



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

APLICACION DE LA TECNICA PIXE AL ANALISIS DE ALIMENTOS: CHOCOLATE Y AZUCAR

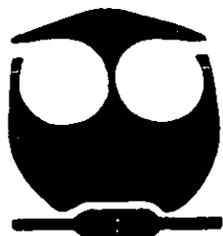
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

SALGADO ESCOBAR ALEJANDRA



MEXICO, D.F.

2001





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.

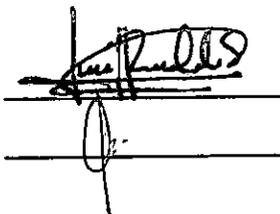
Jurado asignado:

Presidente	Prof. Federico Galdeano Biezobas
Vocal	Prof. Miguel Ángel Hidalgo Torres
Secretario	Prof. José Luis Ruvalcaba Sil
1er. Suplente	Prof. Luz Sandra Sánchez del Ángel
2o. Suplente	Prof. Carlos Manuel Shelly Álvarez-Tostado

El sitio donde se desarrolló el tema fue en el Laboratorio Acelerador Peletrón,
Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, UNAM.

Asesor del tema: Dr. Ruvalcaba Sil José Luis

Sustentante: Salgado Escobar Alejandra

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Luis Ruvalcaba Sil', is written over two horizontal lines. The signature is stylized and somewhat cursive.

Agradecimientos

A mis padres y hermanos por todo el apoyo, confianza, cariño y paciencia que me han brindado; así como a mi asesor, maestros y amigos, en especial Eduardo.

A la Facultad de Química por formarme como profesionista y enseñarme que siempre debemos mejorar cada día de nuestra vida.

A mis sinodales por sus aportaciones y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Instituto de Física de la UNAM por el uso de equipo e instalaciones. El Dispositivo de haz externo fue desarrollado gracias al proyecto CONACYT J32159-U. El acelerador funciona gracias al apoyo del proyecto G0010-E.

Al Sr. Karim López técnico del acelerador Peletrón por la operación del equipo durante el análisis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
CHOCOLATE Y AZÚCAR	3
1.1 Chocolate	3
1.1.1 Fabricación del Chocolate	4
1.2 Azúcar	7
1.2.1 Obtención de azúcar de caña	7
CAPÍTULO II	
TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS	9
II.1. Espectroscopía de Absorción Atómica	9
a) Absorción Atómica	10
b) Emisión Atómica	11
c) Fluorescencia Atómica	11
II.1.1 Análisis Cuantitativo por Absorción Atómica	12
II.1.2 Instrumentación de Absorción Atómica	14
II.2. Determinación de Aniones y Cationes por HPLC	17
II.2.1 Instrumentación para HPLC	19
II.3. AOAC	20

CAPÍTULO III	
LA TÉCNICA PIXE	21
III.1 Principio de la Técnica PIXE	21
III.2 Dispositivo Experimental.	23
III.2.1 Haz Externo PIXE	24
III.2.2 El Acelerador Peletrón	26
III.3 Análisis Cualitativo	29
III.4 Análisis Cuantitativo	31
III.5 Antecedentes de la aplicación de la Técnica PIXE en alimentos	34
CAPÍTULO IV	
ANÁLISIS Y RESULTADOS	37
IV.1 Preparación de Muestras	37
IV.2 Desarrollo Experimental y Análisis de Espectros	37
IV.3 RESULTADOS	39
IV.3.1 Chocolate	40
IV. 3.2 Azúcar	45
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	48
REFERENCIAS	50

INTRODUCCIÓN

La aplicación de la técnica Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (PIXE) a la caracterización de alimentos es reciente en el extranjero y relativamente nueva en nuestro país, ésta reviste particular importancia por las aportaciones que el conocimiento de la composición elemental implica en cuanto a la composición de los alimentos y su impacto en la salud y nutrición, las concentraciones de elementos presentes y su reglamentación (Normas Oficiales), residuos de los procesos productivos y control de calidad.

Para llevar a cabo el estudio de cualquier material mediante técnicas de origen nuclear como PIXE se requiere de un acelerador de partículas para producir un haz de iones. Por lo anterior pueden considerarse como métodos de análisis que requieren una infraestructura mayor. En un principio se consideraban métodos analíticos costosos pero con el desarrollo de las metodologías e infraestructuras y su optimización, los costos de análisis se han tornado equiparables e incluso menores al de otras técnicas, tal es el caso de Absorción Atómica. Además, en algunos casos no se requiere la preparación de muestras para el análisis, lo cual facilita su aplicación. Las técnicas de origen nuclear pueden combinarse para llevar a cabo un análisis simultáneo y muy completo del material, cabe señalar que las estas técnicas permiten determinar la composición de los materiales por elementos (no por compuestos), así como sus perfiles de concentración. En algunos casos es posible el análisis de isótopos de elementos ligeros. La profundidad de análisis depende del material y del elemento que se desea estudiar, pero en general puede considerarse de entre 10 y 100 micrómetros.

Este trabajo presenta el análisis PIXE de chocolates y azúcar, debido al alto consumo en sus diferentes modalidades o presentaciones por la población mexicana, en particular los mayores consumidores se localizan en la población infantil. Cabe señalarse que en el caso del azúcar, éste es usado además como materia prima en la elaboración de otros alimentos.

El chocolate y el azúcar no han sido estudiados previamente con esta metodología, dichos alimentos están constituidos esencialmente de una matriz de compuestos orgánicos y de componentes inorgánicos en pequeñas cantidades. En este caso, el análisis mediante PIXE permitirá determinar las concentraciones de elementos asociados a los compuestos inorgánicos con la posibilidad de compararlos con respecto a las normas oficiales vigentes, y consecuentemente, establecer algunos aspectos ligados a la producción y de alimentos enriquecidos y su posible impacto en nutrición.

Cabe mencionar que dada la naturaleza de los alimentos estudiados, para esta investigación no se requiere una preparación especial de muestras, y la elaboración de una pastilla por compresión basta para su irradiación y análisis.

Se propone el análisis de muestras de chocolate y azúcar procedentes no sólo de nuestro país, sino también del extranjero, con el fin de llevar a cabo una comparación de las composiciones determinadas mediante esta metodología.

Por último, en el caso de alimentos para los cuales no existen Normas Oficiales, el análisis mediante PIXE se presenta como un método alternativo, rápido y versátil para su establecimiento y verificación.

CAPÍTULO I

CHOCOLATE Y AZÚCAR

En este capítulo se presentan las principales características de los alimentos analizados, chocolate y azúcar así como su clasificación y el proceso de preparación de éstos.

I.1 Chocolate.

El chocolate es un preparado a base de granos de cacao enteros, fragmentados o reducidos a pasta, y de sacarosa, con o sin agregación de manteca de cacao, condimentos naturales, vainillina o etilvainillina, moldeado o sin moldear. Al principio se fabricaba directamente rallando granos pelados de cacao con azúcar. En la actualidad se parte de la pasta de cacao sin solubilizar, a la que se añade sacarosa, manteca de cacao, sustancias aromáticas y en ocasiones diversos compuestos (componentes de la leche, pasta de nueces o de café, etc.), se tritura, se machaca hasta formar una pasta untuosa y por último se le da forma. Para lograr un producto homogéneo, muy aromático de forma y estructura constantes y que se deshaga sobre la lengua, hace falta realizar las siguientes operaciones: mezclado y maxalado, fragmentación, concheado, atemperado y preparación de las tabletas.

El chocolate se compone, como mínimo de un 40% de pasta de cacao o de una mezcla de pasta y manteca de cacao y, como máximo, de un 60% de azúcar. La proporción de la manteca de cacao es como mínimo del 21%; la cantidad de pasta de cacao, incluida la fracción agregada de manteca de éste, es como mínimo del 33% [1].

1.1.1 Fabricación del chocolate.

i) Mezclado y malaxado.

La mezcla de la pasta de cacao, azúcar cristalizado, manteca de cacao, en el chocolate con leche, de leche en polvo se lleva a cabo en mezcladoras-malaxadoras. De lo cual se obtiene una pasta básica homogénea y plástica de chocolate.

ii) Fragmentación.

En los cilindros siguientes, la masa de chocolate mezclada, se vuelve a triturar haciéndola pasar por instalaciones graduales de rodillos, primero los de picado grueso y luego los finos. Los cilindros son huecos y puede regularse su temperatura hasta el punto deseado haciendo discurrir agua fría por su interior. En el producto terminado las partículas de cacao tienen un tamaño inferior a 30 ó 40 μ m. La masa a tratar con los rodillos debe tener un contenido graso comprendido entre el 23 y el 28%.

iii) Mejora final (Concheado)

El chocolate malaxado se reseca espontáneamente a temperatura ambiente, es polvoriento y de sabor ácido e inarmónico. Por ello, antes de volver a trabajar el chocolate, se deja reposar unas 24h a 45-50 °C (madurado) adquiriendo una consistencia pastosa. Para que los chocolates finos alcancen una especial fluidez, deben rallarse, agitarse y malaxarse en una operación de concheado en conchas alargadas o redondas. El proceso se suele realizar en dos etapas. En la primera se trabaja la pasta fundamental del chocolate a temperaturas hasta de 80°C durante 6 a 12h. Con esto disminuye la tasa de agua, se elimina una parte de los componentes volátiles (etanol, acetona, diacetilo, metanol, etanol, i-propanol, i-butanol, i-pentanol, acetato de etilo) y se distribuye uniformemente la grasa, de manera que todas las

partículas se revistan de una película de ésta. La temperatura no debe ser en manera alguna tan alta que disminuyan demasiado sustancias aromáticas importantes, como por ejemplo, la pirazina. En la segunda etapa se fluidifica la masa agregando manteca de cacao residual, para homogeneizarse a continuación, agregando en último lugar la lecitina.

iv) Atemperado y preparación de tabletas.

Antes de proceder a la preparación de las tabletas, la masa debe atemperarse para inducir la cristalización, operación decisiva para la estructura (fractura dura, conservación de la forma) y aspecto (superficie brillante, no mate), en la cual se producen núcleos de cristalización en condiciones controladas de trabajo (precristalización). La masa del chocolate completamente fundida se enfría primero desde unos 50°C en 10 minutos sin dejar de agitar hasta 18°C, a cuya temperatura se mantiene otros 10 min.; acto seguido para la formación de la modificación beta estable de la manteca de cacao, se vuelve a calentar durante unos 5 min. más a 29-31°C. Las condiciones del procesado oscilan de acuerdo con la composición de la pasta del chocolate. Antes de moldear las tabletas, se mantiene la pasta a 30-32°C; después se inyecta con bombas dosificadoras en moldes metálicos o de plástico precalentados. En tinas de sacudido se elimina el aire mediante agitación intensa, a continuación se enfría lentamente en artesas de refrigeración y, aproximadamente a unos 10°C, adquieren las tabletas su forma definitiva [2].

Tabla 1. Clases de chocolate [3].

Nombre oficial y sinónimos	Requisitos
Chocolate (sin calificativos) amargo; recubrimientos de chocolate; recubrimientos de chocolate amargo.	50-58 de grasa de cacao. Alkali adicionado.
Chocolate dulce (y recubrimientos de).	No menos de un 3.66% de chocolate, menos de un 12% de extracto seco de leche.
Chocolate (y recubrimientos de) semidulce.	No menos de un 35% de chocolate, por lo demás como el dulce.
Chocolate lacteado (y recubrimientos de); chocolate lacteado semidulce y (recubrimientos de).	No menos de un 3.66% de grasa de leche; no menos de un 12% de extracto seco de leche y 10% de chocolate; extracto seco magro de leche 120-243 veces el porcentaje de grasa de leche.
Chocolate con leche desnatada (sin apelativos, dulce y recubrimientos de).	Menos de un 3.66% de grasa de leche; no menos de un 12% de extracto seco magro.
Chocolate con mantquilla (y recubrimientos de).	Menos de un 3.66% de grasa de leche; no menos de un 12% de extracto seco de nata dulce.
Chocolate con diversos productos lácteos (y recubrimientos de).	Puede contncr menos de un 3.66% de grasa de leche. No menos de un 12% de extracto seco de los derivados lácteos usados.
Recubrimientos de chocolate dulce con aceites vegetales distintos del de cacao.	No menos de un 15% de chocolate.
Cacao dulce con aceites vegetales distintos del cacao.	No menos de un 6.8 % de cacao desengrasado.

1.2 Azúcar

La sacarosa es el azúcar más importante desde el punto de vista económico, y de todas las sustancias orgánicas preparadas industrialmente es la que se obtiene en mayor cantidad. La sacarosa se conoce bajo un gran número de nombres comerciales, algunos de carácter eminentemente popular. Estas denominaciones se refieren, por ejemplo, al grado de pureza (refinado, azúcar blanco, azúcar de consumo, melis, azúcar moreno, azúcar bruto), al tamaño y forma del grano (azúcar molido, azúcar cristalizado, etc.) y a su empleo (azúcar para conservas, azúcar de gelificación). Las dos plantas a las que se recurre como materia prima más importante para la obtención de sacarosa son la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y la remolacha azucarera (*Beta vulgaris ssp. Vulgaris var. altissima*).

La composición química de las diversas presentaciones del azúcar depende del grado de refinado. El azúcar refinado contiene prácticamente el 100% de sacarosa; el azúcar de remolacha contiene, además del 96% de azúcar <1.4% de agua 0.9% de cenizas y 1.5% de sustancias orgánicas no glucídicas; el azúcar moreno, el 98.8% de azúcar, 0.7% de agua, 0.20% de cenizas y 0.29% de sustancias orgánicas no azucaradas. Las cenizas de la remolacha contienen por término medio 28% de potasio, 4% de sodio, 5% de calcio y 13% de ácido fosfórico, además de numerosos elementos traza [1].

1.2.1 Obtención de azúcar de caña.

La obtención de azúcar de caña comienza con la separación del jugo de la caña de azúcar mediante prensado en molinos de rodillos, que suelen ir precedidos de un fragmentador de la caña. El fragmentador inicial y la primera molienda liberan de la caña más del 60% de su peso en jugo, y el 70% o más de su sacarosa. La repetición reiterada de la operación

proporciona rendimientos de azúcar del 93-97.4%. En ocasiones se combina el prensado con la extracción. La práctica de técnicas de obtención continua de jugo de caña supone un ahorro de energía y el incremento del rendimiento en azúcar.

La purificación del jugo bruto débilmente ácido (pH 4.8-5.6) se realiza con lechada de cal o con cal y dióxido de carbono.

La clarificación química del jugo es precedida por una separación mecánica de las partículas vegetales suspendidas por ejemplo, utilizando hidrociclones y filtros arqueados. Después se procede a la evaporación, en la cual la disolución clarificada se concentra hasta conseguir 65-70% de materia seca. Luego se vuelve a concentrar a vacío hasta que se inicia la cristalización. La separación del azúcar de estas melazas o jarabe madre se suele realizar por centrifugación. La cristalización requiere siempre varias etapas, ya que no es posible recuperar todo el azúcar en un solo paso. El subproducto llamado melaza, es el jarabe que se obtiene durante el paso final de la cristalización, de él ya no se puede cristalizar más azúcar debido a la alta concentración de sustancias no azucaradas.

CAPÍTULO II

TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Para realizar el análisis de alimentos se requieren de técnicas con alta sensibilidad e intervalos de detección apropiados. En este capítulo se introducen los principios de las técnicas más usuales para el análisis de alimentos.

En la actualidad existen diferentes opciones para el análisis de micronutrientes en alimentos, como es Absorción Atómica (AA), Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y Análisis químicos reconocidos oficialmente (AOAC), por mencionar los más importantes. Cada una cuenta con sus diferentes ventajas y desventajas. A continuación se describen las características más importantes de cada una de ellas.

II.1 Espectroscopía de Absorción Atómica (AA)

La Espectroscopía de Absorción Atómica se basa en la absorción de energía, emisión y la fluorescencia por átomos o iones elementales [4].

El átomo está constituido por un núcleo rodeado por electrones. Cada elemento tiene un número específico de electrones que está directamente relacionado con el núcleo atómico y que conjuntamente con él, da lugar a una estructura orbital, que es única para cada elemento. Los electrones ocupan posiciones orbitales en una forma predecible y ordenada. La configuración más estable y de más bajo contenido energético, es conocida como "estado fundamental" y es la configuración orbital normal para el átomo.

a) Absorción atómica.

Si luz de una determinada longitud de onda (o energía) incide sobre un átomo libre en estado fundamental, el átomo puede absorber energía y pasa al estado excitado, en un proceso conocido como Absorción Atómica. La propiedad de un átomo de absorber luz de longitud de onda específica, es utilizada en la espectrofotometría de absorción atómica.

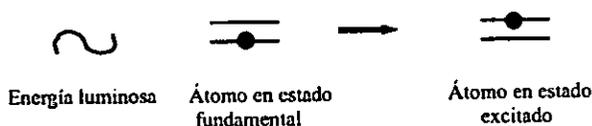


Figura 1. Proceso de la absorción atómica.

La característica de interés en las medidas por absorción atómica es el monto de luz a la longitud de onda resonante que es absorbida cuando la luz pasa a través de una nube atómica. Conforme el número de átomos se incrementa en el paso de la luz, la cantidad que de ésta será absorbida se incrementará en una forma predecible. Se puede efectuar una determinación cuantitativa del analito presente, midiendo la cantidad de luz absorbida. El uso de fuentes especiales de luz y la selección cuidadosa de la longitud de onda, permite la determinación cuantitativa específica de elementos individuales en la presencia de otros.

La nube de átomos requerida para las mediciones en absorción atómica, es producida por la adición de suficiente energía térmica a la muestra para disociar a los compuestos químicos en átomos libres. La aspiración de una solución de la muestra, dentro de una llama alineada con el rayo de luz, sirve para este propósito. Bajo condiciones apropiadas de llama, muchos de los átomos permanecerán en la forma de su estado fundamental y son capaces de absorber luz de longitud de onda apropiada proveniente de una fuente de luz. La facilidad

y la velocidad a la cual se pueden hacer determinaciones exactas y precisas utilizando esta técnica, han hecho que la absorción atómica sea uno de los métodos más populares para la determinación de metales.

b) Emisión Atómica.

Si a un átomo se aplica energía de una magnitud apropiada, ésta será absorbida por él e inducirá que el electrón exterior sea promovido a un orbital menos estable o "estado excitado". Como este estado es inestable, el átomo inmediatamente y espontáneamente retornará a su configuración fundamental. El electrón por lo tanto retornará a su orbital inicial estable y emitirá energía radiante equivalente a la cantidad de energía inicialmente absorbida en el proceso de excitación.

c) Fluorescencia Atómica.

En la fluorescencia atómica los átomos en estado fundamental oxigenados por la llama, son excitados al hacerse añadir un rayo de luz sobre el vapor atómico; se mide la emisión resultante del decaimiento de los átomos excitados por la fuente de luz. La intensidad de esta fluorescencia se incrementa conforme se incrementa la concentración de los átomos, lo que sirve de base para una determinación cuantitativa.

La figura 2 ilustra como se complementan las tres modalidades anteriormente descritas. En tanto que la absorción atómica es la más aplicada de las tres y normalmente ofrece algunas ventajas sobre las otras dos, se pueden obtener beneficios particulares ya sea con la emisión o la fluorescencia, en situaciones analíticas especiales.

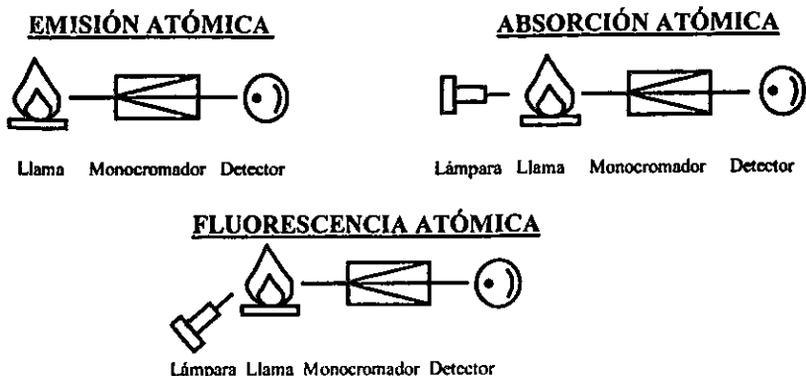


Figura 2. Comparación de las técnicas de espectroscopia de absorción atómica.

II.1.1 Análisis cuantitativo por Absorción Atómica.

El proceso de la absorción atómica está ilustrado en la figura 3. Luz de una longitud de onda de resonancia, de intensidad inicial I_0 , es enfocada sobre la llama que contiene átomos al estado fundamental. La intensidad inicial de la luz es disminuida en una cantidad determinada por la concentración de los átomos en la llama. Luego la luz es dirigida sobre el detector donde se mide la intensidad disminuida, I . La cantidad de la luz absorbida se determina al comparar a I con I_0 .

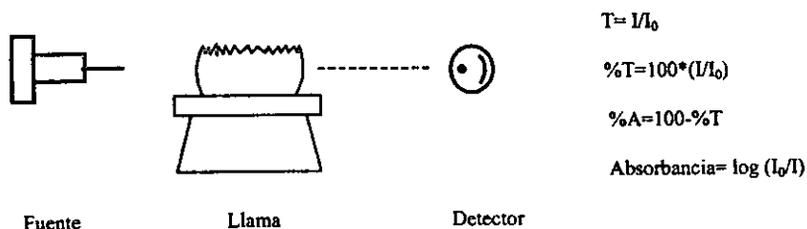


Figura 3. Proceso de absorción atómica.

Absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz en la espectrofotometría de absorción, pues esta cantidad guarda una relación lineal con la concentración. La ley de Beer define esta relación:

$$A = abc$$

En donde A es la absorbancia; a es el coeficiente de absorptividad constante que es característica de las especies que absorben; b es la longitud del paso de luz ocupado por la celda de absorción; y c es la concentración de las especies absorbantes en la celda de absorción. Esta relación de proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración, es observada en absorción atómica. Cuando la absorbancia de soluciones patrón conteniendo concentraciones conocidas del analito se miden y se grafican los resultados de las absorbancias con respecto a la concentración, se establece una relación de calibración. Teniendo tal curva, se puede medir la absorbancia de soluciones de concentración desconocida y su concentración directamente de la curva de calibración.

La sensibilidad define sólo el tamaño de la señal de absorción. Sirve como referencia para optimizar el instrumento. Conociendo la sensibilidad también es posible determinar la concentración óptima de la muestra para el análisis. El límite de detección se establece por las características de la relación señal-ruido para el instrumento. Este término es de gran importancia analítica ya que describe la capacidad analítica del instrumento y suministra una forma de estimar el valor mínimo de detección.

II.1.2 Instrumentación de Absorción Atómica.

Cualquier espectrofotómetro de absorción debe tener componentes que cumplan los tres requerimientos básicos, los cuales son 1) una fuente de luz; 2) una celda de muestreo y 3) un medio de medir luz específica.

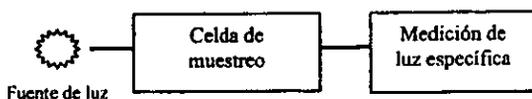


Figura 4. Requerimientos para un espectrofotómetro.

En absorción atómica, estas áreas funcionales son implementadas por los componentes ilustrados en la figura 5. Se requiere de una fuente de luz la cual emita las líneas atómicas características del elemento a ser analizado. Una de las fuentes más ampliamente empleada es la lámpara de cátodo hueco. Estas lámparas son diseñadas para emitir el espectro atómico de un elemento, de esta forma se utilizan lámparas específicas que dependen del elemento que se va a medir.

También se requiere que la radiación de la fuente, sea modulada para suministrar una forma de amplificar selectivamente la luz de la lámpara de la fuente e ignorar la emisión de la llama de la celda.

Algunas consideraciones especiales se requieren también en lo que se refiere a la celda de muestreo de absorción atómica. Se hace necesario generar un vapor atómico en el paso del rayo de luz de la fuente. Esto se obtiene generalmente al introducir la muestra en un

quemador o alternativamente, en un horno eléctricamente calentado que se encuentre alineado en el paso óptico del espectrofotómetro [5].

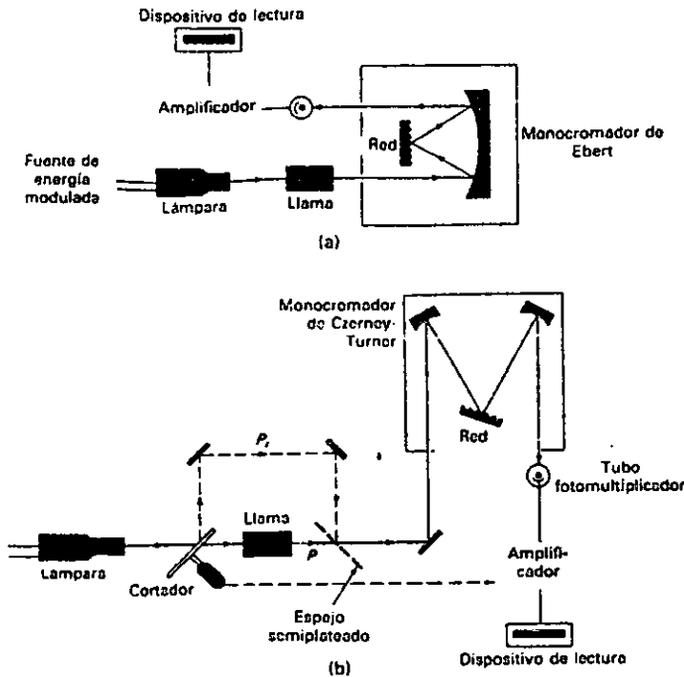


Figura 5. Espectrofotómetro de absorción atómica para un solo rayo.

Se necesita de algunos componentes para la medición de la luz específica. Un monocromador que dispersa las distintas longitudes de onda de la luz que es emitida de la fuente y separa la línea particular que se emplea para este fin. La selección de una fuente específica y de una longitud de onda particular de aquella fuente, es lo que permite que se pueda efectuar la determinación del elemento seleccionado en presencia de otros. La

longitud de onda aislada por el monocromador incide directamente sobre el detector. Este es un tubo fotomultiplicador, que produce una corriente eléctrica que depende de la intensidad de la luz incidente.

La corriente eléctrica del fotomultiplicador es luego amplificada y procesada por la electrónica del instrumento, que produce una señal la cual es medida de la atenuación de la luz que ocurre en la celda de muestreo. Esta señal puede ser posteriormente procesada para producir una lectura en el instrumento dada directamente en unidades de concentración.

En los métodos de absorción atómica de atomización con llama o electrotérmica se encuentran dos tipos de interferencias. Las interferencias espectrales se producen cuando la absorción o emisión de una especie que interfiere se solapa o aparece muy próxima a la absorción o emisión del analito, de modo que su resolución por el monocromador resulta imposible. Las interferencias químicas se producen como consecuencia de diversos procesos químicos que ocurren durante la atomización y que alteran las características de absorción del analito.

Un espectro de absorción atómica característico consta predominantemente de líneas de resonancia, que son el resultado de transiciones del estado fundamental a niveles superiores.

Para la aplicación de la técnica de Absorción Atómica se requiere de la atomización de la muestra. En general los atomizadores son de dos tipos, continuos y discretos. En los primeros, la muestra se introduce en el atomizador a una velocidad constante. La señal espectral es, por tanto, constante con el tiempo. Con los atomizadores discretos, una cantidad medida de la muestra se introduce como un bolo de líquido o de sólido. La señal

espectral en este caso alcanza un valor máximo y luego disminuye a cero cuando el vapor atómico abandona la región calentada.

II.2 Determinación de aniones y cationes en alimentos por HPLC.

La determinación de aniones y cationes inorgánicos en alimentos es de gran importancia desde el punto de vista de salud. Con respecto a los cationes, los metales alcalinos Na^+ y K^+ son esenciales en el mantenimiento del balance electrolítico, y un nivel excesivo de Na^+ está ligado a presión alta en sangre. Los alcalino térreos Mg^{2+} y Ca^{2+} son importantes para el crecimiento de huesos y las concentraciones máximas de estos cationes son regulados por el gobierno de E.U. para las fórmulas infantiles [6].

En la industria alimenticia el mayor interés, en el caso de aniones, es la determinación de haluros, nitruros, y sulfuros que contienen los aniones; y en cationes, la determinación de álcalis y metales alcalino térreos así como metales de transición por cromatografía iónica.

Una variedad de métodos analíticos han sido utilizados para el análisis de iones en alimentos. La Espectroscopia Atómica es comúnmente empleada para la determinación de cationes. En particular la Espectroscopia de Absorción Atómica es usada cuando uno o dos cationes son de interés específico como se mencionó anteriormente. La emisión de flama permite la determinación de metales alcalinos, la espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (ICP) determina muchos metales simultáneamente en una muestra; sin embargo, la instrumentación que se requiere es compleja y costosa.

Algunos cationes como Na^+ , K^+ y Ca^+ pueden ser determinados por Electroodos Especificos para Iones (ISE). Además algunos aniones como los haluros (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) y nitratos pueden ser monitoreados.

La cromatografía líquida, en particular el Intercambio Catiónico (IC), ofrece una alternativa atractiva para la determinación de aniones y cationes, usando relativamente equipo de bajo costo, ambos, cationes y aniones pueden ser determinados por columnas de intercambio iónico. Usualmente las condiciones de operación de IC pueden ser optimizadas para permitir la cuantificación de trazas de aniones de interés en presencia de otros que no nos interesan.

En HPLC la separación se basa en un proceso de intercambio de iones entre la fase móvil y los grupos intercambiadores ligados a la fase estacionaria.

Una de las propiedades que todas las soluciones iónicas poseen es la conductancia, y es generalmente la conductividad de la fase estacionaria la que es monitoreada en la cromatografía iónica. Sin embargo, desde los eluyentes usados para eluir los iones analitos para la columna son también detectados.

La Cromatografía de Exclusión de Iones es una técnica efectiva para la separación de sustancias no iónicas como son los azúcares, usando una columna de intercambio iónico. El mecanismo de retención se basa en la separación de la muestra entre la fase móvil y el interior de las moléculas de la resina y fuera de la fase móvil entre las partículas de la resina.

II.2.1 Instrumentación para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con objeto de alcanzar un caudal de eluyente razonable con rellenos de tamaño de partícula entre 3 y 10 micrómetros, que, por una parte, son comunes en la moderna cromatografía de líquidos, se requieren presiones de algunos cientos de kilogramos por centímetro cuadrado. Como consecuencia de estas elevadas presiones, el equipo necesario para la HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otros tipos de cromatografía. La figura 6 muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos típico de alta resolución [5].

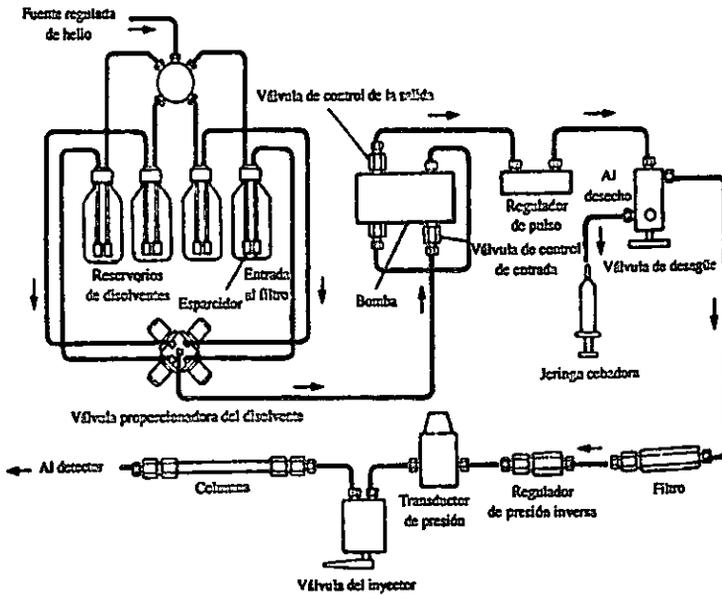


Figura 6. Esquema de un aparato de HPLC

II.3 AOAC (Association of Official Analytical Chemists)

Estos son análisis químicos de gran importancia ya que son métodos reconocidos oficialmente aunque cabe mencionar que poseen algunas desventajas con respecto a las técnicas instrumentales como es la precisión y sensibilidad pero sobre todo la preparación de la muestra lo cual hace lento el análisis, además los procedimientos en general son laboriosos. Para cada elemento puede que exista más de un método, es decir, el método a elegir dependerá del alimento a analizar y de lo que se pretenda obtener.

CAPÍTULO III

LA TÉCNICA PIXE

Las técnicas analíticas de origen nuclear han sido ampliamente utilizadas en la caracterización de la composición superficial de todo tipo de materiales [7]. En particular, la Emisión de Rayos X Inducida por Partículas (PIXE) es una técnica con alta sensibilidad ($\mu\text{g/g}$), pero sobre todo tiene un carácter multielemental y en la mayor parte de los casos, es no destructiva [8]. El intervalo de detección de esta técnica comprende los elementos de número atómico superior a 11, i.e. sodio. Las aplicaciones de la técnica PIXE al estudio de los materiales abarcan una amplia variedad de disciplinas [9], tales como biología, edafología, arqueología, medicina, contaminación ambiental, proceso de materiales industriales, y recientemente alimentos y sus etapas productivas.

A continuación se presentan los fundamentos de la técnica PIXE, las características generales del dispositivo experimental y del acelerador Peletrón que se utilizaron para este trabajo, así como las aplicaciones que se han realizado hasta la fecha mediante la técnica PIXE al análisis de alimentos.

III.1 Principio de la técnica PIXE

Un átomo puede considerarse como un núcleo con carga positiva y electrones que se encuentran distribuidos en capas alrededor del núcleo. Cuando el haz de partículas incide y penetra en un material se llevan a cabo diversos efectos o fenómenos con sus átomos. Uno de éstos es la expulsión de los electrones de las capas internas del átomo, dejando al átomo

ionizado y excitado. Para regresar al estado estable del átomo los electrones de capas más externas tienden a ocupar el lugar de los electrones expulsados, emitiéndose como consecuencia un conjunto de rayos X característicos del átomo en cuestión. Este fenómeno es la base de la técnica PIXE: a partir del conjunto de rayos X característicos producidos y sus intensidades es posible llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo del material irradiado [9].

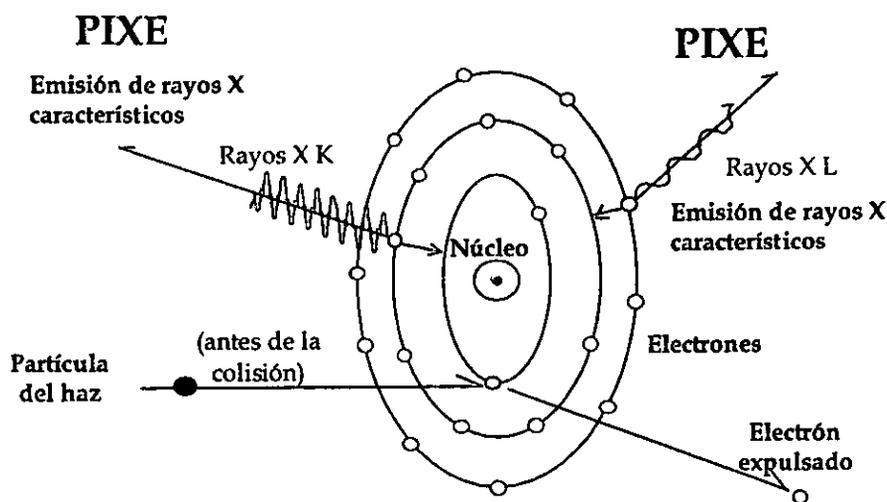


Figura 7. Diagrama del proceso de excitación, ionización y emisión de rayos X característicos por irradiación con iones positivos.

Debido a la existencia de niveles de energía discretos en un átomo, el electrón expelido en el proceso descrito antes puede corresponder a diferentes capas, al igual que el electrón que ocupa la vacante. Esto da origen a grupos de líneas o emisiones de rayos X bien determinadas, y que tienen una denominación acorde con la capa de la cual se removió el

electrón original. Así, una línea que fue causada por una vacante en la capa K del átomo (número cuántico principal $n=1$), se llamará una línea K; una línea debida a una nueva vacante en la capa L (número cuántico $n=2$) será una línea L, y así sucesivamente.

Ahora bien, el electrón que llena la vacante puede provenir de un gran número de subcapas, limitado solamente por las reglas de selección de transiciones atómicas. Esta situación hace que aparezca una cierta cantidad de líneas K, de líneas L, etc., que deben también identificarse. La distinción se hace en virtud de la intensidad relativa a que cada una de estas líneas tiene dentro de su grupo. De esta manera, la línea K más intensa será la línea K_{α} y la siguiente es la K_{β} . Cada una de estas líneas puede, a su vez, estar compuesta por cierto número de transiciones, que se reconocen por un subíndice (1,2,3,...), existiendo así las líneas $K_{\alpha 1}, K_{\alpha 2}, L_{\beta 1}, L_{\beta 2}, \dots$

La probabilidad de producir los fotones de rayos X de una línea en particular, o Sección Eficaz de Producción de Rayos X, es una magnitud física que depende de varios factores, como son la partícula incidente, su energía de incidencia y el átomo en particular. Las secciones eficaces de producción de rayos X son medidas empleando materiales o compuestos de alta pureza para diversas partículas a varias energías.

III.2 Dispositivo Experimental

El dispositivo experimental que se utiliza normalmente en PIXE depende del tipo de análisis que se esté realizando. La versatilidad de su metodología permite analizar la muestra en vacío o en la atmósfera en función del tipo de muestra. En este caso, con el fin de evitar afectar las muestras de chocolate y azúcar por evaporación en el vacío, se realizó

un análisis en la atmósfera empleando un sistema de haz externo. El dispositivo experimental utilizado consta del acelerador de partículas utilizado para producir el haz de partículas, en este caso protones, y el sistema de haz externo para realizar la irradiación de las muestras de alimentos. La figura 8 muestra un diagrama del dispositivo experimental utilizado.

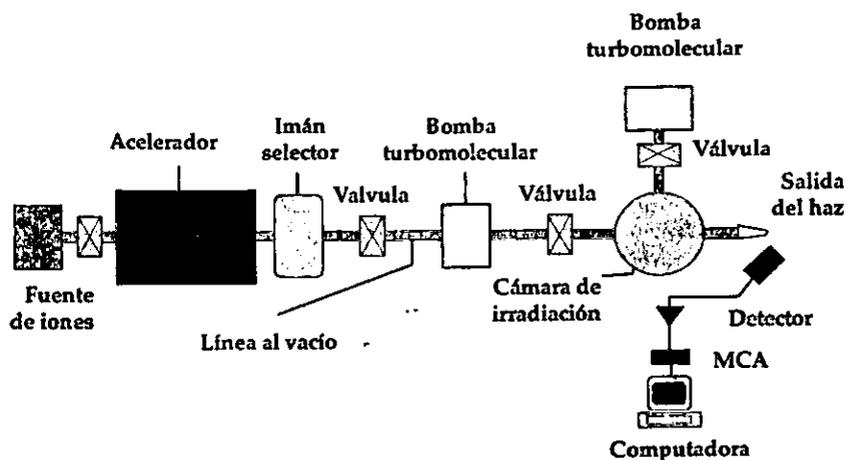
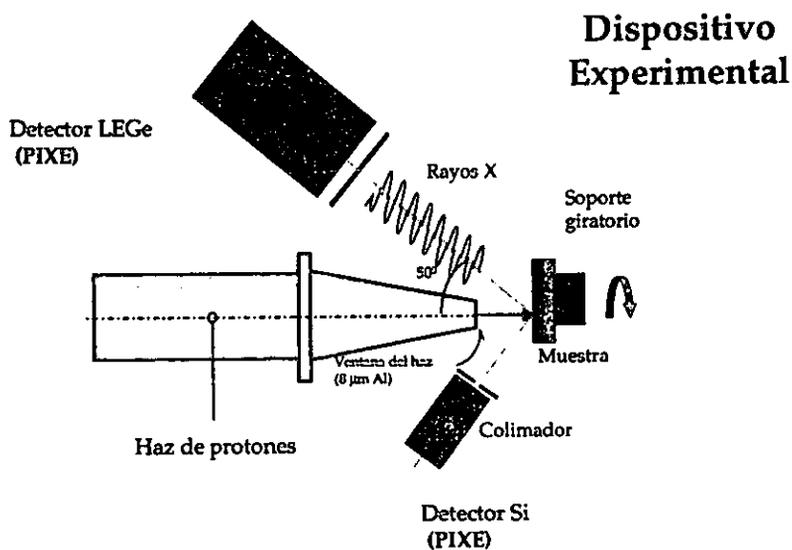


Figura 8. Diagrama del dispositivo experimental: acelerador y sistema de haz externo

III.2.1 Haz Externo PIXE

La figura 9 muestra un diagrama del sistema de haz externo [10]. El haz de partículas es conducido hasta una ventana delgada de un material ligero. En general se trata de un haz de protones, los cuales atraviesan la ventana y se proyectan en la atmósfera con una cierta dispersión. La muestra se coloca frente al haz de manera que mediante un sistema de láseres es factible determinar la región de irradiación. Este sistema no está limitado por la forma y tamaño del objeto proporcionando una gran versatilidad en el análisis de

prácticamente cualquier material, incluso en el caso de líquidos. La muestra puede estar fija o incluso girar delante del haz. La respuesta a la irradiación, i.e. los rayos X característicos emitidos, es captada en un detector de rayos X para luego ser procesada electrónicamente y obtener el espectro PIXE de la región irradiada.



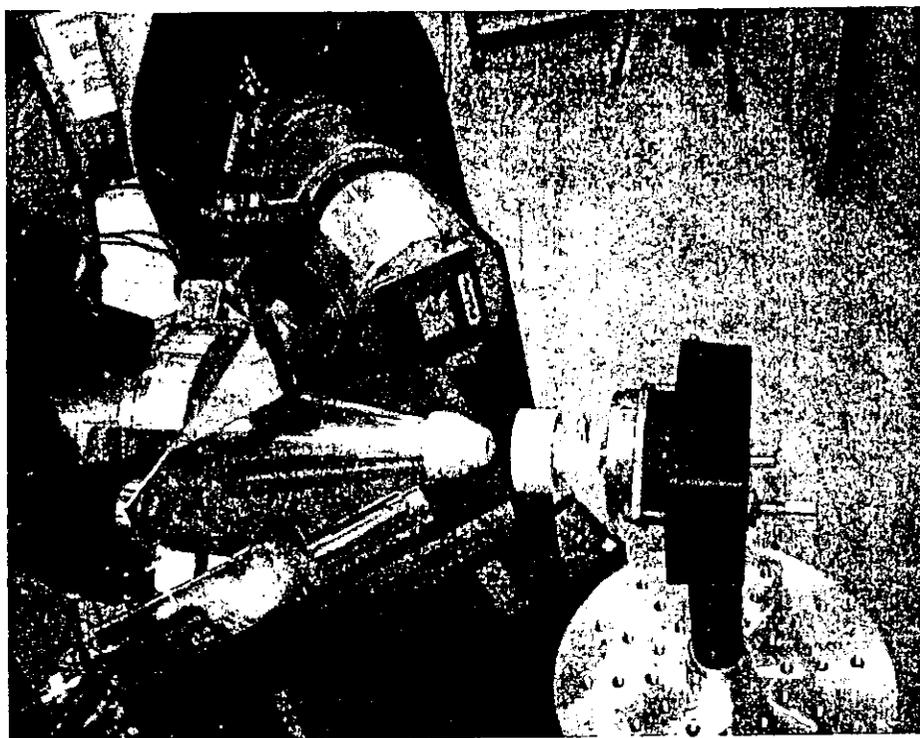


Figura 9. Esquema del sistema de haz externo.

III.2.2 El Acelerador Peletrón.

Es un acelerador electrostático, que posee la ventaja de producir haces de mayor energía con el mismo potencial en la terminal que otros aceleradores como el Van der Graaff. Este acelerador funciona con un proceso de doble aceleración de los iones. En el peletrón se carga la terminal mediante uno o más cinturones, formados por barras metálicas y plásticas alternadas [7].

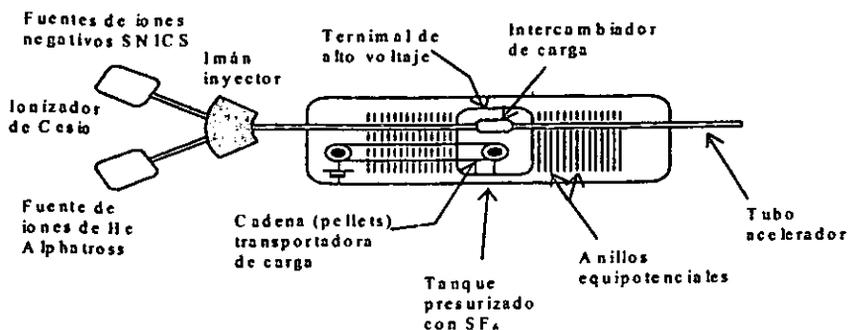


Figura 10. Diagrama de un acelerador tipo Peletrón.

En el peletrón se tiene una fuente de iones negativos, externa al tanque del acelerador. La terminal atrae a estos iones negativos, proporcionándoles una energía eV , donde e es la carga del electrón y V es el potencial en la terminal. En el centro del tanque (dentro de la terminal) existe un convertidor de iones negativos en positivos (que puede ser un gas a baja presión o una laminilla de carbono, llamado *stripper*) produciéndose iones con diversos estados de carga, dependiendo de factores como el átomo que forma el haz, la energía inicial, la densidad del gas, etc. Estos iones positivos se ven empujados por la terminal, por lo cual se suma una energía neV al haz de iones, donde n es el estado de carga del ion, es decir, el número de electrones que perdió. Así pues, la energía final E de los iones es:

$$E = (n + 1)eV$$

El acelerador Peletrón cuenta con dos tipos de fuentes de iones. La primera es para gases, y se conoce como *AlphaTross*. Su funcionamiento se esquematiza en la figura 11. En ella, se aprecia un cilindro de cuarzo, al cual se inyecta el gas a ionizar. Una fuente de radiofrecuencia ioniza el gas, el cual es extraído del cilindro hacia una cámara rellena de vapores de rubidio. La interacción de los iones positivos con el rubidio provoca que dichos

iones se conviertan en negativos mediante la captura de electrones. Puesto que la fuente en su conjunto se halla a un potencial de -50KV , los iones negativos se ven empujados hacia la línea, donde se encuentra el electroimán inyector, que los conduce hacia el acelerador propiamente dicho.

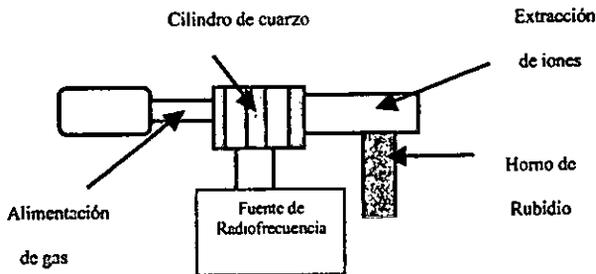


Figura 11. Diagrama de la fuente de Alphas

La segunda fuente es conocida como SNICS. La figura 12 presenta un diagrama de dicha fuente. En este caso, el elemento del cual se desean producir iones se encuentra como sólido en un cátodo, formado fundamentalmente de cobre, el cual se bombardea con un haz de iones de cesio. Esto produce una erosión en el cátodo, y los átomos expulsados interactúan con los vapores de cesio, produciendo un haz de iones negativos mediante la captura electrónica. Al igual que en la fuente Alphas, estos iones negativos se encaminan al acelerador mediante el electroimán inyector.

Tras los procesos de producción de partículas en las fuentes de iones y de aceleración en el tanque por la diferencia de potencial, el haz de partículas es enfocado por campos electromagnéticos y desviado hacia alguna de las líneas de irradiación.

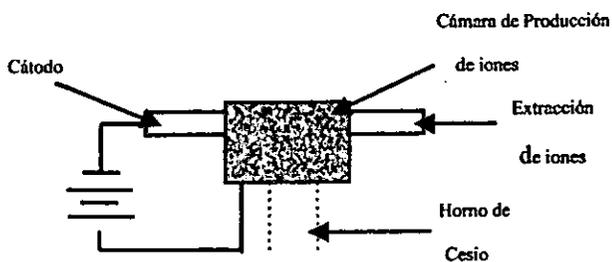


Figura 12. Diagrama de la fuente SNICS.

III.3 Análisis Cualitativo

El haz al atravesar el material va a producir la ionización, de manera tal, que la intensidad de los rayos X emitidos N_{xi} es proporcional a la cantidad de átomos i que están presentes en el material C_i , y al flujo de partículas f para una geometría dada:

$$N_{xi} \propto f C_i \quad (1)$$

Por otra parte, el haz de partículas al penetrar tiene una cierta probabilidad de producir la ionización por su interacción; dicha probabilidad depende de cada átomo, de su arreglo de electrones, de la energía y tipo de las partículas del haz y se denomina sección eficaz de producción de rayos X:

$$N_{xi} \propto f C \sigma_{R_x}(E) \quad (2)$$

donde $\sigma_{R_x}(E)$ es la sección eficaz de producción de rayos X.

Al atravesar el material las partículas del haz pierden energía por la interacción con las capas electrónicas hasta detenerse. La pérdida de energía de las partículas en un espesor pequeño de un material dx puede describirse mediante el poder de frenado $S(E)$. De esta manera, el número de rayos X producido es proporcional a:

$$N_{xi} \propto f \frac{C_i \sigma_{RX}(E)}{S(E)} dE \quad (3)$$

Debe considerarse además que los rayos X inducidos en el material por las partículas son absorbidos en el material mismo y sólo son detectados una parte de éstos. Por lo cual el número de rayos X detectados será proporcional al número de rayos X transmitidos $T(E)$.

$$N_{xi} \propto f C_i \frac{\sigma_{RX}(E)}{S(E)} T(E) dE \quad (4)$$

Debe tomarse en cuenta también que el proceso de ionización, pérdida de energía y absorción de rayos X, se lleva a cabo desde la energía inicial de incidencia del haz hasta que la partícula se detiene en el material. Finalmente, el proceso de detección dependerá de la eficiencia del detector de rayos X ϵ_i y la electrónica asociada, por lo cual la ecuación que toma en cuenta los fenómenos involucrados en la producción de rayos X por irradiación de partículas se escribe:

$$N_{xi} = K f \epsilon_i C_i \int_{E_0}^0 \frac{\sigma_{RX}(E)}{S(E)} T(E) dE \quad (5)$$

donde K es una constante

Con base a lo anterior un análisis cualitativo puede llevarse a cabo considerando las intensidades de los picos de rayos X normalizadas por el flujo f .

El número de rayos X detectados puede normalizarse mediante un monitor de irradiación, ya que en un dispositivo de haz externo, como el que se empleó para realizar los análisis es muy sencillo medir con precisión el flujo f . Dado que el haz atraviesa la atmósfera, el número de rayos X de argón producidos es proporcional al flujo del haz si consideramos la concentración de argón constante en la atmósfera (0.93% en volumen).

Por lo tanto, para realizar un análisis cualitativo el número de rayos X de los diversos elementos debe normalizarse por la intensidad de los rayos X de argón presentes en el espectro PIXE para poder realizar una comparación de intensidades (y por lo tanto de concentraciones) entre diversas muestras de composición semejante irradiadas bajo condiciones similares:

$$\frac{N_{xi}}{N_{xAr}} \propto C_i \quad (6)$$

III.4 Análisis Cuantitativo

Para el análisis cuantitativo, el cálculo de la concentración de un elemento i se lleva a cabo a partir de la siguiente ecuación:

$$N_{xi} = f \epsilon_i \frac{N_A}{A_i} C_i \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T(E)}{S(E)} dE \quad (7)$$

donde

$$T(E) = e^{-\frac{\mu}{\rho \cos \alpha} \int_{E_0}^0 S(E)} \quad (8)$$

En la ecuación anterior N_A es el número de Avogadro, A_i es la masa atómica del elemento, α es el ángulo de incidencia de las partículas y β es el ángulo de detección de los rayos X; ρ es la densidad del material; μ es el coeficiente de atenuación másica del material. La ecuación anterior es válida si el material irradiado es homogéneo.

En el caso en que la matriz no es totalmente conocida se realiza la irradiación empleando un monitor el cual consiste en un alambre de molibdeno el cual fue irradiado al mismo

tiempo que la pastilla, ésta gira de manera que el haz produce una alteración mínima al alimento. Cabe mencionar que el molibdeno se eligió ya que los rayos X que produce son de alta energía por lo que hay poca absorción en absorbedores del dispositivo detector, además, no se encuentra presente en la muestra y porque la sección eficaz de producción de rayos X es relativamente alta. No es factible utilizar la señal de rayos X de argón porque éstos se absorben fácilmente en la atmósfera y en el absorbedor del detector. El sistema descrito se utilizó en los análisis de chocolate y azúcar.

Para realizar el análisis cuantitativo se irradia bajo las mismas condiciones un material de referencia certificado, en este caso el NIST 2704 (National Institute of Standards and Technology), conteniendo los elementos presentes tanto en chocolate como en azúcar.

Para una muestra, el cociente de rayos X de un elemento i con respecto a la señal de los rayos X de molibdeno puede escribirse con base en la ecuación (7) como:

$$\frac{N_{xi}}{N_{xMo}} = \frac{f \epsilon_i N_A C_i \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T(E)}{S(E)} dE}{f \epsilon_{Mo} N_A C_{Mo} \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T(E)}{S_{Mo}(E)} dE} \quad (9)$$

y para el mismo elemento i en el material de referencia de manera análoga:

$$\frac{N_{xi}'}{N_{xMo}'} = \frac{f' \epsilon_i N_A C_i' \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T'(E)}{S'(E)} dE}{f' \epsilon_{Mo} N_A C_{Mo}' \int_{E_0}^0 \sigma_{RxMo}(E) \frac{T(E)}{S_{Mo}(E)} dE} \quad (10)$$

al dividir la ecuación (9) por (10):

$$\begin{matrix} N_{xi} \\ N_{xMo} \\ N_{xi}' \\ N_{xMo}' \end{matrix} = \begin{matrix} C_i \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T(E)}{S(E)} dE \\ C_i' \int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T'(E)}{S'(E)} dE \end{matrix} \quad (11)$$

Se obtiene:

$$C_i = \frac{N_{xi}}{N_{xMo}} C_i' \frac{\int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T'(E)}{S'(E)} dE}{\int_{E_0}^0 \sigma_{Rx}(E) \frac{T(E)}{S(E)} dE} \quad (12)$$

o bien,

$$C_i = \frac{N_{xi}}{N_{xMo}} \frac{N_{xMo}'}{N_{xi}'} C_i' f \quad (13)$$

donde se define f como el factor de matriz.

El factor de matriz toma en cuenta la diferencia entre la matriz del alimento y el material de referencia, los cálculos de atenuación de la radiación y de pérdida de energía del haz dieron como resultado para el tipo de materiales analizados (chocolate y azúcar) un factor de matriz de 0.8.

Debe señalarse que la técnica PIXE ya ha sido validada y está bien establecida para medir la composición elemental de materiales empleando las ecuaciones descritas anteriormente [8,9]. Esto se ha llevado a cabo utilizando materiales de referencia del NIST (National Institute of Standards and Technology) de E.U. y del Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), los cuales han sido medidos empleando diversas metodologías de PIXE en laboratorios de todo el mundo.

III.5 Antecedentes de la Aplicación de la técnica PIXE en Alimentos.

Dada la novedad de las aplicaciones en alimentos, existen pocos trabajos publicados en este campo. Sin embargo, se demuestra claramente las ventajas y posibilidades de la aplicación de un análisis PIXE. Por ejemplo, en el caso del análisis de leche en polvo [11] de 10 marcas comerciales realizado para 16 elementos: P, Cl, K, Ca, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Br, Rb, Sr, Mo y Cd, se encontró que nueve de las muestras analizadas contenían algunos de estos elementos en concentraciones excedentes al límite de toxicidad. El análisis de la muestra estándar de referencia, A-11 de IAEA, para los 16 elementos listados anteriormente mediante este método concuerda con la certificación, excepto para el Cl, K, Ca, Cr y Rb.

En el análisis de salsa de soya por medio de PIXE a la atmósfera [12] fueron detectados seis tipos de elementos trazas, como son Mn, Fe, Ni, Cu, Zn y Br. Las concentraciones de Mn, Fe, Zn, y Br de todas las muestras se determinaron; cada muestra analizada contiene alrededor de 160ppm de Br. Se realizó un segundo muestreo [13] pero ahora con 4 tipos de semillas de soya: de Japón, Canadá, China, América y 3 de sazonador; se encontraron trazas de 6 tipos de elementos como son Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, y Br. La concentración de esos elementos varía dependiendo del lugar de origen. Otro trabajo realizado con respecto a este producto fue el análisis de la planta completa de soya [14], es decir, tanto de la semilla como la vaina. Los componentes de la planta analizados fueron liofilizados para poder aplicar esta técnica y en los cuales se pudo determinar el contenido de K, Mn, Fe, Cu, Zn y Ca.

Elementos traza de 5 clases de harina fueron determinados también por la técnica PIXE [15]. En éstas se detectaron 20 elementos traza, que incluían Cl, K, Ca, Sc, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, y Br. Se observó que la concentración de estos elementos varía dependiendo del lugar de origen de las harinas. Con la idea de saber como se altera la concentración de estos elementos, las muestras se incineraron utilizando microondas en ácido nítrico y se preparó una pasta; en esta metodología se observó que las cantidades de Br no se pierden por medio del calentamiento por microondas.

Las técnicas Fluorescencia de Rayos X (XRF) y PIXE fueron aplicadas en muestras de alimentos frescos y alimentos procesados [16], por ejemplo en muestras de frutas y vegetales frescos, alimentos secos procesados y especias. Los resultados indican que XRF y/o PIXE son apropiados para analizar este tipo de alimentos ya que se logró la detección de trazas de elementos como son Na, K, Mg, Ca, Cu, Cr, V, Zn, Mo, Fe, Mn, Ni, Se, Cl, S y P; así como también algunos metales tóxicos como son el Hg, Pb, y As.

A partir de las investigaciones realizadas son claros los alcances y posibilidades del uso de la técnica PIXE al análisis de alimentos y se hace evidente la importancia del desarrollo y los potenciales de aplicación de esta metodología con dicho fin.

Tal y como se menciona previamente, para realizar el análisis PIXE de un alimento en la mayoría de los casos no se requiere una preparación especial de la muestra a analizar. Incluso es factible analizar líquidos directamente en algunos casos.

Actualmente, de manera paralela a esta investigación se están realizando estudios de alimentos desde esta perspectiva en el Instituto de Física de la UNAM. Los análisis comprenden puré de tomate y nopal en conserva, por citar algunos ejemplos.

CAPÍTULO IV.

ANÁLISIS Y RESULTADOS

En este capítulo se presentan los procedimientos de preparación de muestras; análisis y los resultados obtenidos.

IV.1 Preparación de muestras.

En primer lugar, se realizó la recolección de diversas muestras de chocolates y azúcar, teniendo en cuenta la marca, el tipo de producto, su origen (nacional o extranjero), y la información previa sobre composición. Las muestras de chocolate y azúcar seleccionadas para este estudio se describen en las tablas 2 y 3, respectivamente.

Dada la naturaleza de los alimentos seleccionados se realizó la pulverización, para lo cual se empleó el mortero de ágata, hasta la obtención de un polvo muy fino. Finalmente se prepararon las muestras de chocolate y azúcar en forma de pastilla (presión de 2 ton) con el fin de homogeneizar el alimento y facilitar su irradiación.

IV.2 Desarrollo experimental y análisis de espectros.

Las muestras en forma de pastilla se irradiaron empleando un haz de protones de 3.3 MeV producido por el Acelerador Peletrón del IFUNAM. Así mismo, se utilizaron dos detectores (figura 9), el detector LEGe con colimador y absorbedor de 48 micrómetros de Al y el detector AMPTEK (detector de Si), siendo el primero más sensible a las trazas de los elementos más pesados. Por otra parte, cabe mencionar que la muestra está colocada sobre un soporte giratorio ya que se observó que si ésta se mantenía estática el haz producía

Tabla 2. Muestras de chocolate seleccionadas para este estudio. Se incluyen ingredientes indicados en la etiqueta correspondiente.

	Nombre	Variedad	Origen	Ingredientes
1	Cacao puro		España	
2	Chocomilk	Chocolate en polvo	México	Azúcar, cocoa, leche descremada en polvo, lecitina de soya, vitaminas, minerales, sal yodotada, saborizantes artificiales y antioxidante.
3	Nesquik	Chocolate en polvo	México	Azúcar, cocoa, fosfato dicálcico, lecitina de soya, sal yodotada, vitaminas (A, D, E, C, B1, B2, niacina, ácido fólico), sulfato de zinc, vainillina, canela en polvo y saborizante artificial.
4	Chocokiwi	Chocolate en polvo	México	Azúcar, cocoa lecitina de soya, sal yodotada.
5	Morelia	Chocolate en polvo	México	Azúcar, cocoa, lecitina de soya, saborizante artificial.
6	Batichoco	Chocolate en polvo	México	Azúcar, cocoa, lecitina de soya, carboximetilcelulosa de sodio y vainillina.
7	Cola cao	Chocolate en polvo	España	Azúcar, cacao desgrasado en polvo, harina de trigo, extracto de malta, aroma natural Extracto de nuez de cola, fosfato bicálcico, sal
8	Cola cao light	Chocolate en polvo	España	Cacao desgrasado en polvo, lactosa, harina de trigo, extracto de malta, aroma natural Extracto de nuez de cola, sólidos lácteos, fibra vegetal, Lecitina, fosfato bicálcico, Edulcorantes (aspartame, acesulfame), fosfato tricálcico, sal
9	Ama	Chocolate en polvo	España	Azúcar, Cacao desgrasado, aroma (vainillina), canela
10	Nesquik	Chocolate en polvo	España	Azúcar, Cacao desgrasado, emulgente, sal, aceite vegetal, aroma, canela
11	Paladín a la taza	Chocolate en polvo	España	Azúcar, Cacao desgrasado, almidón modificado, aromas.
12	Valor cao	Chocolate en polvo	España	Azúcar, cacao desgrasado en polvo, fécula de arroz, lecitina de soya, aroma (vainillina)
13	Preparado a la taza	Chocolate en polvo	España	Azúcar, cacao desgrasado en polvo, harina de trigo, lecitina de soya, aroma (vainillina).
14	Neilson	Chocolate en polvo	Canadá	Azúcar, cocoa lecitina de soya, sal yodotada.
15	Conejo turín	Chocolate con leche	México	Azúcar, leche, cacao, manteca de cacao, lecitina y vainilla.
16	Turín blanco	Chocolate blanco	México	Azúcar, manteca de cacao, leche, lecitina y vainilla.
17	Carlos V a la francesa	Chocolate con leche	México	Azúcar, manteca de cacao, pasta de cacao, leche entera en polvo, lecitina de soya, saborizantes artificiales y sal
18	Vaquita	Chocolate con leche	México	Azúcar, manteca de cacao, cacao, leche entera en polvo, leche descremada en polvo, cocoa, lecitina y saborizante artificial.
19	Carlos V leche	Chocolate con leche	México	Azúcar, manteca de cacao, pasta de cacao, leche entera en polvo, suero de leche en polvo, lecitina de soya, saborizantes artificiales y sal yodotada.

Tabla 3. Muestras de azúcar seleccionadas para este estudio.

Muestra	Nombre	Tipo	Origen
1	Azúcar Genuino Gold, METCO, S.A DE C.V	Mascabado	México
2	Azúcar Dominó, DOMINÓ DE MÉXCIO, S. A. DE C.V.	Estándar	México
3	Azúcar Dominó DOMINÓ DE MÉXCIO, S. A. DE C.V.	Estándar	México
4	Azúcar Dominó DOMINÓ DE MÉXCIO, S. A. DE C.V.	Estándar	México
5	Azúcar Dominó, DOMINÓ DE MÉXCIO, S. A. DE C.V.	Refinada	México
6	Azúcar Salwil, PROFKAN, S.A DE C.V.	Estándar	México
7	Azúcar Salwil, PROFKAN, S.A DE C.V.	Refinada	México
8	Azúcar Aurrerá	Estándar	México
9	Azúcar Gam	Estándar	México
10	Azúcar Great Value, NUEVA WAL-MART, MÉX, S. DE R.L DE C.V	Refinada	México

alteración al alimento, es decir, se formaban burbujas por la energía depositada en la superficie por la irradiación. A partir de los espectros obtenidos se determina la composición elemental.

El análisis cualitativo se realizó mediante un programa de cómputo, llamado AXIL el cual fue desarrollado por la Agencia de Energía Atómica (IAEA) para efectuar, entre otros, la deconvolución de los espectros de rayos X por dispersión de energía obtenidos por medio de Fluorescencia de Rayos X (XRF), microsonda de electrones (EDX, EMPA) e Inducción de Rayos X por Incidencia de Partículas (PIXE). En términos generales los espectros de rayos X por dispersión de energía consisten en picos aproximadamente gaussianos correspondientes a cada una de las líneas de emisión características de los átomos que componen a la muestra estudiada con alguna de las técnicas anteriores. Estos picos se encuentran superpuestos a un fondo continuo de radiación. Para obtener la cantidad o intensidad de rayos X registrados en cada una de las líneas de emisión presentes en el espectro se debe proceder a sustraer el fondo de irradiación e integrar el número de cuentas en cada pico. Esto lo efectúa AXIL ajustando por medio del método de mínimos cuadrados no lineales una función continua al fondo de radiación y funciones aproximadamente gaussianas a los picos.

Una vez obtenidos los espectros PIXE de rayos X en un multicanal, éstos se guardan en archivos que tengan un formato que pueda ser posteriormente reconocido por el AXIL. Posteriormente se lleva a cabo la calibración en energía, es decir, hay que determinar a qué energía de rayos X corresponde a cada canal del espectro. Lo que se busca es que la energía real de los picos en el espectro coincida con la que se tiene señalada en el eje X del

espectro. En este caso, se usó un monitor de irradiación que consiste en un alambre de Mo el cual es irradiado al mismo tiempo que la pastilla, que gira. Entonces, se identifican los picos del Mo, ya que éste fue la referencia utilizada. A continuación, se identifican los elementos presentes en la muestra de acuerdo a las líneas de emisión correspondiente a cada pico. Por último se realiza la optimización del ajuste (tipo de función, ajustar el fondo, número de iteraciones), y se procede a pedir el reporte, en el cual se observan los valores del número de cuentas en cada pico.

Para el análisis cuantitativo se determinaron las áreas bajo los picos de emisión de los elementos identificados. Todo lo anterior para cada espectro. La cuantificación de las muestras se obtienen a partir de la ecuación (13) descrita anteriormente.

IV.3 Resultados.

Tanto el chocolate como el azúcar están constituidos esencialmente de C, O, H, N, Na y Mg. No obstante, bajo las condiciones experimentales presentes, no es posible detectar las líneas de rayos X de estos elementos en el espectro debido a que por su baja energía son absorbidos en la atmósfera y en la ventana del detector y no alcanzan la región sensible del detector. Por su naturaleza, los alimentos analizados se componen de matrices ligeras. Así las señales de los elementos detectados corresponden a trazas. Si bien se requieren análisis estadísticos más completos para establecer intervalos de variación en las medidas realizadas, las tendencias son claras en cuanto a los resultados obtenidos.

IV.3.1 Chocolate.

Mediante la técnica PIXE fueron observados K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn y Rb en las muestras de chocolate (ver figura 13).

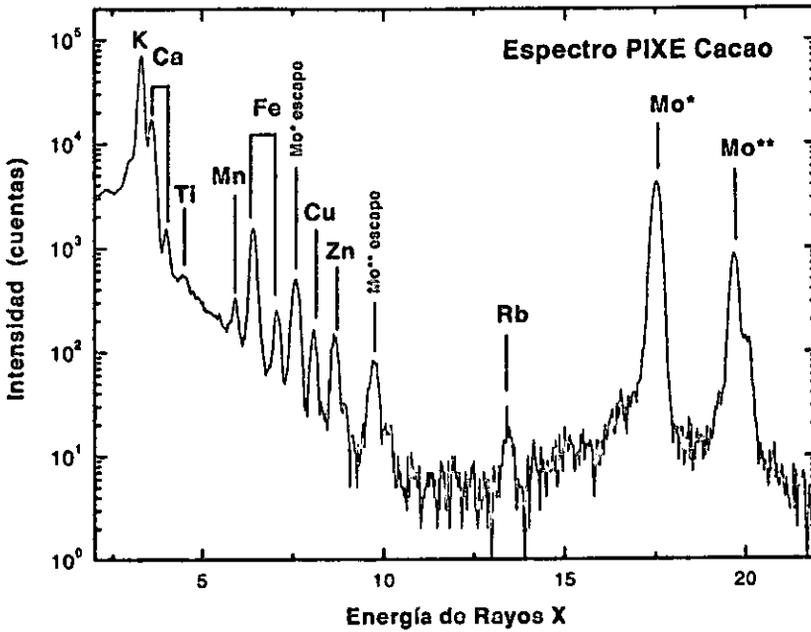


Figura 13. Espectro PIXE típico del chocolate (cacao).

Los resultados cuantitativos del análisis elemental se muestran en la tabla 4. Las concentraciones se midieron con incertidumbres del 5 % para K y Ca, mientras que para el resto de los elementos se estimaron en 10%.

Los límites de detección están determinados por la razón intensidad o tamaño de pico de rayos X con respecto al fondo de radiación. Esto podría limitar la detección de Pb por ejemplo. En nuestro caso particular los límites de detección podrían mejorarse empleando un filamento de Mo de un diámetro menor para reducir el fondo de radiación. Cabe señalar que la técnica PIXE permite medir concentraciones elementales de décimas de ppm en el caso de materiales de origen biológico [17, 18].

En la gráfica 1 y tabla 4 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica PIXE para las muestras analizadas de chocolate. Se observan variaciones en función del lugar de origen, así como de la marca.

En general, los chocolates de origen español tienen mayor concentración de los elementos detectados, sin embargo, el chocolate Nesquik es la excepción ya que sus concentraciones tienen las mismas tendencias que el promedio del chocolate mexicano.

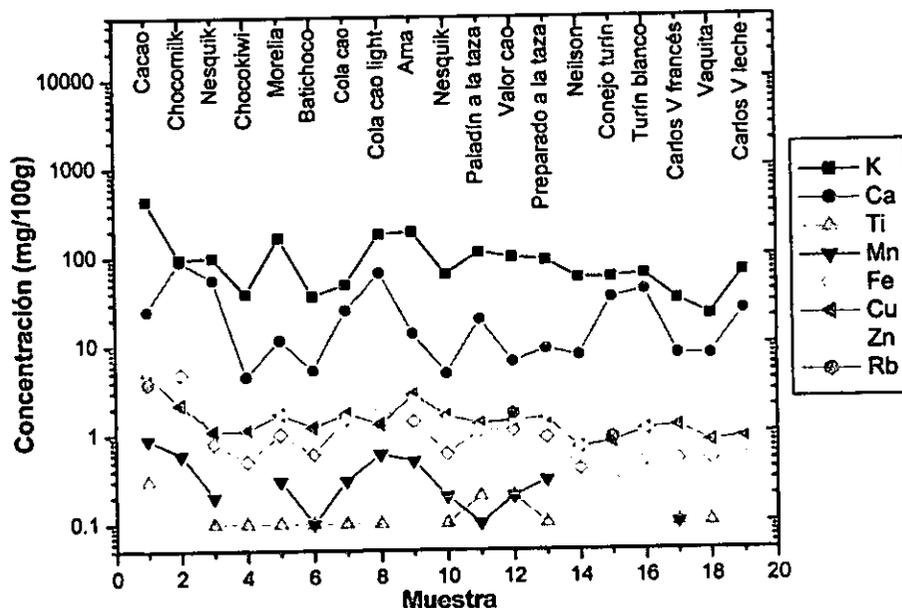
La Norma Oficial Mexicana "Alimentos-Chocolate con leche y sus variedades" [19], sólo especifica:

Arsénico	(As)	0.5	mg/kg	(ppm)	Máx.
Cobre	(Cu)	15	mg/kg	(ppm)	Máx.
Plomo	(Pb)	1	mg/Kg	(ppm)	Máx.

Tabla 4. Concentraciones elementales determinadas mediante PIXE de las muestras de Chocolate.

No. de muestra	Muestra	K	Ca	Tl	Mn	Fe	Cu	Zn	Rb
		(mg/100g) ±5%	(mg/100g) ±5%	(mg/100g) ±10%	(mg/100g) ±10%	(mg/100g) ±10%	(mg/100g) ±10%	(mg/100g) ±10%	(mg/100g) ±10%
1	Cacao	443.9	25.2	0.3	0.9	3.8	4.8	5.3	3.8
2	Chocomilk	95.8	91.3	0.0	0.6	4.8	2.2	11.0	0.0
3	Nesquik	99.9	55.9	0.1	0.2	0.8	1.1	3.9	0.0
4	Chocokiwi	38.8	4.5	0.1	0.0	0.5	1.1	0.9	0.0
5	Morelia	166.6	11.5	0.1	0.3	1.0	1.7	1.7	0.0
6	Batichoco	36.2	5.3	0.1	0.1	0.6	1.2	0.9	0.0
7	Cola cao	49.0	24.8	0.1	0.3	1.5	1.7	1.5	0.0
8	Cola cao light	180.6	65.6	0.1	0.6	1.9	1.3	2.2	0.0
9	Ama	191.3	13.5	0.0	0.5	1.4	2.8	2.4	0.0
10	Nesquik	63.2	4.8	0.1	0.2	0.6	1.6	1.4	0.0
11	Paladin a la taza	111.6	19.5	0.2	0.1	1.1	1.3	1.1	0.0
12	Valor cao	97.9	6.5	0.2	0.2	1.1	1.4	1.4	1.7
13	Preparado a la taza	90.2	9.0	0.1	0.3	0.9	1.5	1.6	0.0
14	Neilson	56.9	7.6	0.0	0.0	0.4	0.7	0.7	0.0
15	Conejo turin	57.6	33.8	0.0	0.0	0.3	0.8	1.5	0.9
16	Turin blanco	62.8	41.2	0.0	0.0	0.5	1.1	1.1	0.0
17	CarlosV francés	32.4	7.8	0.1	0.1	0.5	1.2	0.8	0.0
18	Vaquita	21.3	7.6	0.1	0.0	0.5	0.8	1.2	0.0
19	CarlosV leche	65.9	24.1	0.0	0.0	0.5	0.9	1.1	0.0

Chocolates



Gráfica 1. Resultados de concentración elemental de chocolate.

De acuerdo a estos datos, se puede observar que de los resultados obtenidos de las muestras analizadas, tanto el Chocomilk como el chocolate Morelia sobrepasan el valor permitido de Cu por 44 y 11%, respectivamente. En cuanto a los chocolates de origen español salvo Paladín a la taza y Cola cao light todos están ya sea por arriba o en el límite permitido de Cu.

Comparando los intervalos de valores registrados en la bibliografía [20, 21, 22] tenemos que el promedio general de la concentración de K en chocolate en polvo es aproximadamente un 80% más alto que los valores medidos en este trabajo. Asimismo, los

valores reportados para este mismo elemento de chocolate blanco son aproximadamente 74% más alto que los valores medidos.

En cuanto al contenido de Zn, el promedio en general del chocolate en polvo y chocolate blanco es muy cercano a el reportado, a excepción del Chocomilk y el Nesquik (mexicanos) que están enriquecidos con este elemento, en cambio, en el chocolate con leche, el promedio difiere mucho, es decir, contiene tiene cinco veces más de este elemento.

La concentración de Mn sólo está reportada para chocolate blanco (0.5mg/100g) y para chocolate con leche como trazas. En este estudio sólo encontramos Mn en una de las muestras analizadas, en el chocolate con leche (Carlos V a la francesa) sólo que en concentraciones muy pequeñas. La concentración obtenida experimentalmente de Mn para chocolate en polvo es de 0.1 a 0.6 mg/100g; salvo para el chocolate de Canadá en el cual no se observó este elemento.

El Fe se encuentra en cantidades inferiores a la señalada en la bibliografía en las muestras (1.7-2.4mg/100g), sólo un promedio de 15% de lo reportado, tanto para chocolate en polvo como para chocolate con leche, salvo para Chocomilk que sobrepasa éste valor en un 100%. En el caso del chocolate blanco, éste está por arriba en el valor obtenido experimentalmente (100%) con respecto al de la bibliografía.

En cuanto al Ti y Rb no se encontró nada reportado. Sin embargo, el Ti se encontró presente tanto en chocolate como en azúcar pero en una concentración muy baja. El Rb

solamente se observó sólo en 3 muestras, en el cacao puro, en Valor cao y en Conejo Turín en concentraciones de 38, 16 y 9 ppm, respectivamente.

El P, Cl y S no fueron detectados por lo cual no se hizo una comparación con los valores reportados.

Comparando las concentraciones de estos elementos con respecto al cacao puro se observa una marcada diferencia; siendo que de los chocolates analizados el único que guarda proporciones similares con respecto a éste es el Morelia. Esto podría indicar que el chocolate de esta marca contiene un poco de cacao de cierta pureza.

En cuanto a marcas similares de diversas procedencias, el chocolate Nesquik de origen español contiene al igual que el mexicano K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu y Zn, las concentraciones de Ti, Mn son idénticas, en cambio en K y Ca el mexicano contiene respectivamente el 37% y 91% más que el español y de Fe y Cu el 25%.

IV.3.2 Azúcar

Mediante la técnica PIXE fueron observados K, Ca, Ti, Fe, Cu y Zn en las muestras de azúcar.

Los resultados cuantitativos del análisis elemental se muestran en la tabla 5. Las concentraciones se midieron con incertidumbres del 5 % para K y Ca, mientras que para el resto de los elementos se estimaron en 10%.

En la gráfica 2 y tabla 5 se muestran los resultados obtenidos mediante la técnica PIXE para las muestras analizadas de azúcar. Se observan variaciones en función del tipo de azúcar, así como de la marca.

En cuanto a los resultados para el azúcar, debe señalarse que si bien existen las Normas Oficiales para este alimento [23, 24, 25, 26, 27], éstas no contienen ninguna información en cuanto a elementos. Por lo anterior no es posible realizar una comparación de los resultados obtenidos con dichas normas.

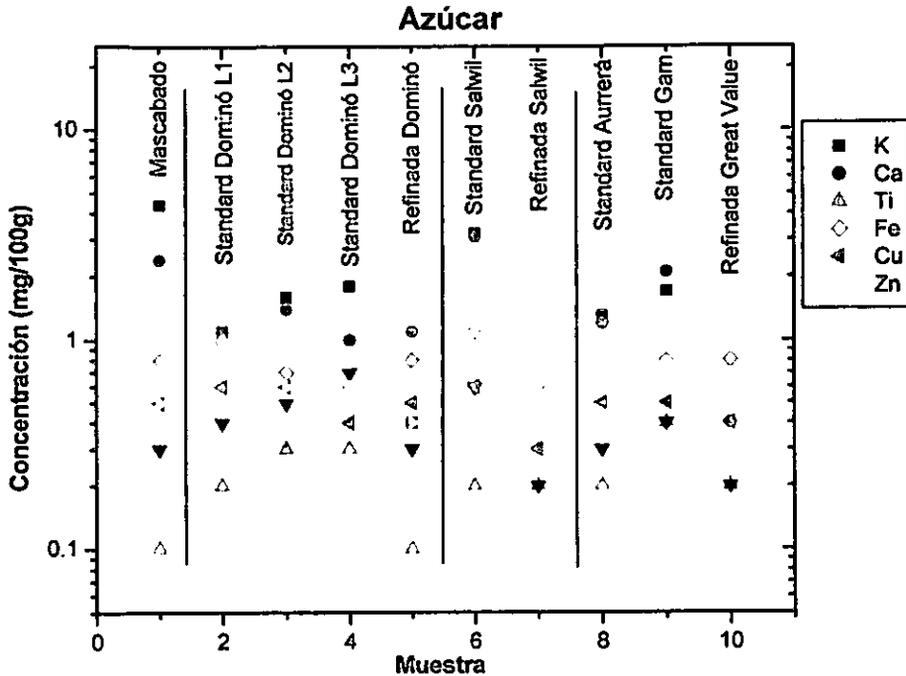
El valor promedio de K en azúcar estándar es muy aproximado al registrado en la bibliografía [20, 21, 22] en cambio, el azúcar mascabado duplica este valor. En cuanto al azúcar refinada, de las muestras analizadas únicamente en la Dominó se observó K. Cabe mencionar que Salwil destaca por su valor en K y Ca, ya que contiene alrededor de un 90% más que las restantes.

Comparando los intervalos de valores registrados en la bibliografía tenemos que el promedio general de la concentración de Ca en azúcar estándar es aproximadamente un

Tabla 5. Concentraciones elementales determinadas mediante PIXE de las muestras de Azúcar

No. de muestra	Muestra	K (mg/100g)	Ca (mg/100g)	Tl (mg/100g)	Fe (mg/100g)	Cu (mg/100g)	Zn (mg/100g)
		±5%	±5%	±10%	±10%	±10%	±10%
1	mascabado	4.4	2.4	0.1	0.3	0.8	0.5
2	st Dominó 1	1.1	1.1	0.2	0.4	1.0	0.6
3	st Dominó 2	1.6	1.4	0.3	0.5	0.7	0.6
4	st Dominó 3	1.8	1.0	0.3	0.7	0.6	0.4
5	ref Dominó	0.4	1.1	0.1	0.3	0.8	0.5
6	st Salwil	3.2	3.1	0.2	0.6	1.1	0.6
7	ref Salwil	0.0	0.6	0.2	0.2	0.6	0.3
8	st Aurrerá	1.3	1.2	0.2	0.3	0.9	0.5
9	az Gam	1.7	2.1	0.4	0.4	0.8	0.5
10	ref Great value	0.0	0.4	0.2	0.2	0.8	0.4

20% más alto que los valores obtenidos experimentalmente. El mascabado registró un 50% más que el promedio de azúcar estándar; por otra parte, la refinada contiene una concentración inferior a las dos anteriores, respecto a la estándar la diferencia es de 40%.



Gráfica 2. Resultados de concentración elemental de azúcar.

El Ti no se reporta dentro de la bibliografía, experimentalmente se presentó en todas las muestras en un intervalo de 0.1 a 0.4 mg/100g, siendo la concentración mayor la que pertenece al azúcar Gam.

En cuanto al Fe, éste se reporta en concentraciones como trazas. En nuestro caso el azúcar estándar presenta la mayor concentración en este elemento (0.5mg/100g), a continuación el mascabado (0.35mg/100g) y por último la refinada con 0.2mg/100g de Fe.

La concentración de Cu es prácticamente igual para todas las muestras (0.75mg/100g), sin embargo, el valor reportado es de 0.02 mg/100g, es decir, 37.5 veces más.

La bibliografía registra 0.02mg/100g para Zn, en este trabajo el promedio de la concentración para este elemento es muy superior, ya que se obtuvo el valor de 0.5mg/100g tanto para azúcar estándar como para mascabado, en cuanto a la refinada contiene un 25% menos a este valor.

En cuanto al azúcar analizada por lotes, se encuentra una diferencia pequeña entre ellas en cuanto a las concentraciones de estos elementos, salvo para K; ya que se observa una diferencia de 40%.

Se confirma que en general, el azúcar refinada contiene cantidades menores de los elementos detectados que el azúcar estándar.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las principales conclusiones de este trabajo incluyen aspectos en cuanto a la metodología empleada, composición de los alimentos, normas oficiales vigentes, nutrición, producción y control de calidad.

- En cuanto a la metodología, se pone en evidencia que la técnica PIXE es apropiada y cuenta con la sensibilidad adecuada para caracterizar los contenidos de elementos presentes en bajas concentraciones constituyendo una nueva alternativa para este fin.
- En lo que respecta a las Normas Oficiales vigentes los resultados señalan que éstas deben complementarse incluyendo algunos otros elementos reportados en la bibliografía y detectados en este trabajo, en particular de los elementos metálicos. Puede mencionarse que, en particular para el caso del Cu en algunos casos se rebasa lo especificado por la Norma Oficial para este alimento.
- Los resultados de composición obtenidos indican que algunas veces no hay una correspondencia entre los valores medidos para ciertos elementos asociados a ingredientes y lo especificado en la información nutricional. Tal es el caso de chocolate con leche para el cual se observaron en algunas muestras cantidades menores de Ca a las esperadas para este tipo de alimento.

- Los chocolates en polvo enriquecidos contienen, en efecto, concentraciones superiores de Ca, Fe y Zn a las de alimentos similares sin este complemento.
- En lo que concierne al control de calidad, los resultados para azúcar indican que sí existen variaciones en concentraciones elementales entre diferentes lotes. Para establecer los intervalos de variación debidos al proceso se requieren análisis estadísticos más completos considerando al menos seis muestras por lote.
- La relevancia de este trabajo estriba en la nueva propuesta metodológica y las implicaciones de sus resultados en alimentación y nutrición, producción y control de calidad y normatividad. La metodología tiene un carácter general y puede utilizarse para la caracterización de otros tipos de alimentos con ventajas con respecto a las metodologías más tradicionales que requieren una preparación de muestra más elaborada. La posibilidad de utilizar otras técnicas de origen nuclear de manera simultánea con PIXE amplía los alcances en cuanto al número de elementos detectados, incluyendo los más ligeros como C, N, O. Esto, así como nuevas aplicaciones a la caracterización de alimentos, constituyen las perspectivas más importantes que plantea este trabajo.

INSTITUTO VENEZOLANO
DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

REFERENCIAS

- [1] Belitz H.D. *Química de los Alimentos*. Acribia, 2ª edic. Zaragoza (España); pág. 928-1046,1997.
- [2] Bekket, S.T. "Industrial chocolate manufacture and use". Ed. Acribia, Zaragoza (España) 1994.
- [3] Hart, Leslie. "Análisis moderno de los alimentos".Ed. Acribia , Zaragoza (España) 1989.
- [4] Richard D. Beaty. "Conceptos, instrumentación y técnicas de espectrofotometría por Absorción Atómica". Ed Perkin Elmer de México S.A.
- [5] Skoog D., Leary J. "Análisis Instrumental". Ed. McGraw-Hill. 4ª edición 1994.
- [6]Nollet Leo. "Food análisis by HPLC". Ed. Marcel Dekker, 1992, Cap. 20
- [7] Miranda J. *Técnicas analíticas de origen nuclear: Un curso introductorio*. Departamento de Física Experimental, Instituto de Física, UNAM, 1996.
- [8] Johansson S.A.E. y Campbell J.L. *PIXE: A novel technique for elemental analysis*, John Wiley & Sons, Chichester, 1988.

- [9] Johansson S.A.E., Campbell J.L y Malmqvist K.G. *Particle-Induced X-ray Emission spectrometry (PIXE) Chemical Analysis: Series of monograph on analytical chemistry and its applications*, vol 133. J.D Widefrodner, series ed., John Wiley & Sons, New York, 1995.
- [10] Ruvalcaba-Sil J.L. *Estudios arqueométricos mediante las técnicas PIXE y RBS*. Antropología y Técnica, IIA-UNAM, en prensa.
- [11] Desales-Galeana G., Tenorio D M., Jimenez-Reyes. *A trace element study of powdered milk by PIXE*. International Journal of PIXE. 3, (3): 243-253,1993.
- [12] Haruyama Y., Saito M., Tomita M. *Trace element analysis in soy sauce*. International Journal of PIXE. 3, (4): 301-305,1993.
- [13] Haruyama Y., Saito M., Tomita M. *Trace element analysis in soy sauce II*. International Journal of PIXE. 4, (2): 117-121,1994.
- [14] Yukawa M., Kimura A., Watanabe Y. *Distribution of elements in bean sprout determined by PIXE analysis*. International Journal of PIXE. 5, (2,3): 69-77,1995.
- [15] Haruyama Y., Saito M., Yoshida K. *Trace element analysis in flour*. International Journal of PIXE. 5, (2,3): 79-84,1995.
- [16] Flocchini G. R., Lagunas-Solar M., Perley B. *Applications of X-Ray Emission to elemental analysis of foods*. International Journal of PIXE. 6, (1,2): 375-394,1996.

[17] Campbell J.L., Russell S.B., Faiq S., Schulte C.W., Ollerhead R.R. Gingerich, Optimization of PIXE sensitivity for biomedical applications. *Nucl. Instrum. and Meth.* **181** 285 (1981).

[18] Campbell J.L., Specimen preparation in PIXE analysis. *Nucl. Instrum. and Meth.* **142** 263 (1977).

[19] Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. NOM-F-60-1982 "Alimentos-chocolate con leche y sus variedades".

[20] Cance Mc. and Widdowson's. *The composition of Foods*. The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 5ª ed.; pág. 328-345, 1991.

[21] Bernard W. *Chocolate & Confectionary Science & Technology*, AVI Publishing Company, 2ª ed.; Westport, Connecticut; pág. 136. 1989.

[22] *Diccionario de los Alimentos*. Edita Mexicana, S.A. México, Barcelona, 2ª edición. pág. 95,124. 1984.

[23] NOM-F-3-1991 "Azúcar Refinado". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

[24]. NOM-F-084-1985 "Azúcar estándar". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

[25] NOM-F-084-1985 "Azúcar curdo o mascabado". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

[26] NOM-F-516-1990 "Azúcar blanco popular". Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

[27] NOM-F-082-1986 "Ingenios azucareros, cenizas sulfatadas-Método gravimétrico".
Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.