.
- KOH 0.5 M.
- Fenofaleína como indicador.
- Alcohol neutro.
- NaOH 0.1 M estándar.

METODOLOGIA:

Después de la titulación de índice de saponificación, adicionar 1 ml de KOH 3 M y transferir a un embudo de separación.

↓
Lavar con agua usando un volumen menor de 50 ml o un volumen menor del HCl 0.5 M utilizado.

↓
Extraer la solución aun caliente con 50 ml de dietil éter por 3 ocasiones.

↓
Llevar los extractos etéreos a un matraz o embudo de separación conteniendo 20 ml de agua y después repetir la operación con 20 ml más de agua agitando vigorosamente.

↓
Extraer la fase etérea y lavar con 20 ml de KOH 0.5 M, repetir 2 lavados más con agua hasta que no se obtenga reacción alcalina con la fenofaleína.

↓
Llevar los extractos etéreos a un matraz de peso conocido y evaporar el solvente a sequedad a no más de 80 °C, obtener peso constante.

↓
Disolver la materia insaponificable en alcohol neutro y titular con álcali 0.1 M.

DISCUSION PARA LIPIDOS.

La polaridad que presentan diferentes solventes será un factor primordial para la extracción selectiva de los ácidos y grasas. De ahí que el escoger uno u otro solvente o sistema de solventes dependerá de su naturaleza.

Con el extractor lipídico pueden realizarse una serie de pruebas químicas y de separación para su caracterización. Una de las técnicas más utilizada es la de saponificación para grasas y aceites, donde se logra separar el material saponificable del insaponificable.

En la saponificación se obtienen ácidos grasos libre y fosfolípidos principalmente, que posteriormente pueden cuantificarse y caracterizarse por métodos volumétricos.

espectrofotométricos y cromatografía de gases. Recurriendo a uno u otro, dependiendo de la sensibilidad y exactitud que sea necesaria.

Por lo que respecta a la fracción inaponificable, en ésta se obtienen terpenos (vitaminas liposolubles) y esteroides (colesterol), además material lipídico asociado. Llevando a cabo la cuantificación por medio del método espectrofotométrico que por su accesibilidad es el más utilizado, además de otras características ya mencionadas.

VITAMINAS

Las vitaminas se clasifican en dos grandes grupos: las hidrosolubles y las liposolubles, las cuales analizaremos previamente.

VITAMINAS LIPOSOLUBLES.

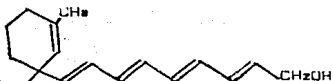
Las vitaminas solubles en grasa o en lípidos son moléculas hidrófobas, la mayoría derivadas del isopreno. En general, las vitaminas liposolubles requieren de una absorción normal de las grasas, para que absorbidas éstas sean transportadas al hígado (vitaminas A, D y K) o en el tejido adiposo (vitamina E) por periodos variables. Las vitaminas liposolubles son transportadas en la sangre por medio de las lipoproteínas o de proteínas fijadoras específicas, ya que no son directamente solubles en el agua del plasma. [2,28,31]

VITAMINA A:

La vitamina A se presenta en varias formas: como retinol (un alcohol); como retinal (también conocido como retineno), un aldehído; y como ácido retinoico. Puede esterificarse conociéndose el producto como éster de retinilo. Estas formas es posible denominarlas Vitamina A.

La vitamina A se mide en U.I. (Unidades Internacionales), siendo 1 U.I. según la define la O.H.S. la actividad de vit. A de 0.344 mcg de acetato de vitamina A puro (0.300 mcg de alcohol de vit. A cristalino) o 0.6000 mcg de β caroteno puro. La unidad de la U.S.P. (United States Pharmacopoeia) es idéntica a la Unidad Internacional.

La actividad de vit. A se debe no solo a los retinoles, sino también a ciertos carotenoides ampliamente distribuidos en los vegetales, en particular los alfa, beta y gama carotenos. Estos no poseen actividad intrínseca de vitamina A por sí mismos, pero son convertidos a ella mediante reacciones enzimáticas. El beta caroteno, cuya molécula es simétrica se escinde por el centro y rinde dos moléculas de retinol. [25,28]

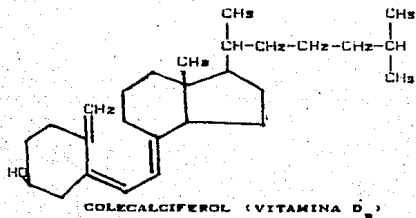
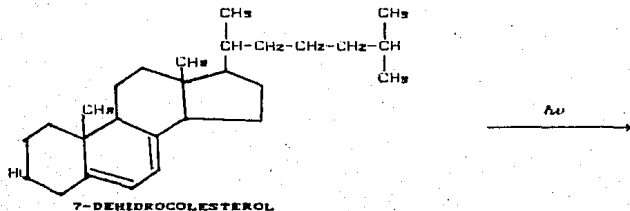


VITAMINA A (RETINOL)

VITAMINA D:

La vitamina D es un nutriente necesario únicamente en los seres humanos no expuestos a la luz del sol. La vitamina D es una auténtica prohormona del tipo de los esteroides pero también en la naturaleza principalmente en los animales pero también en las plantas y en las levaduras. La vitamina D se forma en las plantas y en los animales a partir de ergosterol y del 7-dehidrocolesterol respectivamente.

La radiación con la luz ultravioleta abre espontáneamente al anillo B del ergosterol o del 7-dehidrocolesterol. En los vegetales, la radiación en el ergosterol conduce a la producción de ergocalciferol (vit. D₂) por radiación en la piel. Ergocalciferol y colecalciferol tienen igual capacidad biológica como vitaminas B₁₂, 28, 31].

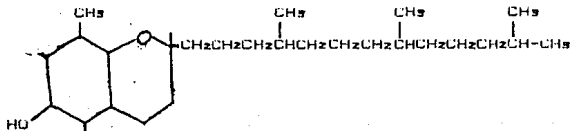


VITAMINA E:

El alfa tocoferol es un aceite presente en los vegetales, en particular en el germen de trigo y en las semillas de arroz y algodón. La vitamina E se requiere en los animales superiores; en la naturaleza existen 7 tocoferoles.

El alfa tocoferol es el que tiene mayor actividad biológica como vitamina; contrario a lo que se piensa no existe suficiente evidencia de que la vitamina E sea necesaria para la fertilidad del hombre.

La vitamina E tiene por lo menos 2 funciones metabólicas: actúa como antioxidante natural soluble en grasas y desempeña un papel específico, aunque poco comprendido en el metabolismo del Selenio. [21,28,31]



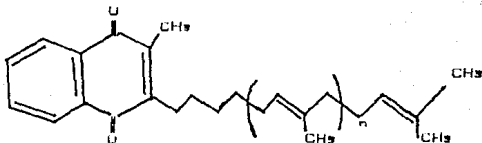
ALFA TOCOFEROL

VITAMINA K:

Las diversas vitaminas K son nattoquinonas con radicales isoprenoides sustituyendo a los átomos de hidrógeno.

La vitamina K abunda en los aceites y en los vegetales de hojas verdes y en el salvado. Las menaquinonas (vitamina K₂) son sintetizadas por la flora bacteriana del intestino por lo que la vitamina K no necesita suministrarse en la alimentación.

Se sabe que la vitamina K se requiere para mantener las concentraciones normales de los factores de la coagulación que se sintetizan en el hígado a partir de un precursor inactivo que depende de la vitamina K para su conversión a factores de coagulación biológicamente activos. [21,28,31]



n = 4, 5, 7 u 8.

VITAMINA K₂

DETERMINACIONES ANALITICAS PARA VITAMINAS LIPOSOLUBLES.

VITAMINA A.

METODO DE CHERR-PRICE:

FUNDAMENTO:

- Se basa en la formación de un color azul por la acción entre vitamina A y el tricloruro de antimonio disuelto en cloroformo. [17]

VENTAJAS:

- técnica analítica sencilla y rápida.
- técnica más utilizada.

DESVENTAJAS:

- La reacción del tricloruro de antimonio no es específica para vitamina A solamente, pues los derivados de la ionona, colesteroína fundida, algunos productos de su oxidación y los carotenoides dan el mismo color.
- La reacción depende de la temperatura, ya que si no es la adecuada se presentan desviaciones de las bandas de absorción.
- La presencia de agua y alcohol interfiere sensiblemente con la concentración.
- La reacción es impedida por los ácidos grasos no saturados, vitamina D.
- Las estearinas alteran el color.
- Los ácidos grasos insaturados de los aceites naturales llegan a ocasionar un error del 100 %, por lo que se recomienda llevar a cabo la reacción de tricloruro de antimonio con la fracción insaponificable siempre que se trate de aceites naturales de hígado de pescado.
- El color es inestable, por lo que las lecturas deben realizarse siempre a un tiempo determinado de 5 a 10 segundos en el que alcanza el máximo desarrollo de color.
- A medida que aumenta la concentración de las preparaciones, el máximo de absorción se desvía de 603 a 618 nm.

REACTIVOS:

- Cloroformo exento de agua y alcohol. Se emplea cloroformo BAB o, que se purifica agitando perfectamente de 2 a 3 veces con un volumen igual de agua y desecando sobre carbonato de potasio calcinado. Destilar y deshechar el primer 10% del producto de destilación. Durante la desecación y destilación proteger el cloroformo de la luz.
- Tricloruro de antimonio A.R. anhidro. Secar nuevamente sobre H_2SO_4 , lavar con cloroformo puro y seco hasta que el líquido sea claro.
- Preparar una solución de tricloruro de antimonio saturada en cloroformo a 20 °C, esta solución contiene siempre una proporción aproximada de 21 a 23 % en peso y volumen de tricloruro de antimonio. Almacenar en frasco ámbar.
- Preparación de las muestras:

SAPONIFICACION

Agregar 30 ml de etanol a 100 mg en un matraz de 250 ml.

↓

Añadir 10 ml de KOH concentrado y refluja durante 30 min

↓

↓

EXTRACCION

Enfriar a temperatura ambiente y extraer la porción insaponificable en un embudo de separación con 4-5 porciones de 30 ml de éter etílico.

↓

Unir los extractos etéreos y lavarlos con agua desionizada hasta que den reacción negativa con fenolftaleína. Secar con sulfato de sodio anhidro.

EVAPORACION

Evaporar con rotavapor a vacío y adicionar el solvente según la técnica a desarrollar, Carr-Price o Espectrofotométrica, diluyendo a concentraciones que se encuentran en un intervalo de 7 - 30 U I/ml.

↓

↓

CARR-PRICE

Al extracto obtenido se le disuelve en cloroformo a un volumen conocido pequeño.

↓

Adicionar 0.5 ml de cloroformo, 0.5 ml de la solución problema a un tubo A.

↓

A un tubo B adicionar 0.5 ml de solución estándar previamente preparada de 7-30 U I/ml., 0.5 ml de la solución problema y adicionar el tricloruro de antimonio.

↓

Leer a 620 nm después de 10 segundos de haber adicionado el reactivo de Carr-Price.

ESPECTROFOTOMETRICO

Disolver el extracto obtenido con isopropanol.

↓

Ajustar el aparato a cero de absorbancia con isopropanol y leer los problemas a 310, 325 y 334 nm.

CALCULOS:

Para Carr-Price. - El contenido de vitamina A en la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$U I \text{ de vitamina A/g} = \frac{a - R}{(b - a) W}$$

a = U I de vitamina A/ml de la sol. problema de acuerdo a la curva estándar.

b = U I de vitamina A/ml de la sol. estándar interno y sol. problema calculadas de acuerdo a la curva estándar.

R = U I de vitamina A/ml contenidos en el estándar interno.

W = gramos de muestra.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO:

Se sustituye las absorbancias a las tres diferentes longitudes de onda antes mencionadas, en la siguiente ecuación:

$$A \text{ (corregida)} = 7 (A \text{ 325 nm}) - 2.825 (A \text{ 310 nm}) - 4.375 (A \text{ 334 nm}).$$

El valor de vitamina A por gramo se calcula:

$$U I / g = \frac{A \text{ (corregida)}}{L C} * 5700 * 1/0.3$$

donde:

A = Absorbancia corregida.

L = Longitud de la celda en cm.

C = Concentración de la muestra en g por l de isopropanol.

El factor de corrección de unidades espectrofotométricas a unidades gravimétricas es 5700. El factor de conversión en gramos a U.I. es 0.3.

VITAMINA E:

La vitamina E se puede determinar midiendo la absorción por valoración potenciométrica y por métodos colorimétricos. La altura de una banda ultravioleta a 294 nm es paralela a la actividad de vitamina E y la relación entre la altura del máximo de absorción a 294 nm y la del mínimo a 260 nm alcanza cifras mayores a medida que aumenta la actividad. Por lo tanto, midiendo la absorción a 294 nm se puede determinar vitamina E en los preparados de tocoferol relativamente puros y en los aceites muy concentrados. Para los aceites naturales con poca concentración de vitamina E.

la medición de la absorción general a 500 nm es muy intensa. (17, 21, 28, 31)

FUNDAMENTO:

Se basa en la reacción que se lleva a cabo entre la vitamina E y el ácido nítrico, cuyo producto final es una combinación de color rojo oscuro que se mide colorimétricamente. (17)

VENTAJAS:

- Reacción específica de los tocoteroides.
- Sensibilidad de la reacción como límite inferior 0.05 % para el d-1 alfa tocoferol.

DESVENTAJAS:

- El alfa y beta tocoterol dan la misma cifra espectrofotométrica, cuando es sabido que el segundo tiene una acción fisiológica menor que el primero.

REACTIVOS:

- Alcohol absoluto.
- Ácido sulfúrico alcohólico 1 M.
- Éter dietílico.
- Sulfato de sodio anhidro.
- Ácido Nítrico conc.
- Agua desionizada.

METODOLOGIA:

Pesar aproximadamente 1 g de aceite puro en un matraz de 100 ml, añadir 10 ml de alcohol absoluto y 20 ml de ácido sulfúrico alcohólico 1 M. Refluja por 45 min y enfriar. Cubrir con aluminio.

↓

Adicionar 50 ml de agua y transferir a un embudo de separación, cubriendo con aluminio, llevar el matraz hasta 50 ml.

↓

Extraer la materia insaponificable con 5 * 30 ml de éter dietílico. Lavar los extractos con agua y secar sobre sulfato de sodio anhidro.

↓

Evaporar a baja temperatura y proteger de la luz, en un rotavapor.

↓

Disolver inmediatamente en alcohol absoluto.

↓

Transferir una alícuota y estándares (0.3 - 3.0 mg de vitamina E) a un matraz volumétrico de 20 ml. Adicionar 5 ml de alcohol absoluto y 1 ml de ácido nítrico conc. gota a gota con constante agitación.

↓

Calentar los matraces en baño de agua a 90 °C por tres min. exactamente.

↓
↓
↓

Enfriar rápidamente y aforar con alcohol absoluto frío.

↓
↓

Ajustar el espectrofotómetro con un blanco de 5 ml de alcohol absoluto y 1 ml de ácido nítrico conc. tratado de igual manera que la muestra. Leer a 470 nm.

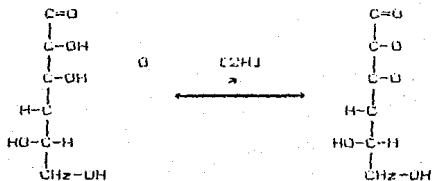
VITAMINAS HIDROSOLUBLES.

VITAMINA C:

El ácido ascórbico es un cristal blanco soluble en agua. La forma estable es anhidra, ya que en solución es fácilmente oxidada, particularmente cuando se calienta en medio alcali, en la luz, cobre o hierro. Es la más inestable de las vitaminas por lo que se debe tener mucha precaución al preparar, almacenar o en la preparación de alimentos.

Existen dos formas activas de la vitamina C, el ácido L-ascórbico puede ser oxidado a L-dehidroascórbico el cual tiene aproximadamente 50 % de la actividad de la forma reducida.

Esta vitamina se encuentra principalmente en frutas, hortalizas y vegetales. En los vegetales la pérdida de la vitamina por cocción es alta, 50 % en tubérculo y 70 % en vegetales verdes; en el caso de las frutas la pérdida es menor, debido a que la acidez de ésta protege la oxidación. (28,31)



ACIDO ASCORBICO

ACIDO DEHIDROASCORBICO

NIACINA:

El ácido nicotínico es un cristal blanco, estable a la luz, calor, medio ácido y alcali; pero es soluble en agua por lo que se pierde durante la cocción de los alimentos.

La niacina puede ser sintetizada a partir del aminoácido triptofano, se ha demostrado que 60 mg de este aminoácido digeridos son suficientes para ser oxidados y producir 1 mg de

niacina, sin embargo esta afirmación no es aplicable en ciertas condiciones como en el embarazo.

La síntesis de niacina requiere de piridoxina, riboflavina y triamina. La deficiencia de estas vitaminas puede ser implicación de la pelagra. La niacina y su forma activa nicotinamida están involucradas en los metabolismos de las grasas, carbohidratos y proteínas. Son parte importante dos coenzimas: el NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y el NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), los cuales están involucrados en la transferencia de hidrógeno en sus formas reducidas (NADH y NADPH).

DETERMINACIONES ANALITICAS PARA VITAMINAS HIDROSOLUBLES

VITAMINA C.

FUNDAMENTO:

La vitamina C tiene la propiedad de decolorar al indofenol (dicloro fenol indorenel) colorante azul y la cantidad decolorada es proporcional a la cantidad de ácido ascórbico presente. (17,21)

VENTAJAS:

- Determinación rápida.

DESVENTAJAS:

- Debe realizarse rápidamente, ya que la vitamina C se oxida al contacto con el aire, luz y calor.

REACTIVOS:

- Solución estándar de vitamina C: Preparar una solución en ácido metafosfórico al 3 % que contenga 1 mg de la solución de vitamina C por ml.

- Solución de indofenol: Pesar 25 mg de indofenol y 21 mg de carbonato de sodio, disolver y aforar a 500 ml con agua destilada. Para su titulación tomar 1 ml de la solución estándar de vitamina C adicionar 9 ml de sol. de ácido metafosfórico al 3 %, agregar el colorante en una bureta y titular hasta un color rosa persistente. (A)

PREPARACION DE LA MUESTRA:

Extraer del alimento en solución la vitamina C. Durante la extracción añadir ácido acético al 5 % o ácido metafosfórico al 3% recién preparado, para destruir la enzima ácido ascórbico oxidasa.

Método útil para frutas y legumbres.

↓

Tomar 5 g del alimento y homogeneizar con 50 ml del ácido acético al 5 % hasta la desaparición de grumos usando arena lavada para ayudar a moler la muestra.

↓

Filtrar en un matraz aforado de 100 ml cubierto con aluminio y aforar.

METODOLOGIA:

Pipetear 10 ml del extracto de un matraz y añadir el colorante con la bureta.

↓

Continuar la adición del indofenol hasta que persista un color rosa por lo menos 10 seg.

↓

Calcular mg de vitamina C en 100 mg de alimento. 37.5 ml de la sol. de indofenol corresponden a 1 mg de vitamina C aproximadamente.

NIACINA.

FUNDAMENTO:

Cuantificación de niacina a partir de la formación del complejo colorido que se forma entre la interacción de la vitamina y el bromuro de cianógeno medible a 440-470 nm [A]

PREPARACION DE LA MUESTRA:

CEREALES:

Pesar 2.5 g de muestra y 1.5 g de hidróxido de calcio, colocarlos en un matraz a 250 ml.

↓

Al mismo tiempo colocar en diferentes matraces de 250 ml 1.5 g de hidróxido de calcio y 0, 5, 10, 20 ó 25 ml de una sol. de niacina conteniendo 10 µg/ml.

↓

Llevar todos los matraces a aproximadamente 50 ml con agua, agitar la mezcla y colocarla en un autoclave durante 2 hrs. a 15 lb de presión.

↓

Enfriar hasta 40 °C, transferir a matraces volumétricos de 100 ml y diluir al volumen.

↓

Transferir exactamente 50 ml del sobrenadante de cada matraz a tubos de centrifuga y colocarlos en un baño de hielo por 15 min o un refrigerador durante 2 hrs.

↓

Centrifugar 15 min a 3 500 rpm y filtrar a través de papel # del núm. 42 o equivalente, refiltrar si fuera necesario para obtener una solución clara.

↓

OTROS ALIMENTOS (NO CEREALES) Y MEZCLAS:

Colocar en un matraz de 1 l 28.35 g de muestra, y agregar 200 ml de una sol. de H₂SO₄ 1 N.

↓

↓

Mezclar y calentar 30 min en autoclave a 15 lb de presión.

↓

Enfriar y ajustar el pH a 4.5 con NaOH 10 N, usando verde de bromo cresol como indicador, diluir a 250 ml con agua y filtrar.

↓

Colocar en un matraz volumétrico de 50 ml, 17 g de sulfato de amonio y colocar 40 ml del filtrado.

↓

Diluir a la marca con agua, agitar vigorosamente y filtrar.

↓

Preparar la sol. estándar colocando 40 ml de una sol. de niacina de 4µg/ml en un matraz volumétrico de 50 ml con 17 g de sulfato de amonio, diluyendo a la marca.

METODOLOGIA:

CEREALES:

Preparar al mismo tiempo 15 tubos de ensaye, 2 para la muestra, 12 para los estándares y el último como blanco de reactivos.

↓

Para los dos tubos de muestra colocar 5 ml de la sol. preparada, para los estándares (2 tubos por dilución) colocar 5 ml de la sol. tratada y para el blanco 5 ml de agua.

↓

Para uno de los tubos de muestra y uno de cada uno de los estándares, que se utilizarán como blancos, agregar 10 ml de agua.

↓

Colocar todos los tubos en el refrigerador en un baño de hielo durante 30 min.

↓

A los tubos de la determinación, agregar en la campana de gases, 10 ml de bromuro de cianógeno al 10 % frío.

↓

Después de 30 s agregar a todos los tubos 1 ml de ácido sulfanílico al 55 %, mezclando inmediatamente y con cuidado. Tapar los tubos que contienen bromuro de cianógeno.

↓

Colocar todos los tubos en hielo.

↓

Ajustar el espectrofotómetro a 470 nm con la sol. blanco de reactivos y determinar la absorbancia de las demás soluciones 15 min después de haber agregado el ácido sulfanílico.

↓

Corregir la absorbancia de las soluciones con el valor contenido para el blanco respectivo y graficar la absorbancia como función de la conc. de niacina en µg/ml.

↓
Calcular la conc. de la niacina en la muestra a partir de los datos de la curva patrón, con la absorbancia corregida. Expresar la conc. de niacina en mg/100 g de muestra tomando en cuenta las diluciones realizadas.

↓
OTROS ALIMENTOS (NO CEREALES) Y BEBIDAS:

Preparar 4 tubos de ensayo para la determinación, dos de ellos serán los blancos y los otros dos de la medición, uno de la muestra y otro del estándar.

↓
Preparar cada tubo por separado, empezando por los blancos. Agitar perfectamente después de la adición de cada reactivo.

↓
Colocar los reactivos como se indica:

Blanco estándar.- 1 ml de sol. estándar, 5 ml de agua desionizada, 0.5 ml de NaOH 2 %, 2 ml de ácido sulfanílico 10 % y 0.5 ml de HCl 1:6.

↓
Blanco de muestra.- 1 ml de sol. muestra, 5 ml de agua desionizada, 0.5 ml de NH_4OH 2 %, 2 ml de ác. sulfanílico al 10 %, 0.5 ml de HCl 1:6.

Determinación de estándar.- 1 ml de sol. estándar, 0.5 ml de NH_4OH 2 %, 5 ml de bromuro de cianógeno 10 %, 2 ml. de ác. sulfanílico y 0.5 ml de agua desionizada.

Determinación de la muestra.- 1 ml de sol. muestra, 0.5 ml NH_4OH 2 %, 5 ml de bromuro de cianógeno 10 %, 2 ml de ácido sulfanílico 10 % y 0.5 ml de agua desionizada.

↓
Ajustar el aparato a 440 nm con el blanco estándar, inmediatamente después agregar el HCl y 30 s después de haber agregado la sol. de ác. sulfanílico.

↓
Tratar el tubo de la determinación del estándar de la misma manera que su blanco, agregando el ác. sulfanílico 30 s después del bromuro de cianógeno, agitando después de cada adición.

↓
Agregar inmediatamente agua, mezclar de nuevo y tapar el tubo. Con el aparato ajustado a cero, leer el máximo de la adición de absorbancia (aproximadamente 1.5 min. después de la adición del ác. sulfanílico).

↓
Ajustar el aparato a cero de absorbancia con el blanco de la muestra y determinar la absorbancia del tubo para la determinación de la misma manera que el estándar.

↓
Calcular el contenido de niacina de la muestra a partir de los resultados de absorbancia del estándar, su concentración y la absorbancia de la muestra.

DISCUSIÓN DE VITAMINAS

La determinación de vitaminas liposolubles e hidrosolubles generalmente no se realiza en un análisis de rutina en el área alimentaria, pero específicamente son importantes cuando el producto ha sido enriquecido o fortificado con estas vitaminas, o el proceso de obtención daña sensiblemente al complejo vitamínico.

Para vitaminas liposolubles la técnica que proporciona mayor sensibilidad es la espectrofotometría, además de ser accesible. Pero estas determinaciones presentan varias interferencias por la existencia de varios reactivos como se observó en las desventajas analizadas y la presencia de ciertas vitaminas liposolubles, las que deben ser separadas del extracto insolubilizable. Esta extracción o purificación depende de las vitaminas a cuantificar.

La evaluación se limitó a solo dos vitaminas, la H y la E, por ser metodologías confiables en la espectrofotometría, no siendo así para la D y para la K.

Por lo que respecta a las vitaminas hidrosolubles, éstas pueden cuantificarse con menos interferencias en comparación con las liposolubles, por métodos volumétricos, espectrofotométricos y actualmente por cromatografía de gases o líquida de alta presión (HPLC).

Los métodos volumétricos no son tan sensibles como lo son los espectrofotométricos, pero ofrecen una alternativa de análisis si no se cuenta con el equipo necesario.

Los espectrofotométricos y cromatográficos proporcionan alta especificidad y sensibilidad, por lo que el uso de uno u otro solo dependerá de la accesibilidad y la presión requerida en el análisis.

MINERALES

Los elementos cuyos requerimientos son mayores de 100 mg/día se mencionan como minerales. Estos elementos pueden ser clasificados en 3 grupos: el primero incluye el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre que son los principales componentes de las moléculas corporales. Estos elementos se obtienen a través de la ingestión de agua, lípidos, carbohidratos y proteínas de los alimentos.

El segundo comprende los minerales nutricionalmente importantes: calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio y cloro que se requieren en cantidades de 100 mg o mayores por día.

El tercer grupo lo constituyen los oligoelementos: cromo, cobalto, cobre, iodo, manganeso, molibdeno, selenio y zinc. Un cuarto grupo contiene elementos adicionales necesarios para la nutrición animal, pero no tienen función especial para el hombre: arsénico, cadmio, níquel, silice, estaño y vanadio. El último grupo contiene elementos como el plomo y el mercurio que son francamente tóxicos.

CALCIO:

Es un constituyente de huesos y dientes, regulador de la función nerviosa y de la muscular. Su absorción requiere de una proteína fijadora de calcio, regulado por la vitamina D.

FOSFORO:

Es constituyente de huesos, dientes y de moléculas vitales importantes como el ATP, ácidos nucleicos e intermediarios metabólicos.

MAGNESIO:

Es constituyente de huesos y dientes, es un cofactor enzimático importante para las cinasas.

SODIO:

Es el catión principal en el líquido extracelular; regula el volumen plasmático, el equilibrio ácido-base, además regula la función nerviosa y muscular.

POTASIO:

Es el catión principal en el líquido intracelular, con funciones de equilibrio nervioso y muscular. [28,31].

MINERALES POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

La espectrofotometría por absorción atómica (AAS) involucra el estudio y medición de la energía radiante de los átomos libres.

El principio se apoya en el hecho de que un átomo de un elemento

en estado fundamental gaseoso, absorberá un fotón de la energía incidente, la cual proviene de una fuente de luz a determinada longitud de onda, dicha absorción se detecta y amplifica en un registrador.

Para realizar un análisis a una muestra problema, ésta debe ser previamente tratada para destruir la materia orgánica y disolverla para después ser atomizada y vaporizada.

Comúnmente se aplican 3 sistemas diferentes de absorción atómica: el de flama, horno de grafito y el de generación de hidruros. [34,45,57,8].

BREVE DESCRIPCIÓN DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN FLAMA Y SU DESARROLLO.

El equipo de espectrofotometría de absorción atómica en flama consiste en lo siguiente:

- 1.- Fuente de luz: Generalmente es una lámpara de cátodo hueco.
- 2.- Flama: Proviene del gas mezcla aire-acetileno, aire-propano, aire-grafito, flama de óxido-nitroso, siendo la más utilizada y común la flama de aire-acetileno (A-AC).
- 3.- Monocromador: Selecciona y da una línea en el espectro de emisión de la fuente de luz e insola a las otras líneas.
- 4.- Detector del Sistema.
- 5.- Operador Simple y de Doble Sistema.

La radiación de una fuente de luz, que emite el espectro del elemento analizado, la energía surge y pasa a través de un monocromador para insolar una línea espectral seleccionada del elemento, la que es detectada por medio de una fotocelda. La señal es amplificada y medida en un registrador.

APLICACIONES.

La espectrofotometría de absorción atómica es muy útil en el área alimentaria por su aplicación en análisis de entoque nutricional y toxicológico, determinando elementos como sodio, potasio, calcio o bien plomo, mercurio, arsénico, etc. [34,B]

También es útil en las áreas de Geología, Biología, Medicina, Metalurgia, etc.

VENTAJAS:

- Altamente específico.
- Alta sensibilidad.
- La volatilización con flama en algunos casos detecta hasta menos de 1 microgramo por mililitro de solución.
- La volatilización con horno eléctrico solo requiere de 5 - 100 microlitros y la sensibilidad aumenta mil veces.
- Es más sensible que la emisión y rayos X.
- Es rápido y requiere de pequeñas cantidades de muestra. [38]

DESVENTAJAS:

- Algunos elementos emiten a la misma longitud de onda que la línea que ha sido medida para la muestra, dando una fuente directa de error.
- Generalmente es posible determinar solo un elemento a la vez. [36]

PREPARACION DE LA MUESTRA.

Usualmente es necesario destruir la materia orgánica, recurriendo a los métodos de Cenizas Secas y Oxidación Humeda.

CENIZAS SECAS:

Se obtienen dentro de un rango de 475 - 600 °C según el elemento de interés, utilizando cápsulas de porcelana o de platino.

VENTAJAS:

- Fácil y buena precisión.
- No requiere de constante vigilancia.
- No requiere de reactivos peligrosos.

DESVENTAJAS:

- Si la temperatura no se controla, se volatilizan ciertos elementos.
- Requiere de un periodo de 4 - 12 hrs. para obtener las cenizas, dependiendo del peso y tipo de muestra. [34, 35]

METODOLOGIA:

Pesar 0.5 - 2.0 g de muestra seca y molida, malla num. 40.

↓

Calcinar en una cápsula de porcelana en la mufia a 500 °C hasta que las cenizas estén exentas de puntos negros de carbón.

↓

Enfriar y pesar a peso constante.

↓

Disolver las cenizas en 5 ml de HCl 20 % o HCl:HNO₃:H₂O en proporción 2:1:3, calentar si es necesario para disolver el residuo.

↓

Filtrar la solución y recibir el filtrado en un matraz aforado a 50 ml. Lavar el papel filtro y aforar con agua desionizada.

OXIDACION HUMEDA:

Se basa en la digestión ácida, la oxidación de la muestra. Después de la digestión la muestra es diluida a un volumen específico o se extrae con un solvente orgánico si el elemento de interés está presente en baja concentración.

VENTAJAS:

- Las pérdidas por volatilización son mínimas, porque la digestión se lleva a cabo a temperaturas más interiores que en las cenizas secas.
- Es confiable.
- Muy requerido para la oxidación de materia orgánica de alimentos que serán analizados por AAS.

DESVENTAJAS:

- Necesidad de una constante vigilancia.
- Resulta peligroso por el manejo de reactivos ácidos, además pueden ser fuente de contaminación. (34.B)

METODOLOGIA:

Pesar 0.5 - 2.0 g de muestra molida malla num. 40 y seca. Llevarla a un matraz Kjeldahl o una bomba de digestión de teflón.

↓
↓
Añadir 10 ml de HNO₃ conc. y reposar toda la noche.

↓
↓
Calentar lentamente y con cuidado sobre una resistencia hasta que la producción de humos rojos (NO₂) haya cesado.

↓
↓
Enfriar perfectamente y adicionar con sumo cuidado 2 - 4 ml de HClO₄ al 70 %.

↓
↓
Calentar cuidadosamente hasta un pequeño volúmen.

↓
↓
Transferir la muestra a un matraz aforado de 50 ml y aforar con agua desionizada.

Las bebidas generalmente son asperjadas directamente si la concentración de sólidos solubles es menor al 3 %, en caso contrario se diluyen.

METODOLOGIA POR TIPO DE ALIMENTO.

La preparación de la muestra previa al análisis por AAS, dependerá del elemento de interés (BI), dicha metodología se revisa brevemente:

CADMIO Y PLOMO EN CONESTIBLES:

La principal fuente de contaminación por cadmio es el uso de fertilizantes que para su fabricación utiliza roca fosfórica con alto contenido en ese metal. La legislación para el cadmio en alimentos según la British Standard Limits es de 1.2 ppm.

Algunas fuentes importantes de contaminación por plomo son:
La concentración normal del suelo que varía de 2 a 200 ppm, de donde son absorbidos por las raíces o tubérculos cultivados en este tipo de suelo. El tetraetilo de plomo, el cual es un líquido utilizado como antidetonante en gasolinas. El plomo puede formar varios tipos de aleaciones, siendo la más importantes en alimentos la de plomo y estaño, usada en la soldadura de envases metálicos, etc.

Los límites de plomo prescritos en the Lead in Food Regulation (1961), para los alimentos en general es de 2 ppm. [34.53]

METODOLOGIA:

Como el plomo y cadmio se volatilizan en las cenizas secas es necesario añadir nitrato de magnesio o ácido sulfurico. Para la oxidación húmeda se utiliza H_2SO_4 conc./ H_2O_2 . [B]

Pesar 10 g de muestra en una cápsula de porcelana y añadir 10 ml de $Mg(NO_3)_2$ al 10 % (w/v) en etanol al 95 %.

↓
Mezclar perfectamente y evaporar el alcohol por baño eléctrico.

↓
Completar el secado por 1 hr. a 150 °C.

↓
Calentar a 200 °C gradualmente hasta carbonizar la materia orgánica (no exceder de 450 °C).

↓
Llevar la cápsula a un horno y dejar la muestra toda la noche a no más de 450 °C.

↓
Agitar y enfriar, añadiendo unas gotas de HNO_3 . Secar sobre un plato eléctrico y regresar al horno por 1 hr.

↓
Si las cenizas no son blancas, repetir el tratamiento con HNO_3 .

↓
Remover y enfriar, añadir lentamente 10 ml de una mezcla de 200 ml de HCl, conc., 560 ml de H_2O y 150 ml de HNO_3 conc.

↓
Calentar si es necesario para disolver las cenizas.

↓
Transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, añadir acetato de sodio al 40 % (w/v) para dar un pH de 3.4.

↓
Adicionar 5 ml de pirrolidin ditiocarbamato de amonio (APDC) al 1 % y reposar por 2 min.

Añadir 10 ml de metil isobutil cetona (MIBK) agitando vigorosamente por 30 s.

Adicionar agua desionizada abajo de la marca del matraz, hasta que el solvente orgánico se eleve dentro del cuello del matraz.

ANALISIS:

Utilizar lámpara de cátodo al vacío (HCl).

Aspirar la capa de MIBK directamente del matraz (1 - 25 µl). Asperjar en el espectrofotómetro con flama aire-acetileno a 283.3 nm.

Solución estándar de plomo: Pesar 0.0100 g de plomo y disolver en 10 ml de HCl conc. en un matraz aforado de 100 ml. Adicionar 5 ml de APDC y 10 ml de MIBK. Agitar vigorosamente. Aforar con agua desionizada, obteniéndose 100 microgramos de plomo/ml. Leer a 283.3 nm.

Solución estándar de cadmio: Pesar 0.0100 g de cadmio y disolverlo en 10 ml de HCl (11) en un matraz aforado de 100 ml. Adicionar 5 ml de APDC y 10 ml de MIBK. Agitar vigorosamente. Aforar con HCl (1 % v/v), obteniéndose una concentración de 100 µg/ml. Leer a 228.8 nm.

CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS: (B)

DETERMINACION DE PLOMO Y COBRE:

Los límites prescritos para gelatina es de 30 ppm y otros alimentos según la FSL son 2 ppm en bebidas y 20 ppm para muchos otros alimentos. (34, 53) (B)

Pesar 4-6 g de muestra seca y molida malla num. 40 en una cápsula de porcelana y añadir 2.5 ml de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ al 50 % (w/v) y precalcinar por 1-2 hrs. en un plato eléctrico o bajo una lámpara de infrarrojo.

Llevar las cenizas a un horno o mufla a 500 °C, por 1 hr. Remover la muestra del horno con HNO_3 conc. cuidadosamente y regresar nuevamente al horno, evaporando previamente para evitar proyecciones.

Repetir el proceso de humectar hasta que las cenizas estén blancas.

Lavar las cenizas con 1 ml de HNO_3 conc. y transferirlas a un matraz volumétrico de 10 ml, añadir 1 ml de HNO_3 diluido. Repetir los lavados 2 veces, Aforar con agua desionizada.

ANÁLISIS:

Determinar plomo, cobre y elementos de interés utilizando las curvas estándar respectivas.

Solución estándar de cobre: Disolver 1.0000 g de cobre en un mínimo de volumen (1:1) de HNO_3 . Aforar a 1 l con HNO_3 1 % (v/v). Leer en el espectrofotómetro a 324.7 con flama A-AC y lámpara de HCL.

↓

Solución estándar de plomo: Disolver 1.998g de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ en un pequeño volumen de agua desionizada y aforar a 1 l. Leer a 283.3 nm con flama de A-AC y lámpara de HCL.

PESCADO Y PRODUCTOS DE PESCADO:

El límite de zinc para pescados y crustáceos según la FSC es de 50 ppm para plomo, según The Lead in Food Regulations (1961), es mayor que el límite de 2 ppm, ya que el pescado contiene naturalmente plomo. (34,53) (B)

METODOLOGIA:

Secar previamente a la muestra y molerla a malla 40. Pesar aproximadamente 5 g y llevar a un tubo digestor.

↓

Adicionar 5 ml de HClO_4 conc. y 5 ml de H_2SO_4 conc. Permitir que la reacción se lleve a cabo.

↓

Al disminuir la intensidad de la reacción llevar el tubo a un plato eléctrico en un aparato digestor. Calentar a baja temperatura (60 °C) por 30 min.

↓

Enfriar el tubo y añadir 10 ml de HNO_3 , regresar al digestor y calentar lentamente a 120 °C.

↓

Incrementar a 150 °C. Retirar la muestra cuando se vuelva negra.

↓

Enfriar y añadir 1 ml de H_2O_2 hasta que las muestras sean claras.

↓

Agitar el tubo y transferir cuantitativamente a un matraz aforado de 50 ml con agua desionizada.

Muchos elementos pueden ser determinados como Cu, Fe, As, etc:

Solución estándar para Zn: Disolver 1.0000 g de zinc en un mínimo de volumen de HCl 1:1 y aforar a 1 l con HCl 1 X. Leer a 213.9 nm en flama A-Ac y lámpara de HCL.

Solución estándar para Fe: Disolver 1.0000 g de fierro en 50 ml de HNO₃ 1:1. Aforar a 1 l con agua desionizada. Leer a 248.3 nm en flama de A-Ac y lámpara de HCL.

Solución estándar de As: Disolver 1.320 g de As₂O₃ en 25 ml de KOH al 20 % (w/v). Neutralizar con H₂SO₄ al 20 % con fenoftaleína. Utilizar agua desionizada. Leer a 193.7 nm en flama de A-Ac y lámpara de HCL. El límite para As según The Arsenic in Food Regulation (1959) es de 1 ppm en general.

Para la determinación de Pb y Cd se extraen de la solución anterior para concentrarlos:

Tomar 40 ml de la digestión y aforar a 100 ml con 5 ml de APDC y 5 ml de MIBK. Agitar vigorosamente por 5 min.

Adicionar agua desionizada antes de la marca.

Determinar Pb y Cd de la fase MIBK.

ANALISIS:

Los estándares deben ser tratados de la misma manera que las muestras, es importante que contengan la misma cantidad de ácido que las muestras, específicamente H₂SO₄.

LECHE. [B]

METODOLOGIA:

Tomar 5 ml de leche y llevarlos a un matraz aforado de 100 ml.

Adicionar 50 ml de TCA al 24 % (w/v) y aforar con agua desionizada.

Agitar la muestra a intervalos de 5 min. por 30 min. y filtrar.

Transferir una alícuota de 5 ml del filtrado a un matraz aforado de 50 ml y añadir 1 ml de solución de lantano al 5 % (w/v) y aforar con agua desionizada.

ANÁLISIS:

Hacer una mezcla estándar que contenga 5.0 mg de Ca/ l, 0.6 mg de Mg/ l, 1.6 mg de Na/ l, 5.0 mg de K/ l, 500 mg de La / l y TCA al 1.2 % (w/v). Todas las determinaciones deben ajustarse con un blanco de reactivos que contiene 500 mg de La /l y TCA al 1.2 %.

↓

Leer en flama de A-Ac y lámpara de HCL a 422.7 nm para el Ca, 285.2 nm para el MG y 780.0 nm para el K.

BEBIDAS y JUGOS DE FRUTAS. (EJ)

METODOLOGIA:

Diluir la muestra a menos de 3% de sólidos con agua desionizada en solución de ácido acético al 4 %.

↓

Aspergar directamente y leer a 283.3 nm para el Pb y 286.3 nm para el Sn. Utilizar flama de A-Ac y lámpara de HCL.

↓

Preparar estándares de plomo como Pb(NO₃)₂ en mezcla de agua desionizada y ácido acético al 4 %. Pesar 1.598 g de la sal de plomo y disolver con agua desionizada. Adicionar 40 ml de ácido acético al 4 % y aforar a 1 l con agua desionizada.

↓

Sol. estándar de Sn: Disolver 1.0000 g de estaño en 100 ml de HCL conc. mezclar con agua desionizada (800 ml aprox.) y adicionar 40 ml de ácido acético al 4 %, aforar a 1 l con agua.

Segun la British Stander Limits para el plomo tenemos 0.2 ppm para bebidas no alcohólicas, 0.5 ppm para jugos de frutas y 1.0 ppm en vinos. [34,53] (EJ)

El limite para el estaño segun la FSC (1953) recomienda 100 ppm para alimentos enlatados. [34,45]

ALIMENTOS SEMISOLIDOS.

METODOLOGIA:

Pesar 5-10 g de muestra y homogeneizar perfectaente con 40 ml de agua desionizada.

↓

Adicionar 10 ml de HCL conc. calentando a ebullición. Mantener la temperatura cuidadosamente por 5 min. máximo.

↓

Diluir con 100 ml de agua desionizada y filtrar.

↓

Adicionar HCl hsta lograr una Concentración no mayor a 5 N.

ANÁLISIS:

Tomar 10-20 ml y llevarlos con (HCl) a una concentración final no mayor a 5 N.

↓

Adicionar 5 ml de APDC agitando vigorosamente.

↓

Saturar con t-metilpenteno-2-ona o heptano-2-ona.

↓

Leer en flama de A-Ac y lámpara de HCl a 324.8 nm.

↓

Tomar 40 ml del filtrado y adicionar 5 ml de APDC agitando vigorosamente. Extraer con 5 ml de MIBK agitando y reposando.

↓

Tomar directamente de la fase de MIBK para la determinación de Pb y Cd.

↓

Solución estándar para el Cut Dissolver 1.0000 g de cobre en un mínimo de volumen de HNO₃ y aforar a 1 l con HNO₃ al 1 %. Leer a 324.8

Para el Plomo y Cadmio ya se ha mencionado la preparación de las soluciones estándar en metodologías anteriores.

DISCUSION DE MINERALES.

El principal enfoque de este capítulo es hacia los minerales o metales tóxicos que contaminan a los alimentos y productos manufacturados. Por lo mismo es necesario recurrir a técnicas analíticas altamente específicas y sensibles que detecten partes por millón (ppm) de dichos contaminantes.

La espectrofotometría por ser accesible es una de las más utilizadas pero presenta interferencias que se deben eliminar extrayendo los diferentes metales que las originan.

Contando con un espectrofotómetro de absorción atómica y personal capacitado esta técnica es superior a la espectrofotometría por ser rápida, sensible en algunos casos hasta menos de 1 µg/ml.

En general los métodos por espectrofotometría son ampliamente utilizados por su accesibilidad.

CONCLUSIONES.

Se llevó a cabo una revisión general de las técnicas analíticas para las proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales; evaluándose a las metodologías individual y conjuntamente, lográndose establecer alternativas útiles para el análisis como: el tratamiento previo de la muestra, tomando en cuenta su naturaleza (animal o vegetal), su composición y capacidad de disolución; elegir adecuadamente de las metodologías propuestas por medio de su evaluación en la sensibilidad y accesibilidad de las mismas.

Respecto a las técnicas gravimétricas y volumétricas, éstas resultan ser poco sensibles para muestras que contengan un bajo contenido del componente a cuantificar, éstas solo ofrecen accesibilidad en cuanto al instrumental. Es por ésta razón que su utilización se ha visto remplazada por metodologías más sensibles, precisas y exactas, verificándose lo anterior al revisarlas y comparárlas con respecto a las técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

Se observó que la espectrofotometría, en la mayoría de las determinaciones para los diferentes componentes de un alimento, ofrece alta sensibilidad (hasta $1 \mu\text{g/l}$), especificidad y exactitud, además de ser accesible y requerir poco tiempo en su desarrollo.

Respecto a la espectrofotometría en proteínas esta técnica es poco utilizable en la área de los alimentos, ya que la presencia de carbohidratos y lípidos interfieren en la solubilidad. Por lo que la proteína debe extraerse o precipitarse obteniéndose una solución con cierta pureza útil en las metodologías tales como Biuret, Folin-Ciocalteu, etc.

Se revisaron técnicas cromatográficas para los capítulos de carbohidratos y lípidos en la identificación y cuantificación de ésteres ácidos grasos por cromatografía de gases y carbohidratos por cromatografía líquida de alta presión por ser un método que ofrece alta sensibilidad. Lo que ha remplazado a técnicas laboriosas de extracción y poco exactas por presentar interferencias y diversas desventajas. Sin embargo, la cromatografía requiere de personal capacitado y reactivos de alto grado de pureza que elevan el costo de las determinaciones limitando su disponibilidad para uso normal en la industria alimentaria.

Se recabó información para la orientación en la selección de unas u otras técnicas recomendadas por organismos oficiales como la Dirección General de Normas Mexicanas, en caso de que la metodología no sea actualizada o resulte de poca exactitud para los requerimientos del análisis debe recurrir a el A.O.A.C. Siendo un ejemplo de éste caso la recomendación del análisis de deterioro de grasas TBA, que no está contemplado en la

norma oficial mexicana.

Por lo que respecta a los capítulos de vitaminas y minerales, el primero sugiere métodos espectrofotométricos para las vitaminas A y E por ser más confiables en comparación a las vitaminas B y H, actualmente puede recurrirse a la cromatografía que ofrece una excelente alternativa de análisis para las vitaminas en general.

La revisión y evaluación de minerales se limitó a la metodología de espectrofotometría por absorción atómica por utilizar equipo de alta precisión y las numerosas ventajas sobre la volumétrica y la espectrofotométrica en U.V. y visible las que involucran diferentes solventes y manipulación.

Con esta revisión y evaluación de técnicas se pretendió conjuntar la suficiente información sobre el manejo de la muestra, la concentración de determinado componente y considerar las posibles interferencias. Cabe señalar que la buena selección de la técnica analítica, no necesariamente debe satisfacer las necesidades del analista, sino que también dependerá de los recursos, capacidad y la infraestructura de la que se disponga. Por estas razones, el contar con información suficiente es una necesidad imperiosa para lograr adecuados y óptimos resultados.

BIBLIOGRAFIA

1. Association of Official Analytical Chemists. Fourteenth Edition (1984).
2. Aguilar Valdés A.; Hernández Olivera S.M.; Ramirez Venegas B.S. Tesis. Facultad de Química. U.N.A.M. (1982). Deslignificación de Esatrojo de Maíz por Pleurotus ostratus.
3. Aquirre García B.H. y Olivera Treviño Ma. de los Angeles. Tesis. Facultad de Química. U.N.A.M. (1981). Hidrólisis Continua de Sacarosa Mediante Invertas Inmovilizadas.
4. Andrew Streibwieser Jr. and Clayton H. Hestlock. Introduction to Organic Chemistry. Ed. Millan Publishing Co. Inc. (1981).
5. Aurand Leonard; Woods A. And Wils N. Food Composition and Analysis AVI BOOK. New York (1987).
6. Baudi Dergal S. Química de los Alimentos. Ed. Alhambra (1981).
7. Liigh E.G. and Dyer W.J. Biochem. and Phys. V. 37 No. 3 (1959). 911-917. A Rapid Method of total Lipid Extraction and Purification.
8. Bradford Marion M. Anal Biochem. 72 (1976) 248-254. A Rapid and Sensitive Metho for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye-Binding.
9. Idem., Anal. Biochem. 81(1977) 478-480. An Evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye-binding. Methods for Quantitative Protein Determination.
10. Idem., Anal Biochem. 81 (1977) 485-487. Assay for Protein by Dye-Binding.
11. Caserio C.M.; Roberts D.J.; Stewart K. Química Orgánica. Fondo educativo Interamericano S.A. (1974).
12. Dabrio Bafuls. Cromatografía de Gases II. ed. Alhambra (1973).
13. Dickes G.J. and Nicholas P.V. Gas chromatography in Food Analysis Butterworths (1976).
14. Dubois M.; Gilles K.A.; Hamilton J.K.; Rebers P.A. and Smith F. Anal. Biochem. 28 (1956) 350-356. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
15. Ellman G. Anal. Biochem. 3 (1962) 40-48. The Biuret Reaction: Changes in the Ultraviolet Absorption Spectra and the Application to the Determination of Peptide Bonds.
16. Fennema U.R. Introducción a la Ciencia de las Alimentos. ed Reverté, S.A. (1983).

17. Gsteiner Federico. Métodos Físicoquímicos para la Determinación de Vitaminas. Manuel Marín editor. Barcelona 1944.
18. Harold H. Mc.Harr y Esquivel Benjamin. Cromatografía Líquida de Alta Presión. Serie. Gral. de la Organización de U.S.A. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnología. Washington, D.C. (1980).
19. Hart E.; Leslie H.H. and Johnstone H. Modern Food Analysis. Spring Verlay, N.Y. (1971).
20. Hayes G.E. and Roming H.O. Modern Quality Control. (1977).
- 21 Howard E.B.; Herbold H.H. Nutrición in Clinical Care. Mc Graw Hill. Second Edition.
22. Jacobs M.B. The Analysis of Foods and Food Products. Robert Krieger Publishing Co. Inc. (1958).
23. Jacobs S. Analyst 87n (1964) 489-494. The Effect on Temperature on the Kjeldahl Digestion Process.
24. Idem Method of Biochem. Anal. 13 (1965) 241-263. The Determination of Nitrogen in Biological Material.
- 25 Journal of Agriculture and Food Chemistry 22 (1974) 1034.
26. Layne Ennis. Spectrophometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. Methods in Enzimology.
27. Lake G.R. and Mc. Culchan P. Anal. Biochem. (1951) 1634-1638. Effects of Digestion temperature on Kjeldahl.
28. Lenhinger A.L. Bioquímica. Ed. Omega. S.A. Barcelona (1977).
29. Littlewood A. B. Gas Chromatography. Principles, Techniques and Applications. Academic Press. (1970).
30. Lowry O.H.; Rosebrough N.J.; Farr A.L. and Randall R.J. J. Biol. Chem. 193 (1957).
31. Martin W.D.; Mayes A.P. and Rodwell W.V. Bioquímica. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México D.F. (1982).
32. Morrison R.T.; Boyd R.N. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. (1970).
33. Norma Oficial Mexicana del Aceite de Cártamo y Maíz.
34. Pearson D. The Chemical Analysis of Foods. J. and Churchill (1970).
35. Pérez Avila R. y Verde Calvo J.R. Tesis. Fac. de Química. U.N.A.M. (1978). Curso Práctico de Laboratorio de Fermentaciones Industriales.
36. Pigman W. The Carbohydrates. Chemistry, Biochemistry and Physiology Academic Press Inc. (1957).

37. Reinsner A.H.; Nemes F. and Bucholtz. Anal. Biochem. 64 (1974) 207-212.
38. Robinson J.W. Atomic Absorption Spectroscopy (1975).
39. Sando Ch. E. Plant Physiol. 3 (1928) 155-184. Lipids and their Estimation in Vegetable Tissue.
40. Schettner W. and Weisman C. Anal. Biochem. 56 (1973) 502-514. A Rapid, Sensitive and Specific Method for the Determination of Protein in the Dilute Solution.
41. Schmidt Care L.A. The Chemistry of the Aminoacids and Proteins (1944).
42. Sedmek J. And Sidney E.G. Anal. Biochem. 77 (1977) 544-552. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G-250.
43. Shallenberger R.S. and Birch G.B. Sugar Chemistry, the AVI Publishing Company, Inc. (1975).
44. Sinnhuber R.O. and Lu I.C. Food Technology 12, 9 (1958) Characterization of the Red Pigment in the 2-thiobarbituric Acid Determination of Oxidative Rancidity.
45. Slavin Morris. Atomic Absorption Spectroscopy. Wiley Interscience Publication (1978) V.II.
46. Somogyi H.J. Biol. Chem. 160 (1945) 61-68. A New Reagent for the Determination of Sugar.
47. Southgate D.A.T. Determination of Food Carbohydrates Applied Science Publishers. (1966).
48. Spectro Thomas Anal. Biochem. 86 (1978) 142-146. Refinement of the Coomassie Brilliant Blue G-250. Method of Protein Quantitation.
49. Sumner J.E. J. Biol. Chem. 47 (1921) 5.
50. Idem, J. Biol. Chem. 62 (1924) 287.
51. Sumner J.E. and Howell S.F. J. Biol. Chem. 108 (1935) 51-54.
52. Technique un Aminoacids, Technicon International Division S.A. Geneve Switzerland.
53. Valle Vega P. Toxicologia de los Alimentos. Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud. Organización Panamericana de Salud. O.M.S.
54. Vallejo C.G. and Lagunas R. Anal. Biochem. 36 (1976) 207-212.
55. Vorbeck Marie L.; Mattick R.; Frank A.L. and Pederson C.S. Anal. Biochem. 33, 11 (1961). Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids for Fatty Acids for Gas-Liquid Chromatography.
56. Vogel A.I. Quimica Analitica Cuantitativa. Ed. Kapeluz. Buenos Aires (1973).

57. Welcher F.J. Standard Methods of Chemical Analysis V. III A.D. Van Nostrand Company Inc. Princeton.

58. Yose R.W. Practical Liquid Chromatography and Introduction. Perkin Elmer Manual.

59. Yu I.C. and Sinnhuber R.D. Food Technology II (1957) 104.

A. Información Interacadémica del Departamento de Estudios de Posgrado en Alimentos. División Ingeniería de la Facultad de Química. U.N.A.M. por M. en C. Francisca Iturbe Chifas.

B. Información obtenida de los Manuales de los temas Mencionados en la Biblioteca de Perkin-Elmer.

C. Pharmacopeia of the United States. Sixteenth Revision XVI.