



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE
CARBOHIDRATOS Y CALCIO UTILIZADOS EN EL LABORATORIO DE
BROMATOLOGÍA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

J. MA. DEL CARMEN CÁRDENAS

GABRIELA DÍAZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS: Q.F. B. LETICIA CECILIA JUÁREZ



JUNIO 2010



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.

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a duda los responsables de que hoy este aquí disfrutado de todo, un gran esfuerzo compartido son ellos papá y mamá. Y sin temor a equivocarme a todos mis profesores y en especial a mi directora de tesis. Me quedo sin palabras gracias totales a todos y cada uno que contribuyo para que este capítulo de mi vida se cierre.... Y colorín colorado no es un cuento pero sea terminado doy el punto final.

Gabriela

*Un agradecimiento a todas las personas que directa o indirectamente permitieron la realización de este trabajo, a mis padres por su sacrificio, a mis hermanos por su estímulo, a mis amigos por sus palabras de aliento, a mis tías por su paciencia, a mi directora por su apoyo incondicional, a mis profesores por sus enseñanzas y a mi universidad por sus valores... muy especialmente un gracias a la vida, que me ha permitido cerrar un ciclo en la vida y abrir otro; que me ha enseñado que **“la vida tiene tres etapas: el pasado lejano, el presente que es lo que quieres que sea y el futuro incierto.”***

Carmen

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Importancia de los alimentos en la nutrición	3
2.1.1 Clasificación de los nutrientes	4
2.2 Química Analítica	7
2.2.1 Clasificación de los Análisis	7
2.3 Métodos Analíticos Cuantitativos	8
2.3.1 Clasificación de los métodos basados en los tipos de reacciones	9
2.3.2 Diagrama de los pasos de un análisis cuantitativo	11
2.3.3 Calibración y medida de la concentración	12
2.4 Carbohidratos	12
2.4.1 Definición	12
2.4.2 Importancia de los carbohidratos en el organismo	14
2.4.2.1 Funciones que desempeñan en el organismo	14
2.4.3 Deficiencia en el organismo	14
2.5 Métodos para cuantificación y determinación Carbohidratos	15
2.5.1 Reacción de Molisch	15
2.5.2 Reacción de Benedict	15
2.5.3 Reacción de Seliwanoff	16
2.5.4 Prueba de Bial	16
2.5.5 Método de Antrona de Clegg	16
2.5.6 Método volumétrico con reactivo de Fehling	18

2.6 Calcio	19
2.6.1 Definición	19
2.6.2 Importancia en el organismo	20
2.6.2.1 Funciones que desempeña en el organismo	20
2.6.3 Deficiencia en el organismo	21
2.7 Métodos para la cuantificación del metal Calcio (Ca^{2+})	21
2.7.1 Métodos Directos	21
2.7.1.1 Espectrofotometria de Absorción Atómica	21
2.7.1.2 Electrodo Selectivo	22
2.7.1.3 Valoración Complejométrica	22
2.7.2 Métodos Indirectos	23
2.7.2.1 Valoración volumétrica del Calcio por calizas	23
2.7.2.2 Determinación gravimétrica	24
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
IV. OBJETIVO GENERAL	26
4.1 Objetivos Particulares	26
V. HIPOTESIS DEL TRABAJO	27
VI. METODOLOGIA	28
5.1 Optimización del método de Carbohidratos Totales	28
5.1.1 Parámetros a evaluar	33
5.1.1.1 Linealidad del método	33
5.1.1.2 Exactitud y Repetibilidad	33
5.1.1.3 Reproducibilidad	34

5.2 Optimización del método volumétrico de Carbohidratos	34
5.2.1 Parámetros a evaluar	38
5.2.1.1 Linealidad del método	38
5.2.1.2 Exactitud y Repetibilidad	39
5.2.1.3 Reproducibilidad	39
5.3 Optimización del método de Cuantificación de Calcio	39
5.3.1 Parámetros a evaluar	44
5.3.1.1 Linealidad del método	44
5.3.1.2 Exactitud y Repetibilidad	44
5.3.1.3 Reproducibilidad	44
VI. RESULTADOS	45
6.1 Carbohidratos Totales	45
6.2 Método volumétrico de determinación de azúcares reductores	46
6.3 Determinación de Calcio	47
VII DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. SUGERENCIA	55
IX ANEXOS	56
X BIBLIOGRAFIA	64

I. INTRODUCCIÓN

La universidad en su carácter de elemento de cambio, capacita al alumnado para realizar todos los métodos analíticos de tipo químico, biológico y tecnológico de tal manera que:

- Sea capaz de adaptar y modificar la tecnología ya existente o crearla en su defecto.
- Se ajuste a las necesidades de la industria en cuestión y del país.
- Respete la legislación y reglamentos en vigor.
- Brinde la información necesaria para la creación del proceso a gran escala.

Por lo cual en el campo de los alimentos y las bebidas el farmacéutico debe llevar a cabo todos los análisis necesarios para establecer el uso adecuado de los principales promotores de salud, que son los alimentos. Además de que debe realizar en este campo una integración entre los criterios y filosofías socioculturales y sus conocimientos tecnológicos, del tal modo que sea capaz de realizar y supervisar los procedimientos y técnicas para determinaciones e investigaciones sobre:

- El valor alimenticio de una sustancia.
- Su calidad e implementación.
- Efectos tóxicos.⁽¹⁾

Debido a lo anterior, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza dentro de la carrera de Química Farmacéutica Biológica (QFB), se estableció el modulo de bromatología el cual se imparte en 7° semestre; la asignatura se ha estructurado en dos partes: teórica (con un total de 3 horas) y práctica (4 horas). La parte teórica aborda fundamentalmente el conocimiento de los aspectos generales de los alimentos (especialmente los higiénico-sanitarios) y de aspectos particulares de grupos concretos de alimentos. La parte práctica se refiere a los aspectos químico analítico y el alimento como promotor de salud.

El QFB como químico analítico debe estar bien formado en las demás ramas de la química. Debe comprenderse la diferencia entre un **analista químico** y un **químico analítico**. El primero es un operador con poco o sin ningún conocimiento que sigue directrices ya establecidas, ejecutando ciertas operaciones según un plan que lo lleva a obtener un resultado. El químico analítico interpreta resultados, modifica métodos existentes cuando las circunstancias lo aconsejan y desarrolla métodos originales. ⁽²⁾La optimización de acuerdo a la NOM-001 define optimización: “Como la actividad recurrente para aumentar la capacidad para mejorar, perfeccionar o llevar a cabo un proceso con el propósito de lograr un proceso óptimo”. ⁽³⁾

Actualmente en la parte práctica se tienen problemas en los métodos de Carbohidratos (carbohidratos totales y volumétrico de Fehling) y Calcio (método indirecto por oxalato de calcio), debido a que los métodos, no son reproducibles.

Por tal motivo se realizó la optimización de métodos de cuantificación utilizados en el laboratorio de bromatología pretendiendo con ello que las técnicas analíticas funcionen correctamente, arrojando datos confiables, y minimizar la utilización de recursos en cuanto a reactivos y tiempo. Se realizará una revisión teórico-práctica de las técnicas de cuantificación de carbohidratos y calcio para manipular variables que afecten la cuantificación de los métodos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Importancia de los alimentos en la nutrición.

Se ha establecido que mediante la nutrición y la elección de los alimentos el hombre puede influir de manera determinante sobre su salud, su capacidad de rendimiento y su esperanza de vida. Los alimentos contienen los nutrientes esenciales para la vida, que son proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales y los elementos traza; al mismo tiempo contienen agua, que es fundamental, y los alimentos de origen vegetal que aportan fibra dietética, que favorece la digestión:

“La nutrición es el proceso biológico en el que los organismos asimilan a los alimentos y los líquidos necesarios para el funcionamiento, el crecimiento y el mantenimiento de sus funciones vitales. La nutrición hace referencia a los nutrientes que componen los alimentos y comprende un conjunto de fenómenos involuntarios que suceden tras la ingestión de los alimentos, es decir la digestión, la absorción o paso a la sangre desde el tubo digestivo de sus componentes o nutrientes, su metabolismo o transformaciones químicas alimenticias por medio de las cuales se produce energía para que ese organismo vivo pueda sostenerse, crecer, desarrollarse y reproducirse. Estos requerimientos energéticos están relacionados con la actividad física y el gasto energético de cada persona.”⁽⁴⁾

Una nutrición adecuada es la que cubre:

- a) Los requerimientos de energía a través de la digestión en las proporciones adecuadas de nutrientes energéticos como los hidratos de carbono y grasas.
- b) Requerimientos plásticos o estructurales proporcionados por las proteínas.
- c) La necesidad de micronutrientes no energéticos como las vitaminas y los minerales.
- d) La correcta hidratación basada en el consumo de agua.

Los alimentos son sustancias químicas que una vez ingeridas, digeridas y absorbidas por el organismo favorecerán el crecimiento y la separación de tejidos, la producción de energía y la regulación de estos procesos. ⁽⁵⁾

2.1.1 Clasificación de los nutrientes.

Los nutrientes se clasifican en cinco grupos funcionales: proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. Estos grupos comprenden un total aproximado de entre 45 y 50 % de sustancias que los científicos consideran esenciales para mantener la salud y un crecimiento normal.

Proteínas: El término proteína viene del griego *proteus* que significa “se lo primero” y se refiere a su importancia en la estructura de las células del cuerpo. Las proteínas son biopolímeros naturales, hechos de monómeros denominados aminoácidos y componentes esenciales de la dieta humana. ^(4,6)

Durante la digestión, las proteínas se degradan a péptidos y posteriormente a sus aminoácidos constituyentes que se absorben y se vuelven a ensamblar para formar las proteínas que conforman el cuerpo humano y que constituyen nuestra estructura y son por lo tanto indispensables para el crecimiento, renovación de las mismas y para la síntesis de muchas sustancias relacionadas con nuestra inmunidad y las relaciones enzimáticas celulares. ^(7,8)

Carbohidratos: Están conformados por carbono, hidrógeno y oxígeno. Son un grupo importante de nutrimentos y a excepción del glucógeno y la lactosa son generalmente de origen vegetal, siendo producidos como resultado de la fotosíntesis. Por lo tanto las fuentes de carbohidratos son principalmente frutas, vegetales y cereales. Tienen una función fundamental que es la energética; constituyen la energía de más fácil utilización. ⁽⁹⁾

Grasas: El término lípido proviene del griego *lipos* “grasa”, contiene átomos de carbono y de hidrógeno, pocos átomos de oxígeno y en ocasiones contiene átomos de fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos son ésteres o potenciales de ácidos grasos, solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Debido a su insolubilidad en agua se transportan en la sangre en complejos moleculares con proteínas constituyen el nutriente energético por excelencia, además suministran los ácidos grasos esenciales y proporcionan al organismo las vitaminas liposolubles: A, D, E y K. ⁽⁹⁾

Vitaminas: Son compuestos orgánicos necesarios en pequeñas cantidades para que el metabolismo corporal sea el adecuado. Por lo general las células del cuerpo no pueden sintetizar estos compuestos. Algunas vitaminas se ingieren en forma de sustancias precursoras inactivas (pro-vitaminas) y sólo en el organismo se transforman en su modalidad activa. La función primordial de las vitaminas es participar en el control del metabolismo lipídico, proteico, hidrocárbico, mineral y energético, aunque algunas de ellas tienen actividades específicas. Existen dos tipos de vitaminas en nuestra alimentación.

Hidrosolubles: Sus propiedades metabólicas son absorción por difusión pasiva o transporte activo, almacenamiento bajo o nulo, excreción a nivel urinario. Son ocho vitaminas del grupo B y la vitamina C.

Liposolubles: Sus propiedades metabólicas son absorción mediada por sales biliares, posible almacenamiento, excreción a nivel fecal vitaminas A, E, D y K.

Minerales: Son utilizados por el organismo en una gran variedad de maneras. Forman parte de la estructura rígida del cuerpo o están presentes en los fluidos celulares o en los fluidos corporales. Esto es en los fluidos extracelulares, necesitamos unos 18-20 minerales que son los siguientes: calcio, fósforo, magnesio, hierro, manganeso, zinc, cobre, cobalto, cromo, molibdeno, yodo, flúor, sodio, potasio, cloro, azufre, selenio, níquel, estaño y silicio. Los minerales pueden clasificarse en:

Micronutrientes: (mayor 0.005% peso corporal), Ca, P, Mg, Na, K, Cl y S.

Micronutrientes: (menor 0.005% peso corporal), Fe, Zn, F, I, Co, Cu y Se.

Las vitaminas y los minerales no tienen una función energética pero son imprescindibles para la vida porque intervienen en multitud de procesos celulares. El hombre no consume estas sustancias de forma individual, sino con los alimentos, en los cuáles se encuentran en mezclas variables. El que quiere alimentarse de forma sana y mantener su actividad física, debe ingerir todas las sustancias citadas según sus necesidades. Para ello tiene que saber que alimentos contiene los nutrientes vitales y en qué cantidades. ⁽⁹⁾

La ingesta Diaria Recomendada por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán establece una ingesta de vitaminas y minerales en g, mg y µg de acuerdo a los requerimientos nutricionales del individuo, por ello a continuación se presenta en el Cuadro 1 de manera general los requerimientos mínimos necesarios de nutrientes en individuos sanos.

Cuadro 1. Índice de Ingesta Diaria Recomendado de Vitaminas y Minerales. ⁽¹⁰⁾

	INFANTES 0-5meses 6- 11meses		NIÑOS Y PÚBERES 1-3a 4- 6a 7-18a			ADULTOS	EMBARAZADAS	MUJERES LACTANTES
Proteína (g)	13	14	20	28	1.3	1	+8	+20
Vitamina A (µg eq retinol)	400	400	450	450		1000	800	1300
Vitamina D (µg)	10	10	10	5		10		10
Vitamina E (µg)	3	4	6	7	10	10	10	
Vitamina C (mg)	35	40	40	45	60	60	70	
Tiamina (mg)	0.35	0.45	0.7	0.8	1.2	1.5	1.5	1.5
Riboflavina (mg)	0.45	0.55	0.8	1	1.5	1.7	1.7	1.7
Niacina (mg)	6	7	9	11	16	17	19	19
Vitamina B ₆ (mg)	0.3	0.6	1	1.1	1.2	2.0	2.2	2.2
Vitamina B ₁₂ (mg)	0.3	0.5	0.7	0.9	0.7	2.0	2.2	2.9
Folacina (mg)	25	35	50	65	180	200	400	400
Calcio (mg)	450	600	800	700	700	800	1000	1200
Fósforo (mg)	350	500	700	800	800	800	1200	1200
Hierro (mg)	10	10	15	15	10	15	20	30
Magnesio (mg)	40	60	80	100	400	350	320	355
Zinc (mg)	5	5	15	10	15	15	15	30
Yodo (mg)	40	50	70	80	150	150	160	175
Cobre (mg)	0.6	0.6	0.7	0.7	1.0	1.0	1.0	
Flúor (mg)	0.5	0.5	1.5	1.5	1.0	2	2	

2.2 Química Analítica.

La Química Analítica puede definirse como la ciencia que desarrolla y mejora métodos e instrumentos para obtener información sobre la composición y naturaleza química de la materia. Ya que como lo enuncia la ley de acción de masas “a materia no se crea ni se destruye solo se transforma”, por ello surgió la necesidad de determinar “cuánto” era lo que estaba presente. Dentro de la Química Analítica se incluye el Análisis Químico que es la parte práctica que aplica los métodos de análisis para resolver problemas relativos a la composición y naturaleza química de la materia. Los ámbitos de aplicación del Análisis Químicos son muy variados, en la industria destaca el control de calidad de materias primas y productos terminados; en el comercio los laboratorios certificados de análisis aseguran las especificaciones de calidad de las mercancías; en el campo médico los análisis clínicos facilitan el diagnóstico de enfermedades.

Es interesante realizar una definición de términos ligados al análisis:

Muestra: Parte representativa de la materia objeto del análisis.

Analito: Especie química que se analiza.

Técnica: Medio de obtener información sobre el analito.

Método: Conjunto de operaciones y técnicas aplicadas al análisis de una muestra.

Análisis: Estudio de una muestra para determinar sus composición o naturaleza química.

2.2.1 Clasificación de los Análisis.

La Química Analítica también puede diferenciarse de acuerdo al análisis, según la información que se desea obtener.

Análisis Químico Cualitativo: revela la identidad de los elementos y compuestos de una muestra mediante ensayos de identidad, marchas analíticas.

Análisis Químico Cuantitativo: estudio experimental de las cantidades de sustancia que aparecen en una muestra o que intervienen en una reacción.

El análisis químico cuantitativo nos permite saber a exactitud las cantidades de las sustancias que forman parte de una reacción y de los productos de ella.

Lavoisier sintió la necesidad de poder pesar con exactitud los cuerpos para conocer el mecanismo de las reacciones químicas, esa inquietud lo llevo a inventar la balanza de precisión, con la cuál confirmo varias leyes de la química, gracias a esta invención surgió la química analítica.

2.3 Métodos Analíticos Cuantitativos.

Mediante métodos analíticos cuantitativos no se eligen únicamente materias apropiadas a un proceso industrial, sino que con ellos también se vigilan diversas fases del proceso hasta llegar al producto terminado que debe de reunir determinados requisitos de las normas de calidad.

En la actualidad no hay industrias que no cuenten con un laboratorio que control de la fabricación de las fases.

El análisis cuantitativo abarca campos no industriales como la medicina, bioquímica, geología, geoquímica, farmacia, agricultura, oceanografía entre otras.

a) Métodos clásicos, se basan en propiedades químicas del analito. Se incluyen las gravimetrías y las volumetrías.

Métodos Gravimétricos: determinan la masa del analito de algún compuesto relacionado químicamente con él.

Métodos Volumétricos: cuantifica el volumen de una solución que contiene reactivo suficiente para reaccionar por completo con el analito.

b) Métodos instrumentales, basados en propiedades químico-físicas. La clasificación de los métodos instrumentales se realiza en base a la propiedad que se mide (espectroscópicos, electroanalíticos, térmicos...).

Métodos electroquímicos comprenden la medición de propiedades eléctricas tales como el potencial, corriente, resistencia y cantidad de carga eléctrica.

Métodos espectroscópicos, se basa en la medida de la interacción de la radiación electromagnética con los átomos o moléculas del analito o en determinar la producción de tal radiación por el analito mismo. ⁽²¹⁾

2.3.1 Clasificación de los métodos basados en los tipos de reacciones.

a) Reacción de Neutralización. Se puede definir como la reacción que se lleva a cabo entre un ácido y una base, dependiendo de lo que se defina por ácido y base ya que el concepto puede ser muy elástico de acuerdo a las teorías de:

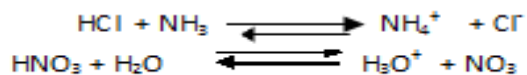
Teoría de Arrhenius.

Ácido es el compuesto que en solución acuosa produce hidrógenos como ión positivo (H^+) y bases en solución acuosa forma iones oxhidrilo (OH^-).



Teoría Brønsted y Lowry.

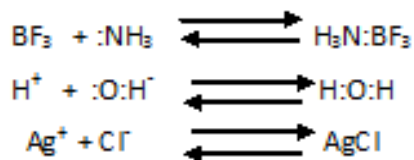
Ácido es el compuesto capaz de ceder protones independientemente del medio convirtiéndose en base y viceversa para la base, esto quiere decir que la base acepta protones convirtiéndose en un ácido. A estos ácidos y bases recién formados se les denomina conjugados de los originales, por lo cual la neutralización según Brønsted y Lowry es la transferencia protones del ácido a la base produciendo sus conjugados.



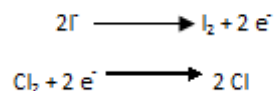
Teoría de Lewis.

Considera que un ácido es toda sustancia capaz de aceptar un par de electrones (e^-) y una base toda sustancia capaz de ceder un par de electrones.

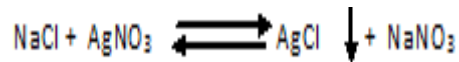
Para Lewis la neutralización es la formación de enlaces coordinados.



b) Reacciones de óxido-reducción (REDOX). Son las reacciones de transferencia de electrones. Esta transferencia se produce entre un conjunto de elementos químicos, uno oxidante y uno reductor (una forma reducida y una forma oxidada respectivamente). Para que exista una reacción redox, en el sistema debe haber un elemento que ceda electrones y otro que los acepte: El agente *reductor* es aquel elemento químico que suministra electrones de su estructura química al medio, aumentando su *estado de oxidación*, es decir; oxidándose. El agente *oxidante* es el elemento químico que tiende a captar esos electrones, quedando con un *estado de oxidación* inferior al que tenía, es decir; reducido.

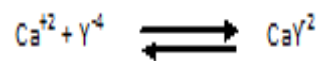


c) Reacciones de Precipitación. Se les denomina así a las reacciones que pueden ocurrir cuando una sustancia insoluble se forma en la disolución debido a una reacción química o a que la disolución ha sido sobresaturada por algún compuesto, esto es, que no acepta más soluto y que al no poder ser disuelto dicho soluto forma el precipitado.

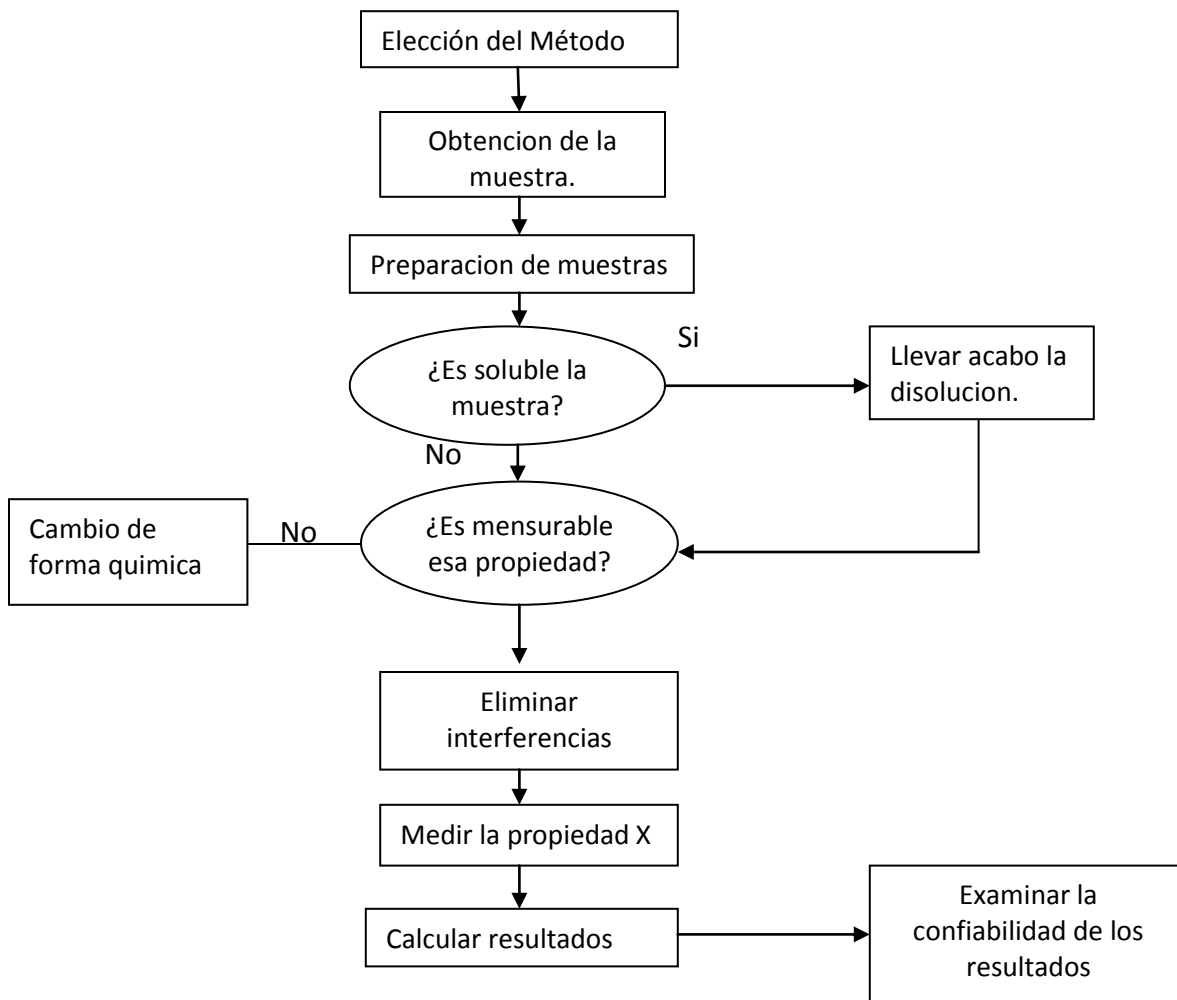


d) Reacciones Complejométricas. Las reacciones de formación de complejos se definen como la unión de un catión metálico y especies químicas donadoras de electrones llamadas ligandos, para formar compuestos de coordinación o complejos. El ligando debe tener por lo menos un par de electrones sin compartir.

Los complejos llamados quelatos, se producen por la coordinación de un catión y un ligando, en los que el catión (metálico) es parte de uno o varios anillos de cinco o seis miembros.



2.3.2 Diagrama de los pasos de un análisis Cuantitativo.



2.3.3 Calibración y medida de la concentración.

Todos los resultados obtenidos dependen de una medición final "X" de una propiedad física o química de un analito, esta propiedad varía de manera conocida y reproducible con la concentración C_x del analito. En teoría es la medida de la propiedad de "X" es directamente proporcional a la concentración es decir:

$$C_x = kX$$

Donde k es una constante de proporcionalidad, ésta se puede calcular con la comparación con un estándar donde la C_x es un valor conocido, K es conocida como calibración, esto es el conjunto de operaciones que determinan bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

2.4 Carbohidratos

2.4.1 Definición

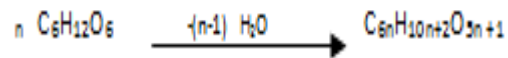
Estos compuestos están formados por Carbono, Hidrógeno y Oxígeno. Estos dos últimos elementos se encuentran en los glúcidos en la misma proporción que en el agua, de ahí su nombre clásico de Hidratos de Carbono, aunque su composición y propiedades no corresponden en absoluto con esta definición.

Anteriormente a todas las sustancias conocidas que respondían a la forma empírica $C_x(H_2O)$, se les consideraban **hidratos de carbono**.

Por ello se puede definir como carbohidratos a los polihidroxialdehidos, a las polihidroxicetonas o derivados de los mismos.⁽¹¹⁾

La clasificación más simple es la que los divide en monosacáridos, oligosacàridos y polisacàridos.

- *Monosacàridos*: son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas que en general poseen una cadena no ramificada. Representantes típicos de este grupo son: glucosa, fructosa y galactosa.
- *Oligosacàridos*: son carbohidratos formados de una manera formal, a partir de monosacàridos con pérdidas de una molécula de agua, es decir según la ecuación.



Ejemplos conocidos son los disacàridos sacarosa, maltosa y lactosa, el trisacàrido, rafinosa y el tetrasacàrido estaquiosa.

- *Polisacàridos*: en ellos “n” es siempre un número más o menos grande. Las propiedades de estos compuestos de alto peso molecular difieren considerablemente de los carbohidratos de pequeño tamaño. Así, los polisacàridos son mucho más difíciles de disolver en agua que los monosacàridos y oligosacàridos, no poseen sabor dulce y son muy lentos reaccionando. Ejemplos de este grupo son: almidón, celulosa y pectina.⁽¹⁰⁾

2.4.2 Importancia de los carbohidratos en el organismo. ⁽⁷⁾

2.4.2.1 Funciones que desempeñan en el organismo.

- a) Aportan energía a corto plazo. La glucosa constituye la única fuente energética del sistema nervioso (en condiciones fisiológicas normales) y de las células sanguíneas, por lo que se deben ingerir carbohidratos cada día. Proporciona 4 Kca/g.

- b) Se almacena energía en forma de glucógeno hepático o muscular o mediante la transformación en grasa; y se utiliza cuando el cuerpo lo necesite energía.

- c) Están unidos a proteínas y lípidos, ya que impiden que estos sean empleadas como fuente de energía. Ambos efectos se logran al utilizar energéticamente los hidratos de carbono.

- d) Participan en la síntesis de material genético (ADN, ARN) y otros compuestos (constituyentes del cartílago, heparina).

- e) Los polisacáridos son elementos estructurales de las paredes celulares de bacterias, plantas y exoesqueleto de los artrópodos.

- f) Actualmente se ha estudiado que forman parte en el reconocimiento intercelular.

2.4.3 Deficiencia en el organismo.

- a) El exceso de carbohidratos puede causar un aumento total de **calorías**, y por ende provocar la **obesidad**. El efecto inverso, es decir, la deficiencia de carbohidratos causa la falta de calorías que se entiende como **desnutrición**. ⁽¹⁰⁾

2.5 Métodos para la cuantificación y determinación de Carbohidratos.

2.5.1 Reacción de Molisch.

Fundamento:

La presencia de carbohidratos en una muestra se pone de manifiesto por la reacción de Molisch, que a cierto punto es la reacción universal para cualquier carbohidrato.

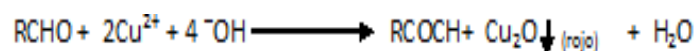
Se basa en la acción hidrolizante y deshidratante del ácido sulfúrico sobre los hidratos de carbono. En dicha reacción el ácido sulfúrico cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la muestra y la deshidratación a furfural (en las pentosas) o hidroximetilfurfural (en las hexosas). Estos furfurales se condensan con el alfa naftol del reactivo de Molisch (reacción de Molisch) dando un producto colorido. ^(12,13,14)

2.5.2 Reacción de Benedict.

Fundamento:

Una de las reacciones más comunes en la identificación de carbohidratos es la reacción de Benedict. Esta reacción es específica para azúcares con grupo reductores libres (C=O). Todos los monosacáridos poseen un grupo reductor libre. Los disacáridos maltosa y lactosa tienen grupos reductores libres, pero la sacarosa no los posee, ya que se pierden los grupos reductores de sus componentes cuando ésta es formada.

La solución de Benedict comprende fundamentalmente una mezcla de CuSO_4 , Na_2CO_3 y citrato de sodio. En esta mezcla alcalina, el ión citrato forma un complejo soluble con el Cu^{2+} y evita que se precipite bajo forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble. Durante la reacción, se oxida el azúcar enolizado, pero esta reacción no es sencilla. Se forman varios productos de oxidación a partir del azúcar. Sin embargo, en condiciones estandarizadas la reducción de Cu^{2+} puede constituir una medición cuantitativa del azúcar reductor. ^(13,14)



2.5.3 Reacción de Seliwanoff.

Fundamento:

Los carbohidratos se clasifican como cetosas o aldosas, en el carbono 2 tienen una función cetona, que en presencia de un ácido fuerte producen rápidamente derivados furfúricos que reaccionan con un difenol llamado resorcina que está contenido en el reactivo de Seliwanoff. La sacarosa (un disacárido formado por glucosa y fructosa) y la inulina (un polisacárido de la fructosa) dan positiva la reacción, ya que el HCl del reactivo provoca en caliente la hidrólisis del compuesto liberando fructosa (responsable de la reacción positiva).^(13,14)

2.5.4 Prueba de Bial.

Fundamento:

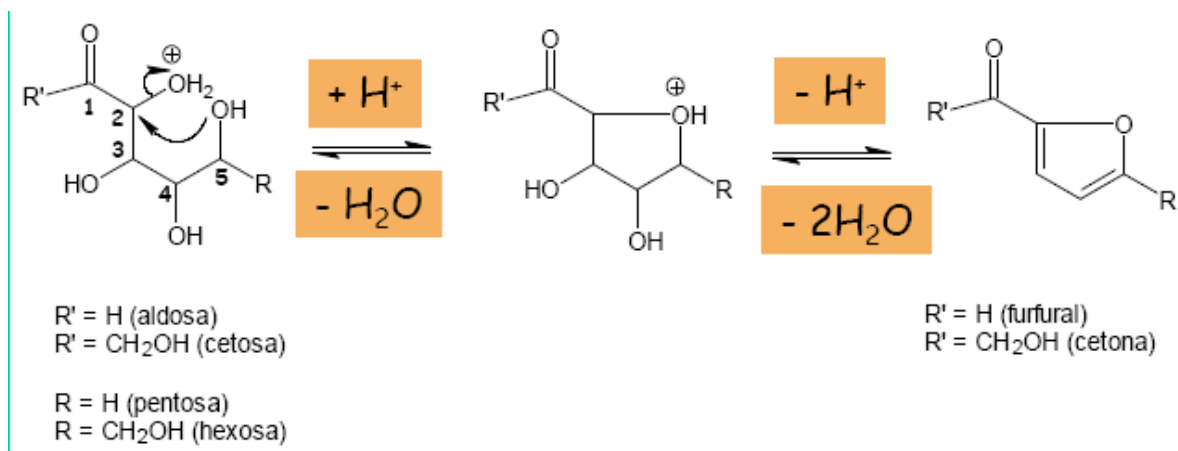
Es una reacción coloreada específica de las pentosas. En condiciones de tiempo, temperatura y concentración de HCl cuidadosamente controladas, las pentosas se convierten rápidamente en furfural, mientras que a partir de las hexosas se producen ciertas cantidades hidroximetil furfural. En presencia del ion férrico y resorcinol (5 metil resorcinol), el furfural se condensa rápidamente y da un producto colorido.^(13,14)

2.5.5 Método de Antrona de Clegg.

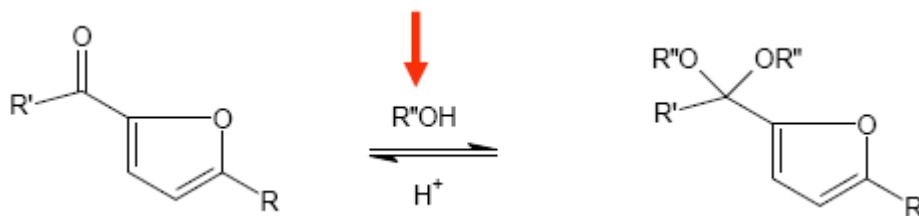
Fundamento:

El ácido sulfurico concentrado hidroliza enlaces glucosidicos para formar monosacaridos que pueden ser luego deshidratados dando furfural este reacciona con antrona (10-ceto-9,10-dihidroantraceno) dando un complejo azul-verdoso.^(12,15)

Reacción de los Carbohidratos en presencia ácidos fuertes.



Reacción de Furfural o Hidroximetilfurfural presencia del grupo funcional fenol (á-naftol, orcinol, resorcinol y antranol).



Radicales.

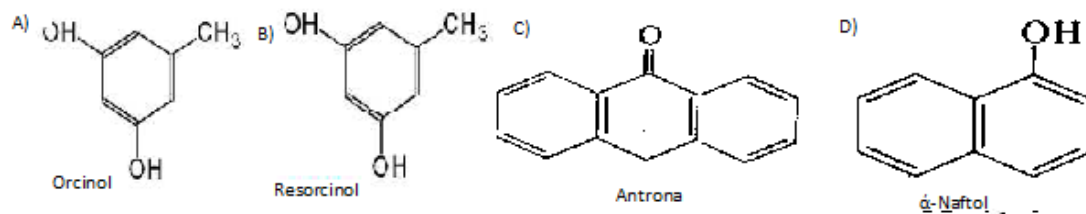
$R'' = \text{Radical}$

A) Orcinol (reactivo de Bial).

B) Resorcinol (Reactivo de Seliwanoff).

C) Antrona (Reactivo de antrona de Clegg).

D) á-Naftol (reactivo de Molisch).

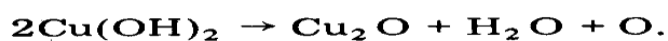


2.5.6 Método volumétrico con reactivo de Fehling.

Fundamento:

La determinación de azúcares por el método volumétrico se basa en la reducción completa de un reactivo alcalino de cobre con muestra a analizar; el punto final se determina empleando el indicador azul de metileno, el cual será reducido a blanco de metilo por un exceso de azúcar reductor.

La determinación volumétrica se sugiere para cualquier tipo de alimentos como; leche, néctar, jugo, mermelada, cajeta, dulce y mole. ^(13,14)



Cuando se calientan los carbohidratos con soluciones salinas de metales oxidantes tales como el Cu^{2+} y otros medios alcalinos, el grupo carbonilo de la aldosa o la cetosa, sea real o potencial (grupos hemiacetálicos) reacciona oxidándose debido al poder reductor de el grupo funcional antes mencionado hasta que se da la formación de azúcares ácidos (ácidos aldónicos) o de productos de precisión molecular a nivel del grupo cetónico e incluso si la oxidación es muy fuerte por un calentamiento prolongado hasta la formación de Cu_2O , CO_2 y H_2O del azúcar en cuestión.

Aquellos azúcares que no tienen grupos carbonilos libre o en forma hemiacetal y que tampoco los pueden formar por las condiciones experimentales, ya sea por hidrólisis o por alguna otra modificación química se les denomina azúcares no reductores como es el caso de la sucrosa o sacarosa, cuya unión osídica esta constituida por interacción de dos grupos hemiacetálicos de glucosa y fructosa.

Todos los monosacáridos son reductores, los más comunes son la glucosa y la fructosa. La maltosa y la lactosa son reductores mientras que la sacarosa no lo es, ya que no posee un grupo carbonilo libre, pero si se realiza una hidrólisis en medio ácido como puede ser el HCl, esta se descompone en monosacáridos reductores.

2.6 Calcio

2.6.1 Definición.

Símbolo químico Ca^{2+} , es un metal alcalino con peso atómico 40.08, número atómico 20, con número de valencia 2^+ , punto de fusión 838°C , punto de ebullición 1440°C . Es el quinto elemento y el tercer metal más abundante en la corteza terrestre. Los compuestos de calcio constituyen 3.64% de la corteza terrestre. El metal es trimorfo, no causa quemaduras sobre la piel. Es menos reactivo químicamente que los metales alcalinos y que los otros metales alcalinotérreos. La distribución del calcio es muy amplia; se encuentra en casi todas las áreas terrestres del mundo. Este elemento es esencial para la vida de las plantas y animales, ya que está presente en el esqueleto de los animales, en el Cuadro 2 se analiza la importancia del Calcio.⁽¹⁰⁾

Cuadro 2. Importancia del Calcio.

Elemento	Requerimiento diario aproximado (adultos).	Contenido corporal aproximado (adultos).	Funciones en el cuerpo	Fuentes alimentarias primarias.
Calcio (Ca^{2+})	1g.	1000g	Presente en huesos y dientes. Necesario para la coagulación de la sangre, la contracción muscular y La actividad nerviosa.	Leche, queso, pan y harina (si es enriquecido), cereales hortalizas verdes.

2.6.2. Importancia en el organismo.

2.6.2.1 Funciones que desempeña en el organismo.

- a) Participa en la estructura, desarrollo y constitución de los huesos y dientes.⁽¹⁶⁾
- b) Actúa junto al magnesio como regulador del ritmo cardíaco.⁽¹⁷⁾
- c) Es indispensable en compañía de la vitamina K para la coagulación sanguínea.^(18,19,20)
- d) Interviene en la transmisión del impulso nervioso.⁽²⁰⁾
- e) Interviene en el tránsito de nutrientes que se lleva a cabo en la membrana celular.⁽²⁰⁾
- f) Reduce los niveles de histamina.^(18,20)
- g) Alivia el insomnio.^(19,20)
- h) Colabora en la conversión del hierro.⁽²⁰⁾
- i) Favorece la absorción de la vitamina B-12.⁽²⁰⁾
- j) Previene, junto a otros minerales, el depósito de metales pesados en el organismo.^(19,20)
- k) Interviene en el control del nivel de colesterol en sangre.⁽²⁰⁾

2.6.3 Deficiencia en el organismo.

- a) Raquitismo.⁽¹⁹⁾
- b) Osteoporosis.^(17,18)
- c) Calambres musculares.^(17,18)
- d) Alteraciones cardíacas.⁽¹⁸⁾
- e) Hemorragias.^(19,20)
- f) Osteomalacia.⁽²⁰⁾

2.7 Métodos para la cuantificación del metal Calcio (Ca²⁺).

2.7.1 Métodos Directos.

2.7.1.1 Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Fundamento

La determinación de calcio se puede llevar a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) empleando una llama de aire/acetileno como se indica en el Cuadro 3. La presencia de fosfatos, Al, Si y Ti en el agua constituye una interferencia química, pues la formación en la llama de compuestos refractarios como oxisales estables, fosfato cálcico o fosfato magnésico, impide la atomización de ambos elementos, dando lugar a un descenso en la señal. Para evitar este problema se añade a las muestras que se van a medir una disolución de lantano, el cuál reacciona con el fosfato dejando libre al calcio.^(21,22)

Cuadro 3. Condiciones para la determinación de Calcio.

Elemento	Llama	Intensidad lámp.	λ (nm)	Rendija (nm)
Ca ²⁺	aire/acetil.	10 mA	422.7	0.7

Flujo de gases: Aire (4.5), Acetileno(2.0)

Tiempo de integración: 2 segundos.

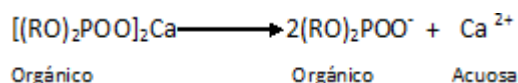
2.7.1.2 Electrodo selectivo.

Fundamento

El calcio iónico se mide mediante la potenciometría del electrodo selector de iones. En el cálculo de los resultados del calcio iónico, la concentración está relacionada con el potencial por medio de la ecuación de Nernst. Los resultados se miden a 37°C.

Utilizan como membrana un polímero orgánico saturado con un cambiador iónico líquido. La interacción con iones a uno y otro lado de la membrana, genera un potencial que puede medirse.

El cambiador líquido forma complejos con el analito. A uno y otro lado de la interfase, tiene lugar el intercambio:



La diferente concentración de Ca^{2+} a ambos lados genera un incremento en el valor del potencial que se puede medir.⁽²¹⁾

2.7.1.3 Valoración Complejométrica.

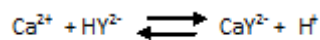
Fundamento

Una reacción de formación compleja ha de ser rápida, transcurrir conforme a una estequiometría bien definida ha de poseer las propiedades características convenientes para la aplicación de los diferentes sistemas de detección de punto final.

Complejo Metal-EDTA (Ca^{2+} con EDTA)

La determinación de un ion metálico por valoración directa con una solución estándar de EDTA (en realidad $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$) es la valoración de calcio (Ca^{2+}) en un medio a pH 10, bien

amortiguado, en este pH la especie predominante es HY^{3-} y la reacción neta de la valoración es (1:1).^(23,24)



2.7.2 Métodos Indirectos

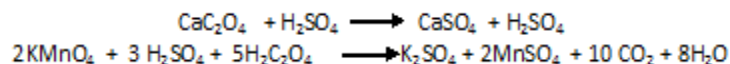
2.7.2.1 Valoración volumétrica del Calcio por calizas.

Fundamento

Los cationes como el Ca^{2+} , cuyos oxalatos son escasamente solubles se pueden determinar precipitándolos como oxalato, separándolos en precipitado, disolviéndolos en ácido sulfúrico diluido y titulando el ión oxalato con solución valorada de permanganato. El método es muy empleado para valorar el calcio.

El calcio se precipita como oxalato por adición de solución de oxalato de amonio. El precipitado separado por filtración y lavado se disuelve en ácido clorhídrico diluido y neutralizando el ácido, con solución diluida de hidróxido de amonio. El precipitado, separado por filtración y lavado se disuelve en ácido sulfúrico diluido y el ácido oxálico liberado se titula con solución de permanganato.

Debe tenerse presente que el método expuesto no es aplicable a la determinación de plomo debido a la formación de una película de sulfato de plomo sobre el oxalato de plomo.^(23,25)



2.7.2.2 Determinación gravimétrica

Fundamento

Depende de la medición de pesos o variaciones de estos como base para calcularlos de la cantidad de sustancias o sustancias buscadas.

Precipitación: La especie química se separa en forma de compuesto insoluble que se puede lavar, secar o calcinar y pesar.

Son los más importantes en el análisis gravimétrico. El componente que se determina se precipita de la solución, en forma del compuesto tan escasamente soluble, que las pérdidas por solubilidad sean des-estimables, cuando el precipitado se separa por filtración y se le pesa después de haberlo sometido a los tratamientos que fueran necesarios así para la determinación.^(23,25)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza no cuenta con los recursos económicos suficientes para proveerse de equipo sofisticado que permita realizar cuantificaciones eficaces en los laboratorios de el modulo de Bromatología, se han establecido una serie de métodos analíticos de rutina que permiten realizar estas determinaciones. Específicamente los métodos de cuantificación de carbohidratos y calcio que actualmente se utilizan, han presentado problemas en relación a su reproducibilidad y repetitividad. Por ello se pretende realizar la optimización de los métodos mediante el control de parámetros físicos y químicos que afecten estas cuantificaciones. Además de que probablemente no se han evaluado como factores primordiales que afecten directamente a los métodos.

IV. OBJETIVO GENERAL:

Optimizar el método general de análisis en la determinación de carbohidratos por el método de Antrona y Fehling así como calcio utilizados en laboratorio de bromatología.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Controlar los parámetros que permitan llevar a cabo la cuantificación de carbohidratos totales y de azúcares reductores.
- b) Controlar los parámetros que permitan llevar a cabo una cuantificación indirecta del calcio.
- c) Obtener un método optimizado adecuado a los recursos que se tienen en el laboratorio de Bromatología y que cumpla con las características de ser reproducible, preciso y exacto.

V. HIPÓTESIS DEL TRABAJO:

Mediante la determinación y el control de variables implicadas en el método analítico se podrán optimizar los métodos de cuantificación de carbohidratos y calcio en alimentos.

VI. METODOLOGIA ⁽²⁶⁾

5.1 Optimización del método Carbohidratos Totales.

Fundamento.

El producto es digerido con ácido perclórico. Los almidones hidrolizables, junto con los azúcares solubles, se determinan colorimétricamente por el método de antrona y se expresa como glucosa.

Material y equipo

- Papel Parafilm
- Tela de poro grande
- Papel Filtro (Whatman No.41)
- Matraz volumétrico 250mL
- Matraz volumétrico 50mL
- Matraz volumétrico 10mL
- Pipeta volumétrica de 1mL
- Pipeta volumétrica de 5mL
- Bureta de 25mL
- Probeta 100mL
- Pipeta graduada 10mL
- Bureta 25mL
- Pipetas volumétricas 1mL
- Vortex
- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Espectrofotómetro

Reactivo 1

- Dextrosa Anhidra (Dextrosa Anhidra J.T. Baker).
- Acido Perclórico al 52%
- Reactivo de Antrona 0.01%

Procedimiento

Preparación del Estándar (Dextrosa Anhidra)

Pesar con exactitud 50mg de Dextrosa anhidra previamente secada por tres horas a 110°C, colocar en un matraz volumétrico de 50mL y aforar con agua destilada.

La solución anterior tiene una concentración 1mg/mL. Realizar la curva del estándar de acuerdo a el Cuadro 1 midiendo las alícuotas, llevandolas a un volúmen de 50mL con agua destilada. Preparar las muestras para la determinación tomando una alícuota de 1mL de cada uno de los niveles de concentración y adicionarles 5mL de Reactivo de antrona.

Cuadro 1. Preparación de curva del estándar de dextrosa anhidra.

[µg/mL]	Alícuota (mL)
80	4.0
90	4.5
100	5.0
110	5.5
130	6.5
150	7.5

Nota: El mezclado se realiza con Vortex con una velocidad de 15rpm.

Preparación de la muestra. (Nestum) ₁

Pesar con exactitud 1.0g de muestra seca, si la muestra es húmeda pesar 2.5g, colocarla en una probeta de 100mL, adicionar 13mL de Ácido Perclórico al 52% , llevar a un volúmen de 50mL con agua destilada, tapar con papel parafilm, agitar durante 30min, con agitación constante.

Transcurrido el tiempo de agitación, filtrar la muestra mediante dos filtros, la primera etapa es con tela seguida de papel filtro a un matraz volumétrico de 250mL, lavar las paredes de la probeta con agua destilada hasta que esté libre de muestra y aforar con agua destilada (ver figura 1).

Tomar las alícuotas correspondientes de acuerdo a el cuadro 2 para la construcción de la curva patrón de la muestra y llevándola a un volúmen de 10mL.

Cuadro 2. Curva Patrón de muestra en alimentos secos.

Concentración	Alícuota (mL)/10mL
266	6.7
300	7.5
333	8.3
366	9.2
400	10.0

Determinación:

Tomar 1mL del estándar, 1mL de agua destilada y 1mL de la muestra, colocarlos en tubos de ensaye, adicionar 5mL de reactivo de antrona al 0.01% a cada uno de los tubos (el reactivo de antrona se debe preparar 5 minutos antes de la determinación y colocarlo en un baño de hielo) y agitar en vortex a una velocidad de 15rpm.

Colocar los tubos tapados con papel parafilm en un BM a ebullición durante 12 minutos, enfriar a temperatura ambiente y realizar las mediciones en una longitud de onda de 630nm.

Diagrama de Flujo de Carbohidratos Totales.

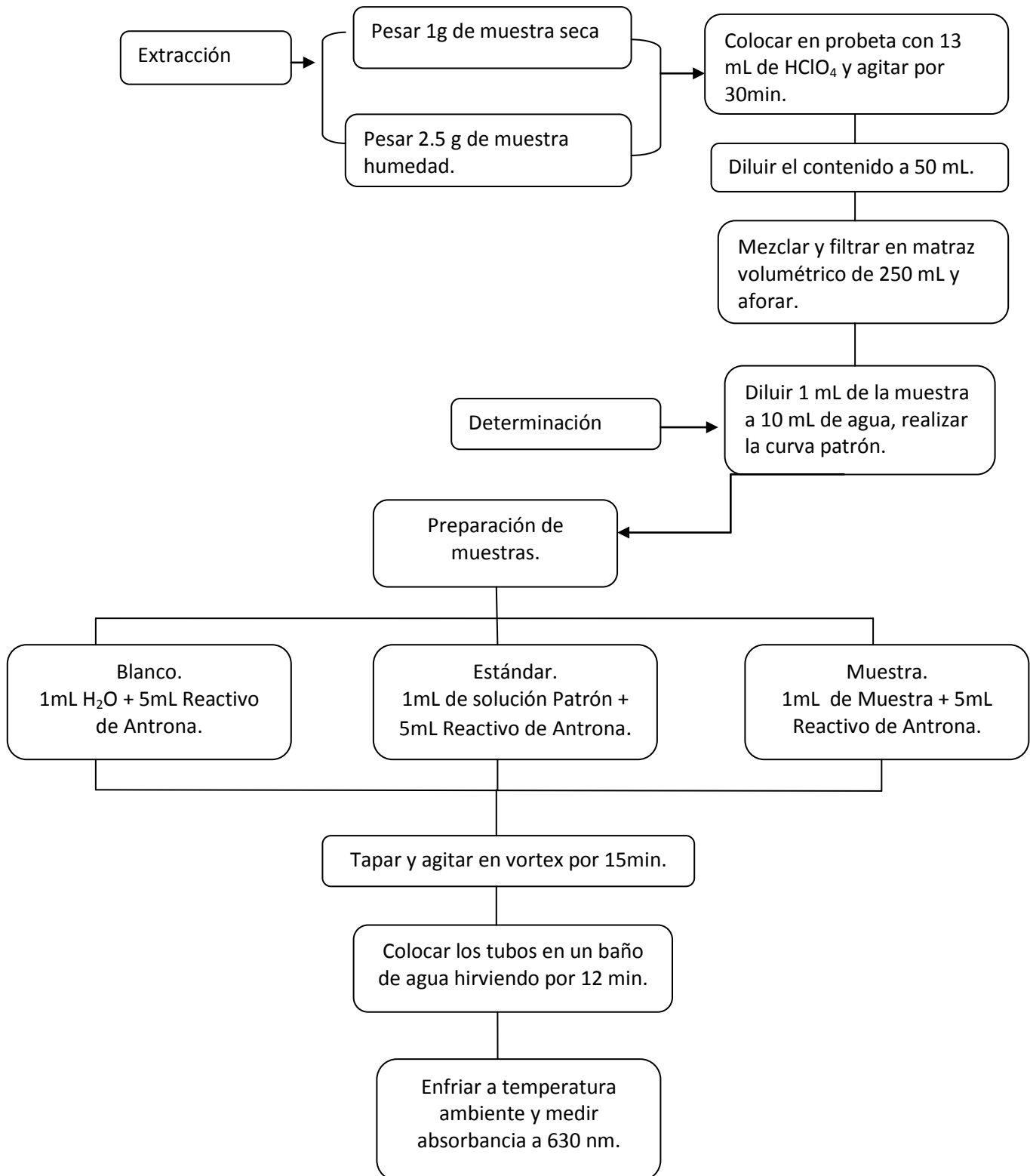


Figura 1. Doble Filtración.



5.1.1 Parámetros a evaluar

5.1.1.1 Linealidad del método.⁽³⁸⁾

Preparar la curva de acuerdo con el cuadro 3, medir las alícuotas correspondientes a los 5 niveles de concentración por triplicado y llevarlas a un volumen de 10mL aforar con agua destilada. Para la determinación tomar una alícuota de 1mL y adicionar 5mL de reactivo de antrona.

Cuadro 3. Preparación de las muestras a diferentes concentraciones para evaluar la linealidad del método.

Nivel de Concentración	Alícuota (mL)
80%	7.0
90%	7.5
100%	8.5
110%	9.5
120%	10.0

Los parámetros a evaluar son pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación (r^2).

5.1.1.2 Exactitud y Repetibilidad.⁽³⁸⁾

Preparar por sextuplicado a una concentración del 120% a partir de la muestra solución stock, para la determinación tomar una alícuota de 1mL y adicionar 5mL de reactivo de antrona.

Evaluar los porcentajes de recobro (%R) y el coeficiente de variación (CV) e intervalo de confianza.

5.1.1.3 Reproducibilidad.⁽³⁸⁾

Preparado por dos analistas diferentes, en dos días diferentes y por sextuplicado, en una concentración de 120% a partir de la solución stock.

5.2 Optimización del método volumétrico de Carbohidratos.

Fundamento

La determinación de azúcares por el método volumétrico se basa en la reducción completa de un reactivo alcalino de cobre con muestra a analizar; el punto final se determina empleando el indicador azul de metileno, el cual será reducido a blanco de metilo por un exceso de azúcar reductor.

Material y equipo

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL.
- Pipeta volumétrica de 10 mL.
- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Bureta de 50 mL.
- Matraces volumétricos.
- Vasos de precipitado.
- Probetas.
- Perlas de ebullición
- Mortero con pistilo.

Reactivos ₁

- Dextrosa anhidra (Dextrosa Anhidra J.T. Baker).
- Solución Fehling A.
- Solución Fehling B.
- SI Azul de metileno.

Procedimiento.*Solución estándar de Dextrosa.*

Pesar 1g de dextrosa anhidra, previamente secada durante 3 horas a 110°C, colocarla en un matraz volumétrico de 250mL y aforar con agua destilada, colocarla en una bureta, esta solución tiene una concentración de 4mg/mL.

Estandarización del reactivo de Fehling.

Colocar en un matraz erlenmeyer 10mL de solución de Fehling A, 10mL de solución de Fehling B, 20mL de agua destilada y 20mL de solución estándar de dextrosa, agregar perlas de ebullición y calentar a ebullición durante 2 min., adicionar tres gotas de SI azul de metileno.

Mantener la ebullición de la muestra, y continuar la valoración agregando gota a gota la solución de dextrosa hasta que color azul vire a incoloro con la presencia de un precipitado rojo.

Realizar el cálculo del factor de Fehling.

$$\text{Factor Fehling} = (\text{Concentración de Dextrosa})(\text{mL gastados})$$

Preparación de la Muestra.

Pesar 2g de muestra y macerar en un mortero con 25mL de agua destilada caliente, una vez frío transferir la mezcla en un matraz volumétrico de 100mL, aforar con agua destilada y colocar la solución a una bureta de 50mL.

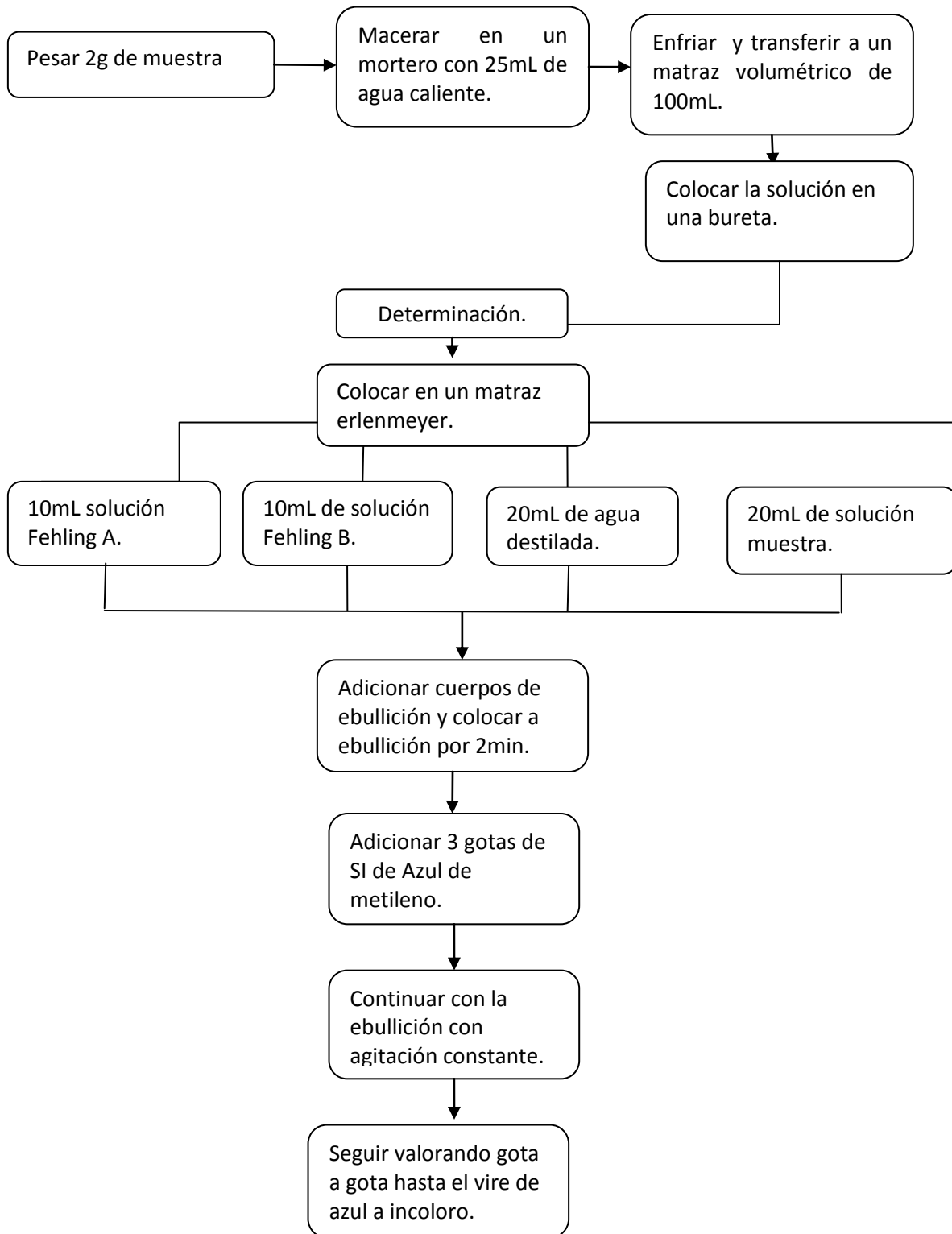
Determinación:

Colocar en un matraz erlenmeyer 10mL de solución de Fehling A, 10mL de solución de Fehling B, 20mL de agua destilada y 20mL de la solución muestra, agregar perlas de ebullición y calentar a ebullición durante 2 min.

Adicionar tres gotas de SI azul de metileno, mantener a ebullición y agitación constante, adicionando la solución de la muestra gota a gota hasta el vire de color azul a incoloro con la presencia de un precipitado rojo.

Realizar los cálculos correspondientes.

$$\% \text{ Azúcares Reductores} = \frac{(\text{Factor Fehling})(5000)}{\text{mL gastados en la Titulación}}$$

Diagrama de Flujo.

5.2.1 Parámetros a evaluar.

5.2.1.1 Linealidad del método.⁽³⁸⁾

Preparar la curva de acuerdo con el cuadro 4 con 5 niveles de concentración por triplicado.

Cuadro 4. Preparación de las muestras para evaluar la linealidad del método.

Nivel de concentración	Preparación de las muestras			
	Fehling A (mL)	Fehling B (mL)	Muestra (mL)	Agua mL
80%	8	8	16	28
				28
				28
90%	9	9	18	24
				24
				24
100%	10	10	20	20
				20
				20
110%	11	11	22	16
				16
				16
120%	12	12	24	12
				12
				12

Se miden las cantidades de los reactivos de Fehling A y B, la cantidad de agua y los mL de muestra, se adicionan las perlas de ebullición y se calienta a ebullición por 2 min.

Adicionar tres gotas de SI azul de metileno, mantener a ebullición y agitación constante, adicionando la solución de la muestra gota a gota hasta el viraje de color azul a incoloro con la presencia de un precipitado rojo.

Los parámetros a evaluar son pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación (r^2).

5.2.1.2 Exactitud y Repetibilidad.⁽³⁸⁾

Preparar por sextuplicado a una concentración del 100% a partir de la muestra solución stock.

Colocar en un matraz erlenmeyer 10mL de solución de Fehling A, 10mL de solución Fehling B, 20mL de agua destilada y 20mL de la solución muestra, agregar perlas de ebullición y calentar a ebullición durante 2 min.

Adicionar tres gotas de SI azul de metileno, mantener a ebullición y agitación constante, adicionando la solución de la muestra gota a gota hasta el vire de color azul a incoloro con la presencia de un precipitado rojo.

Evaluar los porcentajes de recobro (%R) y el coeficiente de variación (CV).

5.2.1.3 Reproducibilidad.⁽³⁸⁾

Preparado por dos analistas diferentes, en dos días diferentes y por sextuplicado, en una concentración de 100% a partir de la solución stock.

5.3 Optimización del método de cuantificación de Calcio.

Fundamento

Este método esta basado en la precipitación de Calcio como oxalato, ya que el óxalato de calcio con ión sulfurico libera ácido oxálico el calcio precipita como sulfato de calcio y el ácido oxálico es liberado y valorado con permanganato de potasio.

Material y Equipo.

- Papel Filtro (Whatman No.41).
- Crisoles de Porcelana capacidad 25mL.
- Vasos de precipitado.
- Embudos tallo corto con estrías.
- Matraz volumétrico 25mL.
- Matraz volumétrico 50mL.

- Matraz volumétrico 10mL.
- Pipeta volumétrica de 1mL.
- Pipeta volumétrica de 5mL.
- Bureta de 25mL.
- Probeta 100mL.
- Pipeta graduada 10mL.
- Bureta 25mL.
- Pipetas volumétricas.
- Matraz erlenmeyer.
- Probetas.
- Soporte universal.
- Tripie.
- Triangulo de porcelana.
- Mechero Fischer.
- Mufla.
- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Balanza analítica (Mettler Toledo).

Reactivos 1

- Agua oxigenada
- Acido Clorhídrico concentrado
- Acido Nítrico concentrado
- Acido Cítrico (30%)
- Cloruro de Amonio (5%)
- SI Verde de Bromocresol (0.04%)
- Solución saturada de Oxalato de Amonio
- Hidróxido de Amonio concentrado
- Acido Sulfúrico (10% v/v)
- Permanganato de Potasio.

Procedimiento

Colocar a peso constante 3 crisoles en la mufla a temperatura de 550°C por 1 hora, para asegurar que los crisoles mantienen un peso constante entre cada pesada debe de existir una diferencia de 0.02 centésimas de diferencia.

Pesar 5g de la muestra con exactitud, realizar una calcinación a fuego directo, colocarlos en un tripie, con un triangulo de porcelana calentar en el mechero Fischer, carbonizar hasta que no exista desprendimiento de vapor (realizar la calcinación en la campana de extracción).

Continuar la reducción a cenizas de la muestra a 550°C aproximadamente por 2 horas. Lavar las cenizas en un vaso de precipitados de 250mL con 40mL de ácido clorhídrico y 60mL de agua, adicionar 3 gotas de ácido nítrico concentrado y llevar a sequedad el calentamiento es a fuego directo.

Enfriar y lavar el vaso con 15mL de agua destilada, filtrar el lavado en papel filtro de poro pequeño (Whatman No. 5) a un matraz volumétrico de 25mL aforar con agua destilada. Tomar una alícuota con una pipeta volumétrica que contenga aproximadamente de 5-20 mg de calcio y transferirlos a un vaso de precipitado, adicionar 1mL de solución de ácido cítrico (30%) y 5mL de solución de Cloruro de Amonio (5%), diluir aproximadamente a 100mL con agua destilada y llevar a ebullición durante 5 minutos y enfriar.

Adicionar 10 gotas de SI verde de bromocresol (0.04%) y 30mL de solución saturada de óxalato de amonio caliente. Si se formara un precipitado, disolverlo adicionando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Neutralizar muy lentamente con una solución de Hidróxido de amonio concentrado, con agitación constante hasta que el indicador vire de color a pH (4.4-4.6).

Colocar el vaso en un baño de vapor durante 30min, se formara un precipitado. Retirar el vaso y enfriar, filtrar a través de un papel filtro (Whatman No.5) a un vaso de precipitado, posteriormente disolver el precipitado pasando a través del papel filtro 50mL de ácido sulfúrico (10% v/v) a un matraz erlemeyer. Enjuagar el vaso y llevar el filtrado a aproximadamente hasta 100mL con agua. Calentar la solución anterior a una temperatura de 70-80°C y titular con una solución 0.02M de Permanganato de Potasio.

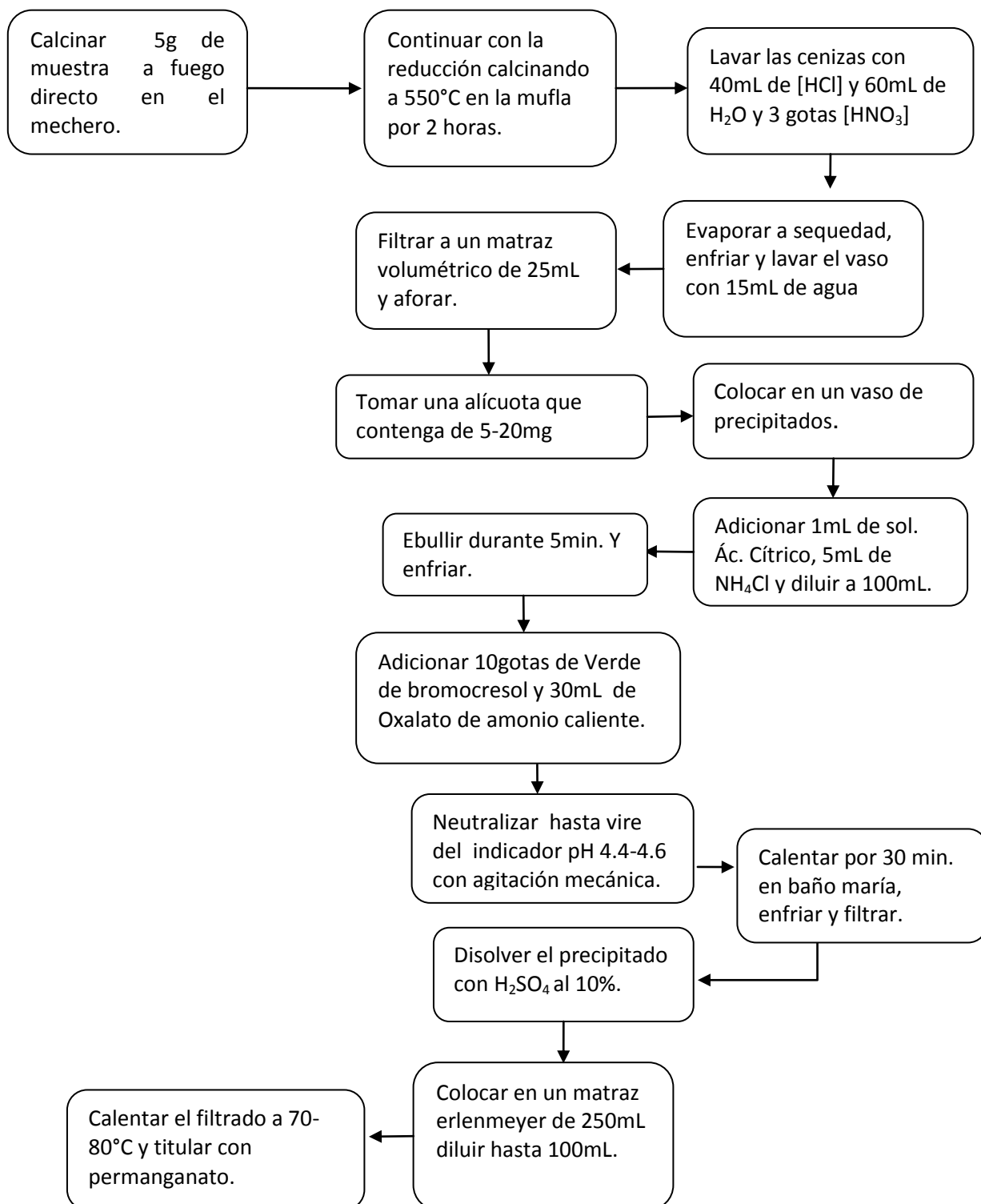
Calculos.

$$mg Ca^{2+} = \frac{((N KMnO_4)(V_{KMnO_4}))(0.02))}{g \text{ de la muestra}}$$

¹

Nota: Ver Anexos para la preparación de los reactivos al igual que la muestra la información de la muestra .

Diagrama de Flujo



5.3.1 Parámetros a evaluar.

5.3.1.1 Linealidad del método.⁽³⁸⁾

Preparar la curva de acuerdo con el cuadro 5 con cinco niveles de concentración medir las alícuotas por triplicado, colocar en matraces volumétricos de 50mL y aforar con agua destilada, para la determinación medir una alícuota de 1mL de cada uno de los niveles de concentración y dar el tratamiento mencionado con anterioridad .

Cuadro 5 . Preparación de las muestras en los 5 niveles de concentración para la evaluar la linealidad del método.

Concentración [mg/mL]	Alícuota (mL).
5	5
10	10
20	20
40	40
50	50

Los parámetros a evaluar son pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación (r^2).

5.3.1.2 Exactitud y Repetibilidad.⁽³⁸⁾

Preparar por sextuplicado a una concentración del 100% a partir de la muestra solución stock. Medir una alícuota de 20mL, colocar en un matraz volumétrico de 50mL y aforar con agua destilada. Para la determinación medir una alícuota de 1mL y realizar la titulación.

Evaluar los porcentajes de recobro (%R) y el coeficiente de variación (CV).

5.3.1.3 Reproducibilidad.⁽³⁸⁾

Preparado por dos analistas diferentes, en dos días diferentes y por sextuplicado, en un nivel de concentración del 100% de acuerdo con el cuadro 6. Medir una alícuota de 20mL, colocar en un matraz volumétrico de 50mL y aforar con agua destilada. Para la determinación medir una alícuota de 1mL y titular.

VI. RESULTADOS

6.1 Carbohidratos Totales.

Curva propuesta para el Estándar Dextrosa.

Resultados obtenidos de la curva propuesta para el estándar con los porcentos de recobro a una $\lambda = 630\text{nm}$.

M	= -0.0003
B	= 0.1183
r^2	= 0.1346

Linealidad del método.

Resultados obtenidos de linealidad del método calculados con el porcentaje de recobro de glucosa en respuesta al método analítico.

$\check{Y}_{\text{Recobro}}$	= 102.52%
S	= 2.255
CV _{Experimental}	= 2.199%
CV _{Teórico Espectrofotométrico}	No mayor del 3%
IC	= [102.05% – 103.77%] ₂

Exactitud y Repetibilidad.

Resultados obtenidos para exactitud y repetibilidad calculados con el porcentaje de recobro de glucosa en respuesta al método analítico.

$\check{Y}_{\text{Recobro}}$	= 105.14%
S	= 0.42
CV _{Experimental}	= 0.399%
CV _{Teórico Espectrofotométrico}	No mayor del 3%
IC	= [104.75% – 107.75%] ₂

Reproducibilidad.

Resultados obtenidos del porcentaje de recobro de glucosa en respuesta a el método analítico, por dos analistas en dos días diferentes.

	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	205.04	0.20	259.12	38.50
Día	0.85	0.00	0.50	5.87
Error	3.25	0.00	$\alpha=0.025$	

6.2 Método volumétrico de determinación de azúcares reductores.

Estandarización Solución Fehling.

Resultados obtenidos de la estandarización de la solución de Fehling

Dextrosa	1.0004g/250mL	ȳ	0.08
[g/mL]	0.0040016	S	0.001
F	500	CV	0.835

Linealidad del método.

Resultados obtenidos de linealidad del método calculados con el porcentaje de recobro de azúcares reductores en respuesta al método analítico.

ȳ % Recobro	98.42%	$Y = mx + b$
S	0.93	$Y = 0.036x + 98.1$
CV Experimental	0.95%	$R^2 = 0.019$
CV Teórico Met. Volumétrico	No mayor al 2%	
IC	$= [97.90\% - 98.94\%]_2$	

Repetibilidad y exactitud.

Resultados obtenidos para exactitud y repetibilidad calculados con el porcentaje de recobro de azucares reductores en respuesta al método analítico.

ȳ % Recobro	99.41%
S	0.83
CV Experimental	0.84%
CV Teórico Met. Volumétrico	No mayor al 2%
IC	$= [98.54\% - 100.28\%]_2$

Reproducibilidad

Resultados obtenidos del porcentaje de recobro de azúcares de recobro en respuesta a el método analítico, por dos analistas en dos días diferentes.

	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	0.0009	0.000004	2.24	38.50
Día	0.0004	0.000002	0.00	5.87
Error	0.2196	0.000460	$\alpha=0.025$	

6.3 Determinación de Calcio.

Resultados de la estandarización del permanganato de potasio.

Estandarización de KMnO ₄					
	Muestra	Na ₂ C ₂ O ₄ (mg)	Vol. KMnO ₄	Molaridad	Normalidad
	1	100	14.50	0.0206	0.1029
	2	101	15.00	0.0201	0.1005
	3	101	15.00	0.0201	0.1005
Vol. Blanco	0.5mL		ȳ	0.0203	0.1013
PM _{Na₂C₂O₄}	134		S	0.00028	0.00141
			CV	1.388	1.388

Linealidad del método.

Resultados obtenidos de linealidad del método calculados con el porcentaje de recobro de calcio en respuesta al método analítico.

ȳ _{% Recobro}	= 98.7%	Y= mx + b
S	= 0.99	y= 118.8x+ 94.101
CV _{Experimental}	= 0.977%	R ² =0.963
CV _{Teórico Met. Volumétrico}	No mayor al 2%	
IC	= [98.15% – 99.25%] ₂	

Exactitud y Repetibilidad

Resultados obtenidos para exactitud y repetibilidad calculados con el porcentaje de recobro de calcio en respuesta al método analítico.

\bar{y} % Recobro	= 99.57%
S	= 0.0642
CV Experimental	= 0.0639%
CV Teórico Met. Volumétrico	No mayor al 2%
IC	= [99.50% – 99.64%] ₂

Reproducibilidad del Método.

Resultados obtenidos del porcentaje de recobro de calcio en respuesta a el método analítico, por dos analistas en dos días diferentes.

	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	F calculada	F tablas
Analista	0.0028	0.0028	4.21	38.5
Día	0.0013	0.0007	4.90	5.87
Error	0.0027	0.0001	$\alpha=0.025$	

2

Nota. IC (Intervalo de Confianza debe incluir el 100% o el promedio aritmético de % de Recobro se debe incluir)
97%- 103% Método Espectrofotométrico, 98%-102% Método Volumétrico.(38)

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

En la optimización de los métodos para cuantificación de carbohidratos y calcio en alimentos, se realizaron modificaciones las cuales permitieron evaluar mediante los parámetros de linealidad del método, exactitud, reproducibilidad, repetibilidad y con ello asegurar la confiabilidad de futuras determinaciones.

CARBOHIDRATOS TOTALES:

La hidrólisis de los enlaces de los carbohidratos se realizó mediante una agitación constante y homogénea, (se utilizó papel parafilm como tapa en las probetas para agitar) La filtración se llevo acabo como se observa en la figura 1, para reducir tiempo y utilizar menos material de laboratorio. El papel filtro utilizado fue Whatman No. 5

Se estableció la importancia de realizar la determinación mediante el método de comparación contra un estándar ya que se evaluó la posible utilización de una curva patrón, debido a que el comportamiento que presentó la curva no fue lineal (pendiente negativa). Lo cual indicó que no existe una relación directamente proporcional entre la concentración y la absorbancia. Por lo cual se realizo al final la comparación con un estandar con la concentración de este al 100% de la curva propuesta esto quiere decir 0.1mg/mL o 100µg/mL. A su vez se tomo la concentración que en ese momento era del 100% como del 120% para que mostrar la linealidad hasta ese nivel de concentración establecido.

La adición del ácido sulfúrico concentrado hidroliza enlaces glucosídicos produciendo monosacárido que fácilmente se deshidratan formando furfural y sus derivados, los cuales reaccionan con la antrona formando un complejo azul verdoso. Esta prueba es tan sensible que incluso llega a ser positiva con el papel filtro (celulosa) y debido a que la reacción es exotérmica y genera la energía necesaria para que la reacción se lleve acabo por si sola en la formación del complejo entre el reactivo de antrona y el ácido sulfúrico; por ello es de suma importancia que la preparación del reactivo de antrona se realice 5

minutos antes de utilizarse y se coloque en un baño de hielo para reducir la velocidad de la reacción.

La reacción de antrona constituye la base de un método rápido y conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas, ácidos hexurónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul verdosa muestra una absorción máxima a los 630nm aunque algunos otros carbohidratos pueden dar otra coloración.

Es bien sabido que esta reacción no es adecuada si en la muestra también se encuentran presentes proteínas que contengan grandes cantidades de triptofanos ya que este aminoácido produce una coloración rojiza.

Después de la preparación de las muestras, se agitaron en un vortex a una velocidad de 15 rpm. Se tuvo el cuidado de tapar con papel parafilm los tubos al colocarlos en el baño de agua hirviendo para evitar la evaporación. El enfriamiento se debe llevar a cabo a temperatura ambiente.

Los parámetros evaluados fueron: Linealidad del método donde se obtuvo un porcentaje de recobro del 102.52% con una desviación estándar del 2.25 y un coeficiente de variación del 2.19%. Siendo lineal el método analítico utilizado.

En la exactitud y repetibilidad, se observa que el coeficiente de variación es de 0.399%, el porcentaje de recobro 105.14, una desviación estándar de 0.42, por lo tanto el método cumple con los parámetros de exactitud y repetibilidad.

La reproducibilidad de el método de carbohidratos totales presenta una F calculada mayor que la F teórica en cuanto al analista mientras que para la reproducibilidad en cuanto al día es menor F calculada que F de tablas y factores este muestra diferencia significativa entre la interacción día-analista, réplica-analista, por lo cual se infiere que el

día no es un factor que afecte en la determinación, mientras que el analista es un factor de suma importancia ya que si no se controlan las variables del método este no podrá ser reproducible de analista a analista.

MÉTODO DE AZÚCARES REDUCTORES:

En cuanto al método volumétrico para la cuantificación de azúcares reductores, es importante que se considere que si se calienta una suspensión de hidróxido de cobre en solución alcalina se forma óxido cuprico de color negro, sin embargo en presencia de sustancias reductoras se precipita óxido cuproso de coloración rojo ladrillo, que son las tonalidades que se puede presentar dependiendo de los ingredientes del alimento.

En la práctica se usa una solución alcalina de una sal de cobre y un compuesto orgánico que tiene un $-OH$ alcohólico. Bajo estas condiciones el cobre forma un complejo soluble y el reactivo es estable. Los hidratos de carbono que poseen un aldehído libre o potencialmente libre o un grupo cetónico presentan propiedades reductoras en soluciones debilmente ácidas.

En la estandarización de el Reactivo de Fehling se obtuvo como resultado un factor del 0.08 con una desviación estandar del 0.001 y un CV del 0.835%, estando dentro de especificaciones, por lo que se considerado estandarizado.

En la linealidad del método se obtuvieron los siguientes resultados un porcentaje de recobro del 98.42, una desviación estandar del 0.93, un coeficiente de variación del 0.95 y un coeficiente de correlación del 0.019% indicandonos con ello que no es un metodo lineal ya que no existe un proporcionalidad que nos indique que el volumen gastado es proporcional a la cantidad de azucares reductores.

En la exactitud y repetibilidad en donde se obtuvo un porcentaje de recobro del 99.41, una desviación estandar de 0.83 y un coeficiente de variación del 0.84%, se observa que el método cumple con estos parametros por lo cual se dice que es reproducible y exacto.

La reproducibilidad de el método volumétrico presenta una F calculada menor que la F teórica por día y analista, con ello se muestra que no existe ninguna interacción entre día-analista ni analista-día con lo cual cumple el parámetro de reproducibilidad.

CALCIO:

Como resultado de la optimización del método analítico es importante considerar las variables que se deben controlar para confiar en los resultados obtenidos al aplicar el método, por ello que respecto a la eliminación de materia orgánica se realice mediante una precalcificación a fuego directo y finalmente la calcificación en la mufla. La extracción de los metales, se debe llevar a cabo con ácido clorhídrico concentrado como se menciono anteriormente. Después de lavar las cenizas se debe llevar a sequedad para concentrar el calcio a fuego directo por 30 min. La solución obtenida diluirla a 25 mL (redujo 10 veces) y tomar como base los miligramos contenidos de calcio que se especificaron en la tabla nutrimental.

La alicuota que se tome debe estar dentro de un intervalo de 5 a 20mg , adicionar las soluciones para restablecer el pH de la solución, adicionar el verde de bromocresol y finalmente la solución saturada de oxalato de amonio (esto es para la formación de oxalato de calcio en exceso y la manipulación del pH, ya que el oxalato de calcio es soluble en medios ácidos a un pH de 4 por lo cual es de gran importancia manipular los vires del indicador para mantener soluble el oxalato de calcio), porteriormente se separa el oxalato de calcio por digestión y precipitación mediante el calentamiento en un baño de vapor en un periodo corto de digestión y un reposo para enfriar, se realizara una filtración y nuevamente disolver el precipitado para realizar una determinación indirecta de el calcio en forma de ácido oxálico controlando los parametros de temperatura.

Para corroborar que las modificaciones al método fueron adecuadas se realizó una curva patrón con CaCO_3 para poder evaluar los parametros antes mencionados y la estandarización de el permanganato de potasio, la concentración obtenida fue de

0.1013N y un coeficiente de variación de 1.38% menor que el valor teórico para métodos analíticos por lo que se considera estandarizado.

En la linealidad del método se obtuvieron los siguientes resultados un porcentaje de recobro del 98.7, una desviación estándar del 0.99 y un coeficiente de variación del 0.977% por lo tanto el método demuestra ser lineal. Aunado a esto el coeficiente de correlación de 0.9566.

En cuanto a la exactitud y repetibilidad el método cumple con los parámetros, con un porcentaje de recobro de 99.57%, un coeficiente de variación del 0.0639%. Con lo cual nos indica que es un método exacto y repetible.

El método es considerado reproducible por día y analista ya que la F calculada es menor a la F teórica por día y analista, con ello se muestra que no existe ninguna interacción entre día-analista ni analista-día con lo cual cumple el parámetro de reproducibilidad.

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados se demostró de manera experimental que el método propuesto para cuantificar carbohidratos totales por Antrona y calcio cumple con las especificaciones de cada uno de sus parametros y es apto para el fin creado.

El método de Azucares Reductores Fehling no se pudo optimizar y por lo se sugiere usar el método polarimétrico.

IX. SUGERENCIAS

Método Propuesto.

La **POLARIMETRÍA**, (método instrumental óptico) es una técnica que nos permite medir el poder rotatorio de sustancias ópticamente activas. El método usado en esta determinación se basa en el principio de inversión de Clerget, por el que se deduce el contenido de sacarosa en los alimentos por el cambio de poder rotatorio de la muestra cuando se hidroliza la sacarosa. La lectura polarimétrica directa se realiza sobre muestra neutralizada, clarificada y filtrada. La hidrólisis o inversión de la sacarosa se realiza mediante tratamiento suave con un ácido, tratamiento que no afecta a la lactosa ni a otros azúcares.

PROCEDIMIENTO:

Se pesa una cantidad exacta de muestra, se diluye a 100mL y trata con amoníaco diluido y ácido acético hasta neutralización. Se clarifica mediante adición de acetato de cinc y Hexacianoferrato II de potasio.

Se afora hasta 200mL, evitando formación de burbujas. Se filtra. Se realiza lectura del poder rotatorio a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ sobre porción filtrada (D).

Sobre otra porción del líquido filtrado se realiza la inversión por tratamiento suave con ácido clorhídrico en caliente. Se determina el poder rotatorio de la solución invertida a $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Se calcula el contenido en sacarosa de la muestra con ayuda de una fórmula que tiene en cuenta, entre otros parámetros, la masa de muestra, el volumen de la solución de la muestra, los porcentajes de materia grasa (F) y proteínas (P), la longitud del tubo polarimétrico, la temperatura, la fuente de luz.

Si se pesan exactamente 40 g de muestra, se lleva a 200 mL y se utiliza un polarímetro de luz de sodio, con escala en grados de ángulo y un tubo de polarímetro de 2 dm de longitud a $20,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, se puede calcular el contenido en sacarosa de los alimentos normales según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ sacarosa} = (D - 1,25 I) (2,833 - 0,00612 F - 0,00878 P)$$

X. ANEXOS

A. PREPARACION DE REACTIVOS:

1. CARBOHIDRATOS TOTALES

Modificaciones Realizadas al método de *Cuantificación de Carbohidratos totales*, en la preparación de soluciones.

a. ACIDO PERCLORICO HClO₄ (52%):

Preparar de 50mL, tomar con exactitud 38mL de ácido perclórico en una probeta de 50mL, y colocar en un vaso de precipitados de 250mL que contenga 12mL de agua destilada, adicionar lentamente el ácido con agitación constante hasta obtener una solución homogénea. Considerar el porcentaje de pureza menor en este caso el 69% del Ácido Perclórico.

En la preparación de la solución de ácido perclórico se deben de considerar lo siguiente:

- La concentración de la solución se expresa en porcentaje volumen-volumen (%V/V).

$$\% \frac{V}{V} = \frac{(\text{Volumen Solute})}{\text{Volumen de Solvente}} * 100$$

- La pureza del soluto

Nota: El ácido perclórico el porcentaje de pureza es de un rango de 69-72%.

b. ÁCIDO SULFÚRICO. (25mL).

Tomar 15mL de agua destilada y colocarlo en un vaso de precipitados, medir 35mL de ácido sulfúrico concentrado en una probeta de 50mL y se adiciona al vaso de precipitado por las paredes de forma muy lenta, colocar en un baño de hielo y agitación manual.

c. REACTIVO DE ANTRONA: (25mL al 0.01%).

Pesar con exactitud 0.0025g de antrona, disolver en ácido sulfúrico, agitar con una varilla de vidrio constantemente hasta disolución completa.

Nota: El Reactivo de Antrona se prepara con 5 minutos antes de realizar la determinación de carbohidratos totales y se coloca en un baño de hielo.

2. MÉTODO VOLUMÉTRICO.

a. SOLUCIÓN INDICADORA AZUL DE METILENO.

Pesar 0.05g de azul de metileno y disolver en 100 mL de agua destilada.

b. REACTIVO DE FEHLING A.

Pesar 34.64g de Sulfato cúprico pentahidratado; transferirlo a un matraz volumétrico de 500 mL, disolver completamente y aforar con agua destilada.

Colocar en un frasco ámbar, etiquetar y mantener en refrigeración.

c. REACTIVO DE FEHLING B.

Pesar 50g de Hidróxido de Sodio, colocarlos en un vaso de precipitado, disolver en 300mL de agua destilada.

Pesar por separado 173g de Tartrato doble de Sodio y Potasio adicionarlo a la solución antes mencionada. Transferir la solución en un matraz volumétrico de 500mL y aforar con agua destilada.

Disolver completamente, etiquetar y colocar a refrigeración.

3. MÉTODO DE CALCIO .

a. PERMANGANATO DE POTASIO: (KMNO₄) 0.02M:

Pesar 3.3g de permanganato de potasio en 1000mL de agua y colocar a ebullición la solución durante 15 minutos a fuego directo y dejar reposar por dos días, filtrara través de un filtro de porosidad fina.

Estandarización del Permanganato de Potasio.

Pesar 200mg de oxalato de sodio (previamente secado a 110°C hasta peso constante), disolver en 100mL de agua, adicionar 7.0mL de ácido sulfúrico concentrado, calentar a 70°C , titular la solución con permanganato de potasio, adicionándolo lentamente y con agitación constante, hasta observar un color rosa claro que permanezca durante 15 segundos. Calcular la normalidad o molaridad considerando que cada mililitro de solución de 0.1N o 0.02M permanganato de potasio es equivalente a 6.7mg de Na₂C₂O₄.

b. ÁCIDO CÍTRICO AL 30% (P/V)

Pesar 6g exactamente de ácido cítrico y disolver en 20mL de agua destilada hasta disolución completa.

c. CLORURO DE AMONIO 5% (P/V)

Pesar 5g exactamente de Cloruro de Amonio y disolver en 100mL de agua destilada.

d. SOLUCIÓN INDICADORA VERDE DE BROMOCRESOL. (0.04%)

Pesar 0.01g de indicador verde de bromocresol, disolver en 25mL de etanol.

e. ÁCIDO SÚLFURICO 20%(V/V)

Medir 20mL de ácido sulfúrico Concentrado, añadir a 180mL de agua con agitación y dejar enfriar la solución.

f. ÓXALATO DE AMONIO

Pesar 20g de Óxalato de Amonio, adicionar 100mL de agua con agitación constante.

B. CRISOL A PESO CONSTANTE

a. Lavar el crisol o capsula de porcelana por cada muestra a analizar pesar y registrar el peso, colocarlo durante 15 minutos en la mufla a una temperatura de 550° a 600°C.

b. Dejar enfriar el crisol en un desecador durante 15 a 20 minutos. Procurar no cerrar el desecador totalmente, ya que el calor de los crisoles puede provocar que la tapa se proyecte y se rompa.

c. Pesar el crisol en una balanza analítica e identificar con el número que tiene marcado en la parte inferior (**NO LE VAYA A PONER MASKING TAPE**). Anotar el peso, volver a pesar entre cada pesada debe de existir una diferencia de 0.02 centésimas de diferencia.

d. Pesar el crisol en la misma balanza que utilizó inicialmente. Anotar el peso.

C. FORMULAS PARA LA EVALUACION DE PARAMETROS ⁽³⁸⁾

1. Linealidad del método.

a. Media aritmética:

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

b. Desviación Estandar :

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

c. Coeficiente de variación :

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

n=número de mediciones.

1.1. Cantidad adicionada Vs Cantidad recuperada

a. Pendiente:

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

n=número de mediciones.

b. Ordenada al origen:

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

c. Coeficiente de determinación :

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

$$S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

$$x = \frac{\sum x}{n}$$

d. Coeficiente de Variación de Regresión:

$$CV_{y/x} = \frac{S_{y/x}}{y} * 100$$

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

2. Exactitud y repetitividad del método.

a. Media aritmética:

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

b. Desviación estándar:

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

c. Coeficiente de Variación:

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

3.Reproducibilidad del Método

Realizar el análisis de varianza de acuerdo con el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + \epsilon_{k(ji)}$$

Donde:

Y_{ijk} = Ensayo de la sustancia de interés de la K-esima muestra analizada por el i -esimo analista en el j -esimo día.

μ = Media poblacional del ensayo de la sustancia de interés de la muestra

A= Numero de analistas

D=Número de días.

ϵ =Error del método analítico (donde K= 1....r).

i = Número de Analista.

j = Número de días.

K = Número de replicas.

Cuadro 1. Analisis de Varianza

Modelo $Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + \epsilon_{k(ji)}$

Fuentes de Variacion	Suma de Cuadrados	Media Cuadrados	F calculada	Grados de libertad	
Ai	$(\sum \sum Y^2 / jk) - ((\sum Y_{ij})^2 / jk)$	SC _A / gl _A	MC _A / MC _D	GL _A	1
Dj	$(\sum \sum Y^2_{ij} / k) - ((\sum \sum Y^2_{i..}) / jk)$	SC _D / gl _D	MC _D / MC _e	GL _D	2
$\epsilon_{k(ji)}$	$(\sum \sum \sum Y^2_{ijk}) - ((\sum \sum Y^2_{i..}) / k)$	SC _e / gl _e		GL _{AD}	20

a. Media aritmética:

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

b. Desviación estándar:

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

d. Coeficiente de Variación:

$$CV = \frac{S}{y} * 100$$

n= número de muestras de contenido/potencia/valoración

4. NESTUM[®] Cereal Infantil Arroz

INFORMACIÓN NUTRIMENTAL

Nestum Cereal Infantil ARROZ (Nestle)

Fases 1.

Cuadro 2. Información nutrimental.

Composición Media	100g Contiene	30g Contienen
Carbohidratos	84g	25.7g
Calcio	480mg	144mg

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Plan de estudios propuesta de modificación del plan de estudios de la carrera química farmacéutico biológica para la aprobación de la orientación en Farmacia Clínica I Tomo I. Fecha de aprobación del consejo Técnico de la FES-Zaragoza 27 de Mayo 1997. Fecha de aprobación del consejo académico de áreas de Ciencias Biológicas y de Salud 22 de Mayo 1998. pp 9-11.
2. Ayres G. Análisis químico cuantitativo. México DF. Harla:1970
3. Norma Oficial Mexicana NMX-CC-001-1995-IMNC (ISO8402:1994) Administración de la Calidad y aseguramiento de la calidad-Vocabulario.
4. Belitz H. Química de los alimentos. España. Acribia:1988
5. Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2005, Servicios Básicos de Salud. Promoción y Educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar Orientación-Vocabulario.
6. Badui S. Química de los alimentos. México DF. Alambra Mexicana: 1997
7. Lubert S. Bioquímica. 3ªed. España. Reverte:1990
8. Behar M. Nutrición. México DF. Interamericana: 1972.
9. Brown E. Nutrición en las diferentes etapas de la vida. 2ª Ed. México. McGraw Hill: 2006.
10. Cervera P. Alimentación y Dietoterapia "Nutrición aplicada en la salud y la enfermedad. 4ª Ed. México: McGraw Hill: 2004.
11. Berk Z. Introducción a la bioquímica de los alimentos. México DF. El manual moderno:1980
12. Laguna J. Bioquímica. 2ª ed. México DF. La prensa Mexicana: 1967
13. Pavia D. Introduction to organic laboratory techniques a contemporary approach. 3º Ed. EUA. Harcourt Brace College Publishers: 1988
14. Rendina G. Técnicas de bioquímica aplicada.1º Ed. México. Interamericana: 1974
15. Osborne D. R. Análisis de los Nutrientes de los Alimentos, España: Acriba S.A de C.V.; 1996.

16. Charley. Tecnología en Alimentos: Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos, México: Limusa 1995.
17. Hart F. Análisis Moderno de los Alimentos, Editorial Acriba S.A. de C.V.; México; 1977.
18. Koolman J. y Röhm H. Bioquímica texto y atlas. 3ª Ed. México D. F. Panamericana; 2004.
19. Mc Naught y Callander R. Fisiología ilustrada. 5ª Ed. Madrid, España: Churchill Livingstone. 1997
20. Ganong William. Fisiología Médica. 4ª Ed. México D.F. Editorial Manual México Moderno. 1987.
21. Skoog, D. A., West D. M., Holler, F.J. y Crouch,R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª. Ed. España: Thomson.2005.
22. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª edición. México: Secretaria de Salud Pública, Comisión Permanente de la Farmacopea de los estados Unidos Mexicanos 8º edición
23. Brumblay R U. Análisis Cuantitativo. 10ª ED. México-España: Cecsá Continental; 1979.
24. Vogel A. Analítica Cuantitativa Teoría y Práctica Vol. 1 Volumetría y Gravimetría. España: Kapelusz S.A. 1960.
25. Flaschka. Química Analítica Cuantitativa Vol. 1. Introducción a los principios químicos. España: Continental. 1984.
26. Corvera V., Aguilar L. Manual de Análisis Bromatológico. UNAM, FES-Zaragoza 2005.
27. AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
28. Ranganna, S. 1977. Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products. McGraw-Hill.

29. Connors k. Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento), 2º ED. Reverte: España; 1981.
30. Cohen Y. Análisis químico farmacéutico de medicamentos. 1º ED. Limusa: México; 1988.
31. Coúltate T. Alimentos química de sus componentes, Acribia: España; 1984
32. Chefter J. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos, España; 1992.
33. Gary C. Química analítica. 3ª ed. México. Limusa: 2007
34. Devore L. Probabilidad y estadística para ingenierías y ciencias. 7ª Ed. México. Learning: 2008.
35. Wackerly D. Estadística matemática con aplicaciones. 6ª Ed. España. Thomson: 2002.
36. Mendenhall W. Introducción a la probabilidad y estadística. 12ª Ed. México. Learning: 2008.
37. Bermejo F. Química analítica general, cuantitativa e instrumental. 7ª Ed. España. Paraninfo: 2001.
38. García Ma. A. Guia de Validación Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Farmaceuticos Biologos, A.C. Edición 2002.
39. McMurry, J. Química Orgánica. Quinta edición, Thomson editores, México, 2001
40. The Merck Index: an encyclopedia of chemical. Drugs and Biologicals. Budavari S. Guide for safety in the Chemical Laboratory.
41. Carey Francis A. Química Orgánica Mc Graw Hill , Tercera Edición . España. 2000