

16
2ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA
CUANTIFICAR PROTEINAS EN PRODUCTOS
DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS
LACTEAS."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
Q.F.B. LUCILA GODINEZ Y RAMIREZ



MEXICO, D. F. 1977

**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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR PROTEINAS EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
VOCAL	Q.F.B. LUCILA GODINEZ Y RAMIREZ
SECRETARIO	Q.F.B. LEONORA SANCHEZ GARCIAFIGUEROA
SUPLENTE	Q.F.B. ROCIO BECEDA HERNANDEZ
SUPLENTE	Q.F.B. ENRIQUE BOUCHOT GAMAS

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABRA EL ESPIRITU"
México, D.F. a, 4 de JULIO de 1996

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DR. BENNY MEISS STEIDER
DIRECTOR DE LA F.E.S. ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la) alumno(a)

CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

denominada: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR

PROTEINAS EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo VOTO DE ACEPTACION, pues reúne los requisitos establecidos por la legislación Universitaria.

Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido(a) en el Jurado del Examen Profesional que sustentará el mencionado alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., de de 19 .

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIRICO FARMACEUTICO BIOLÓGICO

DR. BERRY WEISS STEIDER
DIRECTOR DE LA F.E.S. ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la) alumno(a)
CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

denominada: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR
PROTEINAS EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo VOTO DE ACEPTACION, pues reúne los requisitos establecidos por la Legislación Universitaria.

Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido(a) en el Jurado del Examen Profesional que sustentará el mencionado alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., de de 19

Q.F.B. LUCILA GODINEZ Y RAMIREZ



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DR. BENNY WEISS STEIDER
DIRECTOR DE LA F.E.S. ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la) alumno(a)
CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

denominada: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR
PROTEINAS EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo **VOTO DE ACEPTACION**, pues reúne los requisitos establecidos por la Legislación Universitaria.

Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido(a) en el Jurado del Examen Profesional que sustentará el mencionado alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., de _____ de 19 ____


Q.F.B. LEONORA SANCHEZ GARCIA FIGUEROA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DR. BENNY WEISS STEIDER
DIRECTOR DE LA F.E.S. ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la) alumno(a)

CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

denominada: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR PROTEINAS
EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo VOTO DE ACEPTACION, pues reúne los requisitos establecidos por la Legislación Universitaria.

Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido(a) en el Jurado del Examen Profesional que sustentará el mencionado alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
México, D.F., de de 19 .

Q.F.B. ROCÍO BECEDA HERNANDEZ



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

DR. BENNY WEISS STEIDER
DIRECTOR DE LA F.E.S. ZARAGOZA
P R E S E N T E .

Distinguido Sr. Director:

Con respecto a la tesis profesional presentada por el (la) alumno(a)
CARMEN IRINA FAJARDO MORALES

denominada: VALIDACION DEL METODO KJELDAHL PARA CUANTIFICAR
PROTEINAS EN PRODUCTOS DE SOYA Y SU DETECCION EN MEZCLAS LACTEAS.

le comunico que, después de haberla revisado, le otorgo VOTO DE ACEPTACION, pues reúne los requisitos establecidos por la Legislación Universitaria.

Asimismo, me doy por enterado de haber sido incluido(a) en el Jurado del Examen Profesional que sustentará el mencionado alumno.

Aprovecho la ocasión para reiterarle a usted las seguridades de mi atenta y distinguida consideración.

ATENTAMENTE .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F., de de 19 .


Q.F.B. ENRIQUE BOUCHOT GAMAS

CON GRATITUD
A DIOS Y A LA VIDA .

A MIS NIÑAS :
AZMIN, SOFIA Y LUCIA
POR SER MI MAYOR MOTIVACION .

A MI ABEL
POR SU CARIÑO Y APOYO ILIMITADO.

MI GRATITUD INFINITA A
MIGUEL ANGEL GARCIA POR SU
CONSTANTE AYUDA INCONDICIONAL .

A MI ABUELA FELIPA
Y A MIS PADRES
POR DARME LA OPORTUNIDAD
DE ESTUDIAR.

A MIS FAMILIARES Y COMPAÑEROS
QUE DESINTERESADAMENTE
ME AYUDARON PARA QUE TODO
SALIERA LO MEJOR :POSIBLE .

**GRACIAS POR SU COLABORACION
PARA MEJORAR ESTE TRABAJO :**

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES.

Q.F.B. LUCILA GODINEZ Y RAMIREZ.

Q.F.B. LEONORA SANCHEZ GARCIAFIGUEROA.

Q.F.B. ROCIO BRECEDA HERNANDEZ.

Q.F.B. ENRIQUE BOUCHOT GANAS.

INDICE GENERAL

I. FUNDAMENTACION.

A. LA SOYA Y SUS PRODUCTOS.

1. Generalidades de la Semilla de Soya.	
Histología.	1
Constitución Bioquímica.	3
Aspecto Nutritivo.	5
2. Formas Comerciales de la Soya.	7
Harinas de Soya.	7
Concentrados Proteínicos de Soya.	8
Aislados Proteínicos de Soya.	9
Composición de las Formas Comerciales de la Soya.	10
Características de Concentrados y Aislados de Soya.	11
3. Características del Acido Fítico.	12

B. LA LECHE Y SUS PRODUCTOS.

1. Generalidades de la Leche.	14
Constitución Bioquímica.	14
Aspecto Nutritivo.	16
2. Formas Comerciales de la Leche.	18

C. METODO KJELDAIL.

21

D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

26

E. INTRODUCCION AL SISTEMA ARMONIZADO.

33

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	36
III. OBJETIVOS.	38
IV. HIPOTESIS.	38
V. PARTE EXPERIMENTAL.	39
A. MATERIAL Y EQUIPO.	39
B. REACTIVOS.	40
C. SOLUCIONES.	41
D. PROCEDIMIENTOS.	42
1. Identificación del Acido Fítico en Productos de Soya.	43
2. Determinación de Proteínas por el Método Kjeldahl, (Equipo Tecator).	44
3. Validación del Método Analítico para Cuantificar Proteínas.	46
Selección del Estándar Primario.	46
Linealidad del Sistema de Medición.	46
Precisión del Sistema de Medición.	47
Determinación de la Exactitud del Método Analítico.	48
Determinación de la Linealidad del Método Analítico.	49
Precisión del Método Analítico.	50
Estabilidad Analítica de la Muestra.	51
Límite de Detección y de Cuantificación.	52
VI. RESULTADOS.	53
VII. ANALISIS DE RESULTADOS.	64

VIII. CONCLUSIONES.	72
ANEXO 1, (FORMULARIOS).	73
ANEXO 2, (SOLUCIONES).	82
IX. BIBLIOGRAFIA.	83

I. FUNDAMENTACION.

A. LA SOYA Y SUS PRODUCTOS.

1. Generalidades de la semilla de soya.

Histología.

La soya es una leguminosa y por su alto contenido de grasa se considera oleaginosa, junto con semillas como el cártamo, el algodón, el girasol y el cacahuate. La semilla de soya (*Glycine max.*) difiere en color, tamaño y forma dependiendo de la variedad; la variedad más común es la Lincoln , la cual es amarilla y casi esférica, (Coppock, J. 1974).

La semilla de soya está constituida por tres fracciones: la cascarilla o cubierta, que representa el 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo que representa el 2% y el cotiledón que representa el 90%; en el cotiledón se localizan los esferomas (pequeños compartimentos de grasa) y las aleuronas (cuerpos proteínicos). Las aleuronas están integradas aproximadamente por el 98% de proteínas, lípidos y ácido fítico, (Wolf and Cowan 1979). El hilio es un punto de achatamiento de la semilla y está localizado en la cara ventral de su cubierta, (fig.1).

Microscópicamente la semilla de soya se caracteriza por la capa de prismas, que vista de frente aparece en forma de pequeñas células poligonales, con membranas muy densas y un canaliculo celular estrellado y pequeño, (fig. 2).

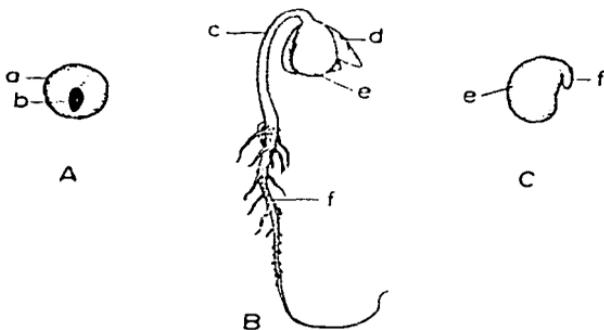


Figura 1. Estructura de la semilla de soya y su germinado.

- (A) Semilla: (a) cubierta de la semilla; (b) hilo.
 (B) Germinado: (c) hipocotilo; (d) plúmula; (e) cotiledón;
 (f) raíz primaria.
 (C) Embrión: (e) cotiledón; (f) raíz primaria.

Debajo de la capa de prismas, se distinguen unas células que componen la capa de los relojes de arena; estas células aparecen con frecuencia aisladas o formando grupos y adheridas a la capa de los prismas, (fig. 3).

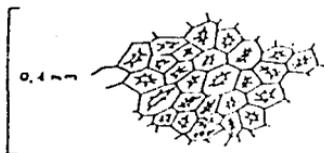


Figura 2. Capa de los prismas vista de frente.



Figura 3. Células en forma de relojes de arena.

Constitución Bioquímica.

El análisis proximal de la semilla de soya muestra que el 40% es proteína, el 21% aceite y el remanente son carbohidratos.

La fracción proteínica de la soya está constituida por una mezcla heterogénea de globulinas y albúminas, con pesos moleculares muy variados, solubles en soluciones salinas y en agua; precipitan en su punto isoeléctrico en un intervalo de pH que va de 4.2 a 4.8.

Las proteínas de la soya son muy sensibles a agentes desnaturalizantes, como los pH extremos, las temperaturas altas, las concentraciones elevadas de disolventes y de sales. De todos éstos, el efecto del calor es el más importante, ya que los tratamientos térmicos son las operaciones unitarias que más se emplean en la fabricación de los alimentos. La consecuencia de todo esto es la reducción de la solubilidad de las proteínas, lo que puede inducir la gelificación. Los geles basan su estructura en el fenómeno de asociación-disociación de las proteínas, lo

que a su vez está determinado por la temperatura, fuerza iónica y el tipo de sal, (Badui, 1990).

Los ácidos nucleicos son constituyentes menores de la soya y contribuyen con el contenido total de nitrógeno sin aportar valor nutricional o valor proteínico, (Coppock, J. 1974).

La fracción oleosa de la semilla de soya está constituida por: aceite, fosfolípidos, esteroides y tocoferoles.

Los carbohidratos presentes en la semilla de soya son: polisacáridos insolubles en agua y etanol como arabinogalactanas, arabinanas, xilanas, galactomananas, celulosa y otro polímero; oligosacáridos hidrosolubles como, rafinosa y sacarosa; por último hay algunos monosacáridos como glucosa y arabinosa.

La soya contiene sustancias que al ser ingeridas por el organismo humano pueden causarle daño. En animales de laboratorio hay inhibición de crecimiento, reducción de la digestibilidad de las proteínas y de la disponibilidad de aminoácidos, vitaminas y minerales; estos metabolitos son conocidos como factores antifisiológicos propios de la semilla, que pueden ser eliminados por tratamiento térmico, (Badui 1990).

Algunos son:

- a. Los inhibidores de las proteasas, como el factor antitripsina.
- b. Las hemaglutininas que aglutinan los glóbulos rojos de la sangre *in vitro*.
- c. Compuestos que evitan la fijación del yodo en la glándula tiroides.

d. Los fitatos, que son compuestos que contribuyen con el fósforo en la soya y reducen la biodisponibilidad del zinc, de acuerdo a algunos investigadores. (O'Dell y Savage, 1960).

En el **cuadro I** se muestra la composición general de la soya de acuerdo a los constituyentes mayoritarios que se han mencionado, (Smith and Circle, 1980).

Componentes	Porcentaje
Proteína cruda	40.6 %
Grasa cruda	16.5 %
Carbohidratos	30.9 %
Humedad	7.0 %
Minerales	5.0 %

Cuadro I. Composición promedio de la semilla de soya madura y seca.

Aspecto nutritivo.

Debido al crecimiento poblacional, se han tenido que buscar otros orígenes de proteínas; así es como se ha incrementado el uso de semillas oleaginosas y los concentrados proteínicos de éstas; la semilla de soya es la más usada por su alto contenido de proteínas.

En cuestión de valor nutritivo, la semilla de soya cuenta con un patrón de aminoácidos semejantes y comparable con el de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), patrón que representa las exigencias nutricionales de una

proteína. La soya proporciona los aminoácidos esenciales: isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, tirosina, metionina, cistina, treonina, triptófano y valina; aunque es deficiente en los aminoácidos azufrados, situación que se acentúa en los aislados proteínicos, ya que la concentración de metionina y cistina se reduce durante el proceso de fabricación de estos productos. El porcentaje de lisina es elevado, lo que hace que la soya sea adecuada para complementar las proteínas de los cereales, (Badui, 1990).

La producción de proteínas de soya representa una alternativa para el gran aumento poblacional y la gran deficiencia que existe de las proteínas como las de la leche y la carne, (Hardin, 1979).

La soya se emplea en la elaboración de productos que imitan la leche, carne, en complementos alimenticios, derivados vegetales, etc. La mezcla de diversas proteínas vegetales y animales se complementa y enriquece con la adición de algunos aminoácidos .

Son importantes las proteínas, pero también el aceite y los carbohidratos de la soya pueden servir para satisfacer requerimientos calóricos de la población; la harina de soya sin desgrasar ofrece un valor nutricional, debido a la proporción elevada de ácidos grasos esenciales como el linoleico y linoléico contenido en su aceite. Las vitaminas y minerales proveen factores nutricionales decisivos bajo condiciones donde la disponibilidad de estos nutrientes suele ser limitada, (Smith and Circle, 1980).

2. Formas comerciales de la soya.

A partir de la semilla de soya se han elaborado varios productos; en la historia temprana de su proceso la producción de aceite fue el primer objetivo. Sin embargo, se ha establecido que la harina de soya es el mayor origen de proteína usada en alimentación animal, (Horán,1974).

La utilización de la soya y sus proteínas en la alimentación humana ha ido aumentando con el tiempo y el avance tecnológico.

Por el alto contenido proteico de la semilla de soya ésta se ha procesado y comercializado principalmente como: harinas, concentrados y aislados, (Badui,1990).

Harinas de soya.

Las harinas son las formas menos refinadas de la soya y para su obtención se pasa por las siguientes etapas básicas: limpieza y rompimiento de la semilla; separación de la cascarilla; ablandamiento de la semilla por vapor caliente y formación de hojuelas mediante presión. La harina sin desgrasar se obtiene en este punto sometiendo las hojuelas a un tratamiento térmico para destruir enzimas y factores antifisiológicos; posteriormente se muelen las hojuelas. Este tipo de harina es usado en panadería y sustitutos de leche, (Alden, D. 1975).

A las hojuelas sin desgrasar se les quita el aceite (del cual se obtiene la lecitina) y de aquí se pueden obtener: la harina de soya baja en solubilidad proteica , usada como alimento para animales, y la harina para consumo humano con alta solubilidad proteica.

Concentrados proteínicos de soya.

Estos productos son más refinados que las harinas y contienen no menos del 70% de proteínas en base seca, ya que se obtienen removiendo constituyentes no nitrogenados de las hojuelas o de harinas de soya.

Para su elaboración se pueden seguir tres procesos:

- a. La extracción con etanol al 60-80%; de esta forma precipitan proteínas y polisacáridos.
- b. La extracción de proteínas en su punto isoelectrico, donde globulinas y polisacáridos se insolubilizan.
- c. La desnaturalización e insolubilización de las proteínas mediante calor húmedo.

En los tres casos los líquidos de lavado contienen carbohidratos solubles, algunas proteínas solubles, nitrógeno no proteico, factores antinutricionales (antitripsina y ureasa), olores y sabores indeseables, algunos minerales y vitaminas, (Alden, D. E. 1975).

Como resultado de lo anterior, estos productos tienen un contenido alto de proteínas, son libres de sabor y de olor desagradable y tienen propiedades funcionales, las cuales permiten su uso en una variedad de productos alimenticios tales como pan, cereales y productos cárnicos.

De acuerdo a la composición de aminoácidos de los concentrados de soya, estos tienen un alto valor nutritivo. El calor al cual se someten estos productos durante el proceso puede modificar el valor nutritivo; por lo tanto es necesario optimizar las condiciones de calor y ver cuales son las aplicaciones del producto.

Aislados proteínicos de soya.

Los aislados de proteínas de soya son definidos como: la mayor fracción proteica de la semilla, producto de alta calidad y pureza, que contiene no menos del 90% de proteínas en base seca, (Wolf, W. and Cowan, J. 1976).

El valor nutritivo de los aislados proteínicos recibe más atención, cuando Osborne y Mendel encuentran que la proteína principal tiene cerca de las 2/3 partes del valor nutricional de la caseína.

Para su obtención se parte de harinas desgrasadas que han recibido un tratamiento térmico mínimo; la extracción se efectúa con agua y álcalis a pH 7.5-8.5; posteriormente el extracto se acidifica a pH 4.5 para precipitar la proteína; el residuo se lava, neutraliza y seca, (Badui, 1990).

La precipitación ácida trae consecuencias sobre los aislados proteínicos:

- a. Hay desnaturalización de las proteínas, lo cual altera en forma adversa su funcionalidad y solubilidad, (Anderson, R. 1974).
- b. La proteína precipita con fitatos (hexafosfatos de inositol), lo cual deteriora su solubilidad y la tendencia a agregarse, (Morr, C. 1979).

Los aislados de soya son más deficientes en aminoácidos sulfurados que los demás productos de la soya; debido al proceso del cual se obtienen, hay destrucción de la cistina y metionina. El uso de estos productos en la industria alimenticia es principalmente en alimentos para infantes, en donde se fortifica la fórmula láctea adicionando metionina.

Otro de los usos más prometedores de los aislados de soya, es en la formulación de alimentos texturizados o análogos de la carne. En éste

proceso el aislado proteínico es disuelto o suspendido en álcali y entonces es pasado con fuerza a través de una especie de tamiz, dentro de un baño ácido para formar fibras, (Badui, 1990).

En algunos estudios que hacen Degroot y Slump, se concluye que el valor nutritivo de los alimentos texturados, es equivalente al de la proteína de la carne de res y cerca del 80% de la caseína. El valor nutritivo de los alimentos texturados no es bajo, ya que la cistina no es destruida, debido a que el tratamiento alcalino en los aislados proteínicos se hace por poco tiempo y a temperatura ambiente.

Composición de las formas comerciales de la soya.

En resumen, las formas comerciales de la soya están clasificadas en: harinas, concentrados y aislados.

En el cuadro II se muestra la composición general de estos productos, (Badui,1990).

	Harinas		Concentrados			Aislados
	grasa	s/grasa	alcohol	ácido	agua	
Proteína	41.5 %	53.0 %	66.0 %	67.0 %	70.0 %	93.0 %
Grasa	21.0 %	1.0 %	0.3 %	0.4 %	1.2 %	-
Agua	5.0 %	5.0 %	6.7 %	5.2 %	3.1 %	4.7 %
Fibra cruda	2.1 %	2.9 %	3.5 %	3.4 %	4.5 %	0.2 %
Cenizas	5.2 %	6.0 %	5.6 %	4.8 %	3.8 %	3.8 %
*ISN	-	-	5.0 %	7.0 %	3.0 %	85.0 %

*ISN= Índice de solubilidad de nitrógeno.

Cuadro II.- Composición de las formas comerciales de la soya.

Características de concentrados y aislados de soya.

De acuerdo a las características analíticas de estos productos proporcionados por distintos fabricantes, el análisis crítico es el contenido de nitrógeno, el cual multiplicado por el factor 6.25 es convertido a proteína. Este análisis generalmente es usado para definir los concentrados y aislados de soya.

Los concentrados en base seca contienen alrededor del 70% de proteína, los aislados 90%. Hay variabilidad en otros componentes, probablemente resultante de la naturaleza de los materiales biológicos, de la diferencia de los procesos empleados y la variabilidad inherente a la metodología analítica, (Mattil, K. 1974).

Los rangos analíticos de estos compuestos para el contenido de proteínas son: aislados proteínicos de soya de 86 a 94 % y concentrados proteínicos de soya de 65 a 72 %, (Smith and Circle, 1980).

Los principales minerales de ambos son: calcio, sodio, fósforo y potasio; además son fuentes principales de calcio y hierro.

Mediante estudios se muestra que los rangos de composición de los aminoácidos esenciales son pequeños y que hay una considerable sobreposición entre los concentrados y los aislados. Se puede establecer que las similitudes en la composición de los aminoácidos, en estos productos comerciales, son mayores que sus diferencias.

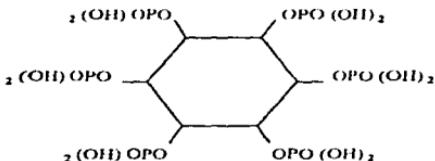
Como se observa, una diferencia substancial entre estos productos es el contenido de nitrógeno y hay algunas otras diferencias que son deliberadas, por ejemplo: los fabricantes producen aislados y concentrados de soya con baja y alta solubilidad proteica; algunos productos se comercian precipitando en el pH isoelectrico y otros neutralizando; otros pueden ser modificados por vía enzimática o

cualquier mecanismo que induzca propiedades específicas. La finalidad de los fabricantes es obtener productos sin color, sabor u olor; producir una diversidad de productos para una variedad de necesidades, (Mattil, K.1974).

3. Características del ácido fitico.

El ácido fitico también es conocido como ácido inositolhexafosfórico y tiene su origen en la fitina encontrada en algunas semillas.

La fórmula de este producto es la siguiente:



El principal origen de fósforo en la semilla de soya es el ácido fitico del cual proviene el 75% del fósforo total; el 12% lo cubren los fosfátidos, el 4.5% es fósforo inorgánico y el fósforo restante tal vez sea de los ácidos nucleicos, (Wolf, W. 1979). El fósforo de los fitatos varía de 0.505% a 0.727%, (Averill and King, 1926).

El contenido de ácido fitico varía según el producto de soya de donde proviene, de los métodos de extracción y cuantificación

utilizados, por ejemplo: los aislados proteínicos de soya contienen de 1.52 % a 1.63 %, las harinas desgrasadas 1.82 % y las harinas sin desgrasar desde 1.12 % hasta 1.60 %, (Thompson, 1892).

En métodos oficiales, después de extraerse el ácido fítico de los productos y separarse mediante precipitación o pasándolo por columna de intercambio iónico, el fósforo es cuantificado y relacionado al contenido de ácido fítico, (USP, 1995).

La presencia de una gran cantidad de fósforo en los aislados proteínicos de soya, indica una intensa reacción del ácido fítico con las proteínas, cuando éstas son precipitadas a pH de 4.5 (Smiley and Smith, 1946). Se ha establecido que las proteínas y el fitato forman un complejo, el cual deteriora la solubilidad y la tendencia a agregarse de las proteínas, afecta la disponibilidad de aminoácidos (Hartman, G. 1978), y reduce la disponibilidad del zinc, calcio y otros micronutrientes (O'Dell and Savage, 1960), propiedad que no es cambiada, ni sometiendo los productos de soya a calentamiento; esto indica que los fitatos son factores antinutricionales que no se destruyen con el calor, (Erdman, 1979).

La interacción del fitato con las proteínas de soya es influenciada por el pH y cationes tales como el calcio. El fitato de calcio es insoluble a pH arriba de 6 y permanece soluble a pH arriba de 10, cuando la proteína está presente.

B. LA LECHE Y SUS PRODUCTOS.

1. Generalidades de la leche.

La leche es el líquido secretado por las glándulas mamarias de los mamíferos, su composición es compleja, es de color blanco y opaco, de sabor dulce y de pH aproximadamente neutro.

En la leche se pueden encontrar tres constituyentes:

- a. La emulsión de materia grasa bajo forma globular.
- b. La suspensión de caseína, ligada a sales minerales.
- c. La solución o fase hídrica, que forma el medio más voluminoso, continuo. Puede considerarse que está formada por el conjunto de sustancias disueltas en el agua como las proteínas solubles, lactosa y sales minerales.

La leche de la especie bovina es la más extendida y su área de difusión aumenta cada día.

Constitución bioquímica.

En la leche hay cuatro tipos de componentes que se encuentran en mayor proporción:

- a. Lípidos.
- b. Proteínas (caseína, albúminas y globulinas).
- c. Glúcidos (esencialmente lactosa).
- d. Sales minerales.

A ellos se les añaden otros componentes presentes en cantidades mínimas: lecitinas, vitaminas, enzimas y nucleótidos.

La fracción proteínica de leche se puede dividir en tres grupos:

a. La caseína entera: es un complejo de proteínas fosforadas y constituye la parte nitrogenada más característica de la leche. La caseína precipita sólo cuando se acidifica la leche a pH de 4.6. En la leche de los rumiantes constituye el 80% del total nitrogenado.

b. Las proteínas de lactosuero: esta fracción está constituida por albúminas y globulinas las cuales se insolubilizan por el calor antes de los 100°C; normalmente se encuentran en muy pequeñas cantidades.

c. Las proteasas-peptonas: son sustancias proteicas con un peso molecular intermedio entre las proteínas y el de los péptidos. En la leche casi no se encuentran.

Todas las proteínas contienen grupos polares que poseen una gran atracción por las moléculas del agua, pero no todas son igualmente solubles. El pH tiene una gran influencia ya que, en el punto isoelectrico cesa la repulsión de moléculas y hay floculación de algunas de ellas; las proteínas que forman la caseína precipitan por un cambio de pH a 4.6.

La fracción grasa de la leche esta compuesta por:

a. Lípidos neutros: es la materia grasa propiamente dicha, constituida por glicéridos. Se trata de una grasa que a temperatura ambiente (20°C) es sólida.

b. Lípidos polares: son fosfolípidos de naturaleza compleja, constituyen alrededor del 1% del conjunto.

c. **Sustancias lipídicas:** son sustancias insolubles en agua y se encuentran en una proporción menor al 1%; por ejemplo las vitaminas A, D y E, esteroles y carotenos.

De los azúcares, la lactosa es la más importante, por ser un glúcido libre que existe en una cantidad considerable; además de ser el componente más abundante de leche, es el más simple y el que se encuentra en proporción constante.

Aspecto nutritivo.

La leche es un elemento casi completo, puesto que contiene elementos nutritivos energéticos (grasas e hidratos de carbono), así como elementos nutritivos de construcción (proteínas y minerales), así como la mayor parte de vitaminas necesarias para el funcionamiento de los procesos bioquímicos de nuestro organismo.

La leche es un excelente origen de calcio, fósforo y riboflavina aunque es pobre en vitamina D. Las proteínas de la leche son importantes en la nutrición humana y la materia grasa es una fuente rica de energía, (Hui, 1992).

En el **cuadro III** se muestra una composición general de la leche de vaca, (Alais, Ch. 1985).

Componentes	Porcentaje
Agua	90.5
Lactosa	4.9
Lípidos:	3.5
Materia grasa	3.4
Fosfolípidos	0.05
Vitaminas, carotenos, etc.	0.05
Proteínas:	3.4
Caseína	2.7
Albúminas y globulinas	0.55
Sustancias nitrogenadas no proteicas	0.15
Salas	0.9

Cuadro III. Composición típica de la leche de vaca.

2. Formas comerciales de la leche.

Antes de la era industrial existían pocos productos lácteos; esencialmente estaban constituidos por la leche entera y desnatada, la nata, la mantequilla y los quesos; pero la lista aumenta cada día y en la actualidad puede resumirse así:

Leche de consumo.

Leches que no están modificadas (excepto por los procesos de esterilización y a veces un desnatado parcial).

Leches concentradas.

Incluye leches condensadas, evaporadas y desecadas (leche en polvo) por la acción del calor.

Leches modificadas.

Comprende leches maternizadas, aromatizadas y esterilizadas; leches fermentadas o acidificadas (yoghurt, leche acidófila, kéfir); leches reconstituidas, en las que uno de los componentes, generalmente la materia grasa, se sustituye por una sustancia extraña como aceite vegetal parcialmente hidrogenado.

Nata.

Parte de la leche muy rica en materia grasa y separada de la leche entera mediante reposo o centrifugación. El helado de nata es un derivado.

Mantequilla.

Obtenida por batido de la nata, la materia grasa ya no se encuentra en su estado natural, puesto que se le ha separado del llamado suero de mantequilla o mazada (con composición parecida a la leche desnatada). Se utilizan también el aceite de mantequilla y diversos tipos de mantequilla deshidratada.

Queso.

Obtenido por coagulación de la leche, generalmente bajo la acción del cuajo. El coágulo se separa del suero y forma el queso tras el desuerado y la maduración; contiene esencialmente caseína y la grasa de la leche.

La caseína se obtiene por coagulación de la leche desnatada, es un subproducto de la fabricación de mantequilla.

Suero de leche.

Producto separado después de la obtención de la caseína, constituido por: albúminas, globulinas, lactosa y sales minerales. Los productos obtenidos de los sueros son: lactosa, queso de suero, requesón, concentrados proteínicos, productos vitaminados, etc.

Productos alimenticios.

Preparaciones que contienen más o menos componentes lácteos como las preparaciones de panadería, galletería, postres lácteos, pastas lácteas, etc; (Alais, Ch. 1985).

En el cuadro IV, se muestra la proporción de los componentes mayoritarios de algunos productos de la leche, (Webb and Whittier, 1970).

Producto	Proteína	Grasa	Lactosa	Cenizas	Agua
Leche de consumo	3.5	3.5	4.9	0.7	87.4
Mantequilla	0.6	81.0	0.4	2.5	15.5
Queso de leche entera	25.0	32.2	2.1	3.7	37.0
Leche evaporada	7.0	7.9	9.7	1.6	73.8
Leche entera en polvo	26.4	27.5	38.2	5.9	2.0
Leche descremada en polvo	35.9	0.8	52.3	8.0	3.0
Suero de mantequilla en polvo	34.3	5.3	50.0	7.6	2.8
Lactosa cruda	-	-	99.0	-	1.0
Caseína	88.0	1.0	-	4.0	7.0

Cuadro IV.- Composición promedio de diversos productos lácteos.

C. METODO KJELDAHL.

El método Kjeldahl, publicado hace más de 100 años (Morries, 1983), es aún, uno de los procedimientos analíticos más usados, para medir el contenido de proteínas en materiales biológicos y para determinar el nitrógeno en materiales orgánicos. La razón por la cual es aceptado ampliamente y considerado un método oficial es: la alta seguridad, en combinación con los conocimientos que han sido desarrollados durante el largo período de su uso. Los resultados obtenidos mediante el método de Kjeldahl se usan para calibrar los métodos físicos y automáticos utilizados para la determinación de nitrógeno, (Pearson, 1988).

No obstante que la técnica ha sido modificada considerablemente, los principios básicos (conversión por oxidación de nitrógeno orgánico a amoníaco), no han cambiado sustancialmente.

El método de Kjeldahl consta de tres etapas:

- a. Digestión.
- b. Destilación.
- c. Determinación del amonio.

El método Kjeldahl está basado en la combustión húmeda, calentando la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores metálicos o de otro tipo, para efectuar la reducción de nitrógeno orgánico a amoníaco, el cual es retenido en solución como sulfato de amonio. La solución de la digestión se hace alcalina y se destila o se arrastra con vapor para liberar el amoníaco, que es atrapado y titulado, (Pearson, 1988).

La etapa de digestión es la parte más difícil dado que los procesos de oxidación y reducción tienen que ser reconciliados; es la etapa que

más modificaciones ha tenido y donde se ve más afectada la exactitud y precisión de la determinación de nitrógeno, (Benton, 1991).

Johan Kjeldahl inició la técnica calentando la muestra con ácido sulfúrico concentrado cerca de su punto de ebullición (330°C). La primera modificación fue la adición de varios metales como catalizadores en la mezcla de digestión, para así aumentar la velocidad de realización en esta etapa; los más utilizados han sido: mercurio, cobre, hierro, selenio y dióxido de titanio.

El siguiente cambio fue la adición de sulfato de potasio o de sodio para incrementar la temperatura de digestión, arriba del punto de ebullición del ácido sulfúrico, disminuyendo con esto el tiempo de digestión. Es importante que durante la digestión la relación entre el ácido y el sulfato sea baja, ya que en caso contrario puede haber pérdida de amoníaco por volatilización, (Benton, 1991).

La adición de ácido perclórico o peróxido de hidrógeno en la mezcla de digestión, se ha sugerido como medio para acelerar el proceso de digestión y disminuir la formación de espuma, (Pearson, 1988).

Es importante que al iniciar una determinación de nitrógeno, la muestra tenga un tamaño de partícula pequeño que asegure su homogeneidad. En el caso de realizar la prueba con el método Macro-Kjeldahl se deben pesar entre 0.5 y 1.0 gramo de muestra.

Para asegurar buenos resultados y evitar errores en la determinación, debido al nitrógeno que pudiesen contener reactivos y papeles usados en el proceso de digestión, se debe trabajar con un blanco.

La destilación se realiza en medio alcalino con adición de hidróxido de sodio. El amoníaco liberado es atrapado en soluciones de

ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido bórico.

Los sistemas Kjeldahl para la digestión han cambiado considerablemente, desde el uso de matraces Kjeldahl de 800 ml hasta un sistema totalmente automatizado. El sistema de Tecator Kjeltec, ilustrado en la figura 4, utiliza para la digestión tubos de vidrio en un bloque metálico, la muestra y la mezcla reactiva se calientan eléctricamente, pudiéndose elegir la temperatura deseada; para eliminar los vapores ácidos se colocan capuchones en la boca de los tubos, los cuales están conectados a agua circulante.

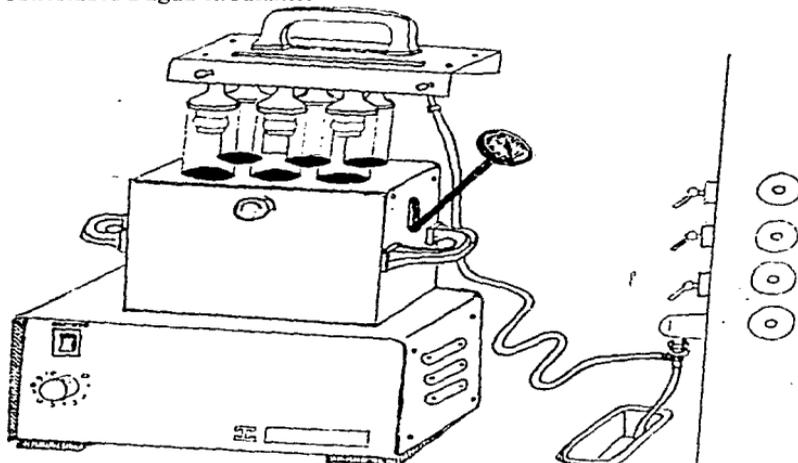


Figura 4. Equipo de digestión de Tecator.

La destilación es el siguiente paso y se lleva a cabo en forma rápida, por arrastre de vapor y en forma automática. Esta etapa puede consumir alrededor de 3 minutos, (fig. 5).

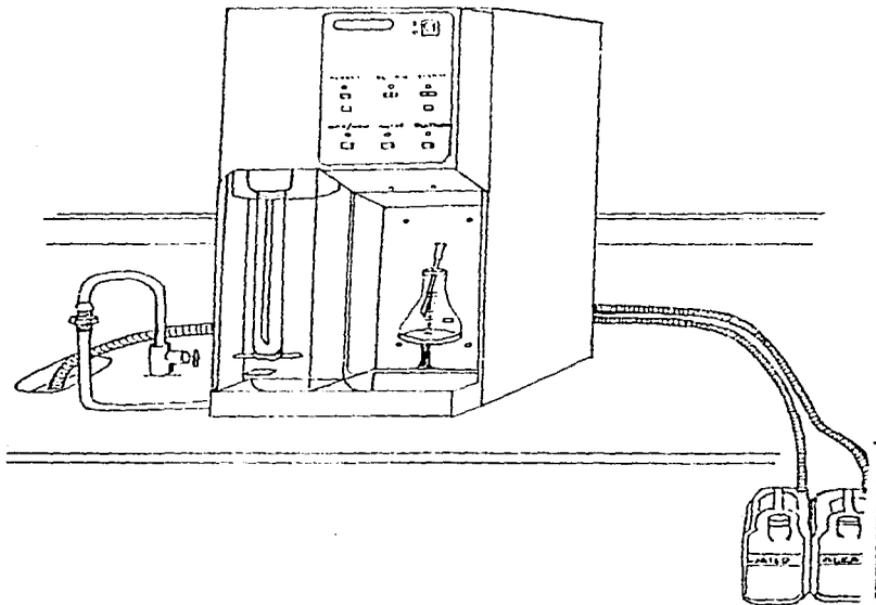


Figura 5. Equipo de destilación de Tecator.

La determinación de la concentración de amoníaco puede ser determinada por varias técnicas. Los dos procedimientos comúnmente usados son: titulando después de finalizar la destilación y mediante reacciones colorimétricas.

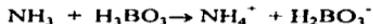
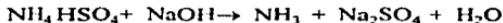
La titulación es el procedimiento más sencillo y rápido; las mezclas de indicadores pueden ser: verde de bromocresol-rojo de metilo o rojo de metilo-azul de metileno; los agentes titulantes son soluciones valoradas de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, (Benton, 1991).

Las reacciones químicas que representan este proceso son:

a. Digestión:



b. Destilación:



c. Titulación:



Ref. Benton, J; 1991

D. VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

La validación de un método analítico es una medida de la eficacia de un sistema analítico en forma total. En otras palabras, los investigadores deben asegurarse de que el método, instrumentos, solventes, reactivos y todo aquello empleado durante el ensayo, sea adecuado para que el compuesto sea analizado.

Los métodos adaptados deben ser verificados bajo condiciones actuales de uso, y las variaciones en la metodología existente tienen que ser sujetas a un proceso de validación, (Guerra, 1986).

El diseño clásico para validar una metodología analítica, es analizar muestras de referencia que son similares en todos los aspectos a la muestra problema y comparar con los resultados esperados o valores certificados.

Hay dos tipos principales de procesos de validación:

a. **Validación Prospectiva:** establece la evidencia documentada para que un sistema esté basado en un protocolo preplaneado.

b. **Validación Retrospectiva:** establece la evidencia documentada para que un sistema esté basado en la revisión y análisis de información histórica.

Existen dos métodos para la determinación de exactitud en un proceso de validación: el de adición de estándar y el de placebo adicionado. En el método de placebo adicionado, el ingrediente activo es añadido a una mezcla de excipientes, éstos no deben tener el mismo comportamiento del ingrediente activo; la mezcla es analizada y comparada con los resultados esperados. En el método de adición de estándar, una cantidad conocida de estándar es añadida a la muestra de

ensayo; muestra normal y adicionada son analizadas, calculándose el porcentaje de recobro. En ambos métodos el recobro es definido como la porción de estándar obtenido por el ensayo entre la cantidad de estándar adicionado, (Guerra, 1986).

Para que un método sea confiable, deberá ser diseñado para permitir una evaluación estadística a un nivel de confianza del 95%. Recobros entre 80-100% son aceptables para concentraciones mayores a 100 ppb, (Guerra, 1986).

Para llevar a cabo un proceso de validación o cualquier trabajo de rutina dentro de un laboratorio, es necesario verificar y asegurarse de que:

a. La muestra con la que se trabaja sea representativa de un lote. Con frecuencia cuando hay variaciones en resultados para el mismo producto, es indicativo de un mal muestreo y se refleja en el grado de precisión.

b. El chequeo rutinario de las balanzas analíticas para disminuir errores sistemáticos en los análisis.

c. El material de vidrio sea lavado y enjuagado con agua destilada.

d. Las curvas de calibración son útiles para detectar problemas en los instrumentos electrónicos; si la ordenada pasa sólo cerca del origen puede indicar un mal funcionamiento del equipo; si una línea recta pasa por el cero, indica una linealidad apropiada dentro del rango del instrumento.

En conclusión, la validación es esencial para medir la confiabilidad de un procedimiento analítico en un problema específico. La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda

establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, (Alcántara, 1993).

La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos:

Linealidad.

La linealidad de un sistema o método analítico, es su capacidad para que los resultados analíticos sean proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un rango determinado.

La ecuación matemática que representa este concepto es:

$$y = mx + b \text{ donde:}$$

“y” es el valor de la propiedad medida, “m” representa la pendiente de la recta, “x” el valor de la concentración y “b” la intersección en el eje de la y a una concentración de 0. El coeficiente de correlación “r” y el coeficiente de determinación “r²” son datos estadísticos que nos sirven para estimar si los puntos experimentales se ajustan a una línea recta; el valor ideal de “r²” es 1.

Los criterios de aceptación, para la linealidad del sistema de medición son:

a. El coeficiente de determinación (r^2) debe ser ≥ 0.98 y, por lo tanto, la relación debe ser lineal.

b. La ordenada al origen debe ser igual a cero.

c. El coeficiente de variación de regresión, debe ser $\leq 1.5\%$.

d. La relación entre la concentración y la propiedad medida debe ser altamente significativa.

Los criterios de aceptación para evaluar el error sistemático proporcional o linealidad del método analítico son:

a. La pendiente de la relación lineal, cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a uno.

b. La ordenada al origen de la relación lineal, cantidad adicionada y cantidad recuperada, debe ser estadísticamente igual a cero.

c. El coeficiente de variación debe ser $\leq 3.0\%$ para métodos químicos y espectrofotométricos.

d. El coeficiente de determinación r^2 debe ser ≥ 0.98 .

e. El intervalo de confianza debe incluir el valor de la pendiente y en su caso el valor de la ordenada al origen.

Precisión.

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; bajo las mismas condiciones (repetibilidad) ó bajo diferentes condiciones de análisis (reproducibilidad).

El criterio de aceptación para la precisión del sistema de medición es que el coeficiente de variación cv, debe ser $\leq 1.5\%$.

Para la precisión del método analítico, el coeficiente de variación total debe cumplir con los fines para los cuales el método será utilizado; para métodos cromatográficos 2%, químicos y espectrofotométricos 3% y microbiológicos 5%.

La repetibilidad, la reproducibilidad interanalista y la reproducibilidad interdía/analista, debe satisfacer los requisitos establecidos para el principio de medición y la utilización del método de medición.

Exactitud.

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 muestras a las que se han adicionado cantidades conocidas de analito.

La exactitud del método analítico a una cantidad fija de analito es conocida como error sistemático constante y los criterios de aceptación son:

- a. El intervalo de confianza para la media, debe incluir el 100% de recobro.
- b. El coeficiente de variación del método químico debe cumplir con el propósito para el cual va a ser empleado. Para métodos químicos $\leq 3\%$ y volumétricos $\leq 2\%$.
- c. El porcentaje de recobro en promedio debe ser de 98 a 102% para métodos volumétricos y del 97% al 103% para métodos químicos.

Rango.

El rango de un método analítico es el intervalo entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia, el cual se ha demostrado que es preciso, exacto y lineal, utilizando el método descrito.

Estabilidad analítica.

Es el conjunto de condiciones en las cuales la muestra mantiene constante su propiedad medible en un lapso determinado.

Las muestras son sometidas a distintas condiciones, por ejemplo: diferentes tiempos de almacenaje, de refrigeración, de temperaturas, etc.

De acuerdo al análisis estadístico que se utilice, (contraste de hipótesis o intervalo de confianza) se debe mostrar que la muestra es estable si la valoración del tratamiento respectivo es equivalente a la valoración inicial

Límite de cuantificación.

Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede determinarse con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia o analito en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de

detección es usualmente expresado como la concentración de analito (porcentaje, partes por billón, etc.) en la muestra.

Especificidad.

Es la medida del grado de interferencia en el análisis de mezclas complejas. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés. El criterio es que el método no debe responder a los placebos.

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, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, etc.

E. INTRODUCCION AL SISTEMA ARMONIZADO.

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 a través de las líneas fronterizas. Más tarde, con el desarrollo de las sociedades industrializadas, cobró gran importancia el saber el nivel de tal comercio, aun cuando se aplicaran impuestos o peajes.

Los primeros sistemas de clasificación de mercancías consistieron en una lista alfabética de los productos, a los cuales se aplicaban ciertos impuestos o peajes (tasa de derechos), o bien eran eximidas de tales gravámenes.

Conforme aumentó el nivel e importancia del comercio internacional, se hizo necesaria la creación de una nomenclatura aduanera tipo, para asegurar:

a. La clasificación sistemática de todas las mercancías que se encuentran en el comercio internacional.

b. Una clasificación internacional uniforme de todas las mercancías, sobre una base lógica en las tarifas de todos los países que adoptaran la nomenclatura.

c. La adopción de un lenguaje aduanero común aceptado a nivel internacional.

d. Una recopilación de datos uniforme a nivel mundial para la comprobación de estadísticas comerciales.

Es así , que en base a las necesidades ya mencionadas se consolida la Ley del Impuesto General.

La Ley del Impuesto General de Importación de México, (mejor conocida como Tarifa de Importación) clasifica todos los bienes objeto

de comercio internacional y determina el pago de impuestos de importación para cada producto específico.

La Tarifa asigna a cada producto un código de 8 dígitos , conocido como fracción arancelaria, y para cada fracción arancelaria determina un impuesto de importación, conocido como arancel.

El sistema de clasificación utilizado en la Tarifa de Importación Mexicana es el "Sistema Armonizado para la Codificación y Designación de Mercancías". Este esquema de nomenclatura internacional es utilizado también en los EE.UU. y Canadá.

El Sistema Armonizado establece un esquema de clasificación común para los países usuarios hasta el nivel de seis dígitos del código, y deja a criterio y necesidades de cada país la utilización de subdivisiones adicionales. Así, a nivel de los primeros seis dígitos del código, México, EE.UU. y Canadá mantienen el mismo sistema de clasificación para todos los productos comerciales.

La tarifa de importación y la de exportación están compuestas por : 22 secciones, 97 capítulos, 31 subcapítulos, 1247 partidas, subpartidas y fracciones arancelarias. Las mercancías dentro de la tarifa se encuentran organizadas de lo más simple a lo más complejo, esto es, primero encontramos la clasificación de los productos en estado natural y posteriormente los productos derivados y elaborados con éstos.

Ejemplos:

Los dos primeros dígitos corresponden al capítulo; los cuatro primeros dígitos a la partida dentro del capítulo; los seis primeros dígitos a la subpartida dentro de la partida y los ocho dígitos a la fracción arancelaria.

1. La clave SA (sistema armonizado) para la vainillina es 0905.00.

2. La clave SA para para goma guar es 1302.32.
3. La fracción arancelaria 3504.00.06 corresponde a los aislados de proteínas de soya.
4. La fracción arancelaria 2106.10.01 es para los concentrados de proteína de soya.
5. La fracción arancelaria para preparaciones alimenticias a base de productos lácteos y proteínas de soya es 1901.90.03
6. En la partida 0404 se encuentran productos lácteos y sus mezclas.
7. El capítulo 30 abarca productos farmacéuticos.
8. La partida 3003 es para los medicamentos constituidos por productos mezclados entre sí, para usos terapéuticos o profilácticos, sin dosificar ni acondicionar para su venta al por menor.
9. La subpartida 3003.10 medicamentos con Penicilina o Estreptomicina o sus derivados.
10. La subpartida 3003.20 incluye medicamentos que contengan otros antibióticos.
11. La fracción arancelaria 3003.20.01 es para desinfectantes para boca, nariz, oídos o garganta.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente se están importando mercancías a base de productos lácteos o sus mezclas (suero de leche, leche descremada, leche entera, caseínatos, etc.) y preparaciones lácteas, las cuales pueden traer como ingredientes ajenos a la leche, concentrados y aislados de proteínas de soya.

Resulta de gran interés y es indispensable identificar estos derivados por los siguientes motivos:

- a. En ocasiones el marbete o información que ampara la mercancía no corresponde con su verdadera constitución.
- b. El tratamiento fiscal es diferente en estos dos tipos de productos (facilidad de importación, tasa arancelaria, precio del producto, autorizaciones y permisos previos).

En el área analítica se plantean dos problemas:

1. Las metodologías existentes para identificar los productos proteínicos de soya son poco prácticos por lo siguiente:

- a. La separación de las proteínas de la soya en productos lácteos, en su punto isoeléctrico es difícil, porque la caseína de la leche también precipita.
- b. La electroforesis y la cromatografía de líquidos a alta presión son técnicas sensibles a la desnaturalización y los cambios conformacionales en productos procesados, en donde hay formación de puentes sulfhidrilo-disulfuro entre caseína y las albúminas y globulinas del suero de la leche. (Douglas and Tobias, 1982).

c. La identificación de fibra de soya mediante la observación microscópica se convierte en un requisito difícil de cumplir, considerando que entre más alto es el contenido de proteínas en un producto, menor es la cantidad de fibra; además, hay que recalcar que se trata de preparaciones, en donde el derivado de soya puede estar en baja proporción.

d. Las metodologías existentes requieren de un material con el que no siempre se cuenta en los laboratorios.

Por lo anterior se plantea la necesidad de desarrollar una metodología sencilla y práctica, que permita detectar productos proteínicos de soya cuando existan, en cualquier proporción, con productos lácteos y sus mezclas; y de esta forma proponer una clasificación arancelaria correcta.

2. Los aislados y concentrados de proteína de soya son productos que se diferencian por su contenido de proteínas, sin embargo algunos quedan entre los límites de los porcentajes de proteínas y es dudoso plantear su identidad.

Por lo antes expuesto se hace necesaria la existencia de un método confiable para cuantificar proteínas, que permita decidir sobre la naturaleza de los productos proteínicos de soya y de esta forma clasificarlos correctamente.

III. OBJETIVOS.

1. Detectar la presencia de los aislados y concentrados proteínicos de soya, en mezclas con productos lácteos, mediante la extracción y precipitación del ácido fítico.
2. Validar el método Kjeldahl adaptado para cuantificar proteínas en concentrados y aislados de proteína soya, utilizando el equipo Tecator.

IV. HIPOTESIS.

1. Si el ácido fítico permanece en productos de soya procesados y además, es extraído y precipitado en presencia de productos lácteos, entonces se podrá detectar la presencia de derivados proteínicos de soya.
2. Si el método para cuantificar proteínas es confiable, entonces se podrá diferenciar correctamente entre un concentrado y un aislado de soya.

V. PARTE EXPERIMENTAL.

A. MATERIAL Y EQUIPO.

Balanza analítica Fisher 250, calibrada.

Barras magnéticas de 3 cm de largo.

Bureta de 50 ml, calibrada, Kimax.

Bureta de 25 ml, calibrada, Kimax.

Frasco dosificador (10-30 ml), Tecator No. 15212002.

Gradilla para tubos Tecator 6 plazas, cat. 1000-0831.

Marco de pesas certificado.

Matraz aforado y calibrado de 1 litro, Pyrex.

Matraces Erlenmeyer de 300 ml, Pyrex.

Matraces Erlenmeyer de 500 ml, Pyrex.

Papel glassine.

Papel parafilm.

Papel Wathman del No. 4.

Parrilla de agitación y calentamiento

Probeta de 50 ml, Pyrex.

Probeta de 100 ml, Pyrex.

Sistema de destilación (Kjeltec System 1026).

Sistema de digestión (Digestion System 6 Tecator).

Tubos de digestión Tecator, cat. 1000-0158.

B: REACTIVOS.

Acido Bórico, reactivo analítico. Productos Químicos Monterrey, lote 003141 (Méx.)

Acido Sulfúrico, reactivo analítico, Merck; pureza 95-97%. No. cat. 731.

Agua destilada.

Cloruro Férrico.

Hidróxido de sodio, donativo.

Peróxido de Hidrógeno al 30%, reactivo analítico, donativo.

Rojo de Metilo, Merck, lote 7020113 (Germany). No. cat. 6076.

Selenio en polvo, donativo.

Sulfato de Potasio, reactivo analítico, Baker, lote G 14453 (Méx.), No. cat. 3.

Tetraborato de amonio (Ammonium hydrogen tetraborate, general purpose reagent). Hopkin and Williams, Ltd. (England) No. cat. 1428.

Verde de bromocresol. Merck, lote 9930452 (Germany). No. cat. 8121.

C. SOLUCIONES:

Acido Sulfúrico 0.1N. (Ver anexo2)

Mezcla reactiva de selenio. (Ver anexo 2)

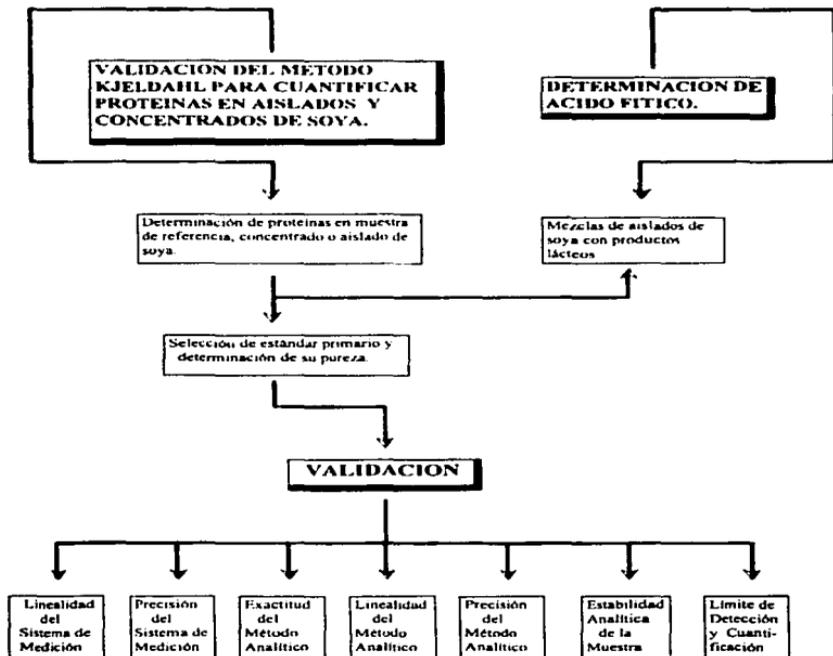
Solución de Acido Bórico al 4% con indicador. (Ver anexo 2)

Solución de hidróxido de Sodio al 40%. (Ver anexo 2)

Solución de HCl y Na_2SO_4 . (Ver anexo 2)

Solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y HCl. (Ver anexo 2)

D. PROCEDIMIENTOS.



I. Identificación del ácido fítico en productos de soya.

Ref. Thompson, D.B. 1982.

Se han usado varios métodos de extracción, los más adecuados son los que llevan como ingrediente el sulfato de sodio, con el cual se ha visto que mejora o aumenta la cantidad de ácido fítico en los extractos.

Al agregar al extracto $\text{FeCl}_3 - \text{HCl}$ se forma un precipitado de fitato férrico, éste está formado por 8 iones férricos que interactúan con el anión fitato, donde cada ión férrico puede estar entre 2 fitatos, (Thompson, 1982).

De acuerdo a Early (1944), hay una relación 4:6 entre el hierro y el fósforo.

Las muestras a las que se les va a identificar el ácido fítico deben estar homogeneizadas y molidas, además de tener bajo contenido de grasa para facilitar este procedimiento, por lo cual se sugiere extraerlas con éter.

a. Colocar 10 g de la muestra que se va a analizar en un matraz Erlenmeyer y agregar 100 ml de una solución de $\text{HCl} - \text{Na}_2\text{SO}_4$.

b. Agitar el contenido del matraz en forma mecánica durante dos horas y filtrar a través de papel Whatman No. 4.

c. Calentar a ebullición hasta precipitar todas las albúminas y globulinas que puedan interferir en una reacción posterior, filtrar nuevamente.

d. Pipetear dentro de un tubo de ensayo 10 ml del filtrado y adicionar 12 ml de una solución de $\text{FeCl}_3 - \text{HCl}$.

e. Agitar el contenido y calentar en baño de agua, el tiempo necesario hasta observar floculación, en caso de que el ácido fítico esté presente, (Thompson, D; 1981).

f. Preparar mezclas de aislado de soya con diversos lotes de productos lácteos; (suero de leche, leche entera, caseína, leche descremada) variar el contenido de aislado de soya en un rango de 1 a 7 % considerando que se pesan 10 g de muestra; aplicar el procedimiento anterior.

2. Determinación de proteínas por el método Kjeldahl (Equipo Tecator).

Ref. Manual Tecator.

a. Pesar la cantidad de muestra conveniente en papel glassine y colocarla en un tubo para digestión; transferir el tubo a la gradilla del digestor.

b. Agregar aproximadamente 4 g de mezcla reactiva de selenio, 12 ml de ácido sulfúrico concentrado y 4 ml de peróxido de hidrógeno. Se prepara un blanco de la misma manera, utilizando únicamente papel.

c. Colocar la gradilla con los tubos en el digestor Tecator, a una temperatura de 350-400 °C. Dejar en digestión durante 30-40 minutos o hasta que el líquido se torne translúcido.

d. Retirar la gradilla con los tubos y dejarlos enfriar; posteriormente agregarles 100 ml de agua destilada por las paredes con precaución.

e. Para destilar, preparar matraces Erlenmeyer con 25 ml de solución preparada de ácido bórico al 4% y 100 ml de agua.

f. Efectuar la destilación del blanco y colocar el tubo con un matraz recibidor en la unidad de destilación "Kjeltec"; esperar a que se realice la destilación.

g. Efectuar la destilación de las muestras utilizando el mismo procedimiento.

h. Titular el destilado, con solución valorada de ácido clorhídrico o sulfúrico 0.1N, hasta el vire del indicador.

Cálculos:

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

N = Normalidad del ácido valorado.

V = Volumen del ácido valorado.

V_b = Volumen de ácido gastado por el blanco.

P = Peso de la muestra.

% Proteínas = % Nitrógeno x F

F = 6.38 en productos lácteos.

F = 6.25 en los demás productos.

3. Validación del Método Analítico para cuantificar Proteínas.

Ref. Alcántara, A. 1993.

Selección del estándar primario.

La calibración del procedimiento Kjeldahl es esencial para asegurar la precisión de la determinación (Dux, 1986), así como el alto desempeño del método. Las etapas de digestión y de destilación pueden ser monitoreadas por el uso de estándares apropiados.

La selección del estándar se basa en que éste y la sustancia a analizar deben tener una composición y comportamiento químico similar. Hay varios estándares reconocidos y certificados por The United National Institute of Standards Technology, (Benton, 1991).

a. Efectuar pruebas con la sal de borato de amonio y estándares primarios reconocidos como el sulfato de amonio y fosfato diácido de amonio.

b. Reproducir las condiciones del sistema de medición del método Kjeldahl, pesar cantidades diferentes de cada sal y disolverlas en 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, con indicador; agregar 100 ml de agua y titular con ácido sulfúrico 0.1 N.

c. Elegir la sal que dé mejores resultados y que reproduzca las condiciones del sistema de medición del método Kjeldahl. Continuar trabajando con ella en las siguientes etapas.

Linealidad del Sistema de Medición.

Se determina construyendo una curva de calibración de una misma solución patrón, utilizando cuando menos 5 diluciones y haciendo

análisis por duplicado para cada dilución. El intervalo entre las concentraciones a utilizar dependerá del propósito del método; deberá estar incluido el contenido de analito esperado en las muestras.

La linealidad junto con la precisión, son los primeros parámetros que se evalúan en una validación.

a. Pesar 40 g de borato de amonio, con un contenido de nitrógeno conocido y aforar en un matraz volumétrico de 1 lt, cada mililitro contiene 2.703 mg/ml de nitrógeno.

b. Tomar alícuotas por lo menos por duplicado de solución de borato de amonio, de: 2.5 ml, 5.0 ml, 7.5 ml, 10.0 ml, 12.5 ml, 15.0 ml, 17.5 ml, 20.0 ml, 22.5 ml y 25.0 ml.

c. Transferir cada alícuota en un matraz Erlenmeyer de 300 ml.

d. Adicionar 100 ml de agua.

e. Agregar 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, con indicador.

f. Titular con solución valorada de ácido sulfúrico 0.1 N (correr un blanco para corregir volumen).

Precisión del Sistema de Medición.

Para su determinación, un analista debe analizar de manera independiente por lo menos 6 diluciones a partir de la misma solución patrón, correspondiente al contenido de analito esperado en las muestras. El punto central corresponde a 25 ml de solución titulante de ácido sulfúrico 0.1N y equivalente a aproximadamente a 500 mg de

borato de amonio. (El contenido de nitrógeno en la solución preparada es de 2.703 mg/ml).

a. Pesar 40 g de borato de amonio, con un contenido de nitrógeno conocido; transferir a un matraz aforado de 1 lt; agregar agua hasta el aforo.

b. Tomar 6 alicuotas de 12.5 ml y transferir a matraces Erlenmeyer de 300 ml.

c. Adicionar 100 ml de agua y 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, con indicador.

d. Titular con solución de ácido sulfúrico 0.1N (correr un blanco para corregir volumen).

Determinación de la Exactitud del Método Analítico .

Un analista debe preparar de manera independiente, por lo menos 6 muestras adicionadas de analito, de tal forma que se obtenga la concentración del 100% del analito esperado en las muestras de interés, y recuperar la sustancia mediante el método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

a. Determinar el error sistemático constante del método analítico o exactitud del método a un porcentaje fijo de 70% y 90% de proteínas, utilizando muestra adicionada que consuma un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición.

b. Pesar para los dos niveles de análisis 0.3 g de muestra; para el primer nivel adicionar 39.6 mg de borato de amonio y para el segundo

131.6 mg. Pesar las muestras por sextuplicado y de manera independiente.

c. Colocar las muestras pesadas en los tubos de digestión Tecator y realizar el procedimiento para determinación de nitrógeno. (Procedimiento No. 4).

d. Calcular porcentaje de proteínas y porcentaje de recobro.

Linealidad del Método Analítico.

La determinación consiste en que un analista prepare muestras adicionadas de estándar o analito, de manera independiente, por lo menos por duplicado, como mínimo a tres distintas cantidades adicionadas; para la recuperación del analito se debe emplear el mismo método de medición, bajo las mismas condiciones de análisis.

La determinación de la linealidad del método o error sistemático proporcional se realiza después de que la evaluación de la exactitud del método analítico haya resultado satisfactorio.

a. Determinar el error sistemático proporcional del método, utilizando muestra adicionada en el intervalo de 65% a 95%, de tal manera que consuma un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición.

Al testigo de referencia adicionar estándar de borato de amonio. La cantidad de muestra seleccionada y de estándar agregado se basa en: que ambos deben gastar un volumen titulante comprendido dentro de la curva estudiada (preferentemente ± 25 ml) ; muestra y estándar deben ser pesados adecuadamente y el contenido de nitrógeno de ambos al ser convertido a proteínas deben cubrir un rango de 65 % a 95 %. Utilizar la

ecuación de la determinación de proteínas; por ejemplo, para el nivel de 70% se calculó:

$$70/6.25 = 0.014 \times 100 \times 0.0981 \times (21.46 + y) / 0.3$$

Donde:

70 = contenido de proteínas requerido.

6.25 = factor de conversión.

0.014 = miliequivalente del nitrógeno.

0.0981 = normalidad del ácido titulante.

21.46 = volumen de ácido gastado por 0.3 gramos de muestra testigo.

y = volumen que debe gastar el estándar y que se convierte a miligramos de éste, para cubrir el contenido de nitrógeno requerido (0.3402 g de borato de amonio consumen 25.83 ml de ácido); en la ecuación se despeja "y".

b. Pesar en papel glassine, para todos los niveles 0.3 g de muestra y adicionar para el nivel 65%, 16.5 mg de borato de amonio; para el 70%, 39.6 mg; para el 80%, 85.6 mg; para el 90%, 131.6 mg y para el 95%, 154.6 mg . Cada determinación se hace por triplicado.

c. Transferir a tubos de digestión Tecator y continuar con el procedimiento para determinación de proteínas (procedimiento No. 4).

d. Calcular los porcentajes de proteínas y los porcentajes de recobro correspondientes a cada medición.

Precisión del Método Analítico.

Se debe llevar a cabo cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes, analizando cada muestra por triplicado. Trabajar de manera

independiente partiendo de una muestra homogénea del producto, cercana al 100% de la concentración teórica, (cantidad de analito esperado).

a. Analizar un concentrado de proteína de soya, que contiene 61.45% de proteínas.

b. Realizar cada determinación por triplicado, cada uno de los analistas en dos días diferentes.

c. Utilizar el Método Kjeldahl, tratando de gastar un volumen titulante comprendido en el intervalo de linealidad del sistema de medición.

Estabilidad Analítica de la Muestra.

El análisis consiste en comparar los resultados obtenidos como mínimo en tres muestras pesadas de forma independiente, con los obtenidos de las mismas muestras cambiando las condiciones. Las muestras se almacenan bajo diferentes condiciones de temperatura ambiente, refrigeración, luz, etc., por el tiempo preestablecido por el analista. Reanalizar las muestras bajo las mismas condiciones de operación, para cada tiempo, de acuerdo con lo establecido por el método analítico.

a. Pesar 16 muestras en papel glassine y transferir a tubos de digestión.

b. Realizar la digestión y la destilación como en el procedimiento para cuantificar proteínas, (procedimiento No. 4).

c. Titular los matraces del destilado: 4 de inmediato, 4 a las 18 horas; 4 a las 42 horas, y 4 a las 66 horas.

d. Calcular porcentaje de proteínas.

Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Sistema de Medición.

Se evalúa la respuesta de la sustancia de interés, como mínimo a tres diluciones a concentraciones bajas, por triplicado; partiendo de una misma solución patrón y determinando la respuesta de 6 blancos preparados de manera independiente. La determinación se efectúa por un mismo analista, bajo las mismas condiciones de operación.

a. Determinar el límite de detección y cuantificación, utilizando una cantidad de borato de amonio que se titule con 0.5ml, 1.0 y 2.5 ml de ácido sulfúrico 0.1N. Trabajar por duplicado en cada caso y corriendo 6 blancos. Cada ml de solución de borato de amonio contiene 0.7569 mg de nitrógeno.

b. Pesar 3.6198 g de borato de amonio, disolverlo y llevarlo al aforo en un matraz volumétrico de 500 ml.

c. Tomar 5 alícuotas de 1 ml, 2 ml y 5 ml.

d. Transferir a matraz Erlenmeyer de 300 ml; adicionar 100 ml de agua y 25 ml de solución de ácido bórico al 4%, con indicador.

e. Titular con solución valorada de ácido sulfúrico 0.1N.

f. Correr 6 blancos, no corregir el volumen.

VI. RESULTADOS.

A. DETERMINACION DE ACIDO FITICO.

Productos lácteos				
% de aislado de soya	1	3	5	7
Tiempo de floculación ,min.				
0	NF	NF	NF	F
5	T	T	T	F
10	T	T	F	F
15	T	F	F	F

Cuadro V. Identificación de aislado de proteína de soya en productos lácteos mediante extracción del ácido fitico.

Donde:

NF= No hay floculación

F= Floculación

T= Turbio

B. VALIDACION DEL METODO ANALITICO.

1. Linealidad del sistema de medición.

mg. Nitrógeno (x)	ml. H ₂ SO ₄ 0.0981N (y)
6.7575	4.9
6.7575	4.9
13.5150	9.8
13.5150	9.8
20.2725	14.8
20.2725	14.85
27.0300	19.8
27.0300	19.8
33.7875	24.7
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6
40.5450	29.7
40.5450	29.6
47.3025	34.55
47.3025	34.6
54.0600	39.4
54.0600	39.5
60.8175	44.4
60.8175	44.4
67.5750	49.25
67.5750	49.15

Cuadro 6. Volumen de ácido sulfúrico consumido por miligramos de nitrógeno.

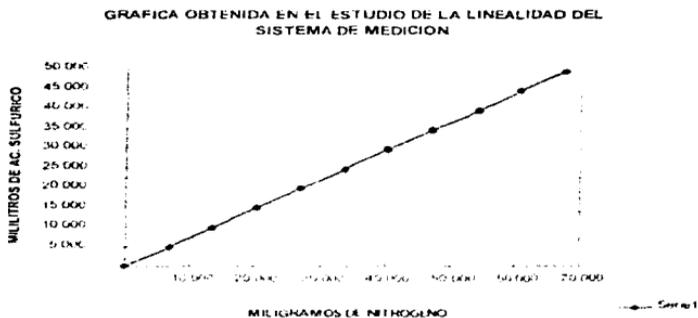


Figura 6. Gráfica obtenida en el estudio de la linealidad del sistema de medición.

Estadigrafos	Resultados
m	0.7245
b	0.0133
cv	0.2532 %
S _{xx}	0.0687
r	1.0000
IC	0.7278; M: 0.7311
IC	-0.0564; B: 0.0830

Cuadro 7. Valor de los estadigrafos calculados en el estudio de la linealidad del sistema.

2. Precisión del sistema de medición.

mg. de Nitrógeno	ml. H ₂ SO ₄ 0.0981N
33.7875	24.7
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6
33.7875	24.6

Cuadro 8. Volumen de ácido sulfúrico consumido en el punto central de la curva de linealidad.

Estadígrafos	Resultados
\bar{y}	24.6167
s	0.0408
cv	0.1658

Cuadro 9. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de la precisión del sistema.

3. Exactitud del Método Analítico (Exactitud al 100 %).

% Proteínas (muestra adicionada) (x)	ml. H ₂ SO ₄ 0.0981N	% Proteína recuperada	% de recobro (Y)
70	24.45	69.9110	99.8729
70	24.45	69.9110	99.8729
70	24.65	70.4828	100.6897
70	24.50	70.0539	100.0770
70	24.40	69.7680	99.6686
70	24.50	70.0539	100.0770
90	31.30	89.5571	99.5079
90	31.35	89.7002	99.6669
90	31.5	90.1294	100.1438
90	31.5	90.1294	100.1438
90	31.6	90.4155	100.4617
90	31.45	89.9863	99.9848

Cuadro 10. Valores de recobros de proteína en el estudio de exactitud para concentrados y aislados de soya.

Estadígrafos	Resultados	
	70%	90%
\bar{y}	100.0430	98.9848
s	0.3518	0.3483
IC	99.6738	99.6193
	$\leq R \leq$	$\leq R \leq$
	100.4122	100.3504
cv	0.3516	0.3483

Cuadro 11. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de exactitud al 100 %.

4. Linealidad del Método Analítico .

% de Proteínas (muestra adicionada)(X)	ml. H ₂ SO ₄ 0.0981N	% Proteínas recuperadas (Y)	% Recobro
65	22.7	64.95040	99.92369
65	22.65	64.80730	99.70353
65	22.6	66.66430	99.48346
70	24.45	69.91100	99.87285
70	24.45	69.91100	99.87285
70	24.65	70.48280	100.68971
70	24.5	70.05390	100.07700
70	24.4	69.76798	99.66854
70	24.5	70.05390	100.07700
80	27.9	79.80230	99.75287
80	27.95	79.97190	99.96487
80	28.0	80.11500	100.14365
90	31.3	89.55710	99.50788
90	31.35	89.70020	99.66688
90	31.5	90.129400	100.14377
90	31.5	90.129400	100.14377
90	31.6	90.415500	100.46166
90	31.45	89.986300	99.98477
95	33.3	95.279600	100.29431
95	33.1	94.675800	99.65873
95	33.0	94.421250	99.39078

Cuadro 12. Valores de recobros de proteínas en el estudio de la linealidad del método analítico.

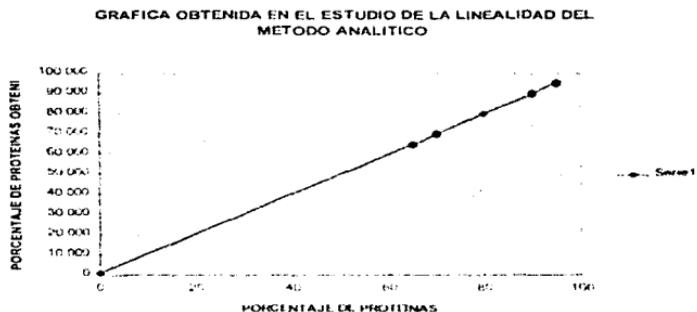


Figura 7. Gráfica obtenida en el estudio de la linealidad del método analítico.

Estadígrafos	Resultados
m	0.9987
b	0.0459
cy	0.3456 %
Syx	0.2763
r ²	0.9994
IC para M	0.9873 ≤ M ≤ 1.0102
IC para B	-0.8788 ≤ B ≤ 0.9873

Cuadro 13. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de la linealidad del método.

5. Precisión del método analítico (Reproducibilidad)

Analistas (c)		
	1	2
Día 1 (f c)	61.0629	61.7231
	60.8366	61.5527
	61.0159	61.1317
Día 2	60.8785	60.9856
	60.7886	61.5591
	60.7617	61.8539

Cuadro 14. Porcentajes de proteína obtenidos por dos analistas, en dos días diferentes.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal	F teórica $\alpha=0.05$
Analista	1	0.99873	0.99873	50.60	gld/gld 18.51
Día/Analista	2	0.03948	0.01974	0.26	gld/gle 4.46
Error	8	0.61127	0.07641	--	

Cuadro 15. Tabla de Análisis de la Varianza.

Estadígrafos	Resultados
\bar{y}	61.2209 %
s	0.3872
cv total	0.6330 %
variación interanalista	0.4039
cv interanalista	0.6598 %
Repetibilidad	0.5418

Cuadro 16. Estadígrafos obtenidos en el estudio de la precisión del método.

6. Estabilidad Analítica de la Muestra

Tiempo	0 Horas	19 Horas	42 Horas	66 Horas
proteínas	61.0652	61.2414	61.0664	61.6787
	61.0560	61.6310	61.1490	61.3671
	61.1930	61.6002	61.2897	61.8065
	61.6136	61.3601	61.5581	61.6940

Cuadro 17. Porcentajes de proteínas obtenidos titulando a diferentes tiempos de almacenaje después de destilar.

Condiciones de almacenaje a temperatura ambiente	t_D calculadas	t_D teórica α 0.05, gl 12 $t=3$	Media aritmética
tiempo 0			61.2320
19 Horas	1.482870	2.68	61.4582
42 Horas	0.221945	2.68	61.2658
66 Horas	2.652126	2.68	61.6366

Cuadro 18. t de Dunnette calculadas y medias aritméticas a diferentes tiempos de almacenaje.

7. Límite de Detección y Cuantificación.

mg de nitrógeno (x)	ml. de $H_2 SO_4$ 0.1077 N (y)				
0.7569	0.55	0.60	0.60	0.50	0.50
1.5138	1.00	1.00	1.05	1.00	0.95
3.7845	2.40	2.60	2.50	2.50	2.50
Blancos	0.55	0.60.	0.60	0.50	0.50

Cuadro 19. Volumen de ácido sulfúrico consumido por la cantidad mínima de nitrógeno.

Estadigrafos	Resultados
s	0.05000
m	0.64789
Sy/x	0.05500
cv	4.07417
r ²	0.99624
IC	0.62404 ≤ M ≤ 0.67174
LD	0.46305
LC	0.77174

Cuadro 20. Valor de los estadigrafos calculados en el estudio del límite de detección y cuantificación del método.

VII. ANALISIS DE RESULTADOS.

En el método para determinar el ácido fítico se observa que la floculación es un indicativo de que hay presencia de cualquier producto de soya; se utiliza un aislado proteínico como testigo porque este es un producto altamente procesado, el cual por tener menos fibra es más difícil de identificarlo en preparaciones alimenticias.

Se sugiere que en las muestras con alto contenido de grasa sea eliminado algo de ésta, ya que obstruye una filtración rápida.

La presencia al 1% de aislado de proteína de soya en productos lácteos puede ser visualizada aunque con cierta inseguridad; sin embargo, cuando hay 3% o más los resultados se vuelven confiables.

La falta de constancia en los resultados cuando hay un porcentaje bajo de aislado de soya, probablemente se deba a la pequeña cantidad de ácido fítico contenido en la muestra, a la interacción de éste con las proteínas, o la solubilidad mínima que tenga el complejo ácido fítico-hierro en el medio extrayente.

Esta prueba es negativa para los productos lácteos probados (suero de leche, leche entera, caseína, leche descremada), aunque la presencia de albúminas y globulinas pueden interferir en la interpretación de los resultados, si estas no son eliminadas totalmente. Es necesario trabajar con un blanco para evitar errores.

El tiempo de floculación nos da idea del lapso en el cual podemos esperar una prueba positiva, ya que a tiempos mayores se pueden precipitar sales u otro tipo de compuestos que den un resultado positivo.

El Método Kjeldahl tradicional (con matraces tipo Kjeldahl) brinda buenos resultados; sin embargo los cambios a nivel de instrumentación, material y reactivos deben ser evaluados.

La metodología con el equipo Tecator utiliza menos volumen de ácido sulfúrico, la digestión se realiza en tubos y el tiempo de digestión disminuye; en trabajo rutinario se usan reactivos sin marca y las mezclas reactivas se preparan en el mismo lugar, es decir, la variabilidad de las condiciones del método aumentan.

La validación de esta metodología es importante para respaldar los resultados obtenidos y así tener seguridad en las conclusiones.

La primera etapa dentro del estudio de la validación consiste en seleccionar el estándar primario para checar todo el sistema de medición; no todas las sales sugeridas son apropiadas, la mejor es la que responde de manera semejante al comportamiento de las muestras; el tetraborato o borato de amonio es una sal estable, de pureza y composición conocida que respondió a los requerimientos del método.

La validación del método es un procedimiento que nos permite conocer el método y su respuesta con las muestras de interés.

Los parámetros evaluados son:

Precisión del sistema de medición.

Se preparó una solución de borato de amonio que tuviera una cantidad de nitrógeno, que al tomar cierto volumen gastara aproximadamente 25 ml de ácido sulfúrico; este valor se tomó como punto central al considerar que hay menos errores de medición.

a. La desviación estándar es una medida de la precisión y representa la variación individual con respecto a la media, el valor obtenido de 0.041 ml nos indica que la dispersión de los resultados es mínima; además, comparando este valor con la escala mínima del sistema de medición utilizada en el experimento, se esperaría un máximo de variación de 0.1 ml, medibles en la bureta y la desviación estándar es menor, por lo que los resultados son aceptables.

b. El coeficiente de variación (cv) que se obtuvo , 0.1658% , es menor al aceptado como criterio ($\leq 1.5\%$) por lo que también se considera que hay precisión en las determinaciones.

c. La amplitud máxima es $4s = 0.164$, esto significa que cuando un analista realiza un duplicado el resultado no variará más de 0.164 unidades.

Por los datos obtenidos de diversas formas se asegura que el sistema de medición es preciso.

Linealidad del sistema de medición.

Se estableció trabajar en un rango de contenido de nitrógeno en donde se consumieran volúmenes, que fueran de 5 ml a 50 ml; de esta forma se cubrían valores de nitrógeno de los concentrados y aislados proteicos de soja de composición conocida y desconocida.

a. El valor del coeficiente de determinación (r^2) obtenido es 1, lo que nos indica que hay una relación lineal entre el volumen de ácido sulfúrico consumido (y) y el contenido de nitrógeno (x) en el intervalo de 6.7575 mg a 67.5750mg de este analito.

b. El valor de la pendiente "m", 0.7295, al ser diferente de 0 nos dice que hay relación significativa entre nuestras variables; hay respuesta en "y" cuando "x" varía.

c. La ordenada al origen de la relación es 0.0133, esto representa una respuesta a una concentración de 0 mg de nitrógeno, lo que se explica por errores que no se han eliminado, como son: el vire del indicador, la forma de visualizar el menisco en la bureta, etc.

d. Los intervalos de confianza para la pendiente (0.7278 a 0.7311) y la ordenada al origen (-0.0564 a 0.0830) incluyen los datos obtenidos, es decir que se está dentro de una alta probabilidad de acercarse al valor verdadero.

Los valores de "m" (0.7295) y "b" (0.0133) son los que representan la mejor recta en donde se minimizan las desviaciones en la dirección "y", entre los puntos experimentales y la línea calculada ; esto se comprueba con el cv de 0.2532% que es menor al 1.5% aceptado como criterio.

Exactitud del Método Analítico (Exactitud al 100%).

En la determinación de la exactitud al 100% (error sistemático constante) y la linealidad del método analítico (error sistemático proporcional) se estableció trabajar con el método de adición de estándar, ya que los concentrados y los aislados de proteína de soya son productos en los cuales existe mucha variabilidad en su composición, debido a que proceden de diferentes importadores y fabricantes.

Se trabajó con un testigo de referencia de concentrado de proteína de soya, puesto que estos productos contienen menos proteínas que los

aislados proteínicos y así poder cubrir un rango superior de contenido de nitrógeno en la determinación de la linealidad del método.

a. Dado que el intervalo de confianza para el porcentaje de recobro incluye el 100%, el método analítico es exacto ya que hay concordancia entre el valor obtenido y el esperado con la cantidad de analito adicionado.

b. Los coeficientes de variación 0.3483% y 0.3518%, también cumplen con el requisito de ser \leq al 3%, la dispersión de los resultados con respecto a la media es mínima.

c. Los porcentajes recuperados aceptados para métodos volumétricos cubren un intervalo de 98% a 102% , característica que cumplen los resultados.

El método es exacto ya que cumple con los criterios establecidos; no hay error sistemático a las concentraciones de 70% y 90%.

Linealidad del Método Analítico.

Los datos en el estudio del error sistemático proporcional o linealidad del método analítico indican:

a. El intervalo de confianza de la pendiente incluye el 1 , valor ideal para una relación directamente proporcional entre volumen de ácido sulfúrico y mg de nitrógeno, el resultado de "m" 0.9987 también está en el intervalo para poder ser considerado el valor real .

b. El valor de "m" implica que hay relación significativa entre las variables "x" y "y".

c. El valor de “b” 0.04593 a pesar de indicar que hay algunos errores que no se han eliminado, al estar incluido en el intervalo de confianza tiene gran probabilidad de acercarse al valor verdadero; además es un valor pequeño considerando el intervalo de volúmenes titulantes.

d. El coeficiente de determinación $r^2 = 0.99943$ es muy cercano a 1; la relación cantidad de nitrógeno y volumen de ácido sulfúrico es lineal.

e. El cv 0.3456% es menor al establecido, $\leq 3\%$, es decir, la dispersión de los resultados con respecto a la media es pequeña.

Debido a que los resultados obtenidos son aceptables, el método no presenta error sistemático proporcional en las concentraciones de 65% al 95% de proteínas.

Precisión del método analítico.

De acuerdo al criterio de aceptación de que el coeficiente de variación total no debe ser mayor al 3%, el valor 0.6330% es pequeño, por lo que se concluye que el método es preciso, la dispersión de resultados con respecto a la media es mínima.

Aunque no es un requisito en la validación, se utilizó el Análisis de Varianza para localizar la fuente de error; este análisis estadístico se usa generalmente cuando hay más de un factor de variación.

Al construir la tabla de ANADEVIA y comparar las F teóricas y las F calculadas se observó que no hay efecto de día, pero si de analista, por ser mayor la F calculada que la teórica, esto hace sugerir que cuando se necesite realizar un duplicado de alguna determinación lo haga el mismo analista.

Al calcular la variación debido, al analista y el coeficiente de variación respectivo ($cv = 0.6598\%$) concluimos que debido a que el valor obtenido es menor al establecido como criterio, el efecto del analista no afecta la precisión del método, pero sí puede disminuirse y controlarse el error.

Por los resultados explicados se considera que el método analítico es reproducible.

Estabilidad de las muestras.

El análisis estadístico que se usó fue el contraste de hipótesis, aunque se pudo haber usado el intervalo de confianza. Las hipótesis establecidas son:

$$H_0 \quad \mu_i = \mu_0 \quad \text{y} \quad H_a \quad \mu_i \neq \mu_0$$

La hipótesis nula plantea que los valores del tratamiento i son iguales a los valores iniciales, es decir que hay estabilidad en las muestras. Dado que las t de Dunnette calculadas son menores a las t teóricas, se considera que la muestra es estable a las 19, 42 y 66 horas de almacenaje a temperatura ambiente, a la luz, conservada y tapada con parafilm.

Como a las 66 horas hay tendencia a dar resultados más altos, lo cual se refleja en que la t de Dunnette calculada es cercana a la teórica, se recomienda no almacenar en este intervalo.

Límite de cuantificación y detección del sistema.

El límite de cuantificación es 0.772 mg. de nitrógeno; este valor es la mínima concentración que puede determinarse con exactitud y precisión aceptable ya que : " r^2 " es mayor a 0.98 y "m" es diferente de cero.

El valor de 0.463 mg. de nitrógeno es la mínima concentración que puede ser detectada , aunque no necesariamente cuantificada.

Especificidad.

Esta determinación no fue necesario hacerse ya que la precisión y exactitud del método nos indican que el método es específico para el analito estudiado; además, la trayectoria y el estudio del método por más de 100 años respaldan su uso.

VIII. CONCLUSIONES.

La identificación de ácido fítico a través de su floculación en preparaciones lácteas indica la existencia de productos de soya.

La técnica para determinar cualitativamente el ácido fítico es sencilla, económica y confiable para rangos de 3% o más de aislados proteínicos de soya en productos lácteos.

El método Kjeldahl adaptado, al ser validado responde a los requerimientos teóricos y prácticos, en la determinación de nitrógeno de muestras como aislados y concentrados de proteína de soya.

Hay precisión y linealidad en el sistema de medición, el método cumple con exactitud, precisión y linealidad en los rangos establecidos de contenido de nitrógeno.

El método Kjeldahl instrumentado por Tecator y 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.

El problema de diferenciar aislados proteínicos de los concentrados proteínicos de soya a través del contenido de proteínas, se deberá basar en que el método es confiable, en los procedimientos de obtención de estos productos y en el criterio establecido por la práctica.

ANEXO 1.

1. Linealidad del sistema de medición y del método analítico.

Estadígrafo:

Fórmula:

Pendiente de la recta:

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

Ordenada al origen:

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

Coefficiente de variación :

$$cv = \frac{Sy / (x) (100)}{y}$$

Desviación estándar de regresión:

$$Syx = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

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 M:**

$$m - t(0.975, n-2) (Sm \leq M \leq Sm) \\ m + t(0.975, n-2) (Sm)$$

**Intervalo de confianza
para B:**

$$b - t(0.975, n-2) (Sb \leq B \leq Sb) \\ b + t(0.975, n-2) (Sb)$$

Donde:

M = Pendiente poblacional real.

t (0.975, n-2) = Valor de la distribución t de Student con n-2
grados de libertad y una confianza del 95% = 2.0739.

$$t = 2.0739$$

$$n = 24 \text{ gl } 25$$

$$t = 2.0930$$

$$n = 21 \text{ gl } 19$$

$$Sm = Sy/x \sqrt{\frac{1}{\frac{\sum x^2 - (\sum x)^2}{n}}}$$

$$Sb = Sy/x \sqrt{\frac{1 + \bar{x}^2}{n (\sum x^2) - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

TABLA DE ANALISIS DE LA VARIANZA.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F
Regresión	1	SCr	Scr	$F_r = \frac{SCr}{MCer}$
Error de regresión	n - 2	SCer	Scer/gler	
Ajuste	(n-2) - t(r-1)	SCfa	SCfa/glfa	$F_{fa} = \frac{MCfa}{Mcep}$
Error puro	t (r-1)	SCep	SCep/glep	

Donde:

$$SCr = m \sum xy + b (\sum y) - ((\sum y)^2) / n$$

$$SCer = \sum y^2 - m (\sum xy) - b (\sum y)$$

$$SCep = \sum y^2 - ((\sum y_i)^2) / r$$

gl = Grados de libertad.

$$SCfa = Scer - SCep$$

2. Precisión.

Estadígrafo:

Fórmula:

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Coefficiente de variación.

$$cv = \frac{(s) (100)}{\bar{y}}$$

3. Evaluación de la Exactitud o Error Constante del Método Analítico.

Estadigrado:

Fórmula:

Media aritmética.

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

Desviación estándar.

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

Intervalo de confianza para R.
(% de recobro)

$$y - t(n-1, 0.975) s/n \leq R \leq y + t(n-1, 0.975) s/n$$

t = 2.5706 con n = 6 y una confianza del 95%

Coefficiente de variación.

$$cv = \frac{(s) (100)}{n}$$

4. Precisión del método analítico.

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F cal.	F teórica
Analista	a - 1	$\sum Y_i^2 / dr - Y^2_{...} / adr$	SCa/gla	MCa MCd	Fgla/ gld α 0.05
Día/Analista	(d-1)a	$\sum \sum Y_{ij}^2 / r - \sum Y_i^2 / dr$	SCd/gld	MCd MCE	Fgld/gle α 0.05
Error	(r-1) da	$\frac{\sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \sum \sum Y_{ij}^2}{r}$	SCe/gle		

Donde:

a = analista

d = días

r = replicaciones

F = F de tablas con $\alpha = 0.05$ y es el cruce donde el valor del numerador se busca horizontalmente y el denominador verticalmente.

Y_{ij} . = suma de las combinaciones analista-día.

$Y_{i..}$ = suma para cada analista.

$Y_{...}$ = suma total de los datos.

Y_{ijk} = suma de cada dato elevado al cuadrado.

SC = suma de cuadrados.

MC = media de cuadrados.

Criterios:

Si $F_A \geq F_{(gla/gld, \alpha = 0.05)}$, el método analítico no es reproducible por los analistas.

Si $F_A \leq F_{(gla/gld, \alpha = 0.05)}$, el método es reproducible por los analistas.

Estadígrafo:

Fórmula:

Desviación estándar total

$$S_t = \sqrt{\frac{n \sum \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{...})^2}{n(n-1)}}$$

Coefficiente de variación total.

$$cv = \frac{(S_t)(100)}{\bar{y}}$$

Variación interanalista (S_a)

$$\pm \sqrt{\frac{MCa - MCd}{rd}}$$

Coefficiente de variación interanalista.

$$cv = \frac{(S_a)(100)}{\bar{y}}$$

Repetibilidad.

$$\pm \sqrt{Mcc}$$

Media aritmética total

$$\bar{y} = \frac{Y_{...}}{n}$$

Donde: n = adr

r = número de replicaciones.

d = número de días.

a = número de analistas.

5. Estabilidad Analítica de la muestra.

Condiciones de almacenaje	Fórmula para t de Dunnett
19 horas, temperatura ambiente	$t_D = \frac{y_1 - y_0}{\sqrt{MCe (2/r)}}$
42 horas, temperatura ambiente	$t_D = \frac{y_2 - y_0}{\sqrt{MCe (2/r)}}$
66 horas, temperatura ambiente	$t_D = \frac{y_3 - y_0}{\sqrt{MCe (2/r)}}$

Donde:

t = 3 tratamientos

r = 4 replicaciones

y_i = media aritmética del tiempo i de muestreo.

y_0 = media aritmética del tiempo cero de muestreo.

t de Dunnette teórica, con g/e grados de libertad, t tratamientos no incluyendo el tratamiento control y una confianza del 95% = 2.68

MCe = media de cuadrados del error = SCe/g/e

SCe = $\sum Y_{ij} - Y_i/r$

g/e = (t + 1) (r - 1) = 12

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6. Límite de detección y Cuantificación del Sistema de Medición.

Estadígrafo:

Fórmula:

Desviación estándar de blancos.

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

Pendiente.

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

Desviación estándar de regresión.

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n-2}}$$

Coefficiente de variación.

$$cv = \frac{(S_{yx})(100)}{y}$$

Coefficiente de determinación.

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

Intervalo de confianza para M

$$m - t(n-2, 0.975) S_m \leq M \leq m + t(n-2, 0.975) (S_m)$$

Límite de detección.

$$L.D = \frac{6 S_b}{m}$$

Límite de cuantificación.

$$L.C = \frac{10 S_b}{m}$$

Donde:

n = determinaciones.

t (13, 0.975) = 2. 1604

ANEXO 2.

Preparación de soluciones y reactivos.

a. Acido Sulfúrico 0.1 N: medir 3 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforarlo a un litro; valorarlo con carbonato de sodio secado por 2 horas a 105°C , usando naranja de metilo como indicador.

b. Mezcla reactiva de selenio: se prepara una mezcla con 1 gramo de selenio y 1000 gramos de sulfato de potasio, (Manual Tecator).

c. Solución de Acido 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 para completar cerca de 1.8 litros; agregar 20 ml de una 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 y mezclar, (Manual Tecator).

d. Solución de HCl y Na_2SO_4 : pesar 10 g de sulfato de sodio y disolver en 50 ml de agua; adicionar 1.2 ml de ácido clorhídrico y todo se afora a 100 ml con agua, (Thompson, 1982).

e. Solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y HCl : pesar 2 g de la sal; adicionar 16.3 ml de ácido clorhídrico concentrado y aforar a 1 litro con agua destilada, (Thompson).

IX. BIBLIOGRAFIA.

1. Alcántara, P. A. "Material de Apoyo para Validación de Métodos". LUAL. México, 1993.
2. Alden, D. E. "Soy Processing from Beans to Ingredients". J. Am. Oil Chemist's Soc. 1975, April, 52: 244A-248A.
3. Averill, H. P. and King, C. G. "Phosphorus content of Soybeans" J. Am. Chem. Soc. 1926, 49: 724-728
4. Ayres, H.G. "Análisis Químico Cuantitativo".Ed. Harla. 1970.
5. Badui, D.S. "Química de los Alimentos". Segunda Edición. Ed. Alhambra Mexicana, S.A. México. 1990, p. 617-637.
6. Benton, J.J. "Kjeldhal Method for Nitrogen Determination". Micro Publishing, Inc. USA. 1991.
7. Cogan, U. and Yaron, A. et al. "Effect of Processing Conditions on Nutritive Value of Isolated Soybean Proteins". J. Agr. Food Chem. 1968, 16: 196-198.
8. Committee International Dairy. Federation, International Organization for Standardization. "Dairy Products in Official Methods of Analysis". AOAC . Washington, D.C. 1980, p. 238-275.
9. Coppock J. "Soy proteins in Food - Retrospect and Prospect". J. Am. Oil Chemist's Soc. 1974. January 51: 59A-62A.

10. Degroot, A. P. and Slump, P. "Effect of Severe Alkali Treatment of Proteins on Aminoacid Composition and Nutritive Value". *J. Nutr.* 1969, **98**: 45-46.
11. Douglas, F. W. and Tobias, J. et al. "Quantitative Determination of total Protein, Casein and Whey Protein of Processed Dairy Products". *J. Dairy Sci.* 1982, **65**: 339-345.
12. Elmer, H. M. "Standard Methods For of Examination of Dairy Products". 14a. de. Editorial American Public Health Association. USA. 1978.
13. Fracciones Arancelarias y Plazos de Desgravación; Tratado de Libre Comercio de América del Norte. SECOFI. México. 1994, p. 8-9.
14. Guerra J. "Validation of FIDA". *Pharmaceutical Technology*. 1986, p. 75-80.
15. Hardin, C. M. "Impact of Plant Proteins in Worldwide Foods Systems in Soy Protein and Human Nutrition". Editado H.L. Wileke , D. T. Hopkins and D.H. Waggel. Academic Press. New York. 1979.
16. Hartman, C. II. Proceedings 69Th. Annual AOCS Meeting, St. Louis, MO. 1978, May 14-18.
17. Horan, F. E. "Soy Protein Products and Their Production", Plenary Sesión II. *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 1974, January 51: 67A-73A.
18. "Introducción al Sistema Armonizado de Designación y Codificación de Mercancías." Dirección General de Aduanas. SHCP. 1995.

19. Kinsella, J. E. "The Chemistry of Dairy to Baking". Ed. Chichester C. O. and Mrak, E. M. *Advances in Food Research* Academic Press. New York. 1971, p. 148-209

20. Manual Tecator. Kjeltec System. 1026 Distilling Unit.

21. Manual Tecator. Digestion System 6/12.

22. "Métodos Analíticos de Validación" Comité de Elaboración de Guías Oficiales de Validación , SSA.

23. Mattil, K. F. "Composition, Nutritional, and Functional Properties, and Quality Criteria of Soy Protein Concentrates and Soy Protein Isolates". *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 1974, 51: 81A-84 A.

24. Mc. Kinney, L.L. and Sollars, W. F. "Studies on the Preparation of Soybean Protein Free form Phosphorus". *J. Bio. Chem.* 1948, 177: 11-132.

25. Morr, C. V. "Technical Problems and Opportunities in Using Vegetable Proteins in Dairy Products". Sesión I. *J. Am. Oil Chemist's Soc.* 1979, March 56: 383-385.

26. Morris, P. " Century of Kjeldahl (1883-1993)". *J. Assoc. Publ. Analysis.* 1983, 21: 53-58.

27. Nelson, J. A. and Trot, G. M. "Judging Dairy Products". 4a. ed. Ed. Olsen Publishing. USA. 1964.

28. "Notas Explicativas del Sistema Armonizado de Designación y Codificación de Mercancías". Tomo I, Capacitación Aduanera y Asesoría, S. C.

29. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 1990, p.781-784.
30. **Osborne, T. B. and Mendel, I. B.** "Observation of Growth in Feeding Experiments with Isolated Food Substances". *Hoppe-Seyler's J. Physiol. Chem.* 1912, 80: 307-370.
31. **Phillippy, B. Q., Johnston, M. R. et al.** "Inositol Phosphates in Processed Foods". *J. of Food Science* .1988, Vol. 53, Num. 2, p. 496-499.
32. **Pinsky, A. And Grossman, S.** "Proteases of the Soybean II". *J. Sci. Food Agr.* 1969, 20: 374-375.
33. **Saio, K. Koyama, E. and Watanabe, T.** "Protein- Calcium Phitic Acid Relation Ships in Soybean I. Effects of Calcium and Phosphorus on Solubility Characteristics of Soybean Meal Protein". *Agr. Biol. Chem.* 1967, 31: 1195-1200".
34. **Smiley, W. G. and Smith, K. A.** "Preparation and Nitrogen Content of Soybean Protein". *Cereal Chem.* 1946, 23: 288-296.
35. **Smith, A. K. and Circle, S.J.** "Soybeans Chemistry and Technology". Vol. I. Segunda Edición. The Avi Publishing, Inc. USA. 1980.
36. **Smith, K. A. and Rackis, J. J.** "Phytin Elimination in Soybean Protein Isolation". *J. Am. Chem. Soc.* 1957 , 79: 633-637.
37. "The United States Pharmacopeia the National Formulary" United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1995, p. 800-1.
38. **Thompson , D. B. and Erdman, J. U.** "Phytic Acid Determination in Soybeans". *J. of Food Science.* 1982 , 43: 513-517.

39. Webb, B. H. and Whittier, E. O. "Byproducts from Milk". The Avi Publishing Company. USA. 1976.

40. Wolf, W.S. and Cowan, J. C. "Soybean as Food Source". CRS Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1979.

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la Semilla de Soya y su Germinado.	2
Figura 2. Capa de los prismas vista de frente.	3
Figura 3. Células en forma de relojes de arena.	3
Figura 4. Equipo de digestión "Tecator".	23
Figura 5. Equipo de destilación "Tecator".	24
Figura 6. Gráfica obtenida en el estudio de la linealidad del Sistema de Medición.	55
Figura 7. Gráfica obtenida en el estudio de la Linealidad del Método Analítico.	59

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Composición Promedio de la Semilla de Soya.	5
Cuadro 2. Composición de las Formas Comerciales de la Soya.	10
Cuadro 3. Composición típica de la Leche de Vaca .	17
Cuadro 4. Composición promedio de diversos Productos Lácteos.	20
Cuadro 5. Identificación de Aislado de Soya en Productos Lácteos mediante la extracción del Acido Fítico.	53
Cuadro 6. Volumen de Acido Sulfúrico consumido por cantidad de Nitrógeno.	55
Cuadro 7. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de la Linealidad del Sistema de Medición.	55
Cuadro 8. Volumen de Acido Sulfúrico consumido en el punto central de la curva de Linealidad.	56
Cuadro 9. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de de la Precisión del Sistema de Medición.	56
Cuadro 10. Valores de recobros de Proteínas en el estudio de Exactitud para Concentrados y Aislados de Soya.	57
Cuadro 11. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de la Exactitud del Método Analítico.	57
Cuadro 12. Valores de recobros de proteínas en el estudio de la Linealidad del Método Analítico.	58

Cuadro 13. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio de la Linealidad del Método Analítico.	59
Cuadro 14. Porcentajes de proteína obtenidos por dos analistas en dos días diferentes.	60
Cuadro 15. Tabla de Análisis de la Varianza.	60
Cuadro 16. Estadígrafos obtenidos en el estudio de la Precisión del Método Analítico.	61
Cuadro 17. Porcentajes de Proteína obtenidos titulando a diferentes tiempos, después de destilar.	61
Cuadro 18. t de Dunnette calculadas y obtenidas a diferentes tiempos de almacenaje.	62
Cuadro 19. Volumen de Acido Sulfúrico consumido por la cantidad mínima de Nitrógeno que puede ser detectado.	62
Cuadro 20. Valor de los estadígrafos calculados en el estudio del Limite de Detección y Cuantificación del Método.	63