

20  
Ref<sup>o</sup>



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTITLAN**

**" VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA  
CUANTIFICAR PROTEINAS EN HARINA DE SOYA  
DESGRASADA "**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A**

**JULIETA GARCIA HERNANDEZ**

**ASESOR: I. B. Q. SATURNINO MAYA RAMIREZ**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



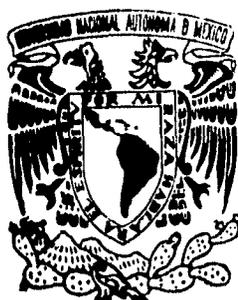
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

20  
rej°



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“ VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA  
CUANTIFICAR PROTEINAS EN HARINA DE SOYA  
DESGRASADA ”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
**JULIETA GARCIA HERNANDEZ**  
ASESOR: I. B. Q. SATURNINO MAYA RAMIREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Validación del Método Kjeldahl para Cuantificar Proteínas  
en harina de Soya Desgrasada"

que presenta la pasante: Julieta García Hernández

con número de cuenta: 8255955-5 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de Agosto de 1996

PRESIDENTE Dr. Requel López Arellano

VOCAL M. en C. José A. Garduño Rosas

SECRETARIO Ing. Saturnino Reyes García

PRIMER SUPLENTE Dr. Rosalva Meléndez

SEGUNDO SUPLENTE Dr. Natividad Venegas Carrer

A Dios, agradezco, por darme,  
la oportunidad de vivir.

A mis Padres:

Jairo (†), por habernos brindado  
su apoyo e inducirnos al camino  
de la superación.

Rosalía, por sus sacrificios y en  
quien mi padre a dejado la unión  
y dirección de su familia.

A mis hermanos, por los  
gratos instantes vividos  
en familia.

A mi esposo Mario, por ser el  
compañero con quien he compartido  
tristezas y alegrías, agradeciendo  
su cariño, apoyo y comprensión.

A mi hija Carolina, que es el  
motivo de mi superación.

A Lucy, con amplio sentimiento  
de sinceridad, por su apoyo  
y confianza.

A mis sinodales, por su desinteresado  
y valioso apoyo brindado durante la  
realización de este trabajo. Gracias.

A todas aquellas personas que  
de alguna u otra forma me  
permitieron concluir este  
trabajo satisfactoriamente.

ESTA TESIS SE REALIZO EN LA ADMINISTRACION  
CENTRAL DE LABORATORIO Y SERVICIOS CIENTI-  
FICOS. A QUIEN REITERO MIS AGRADECIMIENTOS  
POR EL APOYO PROPORCIONADO.

## INDICE GENERAL

INTRODUCCION	i
1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	ii
1.1 JUSTIFICACION	iii
1.2 OBJETIVOS	iii
2.0 ANTECEDENTES	1
2.1 Generalidades sobre semilla de soya y sus productos.	1
2.2 Obtención y composición de productos de soya.	4
2.2.1 Harina de soya.	4
2.2.2 Concentrados de proteína de soya.	6
2.2.3 Aislados de proteína de soya.	6
2.3 Generalidades sobre El Sistema Armonizado de Codificación y Clasificación de Mercancías.	7
2.3.1 Clasificación arancelaria de la harina de soya desgrasada (diferencia con la harina de soya integral, aislados y concentrados).	9
2.4 Definiciones y fundamentos teóricos del Método Kjeldahl.	11
2.5 Principios de validación de métodos analíticos.	14
2.5.1 Definiciones.	15
2.5.2 Características que son necesarias evaluar en una validación de métodos analíticos.	16

3.0 PARTE EXPERIMENTAL	22
3.1 Preparación de la muestra de harina de soya desgrasada.	22
3.1.1 Molienda	22
3.1.2 Determinación de humedad	22
3.1.3 Determinación de grasa	22
3.2 Determinación de proteínas en la muestra de harina de soya desgrasada.	23
3.3 Identificación microscópica de harina de soya.	26
3.4 Validación del método analítico para cuantificación de proteínas.	28
3.4.1 Selección de estándar primario.	28
3.4.2 Precisión del sistema de medición.	28
3.4.3 Linealidad del sistema de medición.	29
3.4.4 Exactitud del método analítico.	30
3.4.5 Linealidad del método analítico.	30
3.4.6 Precisión del método analítico.	31
3.4.7 Estabilidad analítica de la muestra.	32
3.4.8 Límite de detección y cuantificación.	33
4.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	34
CONCLUSIONES	54
ANEXOS	56
BIBLIOGRAFIA	

## INDICE DE CUADROS

#	N o m b r e	Pá g i n a
1	Composición de la semilla de soya y sus partes	2
2	Clasificación de los productos de soya en La Tarifa de la Ley de Impuesto General de Importación.	9
3	Determinación de grasa y humedad en la muestra de harina de soya.	34
4	Determinación de proteínas en la muestra de harina de soya.	35
5	Tabla de resultados de la variable de respuesta Y [ $H_2SO_4$ ] (ml) para la determinación de la precisión del sistema de medición.	36
6	Tabla de resultados de Y ( $H_2SO_4$ ml) y X (mg de nitrógeno), para la determinación de la linealidad del sistema de medición.	38
7	Tabla del contenido de proteínas de borato de amonio y de harina de soya, y su comparación con el % de proteínas en muestra adicionada, por medio de los ml de $H_2SO_4$ gastados.	42
8	Tabla de resultados de % de recobro, para la determinación de la exactitud del método analítico.	44
9	Tabla de resultados % de proteína adicionada (X) y % de proteína recuperada (Y), y ml de $H_2SO_4$ adicionado (X) VS. ml de $H_2SO_4$ recuperado (Y), y ml de $H_2SO_4$ adicionado (x) y ml de $H_2SO_4$ recuperado (y).	44
10	Tabla de determinación de proteínas con analistas y días diferentes.	48
11	Tabla de ANADEVA.	49
12	Tabla de resultados del contenido de proteínas a las 20 43 y 60 hrs. para estabilidad analítica de la muestra.	50
13	Tabla de resultados de Y ( $H_2SO_4$ ml) y X (mg nitrógeno) en la determinación del límite de cuantificación.	52

## INDICE DE FIGURAS

#	N o m b r e	Página
1	Diagrama de proceso para cuantificación de proteínas con equipo Tecator.	25
2	Características más notables de la harina de soya para su identificación a gran aumento.	27
3	Gráfica de la relación de ml de $H_2SO_4$ vs mg de nitrógeno.	39
4	Gráfica de la relación % de proteína recuperada vs % de proteína en muestra adicionada.	45
5	Gráfica de la relación de ml de $H_2SO_4$ adicionado (x) vs. ml de $H_2SO_4$ recuperado (y).	46

## I.- INTRODUCCION

Desde hace muchos siglos, la soya se consume en los países del mundo oriental; sin embargo, en los países del mundo occidental su uso ha empezado en forma muy reciente; tal es el caso de los Estados Unidos, donde esta leguminosa ha llegado a ser una de las cosechas más importantes. En las últimas dos décadas su desarrollo científico y tecnológico se debe básicamente a que la proteína de soya es de buena calidad y tiene propiedades funcionales adecuadas para utilizarlas como sustituto de proteínas animales en la fabricación de algunos alimentos.

En la mayoría de los países los productos lácteos en sus diferentes formas, al igual que los derivados cárnicos, son cada día más difíciles de obtener a bajo precio, por lo que la industria alimentaria ha tenido que buscar sustitutos de estas proteínas tradicionales, y ha encontrado en la soya una muy adecuada.

Recientemente, México importa con frecuencia de Estados Unidos una gran cantidad de soya y productos derivados de ésta, tal es el caso de la harina de soya desgrasada y, en cierta medida, los concentrados y aislados protéicos de soya. Estos tres productos tienen tratamientos arancelarios distintos y una forma de diferenciarlos es por el contenido de proteínas, éste contenido es determinado por el método Kjeldahl, el cual requiere ser validado para demostrar su alto grado de confiabilidad.

## 1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México forma parte del grupo numeroso de países que han adoptado el Sistema Armonizado de Codificación y Clasificación de Mercancías, para fines de comercio exterior. En este sistema, como su nombre lo indica, las mercancías están codificadas por una serie de números que permitirán localizarlas con rapidez. La harina de soya desgrasada, en este Sistema Armonizado, tiene una codificación diferente a la que corresponde a la harina de soya integral, así como a los concentrados y aislados de proteína de soya; por esta razón es imprescindible poder diferenciar dicha harina desgrasada de los otros productos, a fin de emitir un dictamen técnico que conduzca a una clasificación correcta en dicho Sistema Armonizado.

La Administración Central de Laboratorio y Servicios Científicos (ACLYSC), dependiente de la Administración General de Aduanas, tiene como uno de sus objetivos dar apoyo técnico en la identificación de mercancías de difícil identificación que se importan al país, para fines de fiscalización. Con la aceptación del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos de América y Canadá, las técnicas analíticas desarrolladas y practicadas en la Administración Central de Laboratorio y Servicios Científicos deben ser confiables, a fin de estar en igualdad de condiciones con las de los países mencionados.

Asimismo, el programa de acreditación de la Administración del Laboratorio Central al Sistema Nacional de Acreditación de Laboratorios de Prueba (SINALP), requiere de la validación de los métodos analíticos que se practican en él.

#### 1.1 JUSTIFICACION.

Este proyecto surge de la necesidad de desarrollar un método exacto y preciso para la determinación de proteínas en la harina de soya desgrasada; el cual nos conduce a diferenciar este producto, de otros obtenidos apartir de la soya (concentrados y aislados), con diferente codificación en el Sistema Armonizado.

#### 1.2 OBJETIVO

Validar el método Kjeldahl, utilizando el equipo "Tecator"<sup>®</sup> para cuantificar proteínas en harina de soya desgrasada.

## 2.0 ANTECEDENTES

Con el propósito de conocer las características más importantes de la soya y sus productos, a continuación se hace una breve reseña.

### 2.1 GENERALIDADES SOBRE SEMILLA DE SOYA Y SUS PRODUCTOS.

La soya pertenece a la familia de las Leguminosas, subfamilia Papilionacea, y al género *Glycine max.* La soya es una leguminosa típica que presenta variación en color, tamaño y forma, dependiendo de la variedad y condiciones en las que crece.

COMPOSICION QUIMICA DE LA SOYA.- La cascarilla, el hipocótilo y el cotiledón de la soya están constituidos fundamentalmente por proteínas, grasas y carbohidratos (cuadro No. 1). En los cotiledones, el aceite está almacenado en pequeños compartimentos llamados esferosomas (0.2-0.3 $\mu$  de diámetro) mientras que la proteína se localiza en cuerpos de mayor tamaño (2-20 $\mu$  de diámetro) llamados aleuronas o cuerpos proteicos. Los esferosomas se encuentran dispersos entre los cuerpos proteicos, que a su vez consisten en aproximadamente 98% de proteínas, con pequeñas cantidades de lípidos y ácido fítico, y suman aproximadamente 60-70% de la proteína total de la soya desgrasada. Las proteínas de la soya son fundamen-

talmente globulinas, por lo que son solubles en soluciones diluidas de varias sales, insolubles en agua y precipitan en su punto isoelectrico, generalmente en el intervalo de 4.2-4.8.

Cuadro No.1. Composición de la semilla de soya y de sus partes, en %.

	Proteína				Porción de la semilla
	(N X 6.25)	Grasa	CHOS	Cenizas	
Soya total	40	21	34	4.9	-
Cotiledón	43	23	29	5.0	90
Cascarilla	9	1	86	4.4	8
Hipocótilo	41	11	43	4.3	2

M.P Tombs(33)

Los carbohidratos están compuestos por polisacáridos, algunos oligosacáridos como estaquiosa (3.8%), rafinosa (1.1%) y sacarosa (4.5%), y monosacáridos como arabinosa y glucosa en muy pequeñas concentraciones. La acumulación de aceites en las oleaginosas viene acompañada de un decremento

de los carbohidratos, lo que indica que es muy probable que éstos sean los precursores en la síntesis de los lípidos en este tipo de granos. Los ácidos nucleicos se encuentran en muy baja concentración y son incluidos como nitrógeno total cuando la determinación de proteína se hace por el método de Kjeldahl.

El contenido de proteínas en la soya y sus productos, se determina multiplicando el nitrógeno total por 6.25, debido a que de cada 100 g de proteínas, 16 g corresponden a nitrógeno ( $100/16 = 6.25$ ).

En el mercado se encuentran varias presentaciones comerciales de derivados de la soya, que se clasifican de acuerdo con su concentración de proteínas. Las harinas sin desgrasar son las de menor contenido de proteína, que aumenta en las harinas desgrasadas, los concentrados y finalmente en los aislados. Cada uno de estos productos tiene ciertas características y propiedades funcionales que los hacen adecuados para utilizarse en la elaboración de diferentes alimentos.

## 2.2 OBTENCION Y COMPOSICION DE PRODUCTOS DE SOYA. (p. 22, 23, 24, 25, 26)

### 2.2.1 HARINA DE SOYA

En la actualidad se fabrican en forma industrial una gran variedad de harinas de soya; las principales son las harinas sin desgrasar y las harinas desgrasadas, cuya presentación física puede ser en forma de hojuelas, en gránulos o en polvo. Las harinas son las formas menos refinadas y tienen un mínimo de proteína que varía de 40 a 55% según el contenido de grasa .

HARINAS SIN DESGRASAR.- Se preparan haciendo pasar la semilla de soya a una velocidad constante a través de un cocedor a vapor que trabaja a presión; durante este proceso, la cascarilla, que está compuesta básicamente por polisacáridos celulósicos, se elimina y el grano descascarado se muele a una finura de malla 100, o más fino. La composición química de esta harina es prácticamente la misma que la del cotiledón ya que son mínimos los cambios que sufre el grano de soya durante la manufactura de este producto.

Los lípidos de las harinas sin desgrasar contribuyen al valor nutritivo de la soya, ya que su aceite contiene un alto porcentaje de ácidos grasos indispensables poliinsaturados, aproximadamente 50% linoleico y 9% linolénico. La lecitina y los tocoferoles que contiene la soya funcionan como antioxidantes naturales y ayudan a estabilizar el aceite, y

evitar las reacciones de deterioro. La soya tiene un alto contenido en lecitina que hace a su aceite una buena fuente comercial de este valioso fosfolípido.

**HARINAS DESGRASADAS.**- Son las más comunes en el mercado ya que la extracción del aceite de soya resulta económicamente muy ventajoso, lo que ha dado origen a una industria muy importante. La soya se descascara y se muele, procediendo a la extracción del aceite con disolventes como hexano; las partículas de soya desgrasada se pasan por un eliminador de disolvente para recuperar el hexano. Esta forma de soya es la más utilizada en la industria alimentaria.

Existe otro sistema para la obtención de aceite de soya que está basado en métodos mecánicos de compresión. La soya limpia se fragmenta primeramente para reducirla de tamaño, y posteriormente se seca con aire caliente; en estas condiciones es prensada, rompiéndose la estructura celular y liberándose el aceite de los esferosomas, que lo contienen.

El sistema de prensado es enfriado para evitar un sobrecalentamiento que propicie las reacciones de oxidación; los lípidos extraídos se almacenan en tanques de reposo para separar los sólidos en suspensión, que son recirculados nuevamente a la prensa. Actualmente, los sistemas con disolventes son más empleados que los métodos mecánicos para la producción de aceite de soya.

### 2.2.2 CONCENTRADOS DE PROTEINA DE SOYA. (21, 24, 27, 28)

Estos productos son más refinados y contienen cerca del 70% de proteínas. Durante su manufactura se elimina la mitad de los carbohidratos y algunos otros componentes de menor importancia. Actualmente se pueden emplear tres diferentes procesos. El primero utiliza una solución de alcohol al 60-80% para eliminar ciertas fracciones solubles como son los oligosacáridos, parte de las cenizas y algunos otros compuestos de bajo peso molecular; en estas condiciones, las proteínas y los polisacáridos precipitan debido a que son insolubles en alcohol, y se pueden recuperar al someterlos a una eliminación de disolvente, quedando un concentrado proteico como residuo final. El segundo proceso implica la extracción de las proteínas de soya en su punto isoeléctrico. El tercer método utiliza calor húmedo para desnaturalizar e insolubilizar las proteínas de la harina, seguido de un lavado con agua para eliminar los azúcares y otros componentes de bajo peso molecular.

### 2.2.3 AISLADOS DE PROTEINA DE SOYA.

Estos productos son la forma comercial más purificada de la soya, ya que contienen 90% o más de proteínas y se obtienen de los concentrados al eliminarles los polisacáridos, los oligosacáridos y otros componentes. El proceso de aislamiento se basa en las diferencias de solubilidad de las fracciones

globulínicas de la soya con respecto al pH. Para la obtención de los aislados se parte de harinas desgrasadas que han recibido un tratamiento térmico mínimo y la extracción se efectúa con agua y álcalis a pH 7.5.-8.5; el residuo insoluble contiene básicamente polisacáridos que se eliminan por centrifugación. El extracto es acidificado a un pH de 4.5 que precipita la fracción proteica mayor en forma de crema que se separa del suero o fracción soluble por centrifugación; posteriormente se lava y neutraliza con hidróxido de sodio para resolubilizarla, y finalmente se pasa por un secador de espreas obteniéndose un proteinato de sodio que es más soluble en agua que la proteína en su punto isoeléctrico. También se pueden obtener proteínas en forma de calcio y potasio. Los aislados contienen compuestos de bajo peso molecular como saponinas, fosfolípidos, isoflavonas y algunos glucósidos.

### **2.3 GENERALIDADES SOBRE EL SISTEMA ARMONIZADO DE CODIFICACION Y CLASIFICACION DE MERCANCIAS. (4.4)**

Desde tiempos remotos, ha existido un interés en clasificar las mercancías. Este interés surgió del deseo de las autoridades de aplicar impuestos sobre las mercancías que circulaban dentro de sus territorios o através de las líneas fronterizas. Más tarde, con el desarrollo de las sociedades

industrializadas, cobró gran importancia el saber el nivel de tal comercio aún cuando no se aplicaran impuestos. Posteriormente se establece el desarrollo del Sistema Armonizado de Codificación y Clasificación de Mercancías, capaz de cumplir con los principales requisitos de las autoridades aduaneras, estadísticas, transportistas y productores.

De esta manera los objetos transportables que sistematiza, de forma lógica, familias o grupos de mercancías se clasifican con base a tres principios fundamentales: 1) la identificación de la estructura material de los objetos en cuanto a su origen animal, vegetal o mineral; 2) la clasificación de los productos de acuerdo con las cadenas productivas, de suerte que las materias primas preceden a los productos semielaborados y procesados en una escala ascendente de capítulos, partidas, subpartidas y fracciones, y 3) la consideración del uso, el destino y la función de los objetos, lo cual orienta al modelo clasificatorio cuando no es posible utilizar los principios anteriores. Sin embargo, para aquellas mercancías de difícil identificación, es necesario contar con un dictamen técnico para poder clasificarlas de manera correcta. En México se tiene el apoyo de La Administración Central de Laboratorio y Servicios Científicos para identificar este tipo de mercancías.

2.3.1 Clasificación arancelaria de la harina de soya des-  
 grasada (diferencia con la harina de soya integral,  
 aislados y concentrados). (4.9)

Actualmente México importa una gran cantidad de soya y productos derivados de ésta. Dentro de estos productos se encuentran la harina de soya desgrasada, la integral, los concentrados y aislados protéicos de soya; la ubicación y clasificación correcta de estos y otros productos en la Tarifa de la Ley del Impuesto General de Importación permite identificar, si las mercancías están sujetas a permisos (franquicia sanitaria) ó autorizaciones, también permite determinar con exactitud el monto de los impuestos correspondientes. A continuación se presentan los requerimientos de los productos de soya para su importación.

Cuadro No. 2. Clasificación de los productos de soya en La Tarifa de la Ley del Impuesto General de Importación.

Partida	Fracc.		Unidad	Tasa Aranc	Requisito México
2106.	10.01	Concentrado de proteína de soya.	Kg	Ex.	f5,ln,NE, r0,Sl,L
2304.	00.01	Harina de soya desgrasada.	Kg	15%	A4,f5,ln, r0,L
3504.	00.06	Aislado de proteína de soya	Kg	10%	f5,r0,Sl, L

Debido a que los requerimientos y la tasa arancelaria de los tres productos de soya son distintos (ver anexo 1), surge la necesidad de diferenciarlos por medio del contenido de proteínas, éste contenido es determinado por el método Kjeldahl, el cual requiere ser validado para demostrar su alto grado de confiabilidad.

#### 2.4 DEFINICIONES Y FUNDAMENTOS TEORICOS DEL METODO KJELDAHL (EQUIPO TECATOR<sup>®</sup>). (4 s. 12. 20)

El método Kjeldahl es considerado el más antiguo de todos los métodos analíticos usados para determinar nitrógeno total contenido en sustancias orgánicas e inorgánicas, que aún está vigente.

Johan Kjeldahl inició la técnica calentando la muestra en ácido sulfúrico concentrado cerca del punto de ebullición (330 °C). Después adiciona permanganato de potasio para completar la oxidación. El primer cambio en el método fué la adición de varios metales como catalizadores en la mezcla de digestión para acelerar la digestión como: cobre, hierro y selenio. El siguiente cambio fué la adición de sulfato de potasio en la mezcla de digestión, para incrementar la temperatura de digestión arriba del punto de ebullición del ácido sulfúrico (330 °C), por lo tanto el tiempo de digestión fué menor. Con la adición de peróxido de hidrogeno o ácido perclórico a la mezcla de digestión, se observó que el proceso de digestión era más rápido.

Sin embargo, el principio básico de este método (obtención por oxidación del nitrógeno orgánico a ión amonio) no ha sido modificado substancialmente desde que éste fue introducido. El método ha sufrido cambios, tales como: el uso de aparatos especiales para llevar a cabo la digestión, los matraces Kjeldahl de 800 ml fueron reemplazados por más

pequeños, los cuales son colocados en bloques para llevar a cabo la digestión. Otra innovación al método Kjeldahl es el uso de un sistema rápido o el uso de energía de microondas para inducir la digestión. El amonio generado es normalmente obtenido por destilación por arrastre alcalino y determinado por titulación ácida, espectrofotométrica, o el uso de un electrodo ión-específico. El último procedimiento es el menos usado.

La determinación del contenido de nitrógeno total y proteínas por el método Kjeldahl con digestión en tubo (en bloque) y aparato de destilación automatizada (TECATOR, Inc., Herndon, VA) empieza a incrementar su uso, ya que son equipos que ocupan poco espacio y de fácil instalación en el laboratorio. Además, con el desarrollo de estos equipos se logró la eficacia, velocidad y seguridad que se requiere, reduciendo tiempo y esfuerzo.

Al igual que con el método original, el uso del Tecator se basa en la descomposición de los compuestos nitrogenados orgánicos, por ebullición con ácido sulfúrico.

El hidrógeno y carbón de la materia orgánica se oxidan hasta agua y dióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en dióxido de azufre, el cual reduce el material nitrogenado a amoníaco. Este amoníaco se libera después por la adición de hidróxido de sodio, y se destila recibiendo en una solución al 4% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido (usando como indicador una mezcla de verde de bromocresol y rojo de

metilo). En este método se emplea catalizador a base de selenio, para acelerar la digestión.

Se aplica para la determinación de proteínas en productos alimenticios, utilizando factores para convertir el nitrógeno a proteínas.

La cantidad de muestra que usualmente se debe pesar en el macro-Kjeldahl es de 0.5 a 1.0 gramo, una cantidad suficiente para minimizar la heterogeneidad. Para muestras con tamaño de partícula grande es importante lograr la homogeneidad de ésta. Para productos vegetales y otros similares, el tamaño de la partícula se debe reducir a malla 20.

## 2.5 PRINCIPIOS DE VALIDACION DE METODOS ANALITICOS. (3, 11, 13, 14, 16)

Los antecedentes históricos se remontan a 1906 año en que es creada la FDA (Food and Drug Administration), la cual dictaminaba acerca de la calidad de los medicamentos y alimentos en U.S.A.

En la década de los 60's la FDA concentró sus esfuerzos para controlar los productos comercializados y hacia 1976 surge por primera vez el concepto de VALIDACION aplicado a proceso incluido en las CGMP (Current Good Manufacturing Practices).

A mediados de los 80's, el auge de las computadoras influenció virtualmente para que los principios de validación fueran aplicados universalmente de forma fácil y rápida.

La validación del método puede definirse como el proceso debidamente documentado, por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La validación se divide en:

**VALIDACION PROSPECTIVA.-** Evidencia documentada de que un método analítico, cumple su propósito, basado en un protocolo preplaneado.

**VALIDACION RETROSPECTIVA.-** Evidencia documentada de que un método analítico, cumple su propósito, basado en la revisión y análisis de información histórica.

Las características fundamentales que deben poseer los métodos analíticos son: exactitud, linealidad, precisión repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección y de cuantificación. Estas características deberán comprobarse empleando las técnicas estadísticas adecuadas, material y equipos calibrados.

El proceso de validación de un método en particular está basado en principios científicos adecuados y es optimizado para propósitos prácticos de medición, además debe satisfacer regulaciones que en la actualidad emiten las normas oficiales.

#### **2.5.1 DEFINICIONES.**

**ANALITO.-** Componente a determinar en la muestra, empleando un método analítico.

**ESPECIFICACIONES.-** Son los límites físicos, químicos, biológicos y microbiológicos, dentro de los cuales los resultados de los análisis deben de localizarse, cuando son determinados por la metodología de prueba.

**ESPECIFICIDAD.-** Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

**MUESTRA.-** Porción discreta y representativa de un producto que contiene un analito.

MUESTRA ADICIONADA.- Porción discreta y representativa de un producto a la que se le adicionan cantidades conocidas de analito, que es empleado en la validación de métodos analíticos.

INTERVALO DE UN METODO ANALITICO.- Es el intervalo entre los niveles superior e inferior de la sustancia de interés (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal utilizando el método descrito.

REPETIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos aparatos y técnicas.

REPRODUCIBILIDAD.- Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios utilizando el mismo y/o diferentes equipos.

#### **2.5.2 CARACTERISTICAS QUE SON NECESARIAS EVALUAR EN UNA VALIDACION DE METODOS ANALITICOS (1)**

Para poder demostrar la confiabilidad de un método analítico, debe comprobarse, que los procesos a los que se someten las muestras (métodos) y los sistemas, sean evaluados mediante las siguientes características:

**PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION.-** La precisión del sistema de medición, es el grado de concordancia entre mediciones analíticas individuales obtenidas bajo las mismas condiciones de medición, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea de la solución patrón. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación.

**CRITERIO:** El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 1.5% para métodos titrimétricos. (38)

**LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.-** Es la relación que se establece mediante un modelo lineal entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad de muestra.

**CRITERIO:** a) La relación lineal simple entre la cantidad de analito y la propiedad medida debe ser altamente significativa. b) De preferencia la ordenada al origen de la relación lineal simple cantidad de analito y la propiedad medida, debe ser estadísticamente igual a cero. c) El coeficiente de determinación de la relación lineal simple, debe ser mayor a 0.98, o la falta de ajuste a la relación lineal simple, no debe ser estadísticamente significativa.

**EXACTITUD DEL METODO ANALITICO (EXACTITUD AL 100%).-** La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de la muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas del analito.

CRITERIO: a) El intervalo de confianza (IC) para la media, debe incluir el 100%, para métodos titrimétricos (98-102%). b) El coeficiente de variación no debe ser mayor de 3%, si el sistema de medición es fisicoquímico; y no mayor a 5%, si el sistema de medición es biológico y/o a la magnitud preestablecida, acorde a la variación que dependa de la aplicación del método.

**LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO.-** Es la relación que se establece mediante un modelo lineal, entre una propiedad medible (cantidad de muestra recuperada) y el valor real de la propiedad (cantidad de muestra adicionada).

CRITERIO: a) La relación lineal (% adicionado VS % recuperado) debe ser altamente significativa. b) El coeficiente de determinación de la relación lineal debe ser mayor de 0.98. c) La pendiente de la relación lineal debe ser igual a la unidad. d) La ordenada al origen de la relación lineal debe ser igual a cero.

**PRECISION DEL METODO ANALITICO.-** La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de Desviación Estándar o del Coeficiente de Variación. La precisión es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico, bajo condiciones normales de operación.

CRITERIO: a) El coeficiente de variación no debe ser mayor de 3% si el sistema de medición es fisicoquímico. b) Los analistas no deben presentar un efecto significativo en el resultado analítico, en caso contrario, el efecto desde un punto de vista práctico, debe ser como máximo, un valor preestablecido. c) Los análisis para un mismo analista no deben presentar un efecto significativo en la determinación analítica, en caso contrario, el efecto desde un punto de vista práctico debe ser como máximo un valor preestablecido.<sup>4)</sup>

**ESTABILIDAD ANALITICA.-** Son las condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado. Se divide en:

- Estabilidad analítica para muestras dependientes: Se aplica en muestras que provienen de la misma pesada. Las muestras que se generan en cualquier etapa establecida del método analítico, son sometidas a distintas condiciones de estabilidad.

- Estabilidad analítica para muestras independientes: Se aplica para muestras que se obtienen por pesadas independientes, también son sometidas a diferentes condiciones de estabilidad.

CRITERIO: La determinación analítica de la muestra reanalizada, debe ser estadísticamente equivalente a la determinación analítica inicial.

**LIMITE DE DETECCION.-** Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

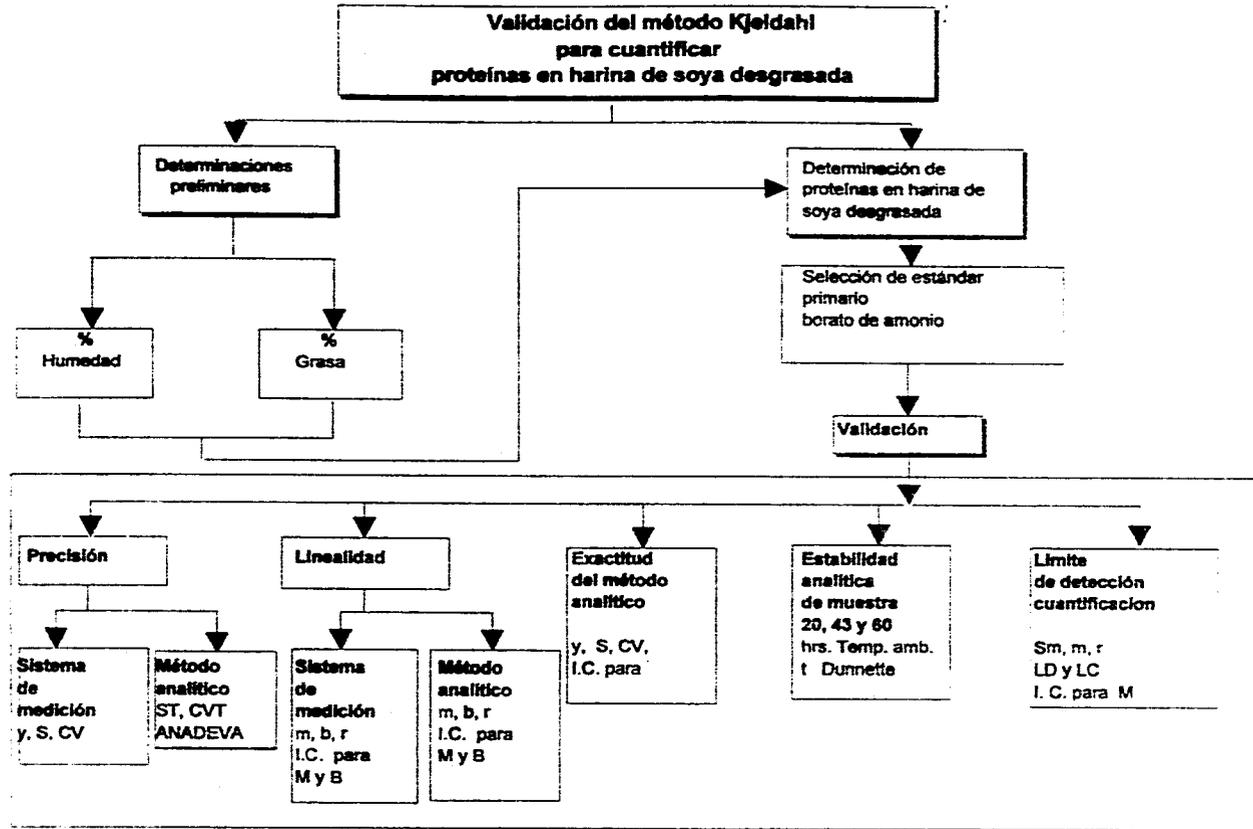
**CRITERIO:** El límite de detección del método debe satisfacer los requisitos para el propósito de aplicación del método analítico.

**LIMITE DE CUANTIFICACION.-** Es la concentración menor de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

Existen otras características menos comunes, que se usan en casos especiales, como la especificidad y tolerancia. A continuación se describen brevemente:

**ESPECIFICIDAD.-** Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

**TOLERANCIA.-** La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, condiciones ambientales, etc.



### 3.0 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 PREPARACION DE LA MUESTRA DE HARINA DE SOYA DESGRASADA. (3.1)

La muestra de harina de soya que se utilizó para llevar a cabo este proyecto, se obtuvo del almacén de muestras de la Administración Central de Laboratorio y Servicios Científicos

Antes de analizar la muestra de harina de soya, es necesario molerla y homogenizarla. Además, debe llevarse a cabo la determinación del contenido de grasa y humedad, ya que es importante para complementar su identificación.

3.1.1 MOLIENDA.- La harina de soya se hace pasar por molino "Cyclotec Sample Mill" Modelo 1093, hasta obtener un polvo fino que pase por malla 20.

3.1.2 DETERMINACION DE HUMEDAD.-Se coloca una caja de humedad destapada, en estufa a 100-105°C hasta peso constante (1h. aprox.) se saca y se coloca en desecador hasta que se enfríe, se pesa y se adicionan 2 g. de muestra, se toma el peso, posteriormente se coloca en la estufa durante 3 horas.

Transferir la caja tapada al desecador, hasta que ésta alcance la temperatura ambiente y pesar.

3.1.3 DETERMINACION DE GRASA.- Pesar 2-3 g de muestra y colocar en cartucho cubriéndolo con algodón, transferir el cartucho al extractor Soxhlet; ajustar un matraz con perlas de ebullición a peso constante y colocar el refrigerante.

Añadir éter por el extremo superior del refrigerante y calentar hasta estar seguro de que el agua circula por el refrigerante. Efectuar la extracción 4 horas y posteriormente evaporar en baño María el éter del matraz y secar a 100 C hasta peso constante.

Los resultados obtenidos de grasa y humedad se reportan en el cuadro No. 3.

### 3.2 DETERMINACION DE PROTEINAS EN LA MUESTRA DE HARINA DE SOYA DESGRASADA. (16, 17, 18)

- 1) Pesar 1 g de muestra en papel glassine y colocarla en tubo para digestión "Tecator"; transferir el tubo a la gradilla del digestor.
- 2) Agregar aproximadamente 4 g de mezcla reactiva de selenio (La preparación de mezcla reactiva se indica en el Anexo 3), 12 ml de ácido sulfúrico R.A. 93-98%; y 4 ml de peróxido de hidrógeno por las paredes lentamente. Se prepara un blanco de la misma manera, utilizando únicamente papel.
- 3) Colocar la gradilla con los tubos en el digestor Tecator, a una temperatura de 350-400°C. Dejar en digestión hasta que el líquido se torne translúcido (30-40 min.).
- 4) Retirar la gradilla con los tubos y dejarlos enfriar, posteriormente agregar 100 ml de agua destilada en cada tubo, por las paredes lentamente.

- 5) Para la etapa de la DESTILACION deben prepararse matraces Erlenmeyer de 300 ml, colocando en cada uno 100 ml de agua destilada y 25 ml de ácido bórico al 4%, con indicador (la preparación de la solución se indica en el Anexo No. 3).
- 6) Efectuar la destilación en blanco, colocando el tubo y el matraz receptor correspondiente en la unidad de destilación "Kjeltec" y esperar a que se realice la destilación. Retirar el tubo y el matraz.
- 7) Efectuar la destilación de las muestras utilizando el mismo procedimiento.
- 8) Titular finalmente el destilado recolectado, con solución valorada 0.1 N de ácido sulfúrico sol.A hasta una coloración rojiza.

$$\% \text{ NITROGENO} = \frac{0.014 \times N \times (V - V')}{P} \times 100$$

N= Normalidad del ácido valorado.

V= Volumen del ácido valorado gastado en la titulación (ml).

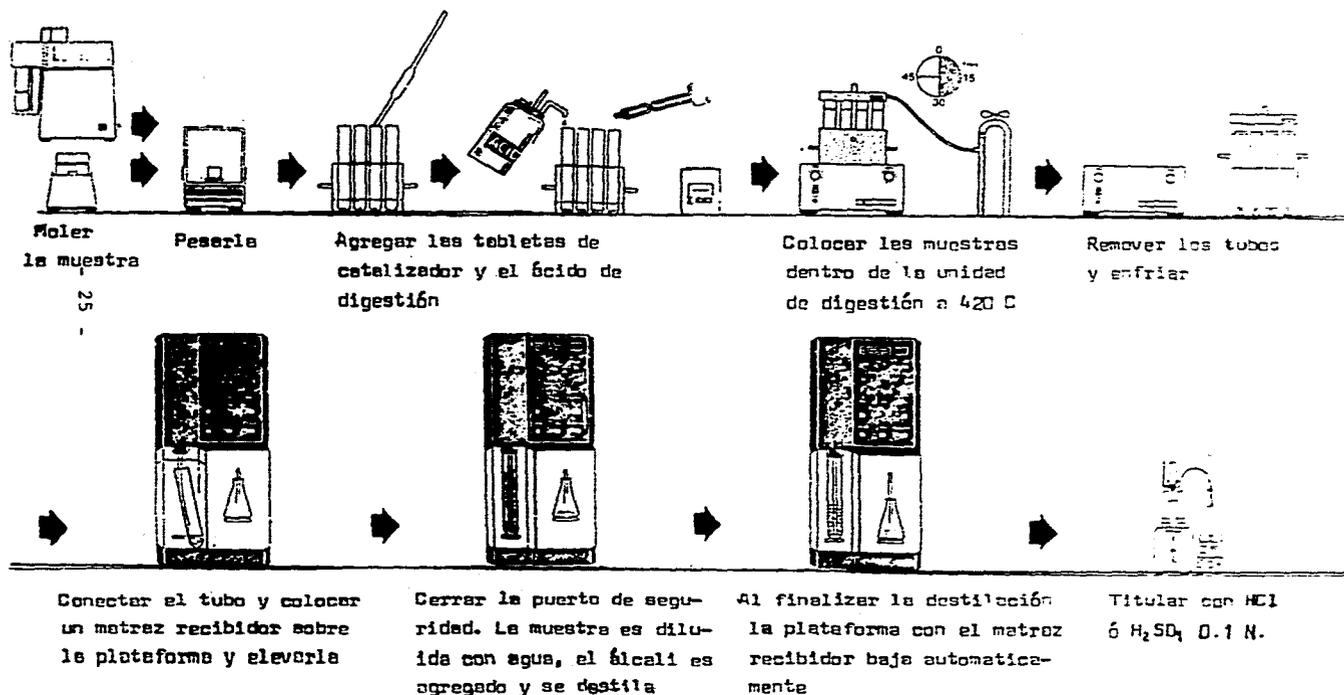
V'= Volumen del ácido valorado gastado en la titulación del blanco (ml).

P= Peso de la muestra (g).

- a) Cálculo preliminar del % de proteína, multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.25 . Los datos se anotan en el cuadro No. 4.

Fig. No. 1 Diagrama de proceso para cuantificación de proteínas con equipo Tecator.

# Kjeltec 1026



### 3.3 IDENTIFICACION MICROSCOPICA DE LA HARINA DE SOYA. (3.3)

El análisis microscópico de la harina de soya es muy importante para completar su identificación. Para llevar a cabo ésta determinación se hizo uso de un microscopio binocular marca Leitz Wetzlar modelo 4917.

Las características más notables a gran aumento se identificaron con el objetivo 10X, colocando la muestra en hidróxido de sodio al 10%, entre un porta y cubre objetos. Al igual que las demás leguminosas la harina de soya presenta células subepidérmicas que tienen la forma de reloj de arena, pero el tamaño de éstas, comparado con el de las células en empalizada, es diferente para cada una de ellas. Ver las características más notables de la harina de soya en la figura No. 2.

### 3.3 IDENTIFICACION MICROSCOPICA DE LA HARINA DE SOYA, (2.37)

El análisis microscópico de la harina de soya es muy importante para completar su identificación. Para llevar a cabo ésta determinación se hizo uso de un microscopio binocular marca Leitz Wetzlar modelo 4917.

Las características más notables a gran aumento se identificaron con el objetivo 10X, colocando la muestra en hidróxido de sodio al 10%, entre un porta y cubre objetos. Al igual que las demás leguminosas la harina de soya presenta células subepidérmicas que tienen la forma de reloj de arena, pero el tamaño de éstas, comparado con el de las células en empalizada, es diferente para cada una de ellas. Ver las características más notables de la harina de soya en la figura No. 2.

CARACTERISTICAS MAS NOTABLES DE LA HARINA DE SOYA  
 PARA SU IDENTIFICACION A GRAN AUMENTO

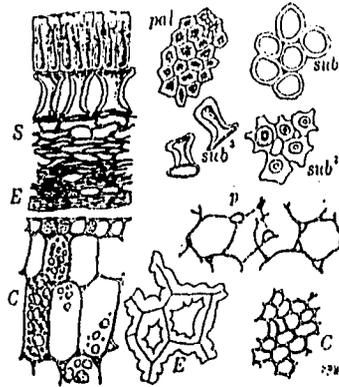


FIGURA No. 1

S= Cubierta de la semilla

E= Endospermo

C= Cotiledon

Sub<sup>1</sup>, sub<sup>2</sup>, sub<sup>3</sup>.- Subepidermis: 1 desde fuera,  
 2 enfoque a profundidad y 3 vista lateral.

P= Parénquima esponjoso

### 3.4 VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

#### 3.4.1 SELECCION DE ESTANDAR PRIMARIO

Para llevar a cabo la selección, se efectuaron pruebas previas con algunas sales de amonio (borato de amonio, sulfato de amonio y fosfato diácido de amonio) disueltas en la solución de ácido bórico con indicador de verde de bromocresol y rojo de metilo (Veáse como preparar la solución en el Anexo No. 3) que se utiliza para recoger el amonio que se obtiene del proceso de destilación, valorando con ácido sulfúrico 0.1N titulado

El borato de amonio, fué elegido por contener en su molécula química el analíto (nitrógeno) de importancia en la muestra , por su fácil adquisición, estabilidad y por reproducir las condiciones de la muestra en la determinación de proteínas, ya que a diferencia de las otras sales, solo éste presentó el color de vire semejante al de la muestra durante la valoración con ácido sulfúrico.

Para el análisis estadístico del sistema de medición se utilizó biborato de amonio trihidratado (Ammonium hydrogen tetraborate,  $\text{NH}_4\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , mol.wt.228.38, 6.13 % de Nitrógeno), por la pequeña cantidad de éste, para la evaluación estadística del método se usó borato de amonio USP (Ammonium borate,  $(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7$ , mol.wt. 263.4, 10.63 % de nitrógeno).

3.4.2 PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION.- La precisión del sistema de medición se determinó, considerando que el punto central corresponde a 25 ml de solución titulante de ácido

sulfúrico 0.1N, y equivale aproximadamente a 500 mg de borato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HB}_4\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). El contenido de nitrógeno en el borato de amonio es de 2.703 mg/ml en la solución preparada.

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Pesar 40g de borato de amonio.
- 2.- Transferir a un matraz aforado y calibrado de 1 lt; agregar agua destilada, disolver y llevar al volumen (sol.B); valorar con sol. A.
- 3.- Tomar 12 alícuotas de 12.5ml.
- 4.- Seis alicuotas se someten a DESTILACION (a partir del inciso 5 del método para la determinación de proteínas).
- 5.- Las seis alicuotas restantes se transfieren a matraces Erlenmeyer de 300 ml.
- 6.- Completar con agua destilada a 100ml.
- 7.- Agregar 25 ml de solución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4% con indicador.
- 8.- Titular con solución valorada de ácido sulfúrico 0.1N (con un blanco corregir el volumen). Los resultados se dos se presentan en el cuadro No 5.

**3.4.3 LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION.-** La linealidad del sistema de medición se determina, considerando que el contenido de nitrógeno en el borato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HB}_4\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) es de 2.703 mg/ml en la solución preparada.

**PROCEDIMIENTO:**

- 1.- Tomar alícuotas, por lo menos por duplicado, de la solución B, de: 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 y 25
- 2.- Transferir a un matraz Elenmeyer de 300 ml.
- 3.- Completar con agua destilada a 100 ml.

4.- Agregar 25 ml de solución de  $H_3BO_3$  al 4%, con indicador.

5.- Valorar con solución valorada de ácido sulfúrico 0.1N.

Correr un blanco para corregir el volumen. Los datos se anotan en el cuadro No.6. En la fig. 3 se muestra gráfica

3.4.4 EXACTITUD DEL METODO ANALITICO.- Determinar la exactitud del método considerando que el 54% corresponde al punto central del intervalo de proteínas contenida en la harina de soya desgrasada, utilizando muestra adicionada que consuma un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición.

#### PROCEDIMIENTO:

1.- Pesar por sextuplicado 150 mg de harina de soya y 125 mg de borato de amonio  $(NH_4)_2 B_4 O_7 \cdot 4H_2 O$ , necesario para obtener el % de nitrógeno equivalente a 54% de proteínas.

2.- Colocar la muestra adicionada en un tubo para digestión Tecator; transferir el tubo a la gradilla del digestor.

3.- Realizar las mismas operaciones del método, para determinar proteínas en la muestra de harina de soya, a partir del inciso 2.

4.- Calcular el % de proteína, multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.25. Reportar en el cuadro No. 7.

3.4.5 LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO.- La linealidad se determina, considerando que la harina de soya presenta un contenido de 48 a 60% de proteínas, utilizando muestra adicionada que consuma un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Pesar 150 mg de harina de soya y adicionar la cantidad necesaria de borato de amonio para obtener un contenido de 48, 54 y 60 % de proteínas. La determinación se realiza por triplicado para cada porcentaje, manteniendo el peso de la harina de soya constante.

% Proteina H.soya + B.amonio	Peso (mg) H.soya	Peso (mg) B.amonio
48	150	15
54	150	125
60	150	540

- 2.- Colocar la muestra en un tubo para digestión Tecator; transferir el tubo a la gradilla del digestor.
- 3.- Realizar las mismas operaciones del método para determinar proteínas en la muestra de harina de soya, a partir del inciso 2.
- 4.- Calcular el % de proteína, multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.25. Los datos se anotan en el cuadro No. 9. En la fig. No. 4 se muestra la gráfica.

3.4.6 PRECISION DEL METODO ANALITICO.- Evaluar la repetibilidad y reproducibilidad interdía-analista, del método analítico, con dos analistas en dos días diferentes. En cada caso se trabaja una muestra por triplicado, utilizando un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición. Se trabajó con una muestra de harina de soya que contiene 47.08% de proteínas.

- 1.- Pesar en papel glassine la muestra, por triplicado.

- 2.- Colocar la muestra en un tubo de para digestión Tecator; transferir el tubo a la gradilla del digestor.
  - 3.- Realizar las mismas operaciones del método para determinar proteínas en la muestra de harina de soya, a partir del inciso 2.
  - 4.- Calcular el % de proteínas, multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.25. Los resultados se reportan en el cuadro No. 10 y 11 (análisis de varriância).
- 3.4.7 ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA. La estabilidad de la muestra se determina a las 18, 42 y 66 horas de almacenamiento a temperatura ambiente, a la luz, tapada con papel parafilm.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Pesar 16 muestras de harina de soya en papel glassine.
- 2.- Transferir tubo de digestión Tecator a gradilla Tecator.
- 3.- Agregar el catalizador de selenio/sulfato de potasio, ácido sulfúrico concentrado y agua oxigenada, procediendo a digerir de acuerdo al método para determinar proteínas en harina de soya.
- 4.- Esperar el tiempo marcado, destilar 4 muestras de inmediato de acuerdo con el método de determinación de proteínas 4 a las 18 hrs., 4 a las 42 y 4 a las 66 hrs.
- 5.- Titular con ácido sulfúrico 0.1N.
- 6.- Calcular el % de proteínas, multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.25. Los datos se anotan en el cuadro No. 12.

3.4.8 LIMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION DEL SISTEMA DE MEDICION.- El limite de detección y cuantificación se determina, utilizando una cantidad de borato de amonio que se titule con: 0.5, 1.0 y 2.5 ml aproximadamente, de ácido sulfúrico 0.1N. Cada caso se trabaja por duplicado, corriendo 6 blancos. La solución de borato de amonio contiene 0.7569 mg de nitrógeno por cada mililitro.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Pesar 3.6198 g de borato.
- 2.- Transferir a un matraz aforado de 500 ml; agregar agua destilada, disolver y aforar; titular con ácido valorado.
- 3.- Tomar 5 alicuotas de 1 ml, 5 de 2 ml y 5 de 5 ml.
- 4.- Trasferir a un matraz Erlenmeyer de 300 ml.
- 5.- Completar con agua destilada a 100 ml.
- 6.- Agregar 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, con indicador.
- 7.- Titular con solución valorada de ácido sulfúrico 0.1N.

Los resultados obtenidos se reportan en el cuadro

No. 13.

#### 4.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de las determinaciones preliminares y del análisis estadístico evaluado tanto para el sistema de medición, como para el método Kjeldahl. Las fórmulas correspondientes se encuentran en el anexo 2.

CUADRO No. 3  
DETERMINACION DE GRASA Y HUMEDAD EN LA MUESTRA  
DE HARINA DE SOYA

n	CONTENIDO DE GRASA (%)	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)
1	2.1800	6.3703
2	2.1182	6.2428
3	2.2106	6.2348
4	2.0963	6.4496
5	2.1960	6.1003
6	2.1216	6.1524
$\bar{y}$	2.1539	6.2583
S	0.0476	0.1312
CV	2.2121	2.0969

CUADRO No. 4  
DETERMINACION PRELIMINAR DE PROTEINAS EN LA  
MUESTRA DE HARINA DE SOYA

PESO DE MUESTRA (g)	VOLUMEN GASTADO DE H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.0001 N) (ml)	% NITROGENO	% PROTEINAS
0.4676	25.6	7.5206	47.0087
0.4677	25.6	7.5206	47.0087
0.4675	25.4	7.4618	46.6962
0.4675	25.8	7.5794	47.3712
0.4672	25.8	7.5842	47.4012
<b>y</b> 0.4674	25.6400	7.5233	47.0932
<b>S</b> 0.0001	0.1673	0.0503	0.3148
<b>CV</b> 0.0382	0.6526	0.6687	0.6687

La precisión en la determinación de grasa, humedad y proteínas se expresan en términos de la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

Los valores de la desviación y coeficiente de variación (desviación estándar con respecto a la media) son pequeños, lo que significa que se tiene una alta precisión en estas determinaciones.

PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

PROPIEDAD MEDIDA: ml de  $H_2SO_4$  [0.0981 N]

NUMERO DE DETERMINACIONES: 6

CONCENTRACION DE  $NH_4HB_4O_7 \cdot 3H_2O$ : 40.0053 mg/ml.

CUADRO No. 5

NITROGENO (mg)		$H_2SO_4$ [0.0981 N]		% NITROGENO	
ETAPA DE DEST.	ETAPA DE TIT.	ETAPA DEST. AMONIO (ml)	ETAPA TIT. $H_2SO_4$	DEST.	TIT.
33.7856	33.9229	24.6	24.7	6.748	6.775
33.9229	33.7856	24.7	24.6	6.775	6.748
33.6483	33.7856	24.5	24.6	6.720	6.748
33.9229	33.7856	24.7	24.6	6.775	6.748
33.7856	33.7856	24.6	24.6	6.748	6.748
33.7856	33.7856	24.6	24.6	6.748	6.748
$\bar{y}$	33.8084	24.61	24.61	6.752	6.752
S	0.1026	0.0503	0.0372	0.018	0.010
CV	0.3035	0.1488	0.15	0.278	0.148

El análisis estadístico de la variable de respuesta ( $\bar{y}$ ) consiste en: cálculo de la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV).

Los resultados de la prueba de precisión del sistema se dan en términos de desviación estándar (variabilidad en torno a la media) y coeficiente de variación (desviación estándar con respecto a la media), como se puede observar la desviación que presentan los datos en las ambas etapas es pequeña, lo que nos indica que las

mediciones tienen una alta precisión, además, si comparamos el volumen de ácido consumido (24.6 ml) con la escala mínima (0.1 ml) de la bureta  $\{0.1 / 24.6 \text{ ml} \times 100 = 0.4\%$  encontramos que el coeficiente de variación determinado en ambas etapas es menor.

En base a estos resultados, se puede decir que el sistema de medición en este método es preciso.

LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION

CANTIDAD ADICIONADA: mg de nitrógeno

PROPIEDAD MEDIDA: ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [0.0981 N]

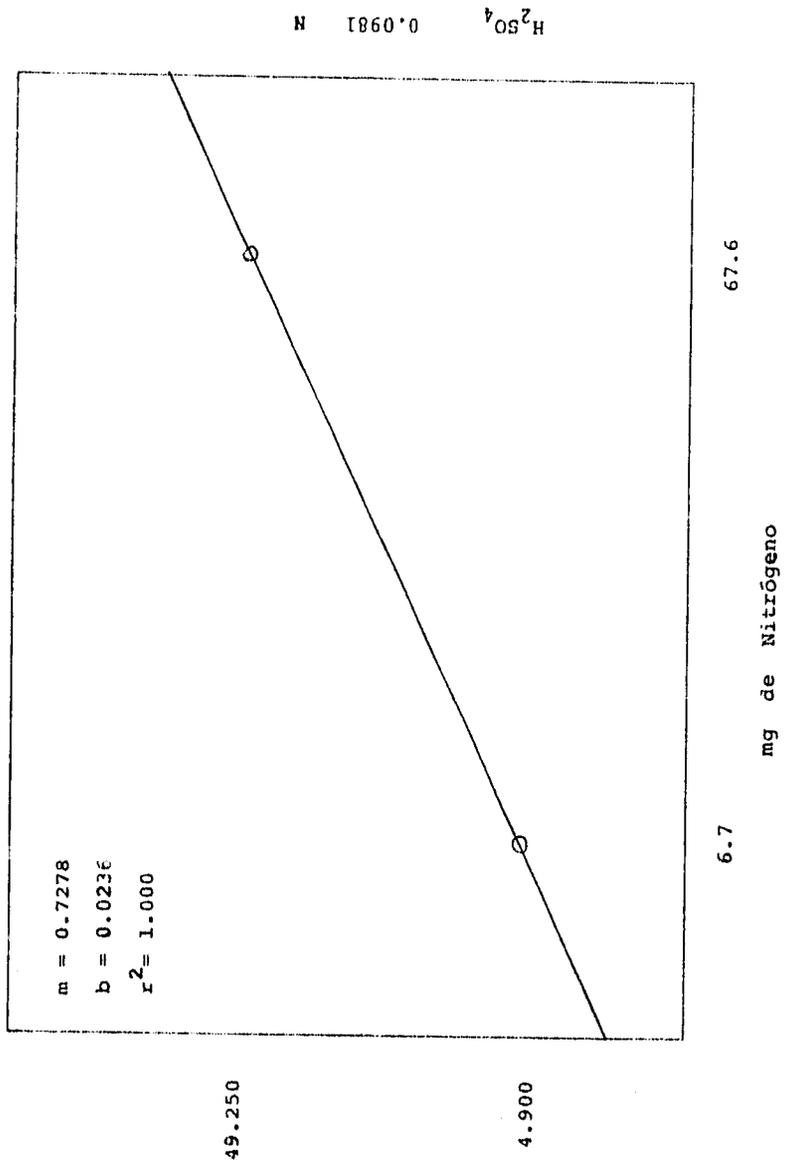
CONCENTRACION DE NH<sub>4</sub>HB<sub>4</sub>O<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O: 40.0053 mg/ml

CUADRO No. 6

N	NITROGENO (mg) DE NH <sub>4</sub> HB <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O	VOLUMEN (ml) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.0981N
	X	Y
1	6.7296	4.9
2	6.7296	4.9
3	13.4593	9.8
4	13.4593	9.8
5	20.3263	14.8
6	20.3263	14.85
7	27.1933	19.8
8	27.1933	19.8
9	33.9229	24.7
10	33.7856	24.6
11	33.7856	24.6
12	33.7856	24.6
13	33.7856	24.6
14	33.7856	24.6
15	40.7899	29.7
16	40.6526	29.6
17	47.4809	34.55
18	47.5196	34.6
19	54.1119	39.4
20	54.2493	39.5
21	60.9789	44.4
22	60.9789	44.4
23	67.6026	49.15
24	67.6399	49.25

La relación entre y(ml) y x(mg N) se explica mediante el siguiente modelo lineal:  $y = mx + b$ . El análisis consiste en: a) cálculo de la pendiente o coeficiente de efecto lineal (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Fig. No. 3 Gráfica de la relación de ml de  $H_2SO_4$  vs mg de nitrógeno



Resultados:

$m = 0.7278$  ml/mg       $b = 0.0236$  ml       $r^2 = 1.0000$

b) Intervalo de confianza para la pendiente poblacional:

$$0.7268 \leq M \leq 0.7287$$

c) Intervalo de confianza para la ordenada al origen :

$$- 0.0143 \leq B \leq 0.0615$$

d) Valores de t calculada y t tablas para la pendiente y ordenada.

Sistema de estudio	Valor de t calculada	Valor de t tablas
Pendiente	0.01283	2.0739
Ordenada	1.2922	2.0739

En cuanto a la determinación de la linealidad del sistema de medición, los resultados obtenidos de  $r^2$  y  $m$  nos indican que existe una buena relación lineal entre las variables  $x$ ,  $y$  y en el intervalo de 6.7296 a 67.6399 mg de nitrógeno .

Con respecto a los intervalos de confianza de la pendiente (0.7268 , 0.7287) y la ordenada (-0.0143 , 0.0615), podemos observar que  $m = 0.7278$  y  $b = 0.0236$  , se encuentran dentro de los intervalos, por lo que podemos decir, que no existe diferencia significativa en los valores obtenidos para  $m$  y  $b$ , además, la determinación de  $t$  calc. para  $m$  y  $b$  nos confirman lo anterior, ya que los valores obtenidos para ambas caen dentro de la zona de aceptación de la prueba de distribución  $t$ .

Otra manera de analizar los resultados, es por medio del análisis de regresión de los meq. determinados en función de los meq. adicionados.

VOL A (ml)	BORATO (mg)	meq ad	meq. det	mg N det
2.500	4.9	0.438035975	0.48069	6.72966
2.500	4.9	0.438035975	0.48069	6.72966
5.000	9.8	0.876071951	0.96138	13.45932
5.000	9.8	0.876071951	0.96138	13.45932
7.500	14.8	1.314107926	1.45188	20.32632
7.500	14.85	1.314107926	1.456785	20.39499
10.000	19.8	1.752143902	1.94238	27.19332
10.000	19.8	1.752143902	1.94238	27.19332
12.500	24.7	2.190179877	2.42307	33.92298
12.500	24.6	2.190179877	2.41326	33.78564
12.500	24.6	2.190179877	2.41326	33.78564
12.500	24.6	2.190179877	2.41326	33.78564
12.500	24.6	2.190179877	2.41326	33.78564
12.500	24.6	2.190179877	2.41326	33.78564
15.000	29.7	2.628215853	2.91357	40.78998
15.000	29.6	2.628215853	2.90376	40.65264
17.500	34.55	3.066251828	3.389355	47.45097
17.500	34.6	3.066251828	3.39426	47.51964
20.000	39.4	3.504287804	3.86514	54.11196
20.000	39.5	3.504287804	3.87495	54.2493
22.500	44.4	3.942323779	4.35564	60.97896
22.500	44.4	3.942323779	4.35564	60.97896
25.000	49.25	4.380359755	4.831425	67.63995
25.000	49.15	4.380359755	4.821615	67.50261

$$m = 1.04094$$

$$b = 0.00651$$

$$r^2 = 0.99997$$

De acuerdo con los resultados obtenidos de  $r^2$  y  $m$ , existe relación altamente significativa de meq. determinados y meq. adicionados, considerando lineal la respuesta para el sistema, además, la ordenada de la relación lineal pasa por el origen

Con este análisis, se determina que en el intervalo de concentración establecido, el modelo lineal es correcto para el sistema de medición.

EXACTITUD DEL METODO ANALITICO  
( EXACTITUD AL 100 % )

CUADRO No. 7

n	PESO de Muestra (mg)	H2SO4 + O.C.P.P.N (ml)	PESO HAR. SOYA (mg)	H2SO4 O.C.P.P.N (ml)	% PROT. MUESTRA ADICION	PESO H. S. de Muestra (mg)	H. SOYA + O.C.P.P.N (ml)	% PROT. RECUPER.	% RECOBRO
1	125	9.10	150	8.15	54.00	275	17.30	53.9995	99.9990
2	125	9.20	150	8.15	54.00	275	17.35	54.1556	100.2882
3	125	9.15	150	8.20	54.00	275	17.30	53.9995	99.9990
4	125	9.10	150	8.15	54.00	275	17.30	53.9995	99.9990
5	125	9.10	150	8.15	54.00	275	17.25	53.8278	99.6811
6	125	9.2	150	8.15	54.00	275	17.35	54.1556	100.2882

La exactitud del método nos indica la desviación que se tiene entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia, expresándolo como porcentaje de recobro, resultado del análisis de muestras a las que se les adiciona cantidades conocidas de estándar.

a) Cálculo de la media aritmética ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

Resultados:

$$\bar{y} = 100.0424 \% \quad s = 0.2267 \% \quad CV = 0.2266 \%$$

b) Intervalo de confianza para la media aritmética :

$$99.8044 \% \leq M \leq 100.2804 \%$$

c) Valores de t calculada y t tablas para la media.

t calc.= 0.4583            t tablas= 2.5706

Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista determinamos con los resultados obtenidos, que el método es exacto ya que el valor de la media se incluye en el intervalo de confianza, y el coeficiente de variación obtenido es pequeño, lo que nos indica que la desviación de los datos experimentales es pequeña con respecto a los de referencia en esta determinación.

En cuanto al valor de la t calculada para la media, este nos indica que no se rechaza la hipótesis nula, ya que su valor se incluye en la zona de aceptación de la prueba de distribución t.

LINEALIDAD DEL METODO ANALITICO

CUADRO No. 8

n	PESO (mg)	H2SO4	PESO	H2SO4	PESO	H2SO4	H2SO4	%
	(NH <sub>4</sub> BO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.0001 N (ml)	HARINA SOYA	0.0001 N (ml)	H. SOYA	0.0001 N (ml)	A-T-B	RECUPERADA
	A		B		T			
1	15.0	1.05	150.0	0.20	165.0	0.20	1.00	47.861
2	15.0	1.10	150.0	0.20	165.0	0.25	1.05	48.121
3	15.0	1.05	150.0	0.15	165.0	0.20	1.05	47.861
4	125.0	0.10	150.0	0.15	275.0	17.30	0.15	53.999
5	125.0	0.15	150.0	0.20	275.0	17.30	0.10	53.999
6	125.0	0.20	150.0	0.15	275.0	17.35	0.20	54.155
7	540.0	39.40	150.0	0.20	690.0	47.60	39.30	59.091
8	540.0	39.50	150.0	0.15	690.0	47.60	39.45	59.215
9	540.0	39.40	150.0	0.20	690.0	47.60	39.40	59.215

CUADRO No. 9

n	% PROTEINA	% PROTEINA	H2SO4	H2SO4
	NTRA. ADICIONADA	RECUPERADA	0.0001 N (ml)	0.0001 N (ml)
			ADICIONADO	RECUPERADO
1	48.00	47.861	1.05	1.00
2	48.00	48.121	1.10	1.05
3	48.00	47.861	1.05	1.05
4	54.00	53.999	0.10	0.15
5	54.00	53.999	0.15	0.10
6	54.00	54.155	0.20	0.20
7	60.00	59.091	39.40	39.30
8	60.00	59.215	39.50	39.45
9	60.00	59.215	39.40	39.40

En la tabla de resultados, la variable de respuesta es el porcentaje de proteína recuperada (y), y (x) es el porcentaje de proteína adicionada.

a) Cálculo de la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Fig. No. 4 Gráfica de la relación de % de proteína recuperada vs. % de proteína en muestra adicionada.

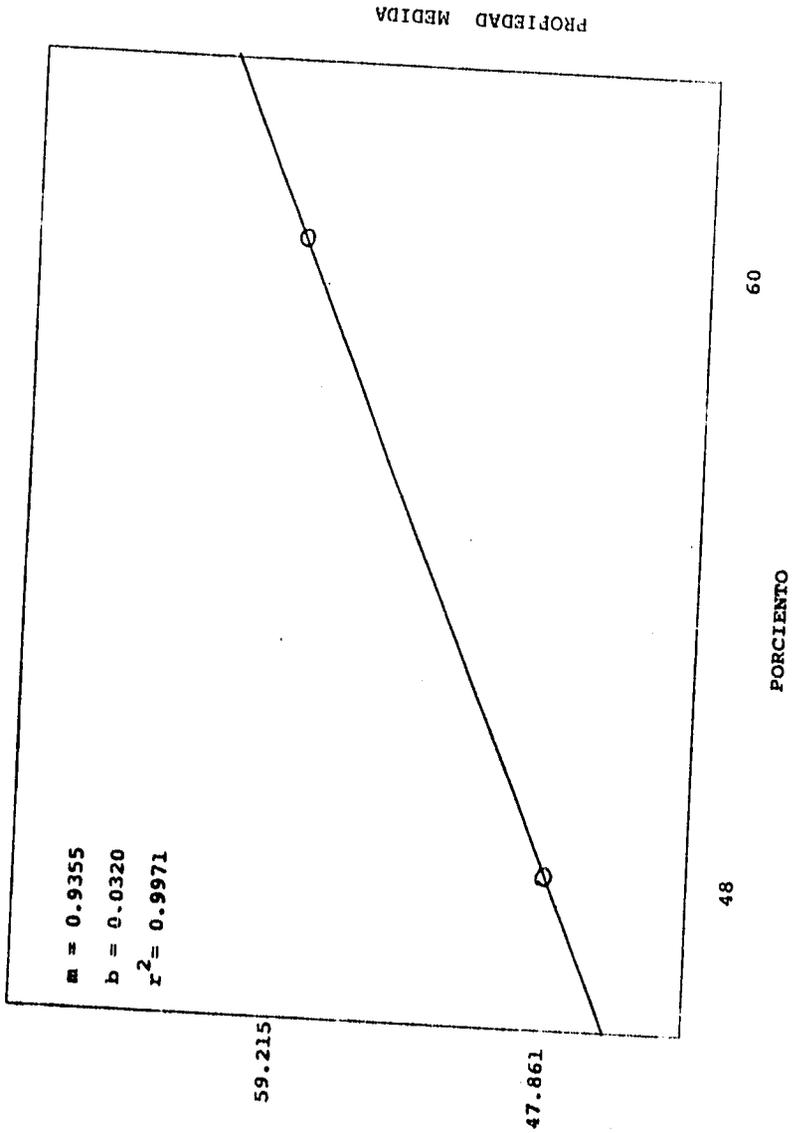
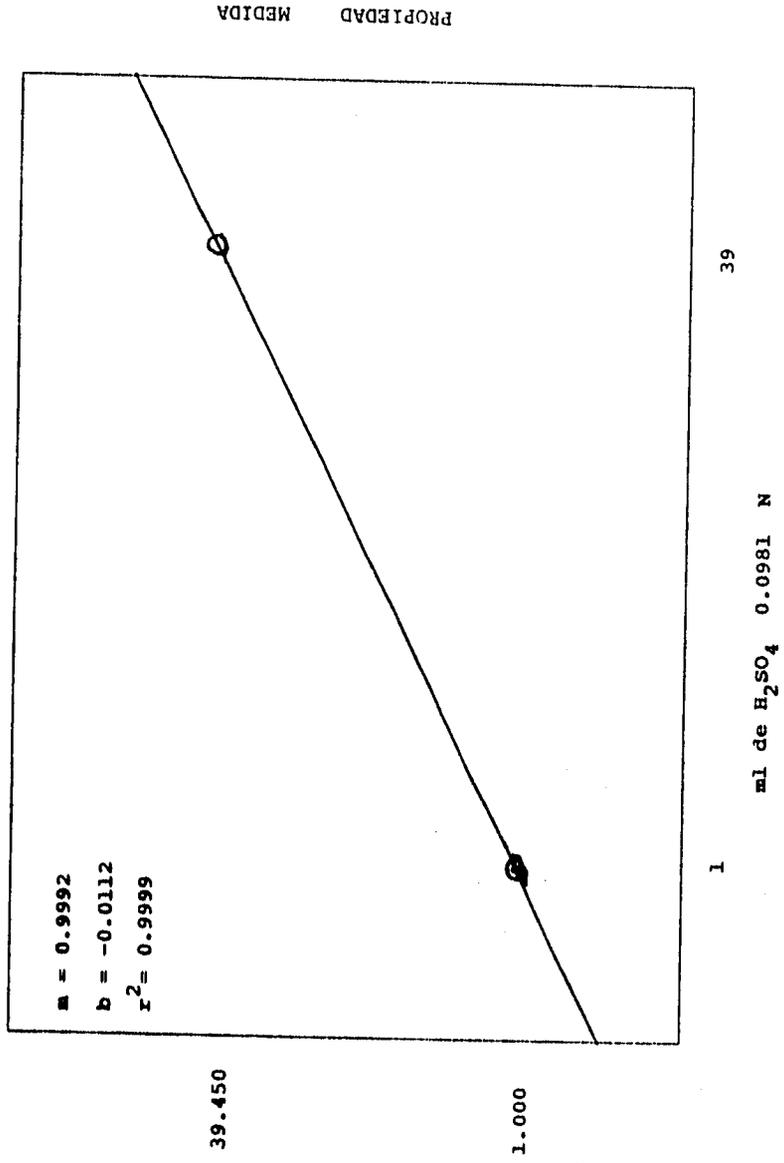


Fig. No. 5 Gráfica de la relación de ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> recuperados vs. ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adicionados.



Sistema de estudio	% de proteína ad. VS % proteína recup.	ml de H2SO4 ad. VS ml de H2SO4 recup.
m	0.9355	0.9992
b	0.0320	-0.0112
r <sup>2</sup>	0.9971	0.9999

b) Intervalo de confianza para la pendiente y ordenada al origen.

% de proteína ad. VS % proteína recup.	ml de H2SO4 ad. VS ml de H2SO4 recup.
$0.8903 \leq M \leq 0.9807$	$0.9966 \leq M \leq 1.0018$
$-0.8142 \leq B \leq 0.8871$	$-0.0709 \leq B \leq 0.0485$

c) Valores de t calculada y t tablas para la pendiente y ordenada.

Sistema de estudio	N PROT. AD. VS PROT. REC		ml DE H2SO4 AD. VS REC	
	VALOR DE t calculada	VALOR DE t tablas	VALOR DE t calculada	VALOR DE t tablas
Pendiente	-0.1424	2.2281	-0.7410	2.2281
Ordenada	0.1013	2.2281	-0.4435	2.2281

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba se considera lineal la respuesta para el método, en los dos intervalos (48 - 60 % de proteínas, y de 1.0 - 39.0 ml de H2SO4 gastado para el borato de amonio) ya que el valor de coeficiente de variación es mayor a 0.98 y la pendiente de 0.99, lo que nos indica que la desviación de los resultados con respecto a la recta es pequeña, presentando relación altamente significativa en los dos casos. Los valores de las t calculadas e intervalos de confianza para la pendiente y ordenada indican que no se rechaza la hipótesis nula y la inclusión de la m y o en dichos intervalos.

PRECISION DEL METODO ANALITICO

CUADRO No. 10  
ANALISTA (a)

		1	2
		46.4665	46.8672
D	1	46.2504	47.0388
I		46.7072	47.0388
A			
( d )		46.5733	47.0388
	2	46.8140	46.8672
		46.6433	47.0388

La variable de respuesta es el % de proteína (y).

a) Cálculo de desviación estándar total ( $S_T$ ), media aritmética ( $\bar{y}$ ), coeficiente de variación total (CV<sub>T</sub>).

Resultados :

$$\bar{y} = 46.7787 \quad S_T = 0.2575625 \quad CV_T = 0.5505979 \%$$

Respecto a la determinación del CV<sub>T</sub> observamos poca dispersión en los resultados obtenidos, por lo que, se puede decir que ni el analista, ni los días para un analista presentan efecto en esta valoración.

Una prueba estadística adicional importante en la determinación de la precisión del método es el Análisis de Varianza (ANAEVA), que permite establecer con base a la variación de los factores de variación, su efecto en la variable de respuesta.

CUADRO No. 11

TABLA DE ANAEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CAL.	F TEOR.
ANALISTA	1	0.4940614	0.4940614	10.1170	10.51
DIA/ANAL.	2	0.0613071	0.0306535	1.4009	4.40
ERROR	8	0.1742544	0.0217813	---	---

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza demuestran que el método es reproducible por los analistas y entre días para un mismo analista, ya que  $F_a < F_{gla, gld}$  y  $F_d < F_{gld, gde}$ , con estos resultados, no se rechaza la hipótesis nula, lo que nos indica que la respuesta del método es la misma al cambiar de analista y día.

ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA

CUADRO No. 12

1

CONTENIDO DE PROTEINAS ( % )				
MUESTRA	0 HORAS TEMP. AMB.	20 HORAS TEMP. AMB.	43 HORAS TEMP. AMB.	60 HORAS TEMP. AMB.
1	47.54289	48.01771	47.58608	47.56813
2	47.51301	47.87043	48.10207	48.01000
3	47.91400	47.92456	47.88119	47.44900
4	47.58254	47.77010	47.51301	47.95323

De la tabla se establece la variable de respuesta ( $y_j$ ), como el contenido de proteína del  $i$ ésimo tiempo de muestreo en la  $j$ ésima muestra.

El análisis consiste en aplicar la prueba de hipótesis, utilizando la  $t$  de Dunnette.

CONDICIONES DE ALMACENAJE	$\bar{y}_0$ (%)	$\bar{y}_i$ (%)	$t_{Dcal.}$	$t_{Dtab.}$
20 hre., temp. ambiente	47.6286	47.8072	1.0323	2.08
43 hre., temp. ambiente	47.6286	47.7030	1.0064	2.08
60 hre., temp. ambiente	47.6286	47.7453	0.7197	2.08

MCE (media de cuadrados del error) = 0.05525.

La muestra es estable en las condiciones estudiadas debido a que las  $t$  de Dunnette calculadas a 20, 43 y 60 hrs. son menores a la  $t$  tablas, lo que nos indica que su almacenaje a las condiciones que normalmente se trabaja no se ve afectada en dichos tiempos, por lo tanto, el error presente en estas determinaciones se considera pequeño.

LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION  
DEL SISTEMA DE MEDICION

CUADRO No. 13

NITROGENO [mg] X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 14H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1077 N [ml] Y
0.7569	0.55, 0.60, 0.60, 0.50, 0.50
1.5138	1.0, 1.0, 1.05, 1.0 0.95
3.7845	2.40, 2.60, 2.50, 2.50 2.50

La variable "y" está definida como los mililitros consumidos de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1077 N. En esta determinación se estima la variación del volumen consumido al nivel menor de concentración de nitrógeno

a) Cálculo de la pendiente (m) y coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>).

$$m = 0.6478856 \text{ ml/mgN}$$

$$r^2 = 0.9962403$$

b) Cálculo del intervalo de confianza para la pendiente poblacional.

$$0.6240362 \leq M \leq 0.6717350$$

c) Cálculo del límite de detección y cuantificación.

Límite de detección: 0.4630447 mg de nitrógeno.

Límite de cuantificación= 0.7717412 mg de nitrógeno.

En la determinación del límite de cuantificación, se comprobó que para concentraciones en el intervalo de 0.7569-3.7845 mg de nitrógeno, la relación entre ambas variables es lineal ya que  $r^2$  es mayor a 0.98 y el intervalo de confianza incluye la pendiente, siendo esta diferente de cero, por lo que podemos decir que con contenidos de nitrógeno comprendidos en este intervalo se consideran confiable la cuantificación y por consiguiente la detección.

## CONCLUSIONES

En todo método analítico es importante interpretar los resultados experimentales de una manera sencilla, adecuada y, principalmente, que proporcione información útil y confiable.

Para dar validez a una medición se deben de tomar en cuenta los errores que puedan presentarse en la obtención de la información experimental, para lo cual es necesario llevar a cabo el análisis estadístico que nos permita conocer la exactitud, precisión, linealidad y el error en nuestras mediciones.

En base al análisis estadístico, se demuestra linealidad, exactitud y precisión para el sistema de medición y para el método Kjeldahl dentro del intervalo de nitrógeno establecido, cumpliendo con el propósito para el cual es empleado.

El método Kjeldahl instrumentado por Tecator<sup>®</sup>, adaptado con reactivos, mezclas reactivas y necesidades propias de su uso, resulta ser un método confiable para cuantificar el nitrógeno en los productos de soya que nos interesan.

Con la validación de éste método, los resultados obtenidos proporcionan información mas útil y confiable para poder diferenciar la harina desgrasada, de la integral, así como de los concentrados proteícos de soya, y de esta manera, dictaminar correctamente para su clasificación en el Sistema de Codificación y Clasificación de Mercancías.

## ANEXO 1

**A4** Mercancías cuya introducción a territorio nacional esta regulada por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, mediante inspección en el punto de entrada al país.

**f5** Mercancías que estarán parcialmente desgravadas (tasa del 5%) del impuesto general de importación, cuando se importen a la franja fronteriza norte del país.

**In** Mercancías totalmente desgravadas del impuesto general de importación, cuando sean originarias de EE.UU. o Canadá.

**L** Mercancías totalmente desgravadas del impuesto general de importación para la industria, construcción, pesca y talleres de reparación y mantenimiento ubicadas en la región fronteriza siempre que no sean originarias de EE.UU. o Canadá.

**NE** Mercancías que deben ostentar etiquetas de información comercial en idioma español en punto de entrada al país.

**RO** Mercancías totalmente desgravadas del impuesto general de importación cuando se importen a la región fronteriza, para el comercio, restaurantes, hoteles y ciertos servicios.

SI Autorización sanitaria expedida por la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, así como por los Servicios Coordinados de Salud Pública en los Estados y de Coordinación con los Gobiernos de las Entidades Federativas.

## PRECISION DEL SISTEMA DE MEDICION

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$$

Desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{n \sum y^2 - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV \text{ ó } DER = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

## LINEALIDAD DEL SISTEMA DE MEDICION Y DEL METODO ANALITICO

Pendiente de la recta:

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum y)(\sum x)}{n \sum x - (\sum x)}$$

Ordenada al origen:

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Coeficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[n \sum xy - (\sum x)(\sum y)]^2}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2][n \sum y^2 - (\sum y)^2]}$$

Desviación estándar de regresión:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - m (\Sigma xy) - b (\Sigma y)}{n - 2}}$$

Intervalo de confianza para la pendiente poblacional:

$$m - t_{(n-2, 0.075)} \times S_m \leq M \leq m + t_{(n-2, 0.075)} \times S_m$$

Intervalo de confianza para la ordenada al origen:

$$b - t_{(n-2, 0.075)} \times S_b \leq B \leq b + t_{(n-2, 0.075)} \times S_b$$

donde :

$t_{(n-2, 0.075)} = 2.0739$  (t de Student en la distribución, con n-2 grados de libertad, con una confianza del 95%)

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n}}$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n}}$$

#### EXACTITUD DEL METODO ANALITICO

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{n (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n (n-1)}}$$

Coeficiente de variación:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

Intervalo de confianza para la media aritmética:

$$\bar{y} - t_{(n-1, 0.075)} \times \frac{S}{\sqrt{n}} \leq M \leq \bar{y} + t_{(n-1, 0.075)} \times \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Donde:

$t_{(n-1, 0.075)} = 2.5706$  (t de Student en la distribución, con n-1 grados de libertad, con una confianza del 95%)

PRECISION DEL METODO ANALITICO

TABLA DE ANADEVA

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F CAL.	F TABL.
ANALISTA	$gla=a-1$	$SCa = \frac{Y^2_{t..} - \frac{Y^2_{...}}{adr}}{dr}$	$MCA = \frac{SCa}{gla}$	$Fa = \frac{MCA}{MCD}$	$F_{\alpha, 0.05, gla, gld}$
DIA	$gld=(d-1)a$	$SCd = \frac{Y^2_{.ij} - \frac{Y^2_{.i.}}{dr}}{dr}$	$MCD = \frac{SCd}{gld}$	$Fd = \frac{MCD}{MCE}$	$F_{\alpha, 0.05, gld, gld}$
ERROR	$gls=(r-1)ad$	$SCe = \frac{Y^2_{ijk} - \frac{Y^2_{.ij}}{1}}{1}$	$MCE = \frac{SCe}{gls}$		

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

donde :

a = analista  
d = días  
r = repeticiones  
F = F de tablas con el 99.0 % de confianza  
Y<sub>ij</sub> = suma de las combinaciones analista-día  
Y<sub>i..</sub> = suma para cada analista  
Y... = suma total de los datos  
Y<sub>ijk</sub> = suma de cada dato elevado al cuadrado

Desviación estándar total:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - y_{...}^2 / adr}{adr - 1}}$$

Media aritmética:

$$\bar{y} = \frac{\sum y_{...}}{n}$$

Coefficiente de variación total:

$$CV_r = \frac{s_r}{\bar{y}_{...}} \times 100$$

Coefficiente de variación del método:

$$CV_m = \frac{s_m}{\bar{y}_{...}} \times 100$$

donde :

$$s_m = \sqrt{MC}$$

ESTABILIDAD ANALITICA DE LA MUESTRA

Condiciones de Almacenaje	Formula para t de Dunnette
20 horas, temperatura ambiente	$t_{Dcal} = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{MCE [z/r]}}$
45 horas, temperatura ambiente	$t_{Dcal} = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{MCE [z/r]}}$
60 horas, temperatura ambiente	$t_{Dcal} = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{MCE [z/r]}}$

donde:

t= 3 tratamientos

r= 4 replicaciones

y= media aritmética del tiempo i de muestreo

y<sub>0</sub>= media aritmética del tiempo cero de muestreo

t de Dunnette teórica, con gle grados de libertad, t tratamientos incluyendo el tratamiento control y una confianza del 95%= 2.68

MCE= media de cuadrados del error= SCE/gle

SCE=  $\sum (Y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / r$

gle= t(r-1)

## LIMITE DE DETECCION Y CUANTIFICACION

Pendiente:

$$m = \frac{n \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Coefficiente de determinación:

$$r^2 = \frac{[n \sum xy - (\sum x) (\sum y)]^2}{[n \sum x^2 - (\sum x)^2] [n \sum y^2 - (\sum y)^2]}$$

Intervalo de confianza para pendiente poblacional:

$$m - t(n-2, 0.075) \times S_m < M < m + t(n-2, 0.075) \times S_m$$

donde :

$t(n-2, 0.075) = 2.1604$  (valor de la distribución t de Student con n-2 grados de libertad y confianza del 95%)

$$S_m = S_{y/x} \sqrt{\frac{1 / \sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}$$

Límite de detección:

$$LD = \frac{6 S_b}{m}$$

Límite de cuantificación:

$$LC = \frac{10 S_b}{m}$$

### ANEXO 3

A. Solución de Ácido bórico al 4% con indicador. Disolver 80 g. de ácido bórico R. A. en 1.2 litros de agua destilada. Mezclar y agregar más agua destilada. Mezclar y agregar más agua destilada para completar cerca de 1.8 litros. Agregar 20 ml de solución de verde de bromocresol (20 mg en 20 ml de alcohol), y 14 ml de solución de rojo de metilo (20 mg en 20 ml de alcohol); diluir a 2 litros con agua destilada y mezclar cuidadosamente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- The United States Pharmacopeia, "The National formulary The United States Pharmacopeia Convention", Inc.(1995)  
p. 1230-31
- 2.- Alcántara, P. A. Material de apoyo para "Validación de Métodos Analíticos". LUAL, México (1993).(11-139)
- 3.- Keenan Taylor, John. "Quality Assurance of Chemical Measurements", Ed. Lewis Publishers
- 4.- Chamberlain, Device."Computer Systems Validation for the Pharmaceutical and Medical Industries". Ed. Alaren Press
- 5.- Benton, J. "Kjeldahl Method for Nitrogen Determination". Micro-Macro Publishing. USA (1991).p. 3-20
- 6.- SHCP."Introducción al Sistema Armonizado de Designación y Codificación de Mercancías". México (1991), p.1,15.
- 7.- Marques Cantu, M.J."Probabilidad y Estadística". 1a. edición. Ed. McGraw-Hill. México (1991), p. 361-403.
- 8.- Badui, D. S. "Química de los alimentos". 2a. edición. Ed. Alhambra Mexicana S. A. México (1990), p.617-637.

- 9.- Witker, Jorge. "En busca del nuevo derecho aduanero latinoamericano". Comercio Exterior. 39,6. México (1989). p.486.
- 10.- Pearson, Egan. "Análisis Químico de Alimentos". Ed. Continental S.A. C.V. México (1988), p. 27-32.
- 11.- Sabater Tobella, J. "Buenas prácticas de laboratorio" Ed. Diaz de Santos S.A. p. 55-100
- 12.- Murray, T. "Focus on Kjeldahl Analysis". J. Assoc. Anal. Chem. (1987), p. 405-409.
- 13.- Guerra, J. "Validation of FDA". Pharmaceutical Technology. (1986), p. 75-80.
- 14.- Martin J.F. "Analytical methods laboratories" Pharmaceutical Technology. (1986), p. 78
- 15.- Hart Leslie, A. M. "Análisis Moderno de los Alimentos". Ed. Acriba. España (1984), p.11.
- 16.- Manual Tecator. "Kjeltec System". 1026 Distilling Unit.
- 17.- Manual Tecator. "Digestion System" 6/12.

- 18.- Flores, M.J. "Bromatología Animal". 3a.edición. Ed.LIMUSA México (1983), p. 464, 883, 1058.
- 19.- Taylor, K. "Validation of Analytical Methods". Anal.Chem 55(6). (1983), p. 600-604.
- 20.- Morris, P. "A Century of Kjeldahl 1883-1993)". J. Assoc. Publ. Analysis. 21, (1983), p.53-58.
- 21.- Considine P. E. "Foods and Food Production Encyclopedia" Ed. VNRC. USA (1982).
- 22.- Campbell, M.F. "Processing and Products Characteristics for Textured Soy Flours". JAOCS. (1981), p. 336-338.
- 23.- Smith, R. A. and Circle S. "Soybeans Chemistry and Technology". Vo. 1. 2a. edición. Ed. The Publishing, Inc. USA (1980).
- 24.- Morr, C. V. "Technical Problems and Opportunities in Using Vegetable Proteins in Dairy Products". Sesión I.J. Am. Oil Chemist's Soc. (1979), p. 383-385.
- 25.- Wolf, W. S. and Cowan, J.C. "Soybean as Food Source". CRS Press, Inc. Boca Raton.Florida.

- 26.- Smith, A.K. "Soybeans: Chemistry y Technology". Ed. Publishing Co. (1978), p. 294-329.
- 27.- Alden, D.E. "Soy Processing from Beans to Ingredients". J. Am. Oil Chemist's Soc. (1975), p. 244-248.
- 28.- Coppock, J. "Soy proteins in Food". J. Am. Oil Chem. Soc (1974), p. 59-62.
- 29.- Horan, F. E. "Soy Protein Products and Their Production" Plenary Sesion II J. Am. Oil Chem. Soc. (1974), P. 67.
- 30.- Nelson, A. I. "Food Products from Whole Soybeans". Soybean Dig., 31(3), (1971), p. 32.
- 31.- Morrison, Frank. "Compendio de alimentación del ganado" 2a. reimpression. Ed. UTEMA. (1973), p. 253, 353-355.
- 32.- Rakosky, J. "Soy Products for the Meat Industry". J. Agr. Food Chem. (1970), p. 1005-1009.
- 33.- Tombs, M.P. "Protein Bodies of the Soybean". Plant Physiol, 42, 797 (1967)
- 34.- Arthur M. "Practical Physical Chemistry", J & A Churchill LTD, London (1961), p. 21.

- 35.- Wilson, R. J. "Chemical Analysis". Vol. 1. (1962), p.114
- 36.- Ziemba, J. V. "Versalite Soy Flours". Food Eng. 34(7).  
(1962),p. 90-91.
- 37.- Winton, K. "The Analysis of Food".2a. edición. Ed. Jhon  
Wiley & Sons, Inc. USA (1947), p. 544-545.
- 38.- Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación  
de la Dirección General de Control de Insumos para la  
Salud, "Métodos Analíticos Validación"