

ANÁLISIS COMPOSICIONAL DE ALIMENTOS

Procedimientos extraídos y adaptados del “Manual de Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas”. Iturbe Chiñas, FA; Sandoval Guillén, J. (2013) con algunas adaptaciones. Recuperado el 06 de Mayo de 2022 del sitio: <https://bit.ly/3MXMZDa>

1 DETERMINACION DE HUMEDAD

1.1 Método por secado en estufa convencional

Medir de 2 a 3 g de muestra en una cápsula de aluminio con tapa (previamente medida después de tenerla a peso constante 2 h a 130 °C). Secar la muestra en la estufa 2 h a 90 - 110 °C. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en el desecador y medir masa tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Repetir hasta obtener peso constante (Nielsen, 2003)

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida de masa por secado a 90 - 110 °C.

1.2 Método por secado en estufa de vacío

Medir de 2 a 3 g de muestra en una cápsula de aluminio con tapa (previamente medida después de tenerlo a peso constante 2 h a 130 °C). Secar la muestra al menos por 24 h en la estufa conectada a vacío a una temperatura de 70 °C como máximo. Retirar de la estufa, tapar, dejar enfriar en desecador y medir masa tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente. Repetir la operación hasta peso constante (Nielsen, 2003)

Calcular el porcentaje de humedad, reportándolo como pérdida de masa por secado en estufa de vacío a 70 ± 1 °C.

1.3 Método de secado en Termobalanza

Encender el equipo y establecer las condiciones de secado (temperatura y tiempo). Abrir la tapa del analizador de humedad y colocar el platillo de aluminio en el asidero porta platillo. Encender el equipo y tarar el equipo. Medir de 5 a 10 g de muestra sobre la charola de aluminio formando una capa lo más homogénea posible. Cerrar la tapa del equipo y pulsar botón de START/STOP para iniciar el proceso de desecación y medición. Registrar la pérdida de masa o en su caso el porcentaje de humedad (según el equipo) después de 10 - 15 min o bien cuando ya no haya variación en la lectura (Kirk *et al*, 1996)

Calcular el porcentaje de humedad determinado por gravimetría.

1.4 Método de destilación azeotrópica

Medir de 10 a 25 g de muestra en un matraz bola de 250 mL con junta esmerilada. Cubrir la muestra con tolueno (aproximadamente 100 mL) Acoplar al matraz bola un colector para destilación azeotrópica (trampa Bidwell) y llenar el vástago graduado del colector con el mismo disolvente. Adaptar un refrigerante al colector en posición de reflujo conectando al flujo de agua (Figura 1) y destilar lentamente hasta que ya no varíe la cantidad de agua destilada en el tubo colector.

Leer el volumen directamente del tubo colector y calcular el porcentaje de humedad por volumetría, considerando la densidad del agua (Nielsen, 2003)

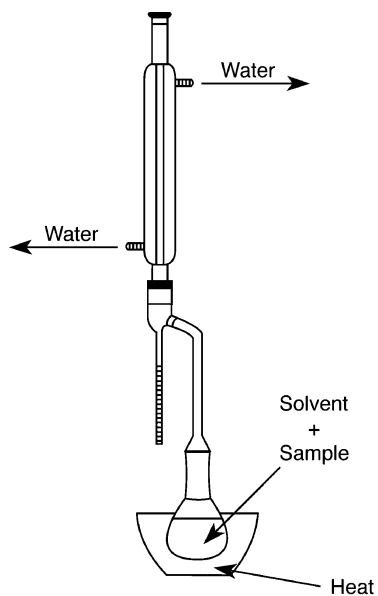


Figura 1. Aparato para destilación en reflujo

2 DETERMINACION DE CENIZAS Y MINERALES

2.1 Método de cenizas totales

Colocar a peso constante un crisol 2 h aproximadamente en la mufla a 600 °C.

Medir de 3 a 5 g de muestra en el crisol (la muestra no debe sobrepasar la mitad del crisol) previamente puesto a peso constante y pesado. Calcinar la muestra, primeramente con un mechero o parrilla, dentro de la campana hasta que la muestra no desprenda humo y posteriormente meter a la mufla 2 h cuidando que la temperatura no pase de 550 °C. Retirar de la mufla y dejar enfriar en el desecador cuidando de no tapar por completo el desecador. Medir masa tan pronto como se equilibre con la temperatura ambiente y repetir la operación anterior hasta conseguir cenizas homogéneas, blancas o ligeramente grises. Enfriar crisol con cenizas dentro de desecador y medir masa para calcular el porcentaje de cenizas por gravimetría (Kirk *et al*, 1996)

NOTA: Colocar los crisoles calientes únicamente sobre placas de asbesto.

2.2 Método de cenizas por digestión húmeda

Medir 5 g de muestra en un vaso de precipitados y adicionar 10 mL de ácido nítrico concentrado. Calentar sobre parrilla de calentamiento durante una hora o hasta la obtención de un líquido traslúcido. Enfriar el digerido, filtrar sobre matraz volumétrico de 100 mL y llevar a la marca del volumen cuidadosamente con agua.

Colocar una alícuota de 10 mL de la solución en un vaso de precipitados de 250 mL a peso constante, evaporar a sequedad sobre parrilla y colocar en estufa hasta peso constante. Calcular por diferencia de masa la cantidad de minerales en la alícuota y relacionarlo con el volumen total de desolución (SSA. NOM-117-SSA1-1994)

NOTA: Todo el procedimiento debe de realizarse en campana de extracción.

2.3 Determinación de minerales

2.3.1 Determinación de cloruros en muestra. Método de Mohr.

Medir 10 mL de una solución al 1% de muestra en un matraz Erlenmeyer de 150 mL, adicionar 15 mL de agua destilada y 1 mL de cromato de potasio al 5%. Posteriormente, titular los cloruros con una solución valorada de nitrato de plata (AgNO_3 0.1 eq/L) hasta que aparezca un precipitado color rojo ladrillo que permanezca por lo menos 30 segundos (Kirk *et al*, 1996). Calcule por volumetría el contenido de cloruros en la muestra ($\text{mg Cl}^-/100 \text{ g muestra}$).

NOTA. En caso de que la solución problema presente sólidos en suspensión se deberá filtrar la solución antes de realizar la determinación de cloruros.

2.3.2. Determinación de cloruros en cenizas. Método de Mohr.

Obtener las cenizas de la muestra por método de incineración a 500 – 550 °C. Resuspender las cenizas con un mínimo de agua, trasvasar a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y agregar 1 mL de solución de cromato de potasio al 5 %. Titular la solución de cenizas solución de nitrato de plata (AgNO_3 0.1 eq/L) hasta que aparezca un precipitado color rojo ladrillo (Nielsen, 2003)

Calcular el contenido de cloruros en las cenizas ($\text{mg Cl}^-/100 \text{ g cenizas}$) a partir de la determinación volumétrica.

2.3.3. Determinación de Hierro en cenizas por método con orto-fenantrolina.

NOTA: Los reactivos corrosivos y tóxicos se deben de manipular dentro de la campana de extracción.

Obtener las cenizas de la muestra por método de incineración a 500 – 550 °C. Para disolver las sales de hierro de las cenizas se deben añadir con pipeta 2 mL de HCl concentrado al crisol que contiene las cenizas. Evaporar el ácido sobre parrilla de calentamiento, enfriar, añadir 1 mL de HCl concentrado y 3.5 mL de agua destilada. Disolver las cenizas en su totalidad con ayuda de un agitador de vidrio.

Recolectar la solución de cenizas en un matraz volumétrico de 50 mL, cuidando de recuperar todo los sólidos mediante el lavado del crisol con agua destilada dos o tres veces más. Juntar los líquidos de lavado y llevar al volumen de aforo.

Homogeneizar la solución antes de tomar 2 alícuotas de 10 mL y colocarlas en tubos de ensayo. Añadir 1 mL de solución de clorhidrato de hidroxilamina al 10% y agitar con vortex. Posteriormente agregar 5 mL de buffer de acetatos y agitar la solución con vortex. Finalmente añadir 1 mL de orto-fenantrolina en solución al 1 % y agitar con vortex. Dejar en reposo de 10 a 15 min. Leer absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm frente a un blanco de reactivos y agua destilada, tratado de la misma manera.

Tomar 2 alícuotas más en tubos de ensayo, agregar 1 mL de agua destilada y agitar. A continuación agregar 5 mL de buffer de acetatos y agitar la solución con vortex. Finalmente añadir 1 mL de orto-fenantrolina al 1% y agitar con vortex. Dejar en reposo de 10 a 15 min. Leer absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm frente a un blanco de reactivos y agua destilada, tratado de la misma manera.

Nota: Es muy importante añadir los reactivos en el orden descrito y agitar con vortex.

La concentración de hierro ($\text{mg Fe}^{2+}/100 \text{ g muestra}$) se calcula interpolando el valor de absorbancia obtenida para la muestra en una curva patrón preparada a partir de una solución de sulfato ferroso amoniacal tratada de la misma forma, en concentraciones de 0.01 a 0.1 mg Fe/mL (NMX-F-503-2011).

3 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.3.2. Proteína cruda por Método de Kjeldahl (Método Oficial AOAC 2001.11)

Preparación de muestra

Medir de 0.1 a 0.2 g de muestra e introducir en un tubo Kjeldahl. Agregar 0.15 g de sulfato de cobre pentahidratado, 2.5 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado.

DIGESTIÓN

Encender la unidad de digestión (Figura 2A Kjeldigester K-446, Büchi) y precalentar a 360 °C. Colocar los tubos en el portatubos del equipo Kjeldahl y colocarlo en el bloque de calentamiento. Ajustar la unidad de evacuación de gases (Figura 2B Scruber K-415, Büchi) con las juntas colocadas sobre los tubos de digestión y accionar la trampa de succión de gases. Calentar los tubos Kjeldahl hasta total destrucción de la materia orgánicas, es decir, hasta que el líquido quede translúcido, con una coloración azul verdosa. Una vez finalizada la digestión, sin retirar la unidad de evacuación de gases, colgar el portatubos para dejar enfriar. Una vez fríos los tubos apagar la trampa de gases y retirar la unidad de evacuación.

DESTILACIÓN

Preparar un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de HCl 0.1 eq/L y unas gotas de indicador rojo de metilo al 0.1 %, o bien 50 mL de ácido bórico (H_3BO_3) al 4% con indicadores.

Dentro de la campana de extracción, se adicionan 10 mL de agua destilada al tubo de digestión, cuidando que resbale lentamente por las paredes del tubo. El tubo con el digerido se adapta dentro de la unidad de destilación (Figura 3 Destillation Unit K-350, Büchi), cuidando de introducir la alargadera hasta el fondo de la solución. Colocar el matraz Erlenmeyer previamente preparado con ácido el final de la línea de destilación. Adicionar solución de NaOH al 36 % (aprox. 40 mL) e inmediatamente iniciar la destilación por arrastre de vapor presionando el botón ON. Se recupera el destilado en el matraz Erlenmeyer hasta un volumen entre 100 - 150 mL, deteniendo la destilación (OFF). Se retira el matraz de la unidad lavando la alargadera con agua destilada sobre el destilado.

NOTA. La unidad de destilación cuenta con dos recipientes externos que deben contener suficiente NaOH al 36 % y agua destilada, usados para la neutralización y destilación del amoníaco, respectivamente. No olvidar abrir el agua corriente para enfriar el refrigerante.

TITULACIÓN

En caso de recibir el destilado en HCl 0.1 eq/L, se titula el exceso de ácido con una solución valorada de NaOH 0.1 eq/L. Cuando el destilado se recibe en H_3BO_3 , se titula la base con una solución valorada de HCl 0.1 eq/L.

Calcular por estequiometría el porcentaje de nitrógeno total y posteriormente el porcentaje de proteína cruda empleando el factor de conversión adecuado para la muestra.

EQUIPO KJELDAHL (BÜCHI)

<https://www.buchi.com/es-es/content/kjeldahl>

A)



B)



Figura 2. Bloque de digestión Kjeldahl A) Unidad de digestión con parrilla de calentamiento para 20 unidades y panel digital, B) Unidad de extracción y neutralización de vapores ácidos de la reacción Kjeldahl.



Figura 3. Unidad de destilación Büchi.

3.3.3. Absorción a 280 nm

Colocar la solución problema debidamente diluida en una celda de cuarzo de 1 cm de paso, dentro del protacelda del espectrofotómetro y determinar la absorbancia a 280 nm, usando como blanco la solución en que se encuentra preparada la muestra (Warburg y Christian, 1941)

La concentración de proteína se obtiene por referencia a una curva de calibración preparada con albúmina bovina sérica (ABS) en concentraciones de 50 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Considerar mínimo 5 puntos para la curva patrón.

3.3.4. Método de Biuret

Colocar 1 mL de la solución de proteína adecuadamente diluida en tubos de ensayo etiquetados y adicionar 4 mL del reactivo de Biuret. Mezclar perfectamente y dejar en reposo 30 min a temperatura ambiente.

Determinar la absorbancia del color violeta producido a 540 nm frente a un blanco preparado de la misma manera con 1 mL del disolvente en el cuál se encuentra diluida la muestra (Gornall *et al.*, 1949).

La concentración de proteína se obtiene por referencia a una curva de calibración preparada con albúmina bovina sérica (ABS) con concentraciones de 1 a 10 mg/mL considerando mínimo cinco puntos.

3.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS POR FRACIONAMIENTO

La extracción de proteínas mediante el proceso secuencial desarrollado por Osborne y Mendel en 1914, se basa en las diferencias de solubilidad entre las proteínas. Las fracciones proteínicas que se obtienen son: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones salinas), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en álcali diluido).

3.4.1. Albúminas

Pesar 10 g de harina desengrasada en un vaso de precipitados de 250 mL, agitar con 50 mL de agua desionizada por 1 h en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min. Recolectar el sobrenadante y lavar con 50 mL de agua el residuo siguiendo el mismo procedimiento.

Juntar los sobrenadantes y dializar contra agua por 24 h cambiando por lo menos tres veces el agua, finalmente las proteínas se liofilizan. El residuo de muestra se utiliza para la extracción de globulinas.

3.4.2. Globulinas

Agregar al residuo 250 mL de solución salina (NaCl 0.5 mol/L) y agitar por 1 h en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min, separar el sobrenadante y lavar el residuo siguiendo el mismo procedimiento. Juntar los sobrenadantes y dializar contra agua, finalmente las proteínas son liofilizadas. El residuo se utiliza para la extracción de prolaminas.

3.4.3. Prolaminas

Agregar 100 mL de la solución alcohólica (etanol al 70 % acetato de sodio 0.5 %) al residuo anterior y agitar por 1 h en refrigeración. Centrifugar a 10,000 rpm por 20 min. Colectar el sobrenadante y lavar 2 veces más el residuo siguiendo el mismo procedimiento. Juntar los sobrenadantes y dializar contra agua por 24 h cambiando por lo menos tres veces el agua, finalmente las proteínas se liofilizan. El residuo de utiliza para la extracción de glutelinas.

3.4.4. Glutelinas

Agregar 100 mL de solución de etanol al 70 %-acetato de sodio 0.5 %-mercaptoetanol 0.1 mol/L al residuo anterior y agitar por 30 min. Separar el sobrenadante y lavar el residuo 2 veces más con la solución de etanol-acetato de sodio-mercaptoetanol. Se juntan los sobrenadantes y dializar contra agua (Osborne y Mendel, 1914).

3.5 PROPIEDADES FUNCIONALES DE PROTEÍNAS

3.5.1. Capacidad de Espumado

Colocar 15 mL (Volumen de líquido inicial) de solución al 0.5% (m/v) de proteína del extracto en un tubo Falcon de 50 mL con graduaciones de 1 mL.

Batir la solución de proteína empleando equipo Ultra Turrax® T-25 por 1 minuto a 13,500 rpm. Al finalizar el tiempo registrar el volumen total de espuma (Volumen final) y volumen de líquido drenado.

Calcular Capacidad de Espumado de la solución de proteínas como Sobrerrendimiento o Poder Expumante (Badui Dergal, S. 2006 y Damodoran y Paraf, 1997)

3.5.2. Estabilidad de la Espuma

Inmediatamente después de batir la solución anterior, medir el volumen de espuma y el volumen de líquido drenado de la espuma cada 3 minutos, durante 15 min.

Calcular el tiempo de vida media de la espuma que se expresa como el tiempo necesario para que se drene el 50 % del líquido de la espuma.

3.5.3. Capacidad de emulsificación (Chau, *et al.*, 1997; Sathe *et al.*, 1983; Yasumatsu *et al.*, 1972)

Colocar una alícuota de 10 mL de solución al 0.5 % de proteína (V_{pi}) en un tubo Falcon de 50 mL y adicionar 15 mL de aceite comestible (V_{ai}) a la solución proteica.

Agitar la solución proteica con aceite durante 1 min a 13,500 rpm con el equipo de dispersión Ultra Turrax® T-25. Colocar el tubo en una gradilla, evitando movimientos bruscos y dejar reposar la emulsión durante 10 minutos.

Medir el volumen de aceite no emulsificado (V_{af}), el volumen de emulsión y el volumen de solución de proteína no emulsificada (V_{pf}). De acuerdo con el volumen de solución de proteína que no formó la emulsión (V_{pf}), calcule la cantidad de proteína en la emulsión. Considerando el volumen de aceite utilizado, calcule la cantidad de aceite que se encuentra en la emulsión.

Reportar la capacidad de emulsificación como el volumen de aceite que puede ser emulsificado por cada gramo de proteínas (mL aceite/g de proteína).

4 ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO

4.1. CUANTIFICACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO EN SOLUCIÓN

4.1.1. Método de fenol-sulfúrico (hidratos de carbono solubles totales)

Preparar una solución o suspensión de la muestra en agua, procurando que los carbohidratos se encuentren en el intervalo de sensibilidad del método (10 - 100 µg/mL)

En tubos de ensayo perfectamente etiquetados, colocar 1 mL de la solución o suspensión acuosa de la muestra.

Para cada tubo adicionar 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5 % y mezclar con vortex. Adicionar cuidadosamente 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado y homogeneizar.

NOTA: Realizar todo el procedimiento frente a la campana de extracción.

Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente (aproximadamente 30 min) y determinar la intensidad del color naranja obtenido en un espectrofotómetro a 480 nm, frente a un blanco preparado con agua y tratado de la misma manera (Dubois *et al.*, 1956).

Calcular la cantidad de hidratos de carbono solubles totales presentes en la muestra a partir de una curva patrón preparada con el carbohidrato de interés en el intervalo del método (10 - 100 µg de glucosa/mL) tomando como mínimo 5 puntos tratados de la misma manera que el problema.

4.1.2. Método ácido dinitrosalicílico o DNS (hidratos de carbono reductores)

Medir 1 mL de la solución acuosa de la muestra y colocar en tubo de ensayo. Adicionar 1 mL del reactivo de DNS, tapar con canica y calentar por 5 min en un baño de agua hirviente. Enfriar y diluir con 10 mL de agua destilada. Leer la absorbancia del color producido a 540 nm frente a un blanco de reactivos y agua tratado de la misma manera que la muestra.

Cuantificar la concentración de azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar (con un mínimo de 5 puntos) preparada con el carbohidrato reductor de interés en concentraciones de 0.2 - 2.0 mg/mL (Nielsen, 2003).

4.2. ANÁLISIS DE POLISACÁRIDOS

4.2.1. Determinación de fibra dietética total (Método enzimático gravimétrico con Pancreatina y Amiloglucosidasa)

Preparación de la solución enzimáticas.

- Disolver el contenido de 8 cápsulas de pancreatina (CREON®) en 50 mL de buffer de fosfatos 0.08 M pH 6.0.
- Preparar una solución de amiloglucosidasa (SIGMA) en concentración 1.0 mg/mL.

NOTA: Preparar al mismo tiempo un blanco de reactivos para la determinación.

Colocar en un matraz Erlenmeyer de 500 mL 1 ± 0.1 g de muestra molida seca y desengrasada, y adicionar 50 mL de buffer fosfatos 0.08 mol/L pH 6. En caso de realizar réplicas el peso de las muestras no debe diferir en más de 20 mg.

Cubrir el matraz con papel aluminio y calentar en baño maría a ebullición durante 10 min.

Disminuir la temperatura de la solución a 65 °C y adicionar 2 mL de la solución de pancreatina e incubar durante 1 h a 65 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, disminuir la temperatura de la solución hasta temperatura ambiente y ajustar el pH a 4.0 - 4.5 con potenciómetro, empleando HCl.

Adicionar 1 U/mL de amilogucosidasa (volumen 2.4 mL/matraz) e incubar durante 30 min a 55 °C.

Precalentar a 60 °C, 140 mL de etanol al 96 % (medir el volumen antes de calentar) y adicionar al matraz después del tiempo de incubación con amilogucosidasa.

NOTA: El etanol no debe de calentarse con mechero, usar parrilla de calentamiento.

Dejar reposar a temperatura ambiente al menos durante 1 h o toda la noche cubriendo la boca del matraz con papel aluminio.

Para recuperar el material insoluble se filtra la solución al vacío con matraz Kitasato y embudo Büchner, sobre un papel filtro Whatman No. 54 ó 541 previamente puesto a peso constante a 80 °C. También puede utilizarse embudo Gooch de vidrio templado, previamente puesto a peso constante a 550 °C.

Lavar el material insoluble con 25 mL de etanol al 78 %.

Lavar el material insoluble con 10 mL de etanol al 95 %.

Lavar el material insoluble con 10 mL de acetona.

Secar en estufa convencional el papel filtro con el residuo a 70 °C hasta peso constante.

Raspar el material insoluble del papel filtro y dividir cuantitativamente en 2 partes iguales. Una se emplea para cuantificar la proteína cruda y la otra para cenizas totales.

4.2.2. Cuantificación de Almidón por formación de complejos de inclusión con yodo

Nota: Este procedimiento únicamente puede ser utilizado cuando el almidón se encuentra completamente disuelto (gelatinizado).

Colocar 2 mL de la solución de almidón en un tubo de ensayo y adicionar 3 mL de una solución de I/KI preparada diluyendo 2 mL de solución de Lugol en 100 mL de agua.

Medir la intensidad del color azul producido en un espectrofotómetro a 600 nm, frente a un blanco de reactivos.

Calcular la cantidad de almidón presente en la muestra a partir de una curva patrón preparada en el intervalo de 0.02 - 0.2 mg de almidón soluble/mL, tratada de la misma manera que el problema.

Los resultados de esta determinación son relativos, ya que no todas las fuentes de almidón forman el mismo complejo colorido con yodo (Nielsen, 2010).

4.2.3. Cuantificación de Pectinas por método con carbazol

En un tubo de ensaye se colocan 5 mL de una solución de tetraborato de sodio (0.025 mol/L disuelto en H₂SO₄ concentrado) y 1 mL de la solución problema, cuidando que la muestra resbale por las paredes del tubo. Se agita cuidadosamente la mezcla con vortez y se calienta en baño de agua hirviente por 10 min. Añadir 0.2 mL de solución de carbazol (0.125 % disuelto en etanol absoluto y almacenado a 4 °C), agitar y calentar en baño de agua hirviente durante 5 min. Dejar enfriar y leer absorbancia en el espectrofotómetro a 530 nm, ajustando previamente con un blanco de reactivos.

La concentración de pectinas se calcula interpolando el valor de absorbancia de la muestra en una curva patrón realizada de la misma forma con ácido galacturónico en concentraciones de 4.0 - 40.0 µg/mL.

Nota: Para manipulación de reactivos corrosivos se debe trabajar en campana de extracción con el equipo de protección adecuado.

La presencia de tetraborato incrementa la intensidad del color producido, disminuyendo la interferencia del color producido por otros azúcares. Puede presentar interferencias por iones cloruro y diversas sustancias orgánicas que dan un color inespecífico.

5 ANÁLISIS DE LÍPIDOS

5.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS

5.1.1 Método de Soxhlet

Colocar a peso constante un matraz bola de fondo plano con perlas o piedras de ebullición en la estufa a 110 °C, aproximadamente 2 h.

Medir de 4 a 5 g de muestra sobre un papel poroso y sin colorantes. Enrollar la muestra en el papel y colocarlo dentro de un cartucho de celulosa, tapando con algodón (no apretar el algodón contra la muestra) y colocar el cartucho con muestra en el extractor Soxhlet.

Adaptar el matraz bola al extractor conteniendo el cartucho de celulosa con muestra, y posteriormente ajustar el refrigerante sobre el extractor, cuidando de no poner grasa en las juntas. Agregar dos cargas del disolvente (éter etílico o éter de petróleo) por el extractor. Montar el sistema de destilación (Figura 4) y calentar el matraz con parrilla a ebullición suave hasta la extracción total del material lipídico.

Para verificar que se ha extraído toda la grasa, dejar caer una gota de la descarga sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa. Una vez extraída toda la grasa, esperar a que se enfríe el equipo de destilación.

El exceso de disolvente contenido en el matraz de bola con grasa, se elimina por destilación a presión reducida empleando un rotavapor. Desmontar el matraz del rotavapor, de ser necesario volatilizar el disolvente remanente sobre parrilla de calentamiento. Secar el extracto en estufa a 80 °C por 30 min, enfriar en desecador y pesar (James, 1999)

Calcular el porcentaje de grasa cruda por gravimetría.

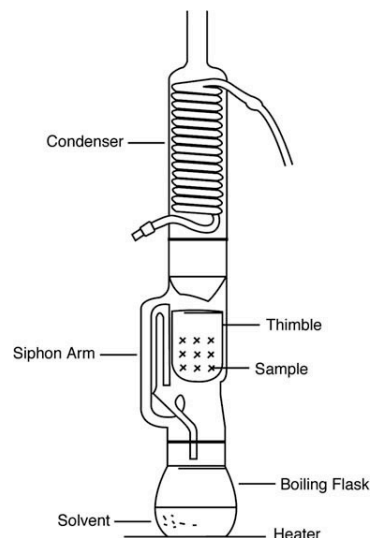


Figura 4. Aparato para extracción Soxhlet

5.1.2. Método por lotes

Colocar a peso constante tres matraces Erlenmeyer de 125 mL en la estufa a 100 °C, aproximadamente 2 h.

Medir de 5 a 10 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitador magnético. Adicionar 40 mL de disolvente, tapar y agitar en parrilla magnética durante 30 min. Dejar sedimentar y filtrar la parte superior sobre otro matraz Erlenmeyer de 250 mL. Recuperar el residuo de muestra y adicionar 40 mL del disolvente limpio. Agitar 10 min más, dejar sedimentar y filtrar el disolvente con grasa. Repetir la operación, juntando los filtrados en el matraz hasta la extracción total del material lipídico. Para verificar que se ha extraído toda la grasa dejar caer una gota del filtrado sobre papel filtro, al evaporarse el disolvente no debe dejar residuo de grasa.

El disolvente con grasa se filtra nuevamente sobre una cama de sulfato de sodio anhidro para eliminar la humedad residual, y se recupera el extracto lipídico en un matraz volumétrico. Con pipeta volumétrica se toman alícuotas de 10 mL del extracto lipídico y se colocan sobre los matraces Erlenmeyer previamente puestos a peso constante y medidos gravimétricamente. El exceso de disolvente se elimina por evaporación sobre parrilla caliente, cuidando de no exceder el calentamiento. El disolvente remanente en el material lipídico se termina de evaporar en estufa a 80 °C durante 30 min. Los matraces con grasa se sacan de la estufa, se dejan enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador y se mide su masa.

Calcular el porcentaje de grasa cruda por gravimetría, tomando en cuenta volúmenes de aforo y alícuota.

NOTA. La manipulación de equipo y disolventes debe de realizarse en campana de extracción, alejados de la flama o superficies calientes.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS

5.2.1. Índice de saponificación

Montar un equipo de reflujo en la campana, colocar en el matraz bola con boca esmerilada 2 g de la muestra lipídica y adicionar 25 mL de solución alcohólica de KOH 0.5 mol/L. Llevar a ebullición suave y mantener durante 1 h. Desmontar cuidadosamente el matraz de sistema de destilación y adicionar 1 mL de solución de fenolftaleína (0.1 %) Titular en caliente el exceso de álcali con ácido clorhídrico 0.5 eq/L (Nielsen, 2010).

Calcular el índice de saponificación por volumetría (mg KOH necesarios para saponificar los ácidos grasos totales de un gramo de muestra).

5.2.2. Índice de refracción

Para reaizar las prubea se emplea un refractómetro, cuidando que la temperatura de trabajo para aceites sea de alrededor de 20 °C y entre 40 - 60 °C para grasas, procurando que la muestra se encuentre completamente líquida. Se puede mantener la temperatura empleando un baño de agua a temperatura constante para que circule a través de los prismas.

Colocar la muestra en el prisma inferior del refractómetro cubriendo completamente la superficie de manera uniforme y sin burbujas. Cerrar la tapa suavemente, encender la lámpara y observar la escala a través del ocular. En caso de que la separación de los campos no sea clara, ajustar con el corrector de dispersión y el tornillo de calibración. Leer en la escala la intersección de los campos. Eliminar completamente la muestra del prisma, utilizando un papel suave (Aurand *et al.*, 1987).

5.2.3 Índice de yodo (Método de Hanus)

Medir de 0.1 g a 0.5 g de muestra lipídica en matraces yodométricos. Adicionar 10 mL de diclorometano para disolver la grasa. Adicionar con pipeta volumétrica 25 mL del reactivo de Hanus en el matraz. Dejar reposar por 30 min en la oscuridad, agitando ocasionalmente y midiendo el tiempo con cronómetro.

Transcurrido el tiempo de incubación en oscuridad, adicionar 10 mL de solución de solución de KI al 15 % y agitar vigorosamente. Adicionar 100 mL de agua recientemente hervida y fría, enjuagando el tapón y la parte superior del matraz.

Titular el yodo remanente con una solución estandarizada de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 eq/L), adicionando gradualmente y con agitación vigorosa hasta una solución color amarillo. Adicionar 1 mL de solución indicadora de almidón (solución de almidón soluble al 1 %). y continuar titulando hasta que desaparezca el color azul. Registrar el volumen del agente valorante gastado (Nielsen, 2003).

Preparar un blanco con 10 mL de diclorometano y tratarlo de la misma manera que a la muestra.

Calcular el índice de yodo por volumetría expresado como gramos de yodo absorbido por 100 g de muestra lipídica.

5.2.3. Peso específico

Llevar un picnómetro a peso constante y medirlo gravimétricamente. Llenar el picnómetro con agua y colocarlo en un baño de agua a 25 °C durante 30 min. Sacar el matraz, secar por fuera y medir masa.

El mismo picnómetro se deberá secar perfectamente para llenarlo con el aceite. Icubar en baño de agua a 25 °C por 30 min. Transcurrido el tiempo secar picnómetro por fuera y medir masa (Aurand *et al.*, 1987).

Referir el peso específico relacionando el peso del aceite al peso del agua a 25 °C.

NOTA: Para las muestras de lípidos sólidos se emplea el mismo método pero incubando las muestras previamente fundidas en baño de agua de 40 - 60 °C.

5.3. DETERIORO DE LÍPIDOS

5.3.2. Determinación de Índice de Acidez o Acidez Titulable

En un matraz Erlenmeyer de 125 ó 250 mL, medir 0.5 g de aceite o grasa fluida y adicionar 25 mL de alcohol previamente neutralizado (utilizando fenolftaleína al 0.1% como indicador). Calentar en un baño de agua a 60 °C, con ebullición suave durante 30 min. Titular en caliente con solución valorante de KOH 0.01 eq/L, agitando fuertemente durante la adición de álcali (Nielsen, 2010).

Calcular el índice de acidez como equivalentes de KOH por 100 g de lípidos.

5.3.3. Determinación de Índice de Peróxidos por método micro-volumétrico

Medir 0.5 ± 0.05 g de aceite o grasa en un matraz Erlenmeyer de 125 o 250 mL y adicionar 2.5 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), disolviendo perfectamente. Adicionar 0.05 mL de una solución saturada de yoduro de potasio y dejar reposar en la oscuridad durante 60 segundos midiendo el tiempo con cronómetro.

Transcurrido el tiempo agregar 7.5 mL de agua desionizada hervida y fría, así como 0.1 mL de solución de almidón indicador (solución de almidón soluble al 1 %). Si se presenta una coloración azul oscuro (en toda la solución o en forma de puntos aislados) titular lentamente con tiosulfato de sodio $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.001 eq/L hasta la desaparición total del color azul (Crowe y White, 2001).

El índice de peróxidos se reporta como los miliequivalentes de peróxido por kilogramo de muestra.

5.3.4. Compuestos polares

Medir 0.5 g de muestra lipídica y se colocan en un matraz volumétrico de 10 mL. Disolver perfectamente la muestra en tolueno y llevar a la marca de aforo.

Colocar en una columna de aproximadamente 10 cm, un filtro de algodón de aproximadamente 1 cm en la parte inferior, que permita el flujo de disolvente. Posteriormente agrega 1 g de sílica gel previamente hidratada al 5 % durante 24 h y colocar otra capa de algodón de 0.5 cm en la parte superior.

Montar la columna de manera vertical y colocar por debajo una cápsula de aluminio previamente puesta a peso constante.

A continuación verter 3.5 ml de fase móvil, mezcla de éter de petróleo-éter etílico (85:15) por la parte superior de la columna. Cuando esté a punto de entrar toda la fase móvil a la columna, adicionar 1 mL de la disolución lipídica preparada (mezcla lípidos-tolueno) y dejar eluir. Posteriormente se agregar otra porción de 3.5 ml de fase móvil. Al finalizar la elución, eliminar el exceso de disolvente en la cápsula de aluminio por evaporación en parrilla de calentamiento y después en estufa convencional a 80° C por 30 min.

La cápsula de aluminio se deja enfriar dentro de un desecador y se mide su masa. La fracción recibida en las cápsulas de aluminio conforma la cantidad de compuestos no polares. A partir de estos se calcula la cantidad de compuestos polares por gravimetría (AOCS Método Oficial Cd 20-91, modificado por Schulte en 2004).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AOAC. Horwitz, W. (Ed). (2005). Official methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, AOAC International, Maryland, USA
- AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th Edition, edited by D. Firestone, American Oil Chemists' Society, Champaign, 1997, Method Cd 20-91.
- APHA, AWWA, WEF. (1995) Standard methods for the examination of water and waste water. 19th Edition. Washington.
- Aurand, L.W., Woods, A.E., Wells, M.R. (1987) Food Composition and Analysis. An AVI Book, New York.
- Badui Dergal, Salvador. (2006) Química de Alimentos. Pearson Educación. Cuarta Edición <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/libro-badui200626571.pdf>
- Crowe T. D. & White P. J. (2001). Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples. *Journal of the American Oil Chemical Society*. 78, 2, 1267-1269.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A & Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356
- Gornall, A.G; Bardawill, Ch. J. & David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751-766
- James, C.S; (1999) Analytical Chemistry of Foods: An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- Kirk R. S., Sawyer R & Egan, H. (1996) Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México.
- Nielsen S. (Ed). (2010) Food Analysis. Springer. New York, USA. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/food-analysis.pdf>
- Osborne T. B; Mendel L. B. (1914). Nutritive properties of proteins of the maize kernel. *The Journal of Biological Chemistry* 18, 1-16.
- Pomeranz Y. & Meloan C. E.; (2000). Food Analysis Theory and Practice Third Edition; Chapman & Hall, USA
- Robertson, J.A., Monredon, F.D., Dysseler, P., Guillon, F., Amdó, R. & Thibauthl, J.F. (2000) Hydration properties of dietary fiber and resistant starch: a European Collaboraty Study. *IWT*, 33: 73-79.
- NMX-F-503-2011. Industria azucarera y alcoholera - determinación de fierro en muestras de azúcares. <http://www.economia-nmx.gob.mx/normas/nmx/2010/nmx-f-503-scfi-2011.pdf>
- Southgate, D.A.T. (1991) Determination of Food Carbohydrates Second Edition; Elsevier Applied Science, New York, USA.
- SSA, 1994, NOM-117-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, fierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica. México.

ANEXO I. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Acido bórico con indicadores

Medir 40 g de ácido bórico y disolverlo en 800 mL de agua destilada posteriormente adicionar 35 mL de fenolftaleína al 0.1% en alcohol, y 10 mL de una mezcla de rojo de metilo 0.066% con verde de bromocresol 0.033% en alcohol. Llevar a un volumen de 1 L.

Buffer de Acetatos para determinación de Hierro

Medir 8.3 g de acetato de sodio anhidro, adicionar 12 mL de ácido acético glacial y aforar a 100 mL con agua destilada

Ortofenantrolina al 0.1%

Medir 0.1 g de ortofenantrolina y disolverlo en 80 mL de agua destilada a 80° C, enfriar y aforar a 100 mL)

Reactivo de Biuret

- **Disolución A:** Disolver 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.0 g de tartrato sódico-potásico en 500 ml de agua destilada.
- **Disolución B:** Preparar 300 ml de NaOH al 10% (p/v)
- Juntar las disoluciones A y B y **llevar el volumen a 1 litro**

Reactivo de DNS

Mezclar 80 mL de NaOH al 10% con 150 mL de agua destilada, agregar 150 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado.

Calentar a 50 °C y agitar constantemente

Agregar 5 g de DNS y agitar constantemente a 50 °C, enfriar a temperatura ambiente y filtrar. Aforar a 500 mL. Guardar reactivo en frasco ámbar en un lugar fresco y seco.

Reactivo de Hanus

Disolver 13.615 g de yodo en 825 mL de ácido acético glacial, calentar para disolver. Enfriar. Tomar 25 mL de la solución de yodo y titular con tiosulfato de sodio 0.1 eq/L, usando 1 mL de solución de almidón al 1% como indicador. Adicionar 3 mL de Bromo a 205 mL de ácido acético glacial.

A 5 mL de solución de bromo adicionar 10 mL de KI al 15%, titular con tiosulfato de sodio al 0.1 eq/L utilizando 1 mL de solución de almidón al 1% como indicador.

Calcular el volumen de la solución de bromo requerida para adicionar a los 800 mL de solución de yodo, de forma que la solución final contenga el doble de halógeno.

Reactivo de yodo (para determinación colorimétrica de almidón)

Pesar 1.269 g I_2 y mezclarlos con 1.8 g de KI disolver en 100 mL con agua.