

6.
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS

SUPERIORES CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUIMICA DE ALIMENTOS PARA LA LICENCIATURA DE Q.F.B.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A:

LAURA GOMEZ ANZALDO

ASESOR: Q.F.B. TAIS NOPAL GUERRERO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

275269



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

"Manual de laboratorio de Bioquímica de Alimentos para la
licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo"

que presenta la pasante: Laura Gomez Anzaldo
con número de cuenta: 9156042-5 para obtener el TITULO de:
Química

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

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de noviembre de 199 8

PRESIDENTE Q. Elia catalina León Arias *Elia catalina León Arias*

VOCAL Q. Ana Ma. Velázquez Sánchez *Ana M. Velázquez*

SECRETARIO Q. F.B. Taís Nopal Guerrero *Taís Nopal Guerrero*

PRIMER SUPLENTE Q. F.B. Martha patricia Zúñiga Cruz *Martha patricia Zúñiga Cruz*

SEGUNDO SUPLENTE Q. F. B. Ma. Elena Mondragón Esquivel *Elena Mondragón Esquivel*

INDICE GENERAL

| | Página |
|--|-----------|
| 1. INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y CUADROS | 2 |
| 2. PROLOGO | 8 |
| 3. OBJETIVOS: | 9 |
| 3.1 Objetivo General | |
| 3.2 Objetivo Particular | |
| 4. ASPECTOS GENERALES | 10 |
| 4.1. Información Básica | 10 |
| 4.1.1. Requisitos Necesarios para Inscribirse | 10 |
| 4.1.2. Temas Experimentales que incluye el Manual | 11 |
| 4.2. Descripción del Curso Teórico | 12 |
| 4.2.1. Objetivos Particulares | 12 |
| 4.2.2. Programa del Curso | 12 |
| 4.3. Descripción del Curso Experimental | 14 |
| 4.3.1. Prólogo al trabajo en el Laboratorio | 14 |
| 4.3.2. Objetivos | 15 |
| 4.3.3. Programa de Actividades | 16 |
| 4.3.4. Sugerencias para la Evaluación del Laboratorio | 17 |
| 4.3.5. Normas Generales de Actuación en el Laboratorio | 19 |
| 5. MUESTREO | |
| 5.1. Qué es un muestreo? | 21 |
| 5.2. Cómo identificar una buena muestra? | 21 |
| 5.3. Selección de una muestra? | 22 |
| 5.4. Tipos de error? | 23 |
| 5.5. Cómo podemos etiquetar a una muestra? | 25 |

| | Página |
|---|-----------|
| 6. TÉCNICAS DE LABORATORIO | |
| 6.1. Pesada | 27 |
| 6.2. Secado | 30 |
| 6.3. Filtrado | 32 |
| 6.4. Medición de Volúmenes | 33 |
| 6.5. Calcinación | 39 |
| 6.6 Métodos Cromatográficos | 39 |
| 6.7. Métodos Espectroanalíticos. | 42 |
| 7. Bloque I: Análisis Brotológico | 46 |
| 7.1. Objetivos | |
| 7.1.1. Objetivo General | 47 |
| 7.1.2. Objetivos Particulares | 47 |
| 7.2. Introducción | 48 |
| 7.3. Metodología | 51 |
| 7.3.1. Determinación de Agua | 52 |
| 7.3.2. Determinación de Nitrógeno total (Método Kjeldahl) | 57 |
| 7.3.3. Cuantificación de nitrógeno no proteico (Triptófano) | 65 |
| 7.3.4. Cuantificación y Clasificación de Grasas | 72 |
| 7.3.5. Mineralización por vía seca | 78 |
| 8. Bloque II: Leche y Derivados | 85 |
| 8.1 Objetivos | |
| 8.1.1 Objetivo General | 86 |
| 8.1.2. Objetivos Particulares | 86 |
| 8.2. Introducción | 87 |
| 8.3. Metodología | |
| 8.3.1 Cuantificación de Lactosa | 89 |
| 8.3.2. Determinación de Turbidez | 100 |
| 8.3.3. Elaboración de Queso, Requesón y Yogur | 105 |
| 8.3.4 Cuantificación de Ácido Láctico | 122 |

| | Página |
|--|---------------|
| 9. Enzimas en los Alimentos | 127 |
| 9.1. Objetivos | |
| 9.1.1. Objetivo General | 128 |
| 9.1.2. Objetivos Particulares | 128 |
| 9.2 Introducción | 129 |
| 9.3 Metodología | 132 |
| 9.3.1 Extracción de Polifenoloxidasa | 133 |
| 9.3.2 Cinética de Polifenoloxidasa | 140 |
| 9.3.3. Actividad de Peroxidasa | 148 |
| 9.3.4. Actividad de Bromelaína | 152 |
| 10. Bloque IV: Vitaminas | 158 |
| 10.1 Objetivos | |
| 10.1.1 Objetivo General | 159 |
| 10.1.2. Objetivos Particulares | 159 |
| 10.2. Introducción | 160 |
| 10.3 Metodología | 165 |
| 10.3.1 Cuantificación de Ácido Ascórbico | 166 |
| 11. CONCLUSIONES | 172 |
| 12. REFERENCIAS | 173 |

1. ÍNDICE DE CUADROS, DIAGRAMAS, FIGURAS Y TABLAS

| | Página | |
|---------------------|---|-----|
| ❖ Cuadros | | |
| 4.3.1. | Programa de actividades | 16 |
| 8.1. | Composición típica de la leche | 87 |
| 8.3.3.2.1. | Características de las dos formas habituales de coagulación de la leche | 108 |
| | | |
| ❖ Diagramas: | | |
| 4.1.2.1. | Partes que Constituyen el Manual | 11 |
| 7.3.1.3. | Sec. Exp. de: "Determinación del Contenido de Agua" | 53 |
| 7.3.2.3. | Sec. Exp. de: "Cuantificación de Proteínas y Compuestos Nitrogenados" | 60 |
| 7.3.3.3 | Sec. Exp. de: "Cuantificación de Triptófano" | 68 |
| 7.3.4.3. | Sec. Exp. de: "Extracción e Identificación de Lípidos" | 74 |
| 7.3.5.3. | Sec. Exp. de: "Cuantificación de Cenizas (Mineralización por vía seca)" | 80 |
| 8.3.1.3. | Sec. Exp. de: "Determinación de Lactosa" | 91 |
| 8.3.2.3. | Sec. Exp. de: "Determinación de Turbidez" | 102 |
| 8.3.4.3.a | Sec. Exp. de: "Elaboración de Queso" | 110 |
| 8.3.4.3.b. | Sec. Exp. de: "Elaboración de Requesón" | 115 |
| 8.3.4.3.c. | Sec. Exp. de: "Elaboración de Yogur" | 119 |
| 8.3.4.3. | Sec. Exp. de: "Cuantificación de Ácido Láctico" | 124 |
| 9.3.1.3. | Sec. Exp. de: "Extracción de la Polifenoloxidasas" | 137 |
| 9.3.2.3. | Sec. Exp. de: "Cinética de Polifenoloxidasas" | 140 |
| 9.3.2.2. | Sec. Exp. de: "Actividad de Peroxidasas" | 150 |
| 9.3.4.3.a. | Sec. Exp. de: "Efecto de la Bromelaina en la gelatina" | 153 |
| 9.3.4.3.b. | Sec. Exp. de: "Efecto enzimático de la Bromelaina en leche" | 156 |
| 10.3.3. | Sec. Exp. de: "Cuantificación de Acido Ascórbico" | 168 |
| | | |
| ❖ Figuras | | |
| 4.3.4.1. | Hoja de Evaluación de Desarrollo Experimental | 18 |
| 5.1. | Hoja de Registro | 25 |
| 6.1. | " Vista en secciones de una balanza analítica Mettler " | 27 |
| 6.2. | " Principio de un servosistema electromagnético " | 28 |

Índice de Cuadros, Diagramas, Figuras y Tablas

| | | Página |
|------------------|---|--------|
| 6.3. | Vista en sección transversal de una balanza electrónica | 30 |
| 6.4. | Forma de utilizar un vaso de precipitados y un vidrio de reloj para impedir la entrada de polvo a un reactivo durante su secado en una estufa " | 31 |
| 6.5. | Desecadores " | 32 |
| 6.6. | Forma en que se pliega el papel filtro para colocarlo en un embudo cónico y procedimiento para filtrar un precipitado " | 34 |
| 6.7. | Crisol de Goch para filtración con disco de vidrio sinterizado | 35 |
| 6.8. | Dispositivo para filtración con un crisol de Goch | 35 |
| 6.9. | Buretas | 36 |
| 6.10. | Parte de una bureta que indica el nivel del menisco | 37 |
| 6.11. | Presencia del Burbuja de aire en la bureta | 37 |
| 6.12. | Algunas pipetas comunes | 38 |
| 6.13. | Forma en que se pliega el papel filtro y se coloca dentro de un crisol para la calcinación " | 39 |
| 6.14. | Colocación de un crisol sobre un mechero | 40 |
| 6.15. | Cromatografía en capa fina | 41 |
| 6.16. | Espectrofotómetro BECKMANN " | 44 |
| 10.1 | Acido -L-Ascórbico | 161 |
| 10.2 | Acido Dehidroascórbico | 161 |
| | | |
| ❖ Tablas: | | |
| 6.1. | Tolerancia de las buretas clase A | 35 |
| 6.2. | Tolerancia de las pipetas volumétricas clase A | 38 |
| 6.3. | Color absorbido o transmitido | 43 |
| 9.3.1. | Parámetros cinéticos para la enzima polifenoloxidasas de aguacates | 135 |
| 10.1 | Ejemplos de manipulación culinaria | 163 |

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUIMICA DE ALIMENTOS

2. PROLOGO

El presente trabajo de tesis tiene como finalidad actualizar las prácticas en el laboratorio de Bioquímica de Alimentos en la Facultad de estudios Superiores Cuautitlán, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para ello, se propone una guía metodológica (manual) que proporciona a los estudiantes de la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo, los conocimientos esenciales de las técnicas básicas de laboratorio, necesarias para el alumnado en las primeras etapas de su formación profesional se espera que este manual agilice la experimentación y conocimientos gracias al diseño ilustrado y seguimiento por diagramas de flujo, que permitan al alumno implementar las técnicas con mayor confianza, así mismo se pretende reafirmar los conocimientos que se adquieren a la par con otras asignaturas y así obtener un óptimo desarrollo dentro del laboratorio. Por último, se pretende que los asesores que imparten dichos laboratorios se apoyen en este manual, para un mejor desempeño de su labor docente.

El trabajo se presenta en 3 partes, siendo el primero de ellos, el **Aspecto general**, nos ubica perfectamente en el desarrollo esencial del laboratorio, sus requisitos, su constitución, el número de profesores que la imparten, la forma en la cual se trabaja dentro de él y por último muestra la forma de evaluación que se sigue en este laboratorio.

En la segunda parte se presentan las **técnicas de laboratorio** a desarrollar por los alumnos; así mismo la introducción de algunos términos no muy comunes o que pasan desapercibidos.

En la última parte se muestran los bloques a desarrollar, así como las técnicas necesarias para el desarrollo de éstos. El seguimiento de los proyectos se podrá llevar a cabo dentro del laboratorio.

Se pretende en primera instancia impartir el curso de Bioquímica de Alimentos para Químicos Farmacéuticos Biólogos, estudiantes de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en un determinado momento hacer extensivo su empleo en algunas otras instituciones que consideren pertinente adoptarlo.

3. OBJETIVOS:

3.1.Objetivo General:

- Elaborar un Manual de Laboratorio de la materia de Bioquímica de Alimentos para alumnos que cursan la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.

3.2.Objetivos Particulares:

- Seleccionar los experimentos adecuados y congruentes con el programa teórico de la asignatura mediante la estandarización de técnicas útiles en el estudio de las propiedades de los alimentos, así como de las biomoléculas que los conforman.
- Adecuar las experiencias para que cubran las necesidades de tiempo, reactivos y material con que se cuenta en el laboratorio de Bioquímica de Alimentos
- Implementar didácticamente el uso de este Manual en el Laboratorio para así facilitar el proceso - aprendizaje; además, homogeneizar el trabajo en los diferentes grupos de laboratorios.
- Que al finalizar el curso, el alumno pueda proyectar nuevos modelos de experimentación o modificaciones a los existentes, con la finalidad de mejorar el curso experimental semestre a semestre.

4. ASPECTOS GENERALES

4.1. Información Básica

La asignatura de **Bioquímica de Alimentos** se ofrece para los alumnos del 5o. Semestre de la Carrera de Químico Farmacéutico Biólogo, consta de 6 créditos, cuya clave es 1504 y es una asignatura teórico - práctica. Esta asignatura es impartida por dos profesores de asignatura, uno en el laboratorio y el otro en la parte teórica de la asignatura.

El curso consta de 4 horas semanales de las cuales 2 son para la enseñanza práctica y las 2 restantes son para la parte teórica.

4.1.1. Requisitos y trámites para inscribirse.

Los trámites para inscribirse al curso son los acostumbrados (Pago de uso de laboratorio, 1 fotografía tamaño infantil). No es necesario cubrir algún otro requisito.

Sin embargo se considera recomendable que los alumnos hayan cursado la asignatura de Bioquímica Celular, ya que apoya mucho los conocimientos y lenguaje que tiene que van con la asignatura.

4.1.2. Temas Experimentales que incluye el Manual

Se propone que el Manual de Bioquímica en Alimentos esté constituido de forma, tal como se ilustra en el diagrama 4.1.2.1:

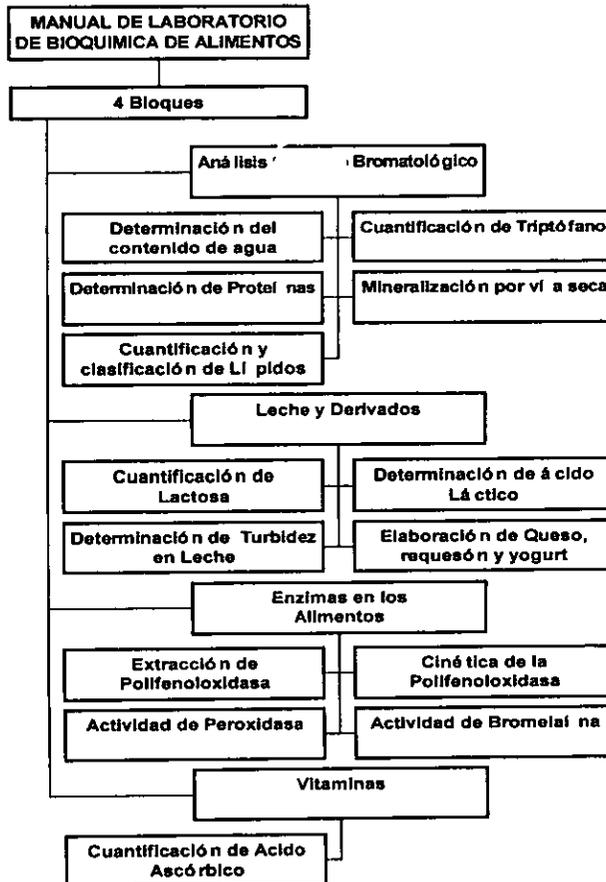


Diagrama 4.1.2.1. "Partes que Constituyen el Manual"

4.2. Descripción de la Parte Teórica del Curso Experimental

4.2.1. Objetivos Particulares:

- * Que el alumno adquiera las bases teóricas necesarias para que pueda enfrentar con seguridad aspectos prácticos dentro del campo del análisis de los alimentos.
- * Que el alumno sea capaz de aplicar las técnicas sugeridas a diferentes tipos de muestras, tan natural como industrializado y de diferente origen alimentario,

4.2.2. Programa del Curso.

A continuación se presenta el programa de éste perfectamente desglosado, incluyéndose el tiempo requerido para cubrir los temas:

Bloque I: "Análisis Bromatológico"

Objetivos Generales:

- Describir de manera general lo que se refiere al Análisis Bromatológico.
- Dar a conocer las diferentes técnicas analíticas que se aplican en el área de los alimentos.

El tiempo sugerido para cubrir esta sesión es: 2 h

Bloque II: "Leche y Derivados"

Objetivos Generales:

- Conocer las propiedades físicas y químicas de la leche; así como la importancia de la misma para la alimentación.
- Inferir los fundamentos de algunas técnicas analíticas que se aplican en el área de Lactología.

El tiempo sugerido para cubrir esta sesión es: 2 h

Bloque III:
"Enzimas en los alimentos"

Objetivos Generales:

- Describir un panorama general que permita conocer las diferentes propiedades de estudiar las enzimas como la importancia de las mismas
- Conocer de manera general diferentes técnicas con que se "miden" las actividades de éstas.

El tiempo sugerido para cubrir esta sesión es: 2 h

Bloque IV:
"Vitaminas"

Objetivo General:

- Describir de manera general los usos a nivel industrial que tiene el ácido ascórbico en el área de los alimentos.
- Estudiar las técnicas que permiten determinar cuantitativamente y cuantitativamente el ác. ascórbico.

El tiempo sugerido para cubrir esta sesión es: 2 h

Antes de cada bloque se efectúa una evaluación.

4.3. Descripción del Curso Experimental

4.3.1. Prólogo al Trabajo en el Laboratorio.

El trabajo experimental es de vital importancia en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos, se pretende apoyar, motivar, impulsar y desarrollar al alumno, en los conocimientos y metodologías fundamentales, porque hace que los alumnos adquieran habilidades y destrezas necesarias para desarrollar las metodologías fundamentales para trabajar en el campo de los alimentos.

Dado el interés por la mejoría del laboratorio de Bioquímica de Alimentos, se ha considerado y hecho posible la adaptación y estandarización de algunas técnicas que se utilizan a nivel tanto industrial, como para aplicar algunas normas de calidad.

Este modelo de enseñanza experimental, le proporciona al alumno otra forma de trabajo, en la cual la enseñanza experimental esta vinculada con la enseñanza teórica, lo que permite al alumno, desarrollar, aplicar, analizar, sintetizar y evaluar sus conocimientos, así mismo este manual pretende reafirmar algunos aspectos experimentales que pudieron ser olvidados como lo puede ser poner a peso constante, incinerar titular etc.

Es importante aclarar que la técnicas incluidas en este manual no son muy sofisticadas; sin embargo están dentro de un nivel muy didáctico que es a final de cuentas lo que se propone con este manual.

4.3.2. Objetivos del Curso Experimental.

4.3.2.1. Objetivo General:

- Describir a los alumnos de Bioquímica de Alimentos los aspectos básicos de cuantificación, extracción y determinación de la actividad de algunos nutrimentos contenidos en los alimentos

4.3.2.2. Objetivos Particulares:

- Que el alumno utilice los procedimientos experimentales disponibles para el análisis de los alimentos.
- Que el alumno pueda aplicar eficientemente algunos de los métodos analíticos en el área de alimentos.
- Que el alumno utilice e identifique, los equipos, instrumentos y materiales básicos que con mayor frecuencia se utilizan para realizar estas técnicas.
- Que el alumno proponga con base a los conocimientos adquiridos, las modificaciones al procedimiento metodológico que se le proporciona, para que establezca sus objetivos personales o de grupo
- Que el alumno evalúe los resultados experimentales obtenidos y que los discuta en grupo, para establecer las condiciones óptimas de cada técnica.

4.3.3. Programa de Actividades

En el cuadro 4.3.1. se describen las actividades a realizar en el laboratorio por cada sesión experimental. Cabe aclarar que cada sesión consta de 2 horas.

| Sesión No. | Actividad |
|------------|--|
| 1 | Inscripción y presentación del curso de laboratorio de Bioquímica de Alimentos |
| 2 | Examen y Seminario de presentación del proyecto I: "Análisis Bromatológico" |
| 3 | Práctica 1: "Cuantificación del Contenido de Agua" y Práctica 2: "Cuantificación de Nitrógeno total (Kjeldahl)" |
| 4 | Práctica 3: "Cuantificación de Nitrógeno No proteico (Triptófano)" y Práctica 4: "Mineralización por vía seca (Cenizas)") |
| 5 | Práctica 5: "Cuantificación y clasificación de lípidos de origen alimenticio" |
| 6 | Tratamiento de datos y análisis de resultados |
| 7 | Entrega del Primer Reporte, Examen y Seminario de presentación del proyecto II: " Leche y Derivados". |
| 8 | Práctica 6 " Cuantificación de Lactosa" Práctica 7: "Determinación de Turbidez en leche" |
| 9 | Práctica 8: "Determinación de Ácido Láctico" Práctica 9: "Elaboración de queso ,requesón y yogur" |
| 10 | Tratamiento de datos y análisis de resultados |
| 11 | Entrega del Segundo Reporte, Examen y Seminario de presentación del proyecto III: "Enzimas de los alimentos" |
| 12 | Práctica 10: "Extracción de la polifenoloxidasas" |
| 13 | Práctica 11: "Actividad de la Peroxidasas" |
| 14 | Práctica 12: "Cinética de la Polifenoloxidasas" Práctica 13: "Actividad de Bromelaina (en leche y gelatina) |
| 15 | Tratamiento de datos y análisis de resultados |
| 16 | Entrega del Tercer Reporte, Examen y Seminario de presentación del proyecto IV: "Vitaminas" |
| 17 | Práctica 14: "Cuantificación de Ácido Ascórbico" |
| 18 | Tratamiento de datos y análisis de resultados |
| 19 | Entrega del último Reporte y Examen Final de Laboratorio. |

Cuadro 4.3.1. Programa de Actividades.

4.3.4. Evaluación del Laboratorio.

En relación a la evaluación que se hará en cada sesión experimental no sólo corresponde al desarrollo experimental, sino también al de los exámenes que se efectúan al inicio de cada proyecto y a la entrega del protocolo y el respectivo reporte de cada proyecto. Las actividades que se toman en cuenta son:

- a) Asistencia (Mínimo el 80% de asistencia –3 retardos equivalen a una falta-)
- b) Examen (En cada inicio de proyecto y un examen final)
- c) Trabajo en el Laboratorio
- d) Reporte del proyecto:

En el reporte se presentan los siguientes puntos:

- Carátula
- Objetivos
- Introducción
- Observaciones y resultados
- Análisis de resultados
- Conclusiones
- Bibliografía

Todos los parámetros suman 10puntos

La información anterior se verterá en la Hoja de Evaluación de Desarrollo Experimental (Fig. 4.3.4.1.), que el asesor manejará dando como resultado el total del 30% de la calificación final de la asignatura.

**BIOQUIMICA DE ALIMENTOS
HOJA DE EVALUACION DE DESARROLLO EXPERIMENTAL**

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Sección. de Bioquímica y Farmacología Humana
Laboratorio de Bioquímica de Alimentos



Nombre del Alumno: _____
Número de Cuenta: _____
Semestre: _____

| Fecha | Proyecto | Nombre de la Práctica | Examen | Trabajo en el laboratorio | Reporte | Promedio |
|-------|--------------|--|--------|---------------------------|---------|----------|
| | A.B. | Cuantificación del Contenido de Agua | | | | |
| | A.B. | Cuantificación de Nitrógeno Total (Kjendahl) | | | | |
| | A.B. | Cuantificación de Nitrógeno No Proteico | | | | |
| | A.B. | Mineralización por Vía Seca | | | | |
| | A.B. | Cuantificación y clasificación de Lípidos | | | | |
| | L. y D. | Determinación de lactosa | | | | |
| | L. y D. | Determinación de Turbidez en leche | | | | |
| | L. y D. | Determinación de Ácido Láctico | | | | |
| | L. y D. | Elaboración de queso, requesón y yogur | | | | |
| | E. de los A. | Extracción de Polifenoloxidasa | | | | |
| | E. de los A. | Actividad de la Peroxidasa | | | | |
| | E. de los A. | Cinética de la Polifenoloxidasa | | | | |
| | E. de los A. | Actividad de la Bromelaina | | | | |
| | Vitaminas | Cuantificación de Ácido Ascórbico | | | | |

Promedio Final

| | |
|---------------------------------------|--|
| Promedio Final de Laboratorio (80%) | |
| Calificación de Examen Final (20%) | |

Firmas de los asesores

Esta hoja sólo es válida si es firmada por los asesores.

Fig.4.3.4.1 Hoja de Evaluación de Desarrollo Experimental

4.3.5. Normas Generales de Actuación en el Laboratorio⁽¹⁾

El laboratorio tiene un reglamento que ordena y optimiza el trabajo en el laboratorio y que a continuación se presenta:

- Aspecto Profesional

1. Todos los estudiantes deben utilizar bata de algodón de manga larga abotonada. No se les permitirá a los estudiantes trabajar si no tienen la vestimenta adecuada. Cada estudiante es responsable de mantener su ropa limpia. Una bata limpia es deseable tanto por sanidad en el laboratorio como para la protección de la ropa de calle.⁽¹⁾
2. El cabello debe estar recogido. Si es largo debe atarse.
3. Debe observarse una correcta higiene personal.

- Normas Generales

1. Antes de comenzar a trabajar:

- a) Recopile todo el equipo y materiales necesarios limpios y secos.
- b) La falta de ingredientes o de equipo en el momento oportuno puede dar lugar a resultados pobres o al fracaso.
- c) Practique los principios de una buena organización, tanto en el manejo del equipo y de los reactivos para lograr una máxima eficacia.

2. Antes de comenzar el experimento:

- a) Lea el protocolo cuidadosamente.
- b) Decida quiénes van a llevar a cabo cada parte del experimento.
- c) Lávese las manos
- d) Lea las etiquetas detenidamente, pese y mida con exactitud. Tome sólo las cantidades necesarias para su equipo.
- e) Retire los reactivos de su lugar en bandejas.
- f) Tenga todos los materiales medidos y listos para su uso antes de comenzar a trabajar.

3. Durante la preparación del experimento:

- a) Mantenga su lugar de trabajo ordenado. limpie los reactivos derramados. Lave a medida que trabaja (esto puede incluir los utensilios que no vayan a utilizarse más).
- b) Tras ocupar el equipo y materiales asegúrese de que queden limpios y listos para guardar o para un futuro uso.
- c) Coloque los residuos en contenedores generales de basura separándolo en bolsas. No tire al desagüe o a la tarja el cristal, metal, porcelana, madera, paja, cuerdas, papel, tela, residuos de alimentos empleados.
- d) No ingiera alimentos ni bebidas dentro del laboratorio y menos aún cuando sean muestras para trabajar.

5. MUESTREO

5.1. Qué es un muestreo?

El proceso de muestreo es una faceta de la estadística que se utiliza para determinar una muestra. ⁽²⁾

5.2. ¿Cómo identificar una buena muestra?

Para realizar un análisis químico, los problemas reales comúnmente comienzan con una muestra que no es idónea para realizar con ella un experimento de laboratorio. La mayoría de los análisis químicos suelen consistir en cinco pasos: ⁽⁴⁾

1. Obtención de una muestra representativa del material por analizar.
2. Transformar la muestra en una especie adecuada para el análisis.
3. Eliminar o enmascarar las especies que podían interferir en el análisis químico.
4. Realizar el análisis.
5. Interpretar los resultados

En la operación de muestreo participan varios conceptos. Un **lote** es el material completo del que se toman las muestras. Pueden ser una carga de reactivos, toda el agua de un lago o el bazo de un caballo. A menudo, los lotes están formados por *unidades muestrales*, como las cajas individuales que constituyen la carga de un camión. Una **muestra bruta** es la que se toma del lote para análisis o almacenamiento; suele seleccionarse de modo que sea representativa del lote, y su elección es crítica para realizar un análisis válido. De la muestra bruta se toma una **muestra de laboratorio**, más reducida, la cual debe tener exactamente la misma composición que aquella. Por ejemplo, ello podría lograrse pulverizado finamente toda una muestra bruta sólida, mezclándola bien y conservando una parte de ese polvo en un frasco para comprobación. Entonces se emplean **porciones de prueba** (*alícuotas*) de la muestra de laboratorio para realizar análisis individuales. ⁽⁴⁾

Es necesario contar con un plan cuidadoso para tomar partes de un lote y conformar una muestra bruta. Se colecta una **muestra al azar** (o muestra aleatoria) dividiendo el lote en muchos segmentos reales o imaginarios. entonces se toman muestras de algunos segmentos determinados al azar, de preferencia

con ayuda de una tabla de números aleatorios. en el caso de materiales altamente **segregados** (con regiones cuya diferencia de composición es obvia), se constituye una **muestra compuesta**, de modo que resulte tan representativa como sea posible del lote entero. Por ejemplo, si se observa que un sólido presenta tres zonas con volúmenes relativos de 1:6:3, una muestra compuesta consistiría en muestras de cada zona en una relación de volumen de 1:6:3. El muestreo en cada zona puede al azar. La muestra compuesta se homogeneiza (quizá moliéndola), y se toma una muestra de laboratorio. se espera que la composición de la muestra compuesta sea representativa del lote completo.⁽⁶⁾

Con muy pocas excepciones los alimentos no son sistemas físicos bien definidos, como las disoluciones ideales o los sólidos cristalinos. Por el contrario se caracterizan por la presencia de una multitud de fases interactuantes. Por ejemplo: La Textura, que se debe principalmente a la presencia de componentes macromoleculares y a fases en dispersión coloidal. Por tal motivo la textura puede afectar en forma indirecta la reactividad química del alimento.⁽⁶⁾

5.3. Selección de una muestra

Si se trata de muestras de **materiales granulares** o en **polvo** se realiza de la siguiente forma:⁽⁶⁾

1. Depositar los **gránulos** o **polvos** sobre una hoja de papel y mezclar con una espátula. Trazar una cruz sobre el material apilado.
2. Elimine 2 de los segmentos diagonalmente opuestos y vuelva a introducirlos en el paquete.
3. Mezcle nuevamente con la ayuda d la espátula y repita los pasos 1 y 2. Continuando hasta que sólo se tenga una muestra de aproximadamente 0.025 kg.
3. Transfiera a un frasco de vidrio limpio (de preferencia esterilizado), con tapa hermética que no sea de metal.
4. Si es necesario triturar la muestra; lo hará con un mortero con pistilo y hacer pasar la muestra por un tamiz antes de realizar los pasos anteriores.

Para tomar muestras de **carne y productos cárnicos**⁽⁶⁾:

1. Se pare la carne del tejido óseo, de la piel y de todos tipo de cubierta superficial.
2. La muestra se hará pasar por la máquina picadora para convertirla en picadillo fino.
3. Transferir al frasco de la muestra y almacenar en refrigeración.

Las muestras de **semisólidos o con fases líquidas y sólidas mezcladas**, como lo pueden ser el que so el chocolate deben desmenuzarse. En la toma de muestra del material ya desmenuzado, se debe seguir con los pasos para *muestras granulares*.⁽⁶⁾

Otro tipo de muestras son las **pastas semiviscosas**, como el budín de leche y los **líquidos que contienen sólidos** tales como las frutas troceadas en almibar, tienen que homogeneizarse, la muestra debe enfrascarse inmediatamente.⁽⁶⁾

Las muestras deben transportarse en frascos de vidrio o plástico. Estos recipientes además de lavarlos perfectamente tienen que secarse cuidadosamente antes del uso. Así mismo con la tapa debe quedar absolutamente seca, ya que puede quedar dentro de las ranuras dando lugar a resultados erróneos durante el análisis.⁽⁶⁾

5.4. Tipos de errores

Para realizar en óptimas condiciones el análisis de nutrientes a nuestro producto terminado y evitar que se produzcan errores ajenos a la eficiencia y exactitud del usuario. El análisis de los alimentos está siempre sujeto a una serie de errores que afectan tanto a su exactitud (su capacidad para ofrecer una respuesta "verdadera") como su precisión (su capacidad para producir una respuesta). Estos errores son de los dos tipos principales que se indican a continuación.⁽⁴⁾

Errores indeterminados. La magnitud de estos errores normalmente no puede predecirse y es por ello esencial que sean detectados, explicados y suprimidos. Se deben a graves errores experimentales o a fluctuaciones ambientales. Ejemplos típicos serían los errores matemáticos en los cálculos o los causados por vibraciones al utilizar una balanza muy sensible, tocar los vasos de precipitado cuando están a peso constante, no leer bien el desarrollo de la práctica.⁽⁴⁾

Errores concretos. Son los inherentes al procedimiento analítico global utilizado, pudiendo ser de naturaleza operacional (técnica o reactivos) o instrumental. Pueden cometerse al "azar" en el sentido de que obedecen a las leyes de la distribución al azar y su frecuencia se sitúa en torno al resultado medio de un gran número de experimentos (es decir, están relacionados con la precisión del método), o "sistemáticos", lo que indica que son constantes y discurren en la misma dirección, por ej., los causados por calibración defectuosa, prejuicios personales e interferencias químicas (es decir, están relacionados con la exactitud del método)⁽⁴⁾

En la determinación analítica de un componente de un alimento intervienen tres fases principales, cada una de las cuales puede ser fuente de error.⁽⁶⁾

- 1) la toma y preparación de la muestra,
- 2) la manipulación de la muestra y
- 3) la media de una característica de la muestra preparada.

Es evidente que si en la primera etapa se comete un grave error, cualquier etapa siguiente resulta inútil y por ello el muestreo debe considerarse una importante operación, con su propio conjunto de problemas y técnicas para salvarlos.⁽⁶⁾

En el área del muestreo, aparte de los errores operacionales e instrumentales, existen dos fuentes principales de error indicadas a continuación.⁽⁶⁾

- **Muestra no representativa del conjunto debido a inhomogeneidad.** Este fallo puede ocurrir en la fase primaria del muestreo, bien por diferencia en la composición entre unidades individuales del alimento de la misma variedad y madurez, o por diferencias en la composición entre las diversas partes del mismo producto alimenticio, por ejemplo, la variación del contenido vitamínico de numerosas coles de la misma variedad y madurez cultivadas individualmente, y la variación del contenido vitamínico entre las hojas exteriores y el cogollo de una col individual. Para compensar éstas variaciones es esencial tomar suficiente cantidad de muestra. Si la precisión de los resultados fuese peor de la que sería de esperar del método usando muestras de referencia, entonces queda manifiesta la existencia de problemas de muestreo y los procedimientos de muestreo deberán reexaminarse.⁽⁶⁾
- **Cambios en la composición del producto durante la preparación de la muestra.** Como ejemplos de esta clase pueden citarse la pérdida o captación de humedad, la pérdida de componentes volátiles y la descomposición química o enzimática de componentes sensibles como las vitaminas. Estos cambios están relacionados con los procedimientos de manipulación como la reducción del tamaño de partícula por trituración, molturación, troceado o pulverización, el grado de mezclado por agitación o sacudida, la necesidad de desecar para estabilizar u obtener una muestra más fácilmente manipulable y los efectos de la duración y condiciones de almacenamiento antes del análisis.⁽⁶⁾

Se ha visto que muchos de estos procedimientos causan cambios indeseables en la composición de nutrientes particulares en alimentos particulares.

5.5. Cómo podemos etiquetar una muestra?

Ya que elegimos la muestra se procede con el *Etiquetado y Hojas de Registro*. La información mínima requerida para identificar la muestra es la siguiente⁽⁴⁾:

- Número consecutivo de la muestra
- Tipo de muestra
- Número del lote o producto
- Fecha y hora de la toma de muestra
- Fecha de recepción en el laboratorio
- Fecha de elaboración del análisis
- Nombre de los integrantes del equipo que analizará la muestra
- Lugar de adquisición y suministrados de la materia prima
- Características especiales

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Nombre de la Técnica usada | |
| Tipo y nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

Fig. 5.1. Hoja de Registro⁽¹⁾

En la hoja de registro,(Fig. 5.1) y también no ubicada en la sección de Resultados, casi al final de cada técnica en el primer bloque) se encuentra una celda que se denomina 1"Cálculos comprobados por"; esto significa que los cálculos sean comprobados por otra persona del equipo, es decir un colaborador, para evitar errores. Otro punto muy importante es el que las determinaciones se deberán hacer por duplicado.

Para reportar los resultados no es necesario tener más de dos cifras significativas o decimales, ya que con una cifra es suficiente y que ésta coincida con el reportado en la bibliografía o del total de muestras. El precisar con más escrúpulo el peso de la muestra o el volumen de agente valorante consumido no mejora el resultado ni aumenta su significado desde el punto de vista analítico industrial.⁽⁴⁾

Algunas recomendaciones que se hacen son las siguientes abreviaciones o símbolos de las unidades que se utilizan en el llenado de la Hoja de Registro⁽¹⁾

| Símbolo | Unidades |
|--------------------------------------|--|
| g | gramo |
| mL | mililitro |
| % p_o/v_o | peso del componente disuelto en 100 mL de disolución |
| % v_o/v_o | volúmen del componente en 100 mL de disolución |
| % p_o/p_o | peso del componente en 100 g de muestra |

6. TECNICAS DE LABORATORIO

En la siguiente sección se ofrece una descripción introductoria a los métodos instrumentales y técnicas especiales para el análisis de alimentos; como la espectroscopía, cromatografía y otras técnicas. Así mismo hacemos la sugerencia del manejo de algunos materiales que son muy usados en el laboratorio, como lo son: la balanza analítica, desecadores, crisoles, pipetas y buretas, etc.

6.1. Pesada

6.1.1. Balanza Analítica

La balanza analítica común es la de tipo semi-micro de un sólo platillo, cuya capacidad es de 100 a 200g y su sensibilidad es de 0.01 a 0.1 mg. Una balanza típica se presenta en la Fig. 6.1.

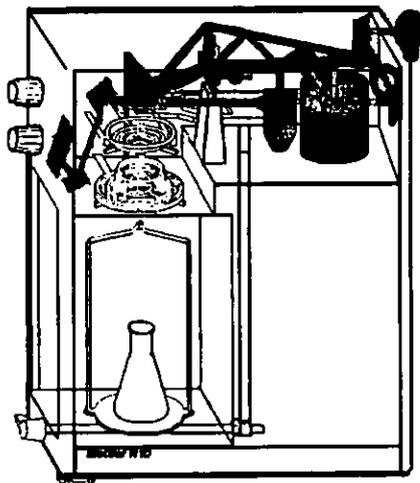


Fig. 6.1 Vista lateral y por secciones de una balanza analítica Mettler.⁽⁴⁾

6.1.2. Balanza Electrónica

El instrumento de la Fig. 6.1 es una **balanza mecánica**, aunque tenga una luz eléctrica para iluminar la escala de lecturas. La pesada se realiza retirando pesas incorporadas, en cantidad equivalente al peso del cuerpo por pesar. La cruz se vuelve a una posición cercana a la original, y la desviación residual se lee en una escala iluminada.⁽⁴⁾

La balanza electrónica, que reemplaza rápidamente a la balanza mecánica, no tiene pesas incorporadas. En ella se utilizan una acción electromagnética para volver la cruz a su posición original. La corriente eléctrica necesaria para generar dicha acción es proporcional a la masa del objeto que se pesa.⁽⁴⁾

El instrumento está calibrado o graduado para permitir la toma de lecturas en unidades de masa.⁽⁴⁾

La balanza electrónica tiene errores potenciales que no se observan en las balanzas mecánicas. Por ejemplo, pueden producirse errores al pesar materiales magnéticos. Es posible comprobar la existencia de este factor moviendo el objeto magnético cerca del platillo vacío y observando si hay fluctuaciones en la lectura de cero. No debe penetrar polvo en el espacio situado entre la bobina y el imán permanente del servomotor.⁽⁴⁾

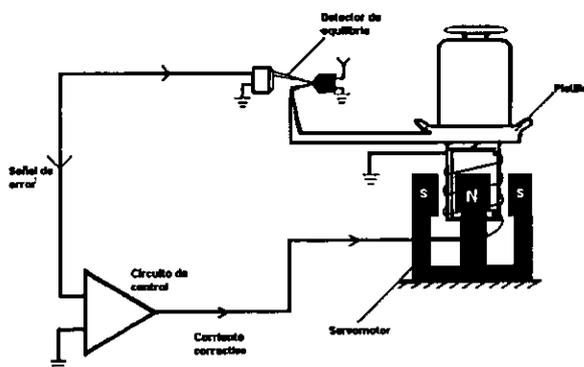


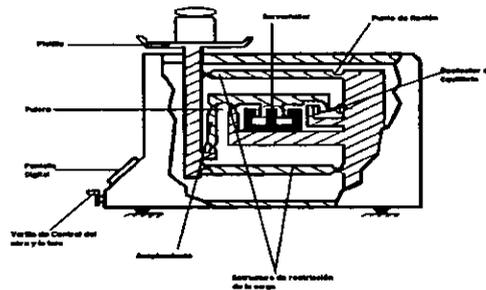
Fig. 6.2. Principio de un servosistema electromagnético⁽⁴⁾

6.1.3. Desarrollo de la pesada

La forma habitual de efectuar una pesada consiste en pesar primero un trozo de papel satinado o un recipiente en el platillo de la balanza. A continuación, la sustancia que se va a pesarse vierte en el papel o el recipiente y se efectúa una segunda lectura. La diferencia entre las dos masas corresponde a la masa de la sustancia agregada. La masa del recipiente vacío se denomina **tara**. Ninguna sustancia química debe colocarse directamente sobre el platillo de la balanza. De este modo la balanza queda protegida contra acciones corrosivas, y es posible recuperar la totalidad de la sustancia que se pesa.⁽⁴⁾

De manera alternativa, a veces es conveniente pesar "por diferencia". primero se pesa un pequeño frasco que contiene al reactivo. Luego se transfiere una parte de éste a un recipiente, y el frasco se pesa de nuevo. La diferencia entre las dos masas es igual a la masa del reactivo transferido. Pesar por diferencia es particularmente útil en el caso de **reactivos higroscópicos** (aquellos que absorben rápidamente la humedad atmosférica), puesto que el frasco que se pesa puede mantenerse cerrado durante las operaciones de pesar.⁽⁴⁾

Deben tomarse precauciones para minimizar los errores de pesada. Durante ésta no debe tocarse el recipiente con las manos descubiertas, puesto que las huellas digitales modifican su masa. Una muestra siempre debe estar a la temperatura ambiente antes de pesarla, para evitar los errores causados por las corrientes de convección del aire. Para enfriar una muestra secada en un horno, generalmente se requiere que permanezca media hora en un desecador a la temperatura ambiente. El platillo de la balanza debe estar en posición de bloqueo cuando en él se coloca una carga, y en posición de semibloqueo cuando se hacen los ajustes de pesada. De ésta forma se protegen las cuchillas (Fig. 6.1) contra el desgaste causado por esfuerzos bruscos. Las puertas de vidrio de la balanza analítica deben estar cerradas durante las operaciones de lectura, a fin de evitar oscilaciones producidas por las corrientes de aire. Las balanzas abiertas que se cargan por arriba deben estar provistas de una protección eficaz alrededor del platillo, para minimizar los efectos de dichas corrientes. las balanzas sensibles se montan frecuentemente sobre una base pesada (como una plancha de mármol) para reducir los efectos de las vibraciones sobre las lecturas. Una balanza se nivela mediante los soportes ajustables, y haciendo uso del nivel de burbuja.⁽⁴⁾

Fig. 6.3 Vista en sección transversal de una balanza electrónica⁽⁴⁾

Deben tomarse precauciones para minimizar los errores de pesada. Durante ésta no debe tocarse el recipiente con las manos descubiertas, puesto que las huellas digitales modifican su masa. Una muestra siempre debe estar a la temperatura ambiente antes de pesarla, para evitar los errores causados por las corrientes de convección del aire. Para enfriar una muestra secada en un horno, generalmente se requiere que permanezca media hora en un desecador a la temperatura ambiente. El platillo de la balanza debe estar en posición de bloqueo cuando en él se coloca una carga, y en posición de semibloqueo cuando se hacen los ajustes de pesada. De ésta forma se protegen las cuchillas (Fig. 6.1) contra el desgaste causado por esfuerzos bruscos. Las puertas de vidrio de la balanza analítica deben estar cerradas durante las operaciones de lectura, a fin de evitar oscilaciones producidas por las corrientes de aire. Las balanzas abiertas que se cargan por arriba deben estar provistas de una protección eficaz alrededor del platillo, para minimizar los efectos de dichas corrientes. las balanzas sensibles se montan frecuentemente sobre una base pesada (como una plancha de mármol) para reducir los efectos de las vibraciones sobre las lecturas. Una balanza se nivela mediante los soportes ajustables, y haciendo uso del nivel de burbuja.⁽⁴⁾

6.2. Secado

Los reactivos y precipitados, así como el material de vidrio, pueden secarse fácilmente en una estufa u horno eléctrico cuya temperatura se mantiene aproximadamente a 110°C (ciertos reactivos o precipitados requieren otras temperaturas de secado). Cuando un crisol para filtración debe llevarse a peso constante antes del análisis gravimétrico, hay que secarlo durante una hora o más, y luego enfriarlo en un desecador. El crisol se pesa y se calienta de nuevo durante

unos 30 min. Cuando dos pesadas sucesivas no difieren en más de 0.3 mg, se considera que el filtro ha sido secado y llevado a *peso constante*. El secado en estufa de los reactivos sólidos o de crisoles para filtración debe efectuarse utilizando un vaso de precipitados y un vidrio (o cubierta) de reloj (Fig. 6.4), a fin de evitar la caída de polvo en el reactivo.⁽⁴⁾

Después de que un reactivo o un crisol se han secado a temperatura elevada, se dejan enfriar hasta la temperatura ambiente en un **deseCADOR**, el cual es una cámara cerrada que contiene una sustancia secadora o **deseCADANTE** (El cloruro de calcio fundido, granular, con un tamaño de partícula que oscila entre cuatro y ocho mallas es una de las sustancias desecantes que más se emplean. Sin embargo, el cloruro de calcio no es un desecante muy eficaz. El ácido sulfúrico concentrado es mejor deshidratante pero es incómodo porque existe peligro continuo de que se produzcan salpicaduras. Si es necesario usar este material, las salpicaduras pueden reducirse al mínimo cubriendo parcialmente la cámara de desecación con porcelana perforada. un desecante mucho mejor es la sílica gel tratada. Este desecante puede adquirirse con un cambio de color visual que indica cuando debe ser regenerado. los desecantes más poderosos son el perclorato de magnesio y el pentóxido de fósforo. Ambos son caros y además su manipulación es delicada. El desecante se coloca bajo un disco con perforaciones situado cerca del fondo de la cámara.⁽⁵⁾

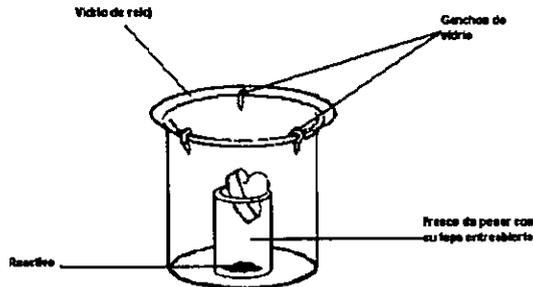


Fig.6.4. Forma de utilizar un vaso de precipitados semicubierto y un vidrio de reloj para impedir la entrada de polvo a un reactivo durante su secado en una estufa.⁽⁴⁾

La superficie de contacto entre la tapa y el cuerpo del desecador se engrasa, con el fin de tener un sellado hermético. Dos tipos comunes de desecadores se muestran en la Fig. 6.5.

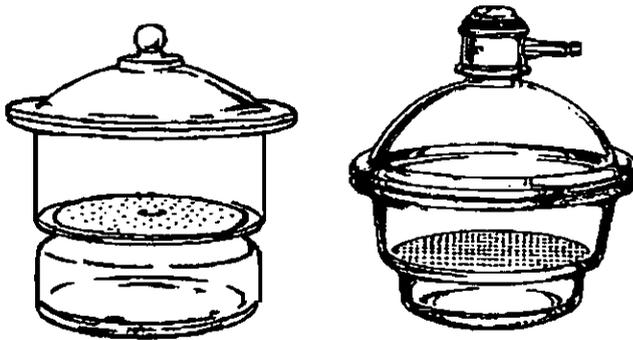


Fig.65 Desecadores. a) Común. b) De vacío. El aire se elimina por aspiración a través del conducto lateral situado en la parte superior, y luego se sella haciendo girar la junta que tiene dicho conducto. El secado a presión reducida es más eficaz⁽⁴⁾

Después de colocar un objeto caliente en un desecador (con la ayuda de algunas pinzas - evite tener contacto con las manos-), se deja la tapa entreabierta durante un minuto o dos hasta que el objeto se haya enfriado un poco. Ello evita que la tapa salte cuando el aire interior se dilata debido al calor del objeto. Antes de ser pesado, un objeto debe dejarse enfriar durante unos 30 min para alcanzar la temperatura del ambiente. La manera correcta de abrir un desecador consiste en hacer deslizar la tapa sobre la superficie que separa las dos partes hasta que aquélla pueda retirarse. El cierre con lubricante impide que la tapa pueda quitarse tirando de ella directamente hacia arriba.⁽⁴⁾

6.3. Filtración.

Es la separación física de dos sustancias químicas (soluto y solvente) mediante la acción de hacer pasar la mezcla a través de una membrana con un poro determinado que solamente permitirá el paso de una de las sustancias, esto por la ayuda de la gravedad o uso de vacío. Los papeles filtro tienen que humedecerse con el solvente antes de añadir el líquido para su filtración. El líquido a filtrar se verterá de forma que se deslice sobre una varilla de vidrio que se apoya en la boca del recipiente y se dirige hacia el embudo. Este proceder evita en gran parte el riesgo de que se produzcan salpicaduras. La utilidad de las varillas agitadoras de vidrio aumenta si se les pone en la parte terminal un protector de goma. (Como protector de goma puede usarse un tubo de goma de diámetro

apropiado y 2.5 cm de longitud, al cual se le denomina gendarme). El protector de goma que cubre a la varilla sirve para desprender las sustancias que queden adheridas a las paredes del recipiente. Por otra parte tales protectores reducen el riesgo de roturas cuando se agita enérgicamente. Las partículas que permanecen en el vaso pueden ser retiradas con un pequeño trozo de papel filtro humedecido, el cual se coloca en el filtro para calcinarlo con el resto del precipitado. El líquido a partir del cual precipita o cristaliza una sustancia se llama **solución madre**. El líquido que atraviesa el filtro se denomina **filtrado**.⁽⁴⁾

Los papeles de filtro pueden emplearse también para obtener sustancias viscosas que van a ser sometidas a pruebas destructivas. Igualmente pueden utilizarse para contener muestras polvorientas.⁽⁴⁾

En el análisis gravimétrico se determina la masa de producto de una reacción a fin de conocer la cantidad de sustancia problema inicialmente presente. Los precipitados para el análisis gravimétrico se recogen por filtración, se lavan y luego se secan. Cuando no es necesario calcinar el precipitado, es preferible recogerlo en un embudo de filtración con vidrio sinterizado como el que se ve en la Fig. 6.6. Tal embudo tiene un disco de vidrio poroso que deja pasar el líquido pero detiene las partículas sólidas. Cuando se utiliza crisol filtrante se seca y se pesa antes de recoger el precipitado. Después de que el producto se ha recogido del precipitado. El crisol filtrante suele emplearse con aspiración mediante una trampa de agua, como se observa en la Fig. 6 7.7.

En algunas técnicas gravimétricas se requiere separar el precipitado y luego **calcinarlo** a temperatura elevada, a fin de transformarlo en un producto bien definido de composición conocida. El papel debe adaptarse firmemente y asentarse con un poco de agua destilada en la cavidad del filtro. Cuando se vierte líquido en el embudo, el vástago de éste debe quedar lleno de una vena ininterrumpida de líquido. El peso del líquido en dicho vástago contribuye a acelerar la filtración.⁽⁴⁾

6.4. Medición de Volúmenes

6.4.1. Buretas

Una **bureta** es un tubo de vidrio con graduación que permite medir el volumen de líquido vertido por él. Esto se realiza leyendo el nivel antes y después de verter líquido. La bureta típica que se muestra en la Fig. 6.8 (a) tiene llave de teflón. Una tapa superior holgadamente adaptada evita la entrada de polvo y vapores. Se garantiza que las buretas de Clase A satisfacen las tolerancias de la Tabla 6.1.⁽⁴⁾

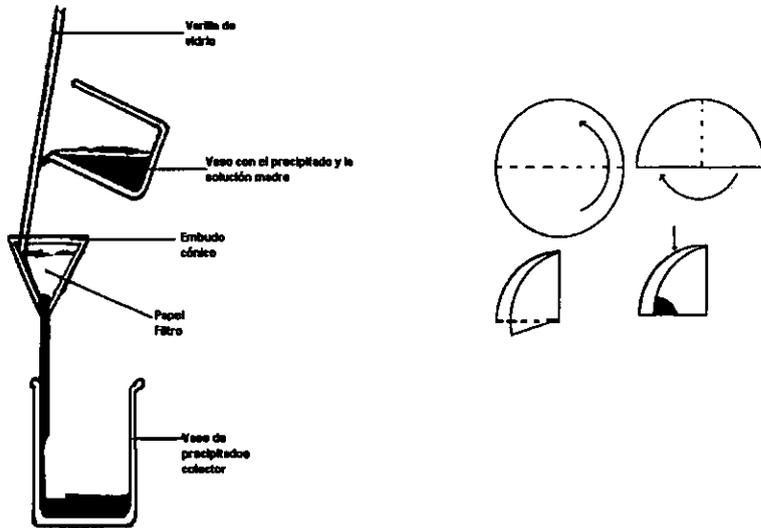


Fig. 6.6. Procedimiento para filtrar un precipitado y forma en que se pliega el papel filtro para colocarlo en un embudo cónico (a) Se dobla el papel por la mitad; (b) Se dobla de nuevo por la mitad; (c) Se le corta una esquina; (d) Se abre del lado que no haya sido roto para introducirlo en el embudo.⁽⁴⁾

Cuando se lee la altura del líquido en una bureta, es preciso que el ojo se sitúe al mismo nivel que la superficie libre del líquido. Ello minimiza el error de **paralaje** en la lectura del nivel. Cuando el ojo se encuentra por encima de este nivel, el líquido parece estar de su nivel real. Cuando el ojo se encuentra demasiado bajo, parece que hay menos líquido.⁽⁴⁾

La superficie de la mayoría de los líquidos forma un **menisco** cóncavo, como se muestra en la Fig. 6.9. Es práctico utilizar una tira de cinta negra, adherida a una tarjeta blanca como fondo, para la posición precisa del menisco. A fin de utilizar esta tarjeta, se alinea la parte superior de la cinta negra con el fondo del menisco y se lee la posición sobre la bureta. Algunas soluciones, en particular las que están fuertemente coloridas, parecen tener dos meniscos. En tales casos, cualquiera de los dos puede utilizarse. Lo que importa es realizar las lecturas en forma reproducible. Para utilizar con la mayor exactitud posible una bureta es necesario seleccionar la parte de una marca que se toma como cero.⁽⁴⁾

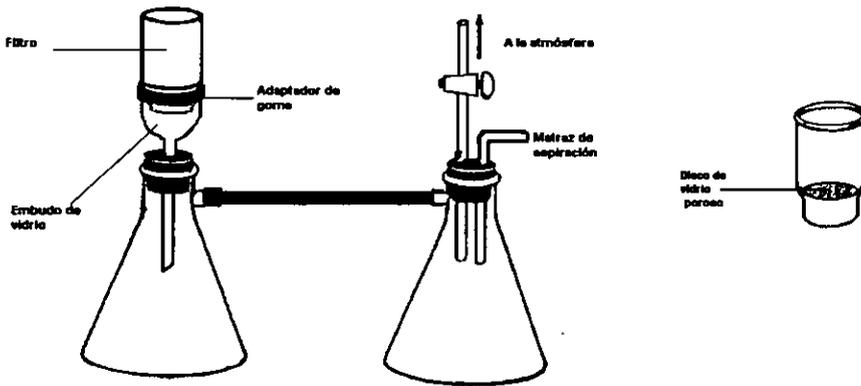


Fig. 6.7. Dispositivo para filtración con un crisol de Goch. La función de la trampa es impedir el posible retorno de agua del desde la trompa de agua hacia el frasco de aspiración (de Kitasato)⁽⁴⁾

Tabla 6.1 Tolerancias de las buretas Clase A

| Capacidad (mL) | Graduación mín. (mL) | Tolerancia (mL) |
|----------------|-----------------------|------------------|
| 5 | 0.01 | +/- 0.01 |
| 10 | 0.05 ó 0.02 | +/- 0.02 |
| 25 | 0.1 | +/- 0.03 |
| 50 | 0.1 | +/- 0.05 |
| 100 | 0.2 | +/- 0.10 |

En la proximidad del punto final de una titulación o valoración, es necesario verter con la bureta menos de una gota a la vez. Ello permite la localización más precisa del punto final puesto que el volumen de una gota a la vez. El volumen de una gota es aproximadamente de 0.05 mL (en una bureta de 50 mL). A fin de verter una fracción de gota, se abre con cuidado la llave hasta que una fracción de gota penda de la punta de la bureta. (También puede verterse una fracción de gota haciendo girar rápidamente la llave, pasando por la posición de apertura). Entonces se hace que la punta de la bureta toque la pared interna del recipiente de vidrio, para transferir el líquido a dicha pared. El recipiente se inclina con cuidado después para que el líquido que contiene arrastra al que se acaba de agregar, y éste se mezcle con el resto del contenido. ⁽⁴⁾

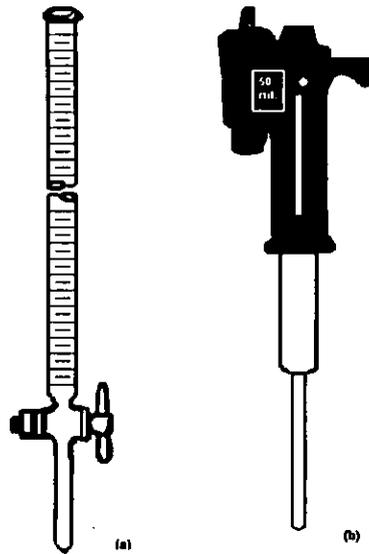


Fig. 6.9 Buretas. a) Bureta de vidrio b) Titulador digital con cartucho de plástico que contiene solución de reactivo.⁽⁴⁾

Cerca del final de una titulación, el recipiente debe inclinarse y hacerse girar de manera que las gotas de reactivo adheridas a la pared y que no reaccionaron se mezclen con el resto del líquido. En la pared de la bureta, el líquido debe escurrir de manera uniforme. Si no lo hace, la bureta debe limpiarse con detergente y un escobillón para buretas. Si esto resulta insuficiente, hay que dejar durante un tiempo la bureta llena con solución de ácido sulfúrico y peroxidisulfato o con mezcla crómica.

El material volumétrico de vidrio nunca debe dejarse en contacto con soluciones detergentes alcalinas, puesto que el vidrio sufre un ataque lento por las bases. La tendencia de los líquidos a adherirse a la pared interna de una bureta puede reducirse mediante un vaciado lento. El vaciar con lentitud una bureta también contribuye a la reproducibilidad de los resultados. Se recomienda que la rapidez de vaciado no exceda de 20 mL /min.⁽⁴⁾

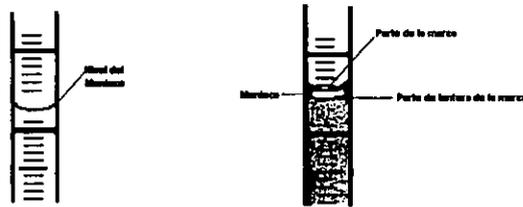


Fig. 6.10. Parte de una bureta que indica el nivel del menisco en 9.68 mL. Siempre debe estimarse la lectura de cualquier escala hasta un décimo de la menor división. esto corresponde a 0.01 mL para la bureta de la figura.⁽⁴⁾

Uno de los errores más comunes al usar una bureta consiste en no expulsar la burbuja de aire que se forma con frecuencia bajo la llave. Cuando tal burbuja se encuentra presente al inicio de una titulación o valoración (Fig.6.11), puede escapar mientras se vierte reactivo y provoca un error en la lectura del volumen de líquido vertido de la bureta. Suele ser posible expulsar la burbuja abriendo completamente la llave durante uno o dos segundos. A veces, una burbuja muy adherente puede eliminarse agitando la bureta con cuidado mientras se vacía el líquido en un sumidero. Cuando se llena una bureta con un solución nueva es recomendable enjuagarla varias veces con esa solución, eliminando cada enjuague. No se requiere llenar por completo la bureta con la solución de lavado.⁽⁴⁾

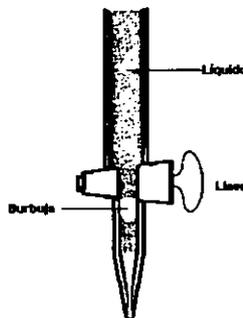


Fig. 6.11. La burbuja de aire que frecuentemente queda atrapa bajo la llave de la bureta debe ser expulsada antes de utilizar el instrumento.⁽⁴⁾

6.4.2. Pipetas y Jeringas

Las **pipetas** se utilizan para verter volúmenes conocidos de líquido. La pipeta volumétrica o aforada, que es la más exacta, se calibra o gradúa para transferir un volumen invariable. La última gota de líquido no escurre fuera de la pipeta, y debe dejarse en ésta. *No se le debe expulsar soplando*. La pipeta graduada se calibra para verter un volumen variable que corresponde a la diferencia entre los volúmenes leídos antes y después de la entrega. Cuando hay duda de si la pipeta debe usarse soplando o no, es preciso consultar el catálogo del fabricante. Las pipetas serológicas tienen graduaciones hasta la punta. La pipeta serológica transfiere 10 mL cuando la última gota se expulsa soplando. (ver Fig. 6.1.2.).⁽⁴⁾

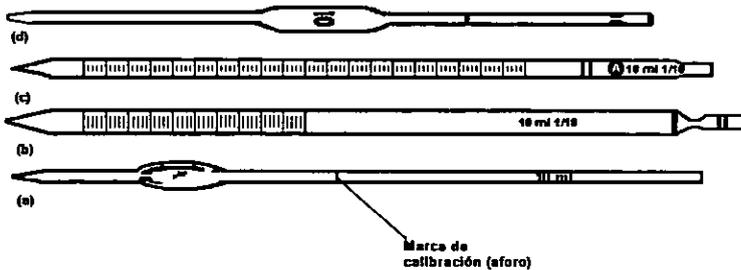


Fig.6.12. Algunas pipetas comunes. a) Volumétrica o aforada, b) graduada (de Mohr), c) de Ostwald-Folin (la última gota se expulsa soplando), d) serológica (la última gota se expulsa soplando)⁽⁴⁾

| Capacidad (mL) | Tolerancia (mL) |
|------------------|-----------------|
| 0.5 | +/- 0.006 |
| 1 | +/- 0.006 |
| 2 | +/- 0.006 |
| 3 | +/- 0.01 |
| 4 | +/- 0.01 |
| 5 | +/- 0.01 |
| 10 | +/- 0.02 |
| 15 | +/- 0.03 |
| 20 | +/- 0.03 |
| 25 | +/- 0.03 |
| 50 | +/- 0.05 |
| 100 | +/- 0.08 |

Tabla 6.2. Tolerancia de las pipetas volumétricas Clase A⁽⁴⁾

6.5. Calcinación

Para calcinar un precipitado como el $\text{Fe}(\text{OH})_3$, primero se colecta en papel filtro sin cenizas. Entonces se permite que se seque por completo (de preferencia toda una noche), protegiéndolo del polvo con un vidrio de reloj. Con cuidado se retira el papel del embudo, se pliega como en la Fig. 6.13, y se transfiere a un crisol de porcelana que se ha llevado a peso constante por medio de varios ciclos de calentamiento, enfriamiento en un desecador, y medición del peso. Junto con el crisol se debe calentar, enfriar y pesar su tapa.⁽⁴⁾

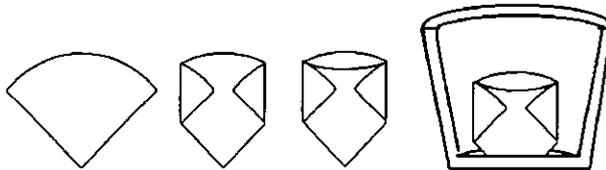


Fig.6.13. Formas en que se pliega el papel filtro y se le coloca dentro de un crisol para la calcinación.

El papel filtro y el precipitado se introducen en el crisol y se secan cuidadosamente con una llama pequeña, como se muestra en la Fig. 6.14. La llama debe dirigirse a la parte superior del crisol, que estará destapado. es necesario evitar el chisporroteo. Una vez que el papel filtro está seco, se *calcina* incrementando la temperatura de la llama. La tapa del crisol se mantiene a la mano a fin de sofocar las llamas si el papel se inflama. Para manipular el crisol y su tapa se emplean pinzas, no las manos. Cualquier residuo de carbón que quede en el crisol o su tapa debe quemarse dirigiendo contra él la llama del mechero. La calcinación se completa calentando el fondo del crisol a la máxima temperatura de la llama (llama azul) durante 15 min.⁽⁴⁾

Después de la calcinación, el crisol y su tapa se enfrían brevemente al aire y después en un desecador durante 30 min. Junto con su contenido, se llevan a peso constante por medio de calentamientos repetidos.⁽⁴⁾

6.6. Métodos Cromatográficos

La cromatografía es un proceso físico dinámico en el cual los componentes moleculares de una mezcla son separados debido a sus diferentes afinidades hacia dos sustancias referencias como las fases, una que es fija o

estacionaria, y la otra, móvil. La fase móvil puede ser un líquido, de donde surge un grupo de técnicas conocido como cromatografía líquida; o puede ser gaseosa, en cuyo caso la técnica básica se conoce como cromatografía de gases. Ambas técnicas tienen un gran valor para el analista de alimentos.⁽²⁾

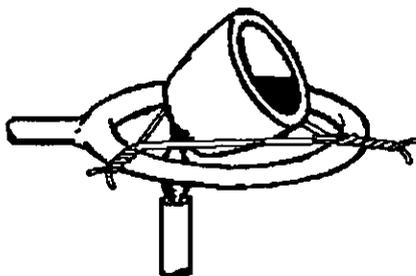


Fig. 6.14. Colocación de un crisol sobre un mechero.⁽⁴⁾

6.6.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina o delgada constituye otro método para separar y, en algunos casos identificar mezclas de dos o más compuestos orgánicos. En algunos aspectos esta técnica es similar a la cromatografía en columna y en papel.⁽²¹⁾

En principio, la práctica de la cromatografía en capa fina es sencilla, como se muestra en la Fig. 6.15. Se cubre una placa de vidrio con una capa fina de un adsorbente adecuado, se coloca en el origen de la placa una mancha de una solución del compuesto orgánico (o mezcla) en estudio, se deja que un disolvente adecuado ascienda por la capa del adsorbente y el compuesto (o compuestos) se localizan en la placa, directamente en el caso de compuestos coloridos o con la ayuda de un indicador (o utilizando luz ultravioleta) cuando los compuestos son incoloros.⁽²¹⁾

Los diversos compuestos ascienden por la capa de adsorbente a velocidades diferentes con relación al disolvente y de esta forma se realiza la separación de los componentes de una mezcla. A veces es posible identificar los componentes de la mezcla midiendo las razones de emigración de las manchas con respecto a la del frente del disolvente y estableciendo comparaciones con el comportamiento de compuestos conocidos.⁽²¹⁾

Prácticamente, pueden emplearse las mismas consideraciones tanto en cromatografía de columna como en capa fina para determinar el grado en que el compuesto en cuestión se mueve a lo largo de la superficie del adsorbente. El compuesto que avanza se ve atraído a zonas polares de la superficie del adsorbente por fuerzas electrostáticas, quedando reversiblemente ligado a la misma. Esta interacción competitiva triple entre soluto, disolvente y adsorbente establece las proporciones relativas en que el frente del disolvente y el soluto asciende por la capa de adsorbente en la placa de vidrio.⁽²¹⁾

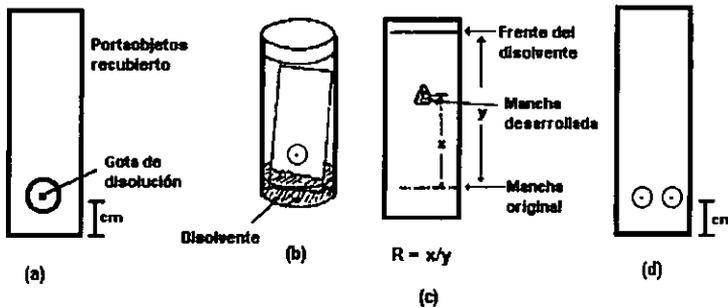


Fig. 6.15 Cromatografía en capa fina. a) Mancha original de la solución. b) Desarrollo del cromatograma. c) Cálculo del valor de R_f . d) Manchas originadas por dos soluciones.

Como en la cromatografía en columna, un soluto se ve atraído por el adsorbente tanto más intensamente cuanto mayor es su polaridad. De esta forma, compuestos como alcoholes, ácidos carboxílicos y aminas son atraídos por el adsorbente con mayor fuerza que compuestos tales como hidrocarburos y sus derivados halogenados. En consecuencia, el primer tipo de compuestos asciende por la capa de adsorbente con mayor lentitud que el segundo. La actividad del adsorbente influye asimismo en el grado de emigración del soluto. Los adsorbentes más activos establecen "ligaduras" relativamente intensas con las moléculas de soluto a lo largo de la superficie de tales adsorbentes es relativamente lenta. Los dos adsorbentes más corrientes son alúmina activa y gel de sílice. Como en la cromatografía en columna, las actividades de estos adsorbentes se ven afectadas en gran manera por su contenido de agua. Las muestras más activas son aquellas que contienen menor cantidad de agua.⁽²¹⁾

La polaridad del disolvente influye asimismo en el grado de ascensión del soluto por la capa fina de adsorbente determinados, el cambio de un disolvente menos polar a otro de mayor del soluto por parte del disolvente, y, por tanto, el soluto ascenderá en mayor grado por el adsorbente en el caso del disolvente más polar.⁽²¹⁾

Como en la cromatografía de papel, es posible el cálculo de valores de R_f en la cromatografía en capa fina. El valor de R_f se define como la relación entre la distancia recorrida por soluto y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo (Fig. 6.15 c). Lógicamente, los valores de R_f de un compuesto determinado varían ampliamente con los cambios de soluto o de disolvente y son menores de uno.⁽²¹⁾

6.7. Métodos Espectroanalíticos

6.7.1. Análisis Colorimétrico ó Espectrofotometría Visible

La radiación electromagnética puede ser considerada como energía propagada en forma de ondas. El rango de longitudes de onda se extienden desde menos de un angstrom hasta más de 2000 m. Las regiones del espectro electromagnético se muestra en la Fig. 6.18 con la naturaleza de los cambios atómicos y moleculares que se encuentran asociados con la radiación correspondiente. Ingle y Crouch en 1898 desarrollando métodos espectroanalíticos para investigar y medir estos cambios y efectos. En el análisis de alimentos, los métodos generalmente usados son aquellos que miden la emisión o la absorción de la radiación en las longitudes de onda ultravioleta (UV), visible o infrarroja.⁽²⁾

Cuando a través de un líquido se hace pasar un haz de luz blanca parte de la radiación es absorbida por la muestra. El color de la solución será el complementario del absorbido; así, si se absorbe el anaranjado, el color observado es el azul-verdoso. Un efecto similar tiene lugar cuando la luz se refleja sobre una superficie. La longitud de onda transmitida de la absorción puede relacionarse con la concentración, con tal que la prueba se realice en las mismas condiciones.

El color a medir puede deberse bien a la presencia de un pigmento añadido o bien a la formación de un producto coloreado por reacción química. A partir de la intensidad del color obtenido, al reaccionar la muestra con los reactivos del color, se determina la concentración de la sustancia problema y a éste tipo de análisis se le conoce como análisis colorimétrico. Las mediciones se realizan en fotómetros especialmente diseñados para comparar la intensidad de luz transmitida por la solución problema frente a la de un blanco (solvente puro o solvente puro y reactivos sin la muestra). Durante el paso del haz de luz a través de la solución ciertas longitudes de onda resultan absorbidas, mientras que otras son transmitidas y las que originan su coloración. La relación entre el color transmitido y el absorbido se indican en la Tabla 6.3.⁽⁶⁾

| <i>Transmitido</i> | <i>Absorbido</i> | <i>Long de onda absorbida (nm)</i> |
|--------------------|------------------|------------------------------------|
| verde azulado | rojo | 650 - 700 |
| azul verdoso | anaranjado | 600 - 650 |
| azul | amarillo | 570 - 600 |
| púrpura | verde | 490 - 570 |
| rojo | azul verdoso | 475 - 490 |
| amarillo | azul | 440 - 475 |
| verde amarillento | violeta | 400 - 440 |

Tabla 6.2. Color absorbido o transmitido⁽⁶⁾

El diseño del equipo existente en el mercado es muy variado aunque su funcionamiento es básicamente similar.⁽⁴⁾

El medio más simple de seleccionar una determinada longitud de onda es usar un filtro. Normalmente en su fabricación se procura que el nivel de transmitancia sea máximo y el rango de longitud de onda transmitida sea estrecho (normalmente de 40 a 50 nm).⁽⁶⁾

6.7.2. Colorimetría y Espectrofotometría

La colorimetría o análisis colorimétrico es la medición de la concentración de un compuesto colorido en solución. Dado que la aparición de color se debe a la absorción de ciertas longitudes de onda de la luz visible, el método debería llamarse con más exactitud análisis de absorcimétrica. Esto elimina el uso de "colorimetría", palabra que también describe el método empleado para la medición absoluta del color de sólidos y de líquidos. El color de una solución puede ser inherente a la sustancia disuelta, o puede ser generado por adición de un reactivo que reacciona con un compuesto no colorido para formar un color. Dentro de ciertos límites, la intensidad del color formado será proporcional a la concentración del compuesto original colorido o sin éste en solución, y puede medirse visual o instrumentalmente. Las soluciones en tubos de ensayo o en probetas pueden ser comparadas a simple vista. Los colorimétricos visuales sencillos o comparadores del color son aditamentos visuales que sostienen tubos o celdas y usan luz externa natural o artificial como fuente de luz. Es posible estimar la concentración de un compuesto haciendo una comparación de la intensidad de color de la luz transmitida de la solución de prueba con la de soluciones estándares preparadas, o bien con cristales coloridos estándares permanentemente calibrados. Sin

embargo, el ojo humano está sujeto a la fatiga y tiene poca sensibilidad fuera del rango de longitud de onda de 450 - 675 nm..^(2,4) (Ver Fig. 6.16).

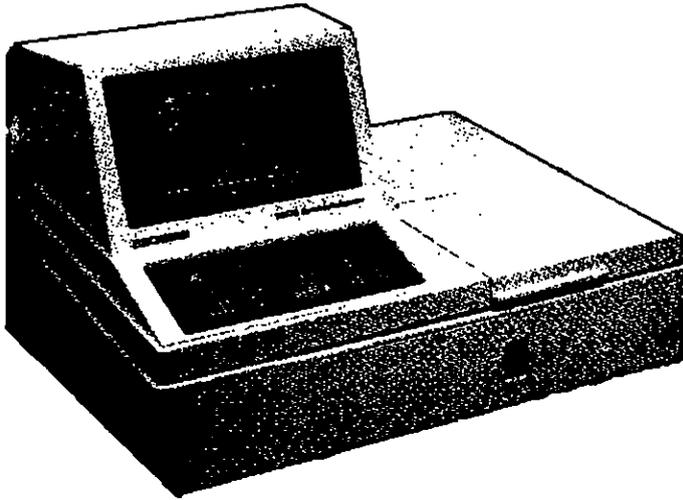


Fig. 6.16. Espectrofotómetro de Beckmann

6.7.3. Fotocolorímetros

Los colorímetros fotoeléctricos son instrumentos sencillos en los que el ojo se reemplaza por una fotocelda sensible a la luz, ya sea una celda delgada de selenio o un fototubo y la fuente de luz es una lámpara incandescente. Se utilizan filtros ópticos para aislar las regiones espectrales de modo que solamente las longitudes de onda seleccionadas de la luz transmitida por la solución colorida pueden hasta la fotocelda detectora. En tales instrumentos, también conocidos como fotómetros con filtro, la corriente originada por la luz que cae sobre la fotocelda es amplificada e indicada como densidad óptica, absorbancia o transmitancia en un medidor o mediante un indicador digital. En especial, se utilizaban filtros insertables de gelatina, cada uno con un paso de banda de 40 nm o menos, que permitan mediciones selectivas de absorbancia en el rango de 400 - 710 nm. Estos instrumentos son relativamente baratos y resultan adecuados para un número de determinaciones en el análisis de alimentos, en donde sólo se requiere una medición en una banda amplia de absorción. Instrumentos de este tipo, equipados con celdas de paso, se utilizan en sistemas analizadores

automáticos de inyección de flujo y de flujo interrumpido, incluyendo instrumentos para el análisis de inmunoensayo enzimático automatizado de inmunoabsorbencia ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés, Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

7. Bloque I:

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

7.1 OBJETIVOS:

7.1.1. Objetivo General

Analizar el contenido de las biomoléculas mayoritarias de un alimento (en este caso de un producto terminado), por medio de diferentes técnicas que son elementos de un Análisis Bromatológico.

7.1.2. Objetivos particulares:

Al desarrollar este proyecto el alumno:

- a) Conocerá que todo alimento esta constituido por agua, mediante la determinación del contenido de agua por vía seca.
- b) Cuantificará el contenido de proteína mediante la determinación de nitrógeno total (N_2 amino y amido) por un método denominado Kjeldahl.
- c) Determinar el nitrógeno no proteico por la composición de aminoácidos a través de la cuantificación de Triptófano.
- d) Cuantificará los lípidos brutos por arrastre de disolvente, permitiendo la clasificación de ellos por cromatografía en capa fina
- e) Realizará una mineralización por vía seca, es decir una cuantificación de micronutrientes, como lo son el Na, Ca, I₂, etc.

7.2. Introducción:

Los alimentos procesado se elaboran dentro de los límites establecidos en las fórmulas de fabricación, satisfaciendo también requerimientos legales y otros establecidos. Esto hasta donde sea posible se logra mediante la estandarización del proceso en cada una de las siguientes etapas de cultivo, la "materia prima", el proceso de elaboración y por último, el producto terminado y su almacenamiento. La creciente capacidad de producción y la complejidad requirieron el desarrollo de técnicas adecuadas para un rápido control y evaluación. Al mismo tiempo se ha intentado reemplazar los métodos subjetivos de evaluación de varias propiedades organolépticas por procedimientos objetivos más precisos. El conocimiento de los constituyentes presentes aun en pequeñas cantidades en los alimentos, ha mejorado en forma notable debido particularmente a que se utilizan nuevas técnicas de separación, identificación y medición.⁽³⁾

En muchos laboratorios de análisis de alimentos, la mayor parte del trabajo de rutina comprende métodos de análisis rápidos y el estudio de aditivos y contaminantes. Los principales componentes de interés son humedad, grasa, proteínas, cenizas y carbohidratos accesibles e inaccesibles. En la práctica los métodos varían según el alimento examinado; también pueden ser empíricos, por ejemplo, los resultados para humedad y la grasa dependen del procedimiento adoptado y, a menudo, lo que se determina sólo es la humedad libre o la grasa libre. Los valores obtenidos para la humedad (más bien las pérdidas por secado) por secado en estufa, incluyen otras materias volátiles, como aceites esenciales, residuos de ácidos volátiles. Se debe poner mucha atención a la preparación de la muestra y al tamaño de las partículas. Los azúcares provenientes de fuentes naturales, como las frutas incluyen una mezcla de diversos compuestos, por lo cual es conveniente reportarlos como el total de sólidos solubles (sin corregir) que se miden mediante una simple determinación refractométrica. Las proteínas se

calculan a partir del nitrógeno total por el método de kjeldahl usando un factor arbitrario, el cual varía según el alimento debido a las diferentes proporciones de aminoácidos presentes. La "fibra" y las "cenizas" son esencialmente términos analíticos; ninguno de los dos representa un componente en particular o un grupo de componentes presente en el alimento original, pero siempre que se aplique un procedimiento estándar al mismo tiempo de alimento, los resultados constituyen una base de interpretación adecuada. En muchas estimaciones es preciso efectuar ajustes debido a interferencias del propio alimento o por contaminación con los reactivos, por lo cual es necesario realizar determinaciones testigo. Algunas veces estos ajustes son necesarios por los cambios que ocurren durante el almacenaje.^(2, 3,5)

La mayor parte de los alimentos que son consumidos, son mezclas complejas de miles de especies químicas. Pero sólo son tres grupos de biomoléculas de origen orgánico como lo son los carbohidratos, los lípidos y las proteínas en conjunto con el agua de origen inorgánico que constituyen la parte principal de los alimentos y generalmente llegan a ser más del 99% de su masa. Sin embargo, el total se haya formado por cientos de compuestos diversos, algunos de ellos en concentraciones de ppm o aún menores. Por lo común, a estos componentes "secundarios" se debe el sabor, el olor y el color característico de los alimentos.⁽³⁾

Para poder cuantificar el contenido de los componentes mayoritarios, sin precisar su naturaleza ni su interés nutritivo, necesitamos hacer uso de una herramienta de la Ciencia de los Alimentos; como lo es el Análisis Bromatológico, que es el tratado de los alimentos y de la dietética. Incluye varias técnicas y procedimientos analíticos de aplicación general para determinar aquellos nutrientes de conocida significación en la dieta humana las cuáles nos informan sobre la cantidad de nutrientes que contienen un alimento, como lo son las proteínas brutas o totales, de lípidos brutos y de cenizas⁽⁵⁾

Existen algunos métodos, como la titulación de Karl Fischer, que determinan el contenido de agua por medio de una reacción estequiométrica. También existen otros métodos que se basan en la destilación, directa o azeotrópica, con un disolvente inmiscible.⁽⁵⁾

También existen otros métodos que están incluidos en este campo analítico, debido a la enorme diversidad de productos alimenticios actualmente disponibles existen métodos muy sofisticados como puede ser el método de cromatografía de alta resolución (CLAR), para determinar ciertas vitaminas o métodos de absorción atómica que sustituyen a los procedimientos químicos clásicos y un poco obsoleto para determinar metales.⁽⁵⁾

En este manual sólo se tratarán las técnicas más sencillas y adecuadas de acuerdo al tiempo y al material con que se cuenta en el laboratorio.

BLOQUE I:

METODOLOGÍA

7.3.1. Determinación del Contenido de Agua

7.3.1.1. Objetivo:

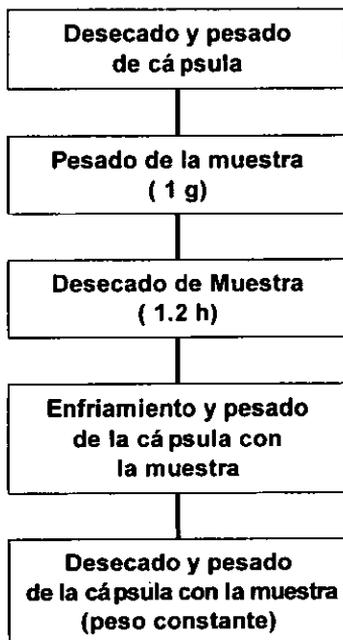
Conocer el contenido de humedad de la muestra.

7.3.1.2. Fundamento:

Todos los alimentos, cualquiera que sea el método de industrialización al que hayan sido sometidos, contienen agua en mayor o menor proporción. Las cifras de contenido de agua varían entre un 60 y 95% en los alimentos naturales. En los tejidos vegetales y animales, puede decirse que existe en dos formas generales: "agua libre" y "agua ligada". El agua libre o absorbida, que es la forma predominante, se libera con gran facilidad y es estimada en la mayor parte de los métodos usados para el cálculo del contenido de agua. El agua ligada se halla en los alimentos como agua de cristalización (en los hidratos) o ligada a las proteínas y a las moléculas de sacáridos y absorbida sobre la superficie de las partículas coloidales. Estas formas requieren para su eliminación en forma de vapor un calentamiento de distinta intensidad. Parte de la misma permanece ligada y/o coordinada a compuestos del alimento incluso a temperaturas que lo carbonizan.⁽⁵⁾

El método de determinación del contenido de agua consiste en deshidratar la muestra en una estufa hasta tener un peso constante, a determinadas temperaturas y presiones. Pero en el transcurso del desarrollo de éste método pueden formarse hidratos, lo que dificulta más la eliminación del agua por vaporización. Esta técnica es aplicable a todos los productos alimenticios excepto los que puedan contener compuestos volátiles distintos del agua o los que son susceptibles a la descomposición a 100° C.⁽⁵⁾

7.3.1.3: Secuencia Experimental de: **Determinación del contenido de agua.**



7.3.1.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o equipo | Reactivos a utilizar |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 2 cápsulas de níquel o porcelana (de ser posible con tapas que ajusten perfectamente)• 1 Estufa de aire• 1 desecador• 1 pinzas para cápsula de porcelana o crisol | <ul style="list-style-type: none">• Cloruro cálcico seco (contenido en el desecador• Muestras problema |

Procedimiento experimental:

1. Marcar con lápiz en un lugar determinado el número y nombre que identifique la muestra. Pesar la cápsula vacía con la tapa hasta el mg más próximo. Calentar o secar la cápsula y la tapa en la estufa durante 15 min. a 600°C y transfiera con ayuda de unas pinzas para cápsula a un desecador para que se enfríen (alrededor de 10 min. para las cápsulas metálicas y unos 20 min. para las de porcelana). Repita la operación cuantas veces sea necesario hasta encontrar el peso constante.
2. Transferir 1.0 g de muestra ya seleccionada, a la cápsula. Colocar la tapa y pesar con su contenido, tan rápidamente y precisamente como sea posible, hasta el mg más próximo.
3. Quitar la tapa y colocar cápsula y tapa en la estufa evitando el contacto de la cápsula con las paredes. Desecar durante 1.2 h (72 min.) a una temperatura de

600°C. En el caso de productos que no se descomponen durante largos períodos de desecación, es permisible la desecación durante más de 16 horas.

4. Retirar la cápsula de la estufa, colocar la tapa, dejar enfriar y colocar en un desecador, volver a pesar después de 24 horas. (Recuerde que todo este procedimiento debe llevarse a cabo con ayuda de pinzas para cápsula o para crisol).
5. Desecar durante una hora adicional para comprobar que se ha llegado al peso constante.
6. Pesar finalmente y calcular el contenido de agua.

7.3.1.6. Procesamiento de Datos:

7.3.1.6.1. Cálculos

Para el obtener el valor del contenido de agua se necesita hacer uso de la siguiente fórmula

$$\frac{W_2 - W_3}{W_1}$$

donde:

Peso (g) de la muestra = W_1

Pérdida de peso (g) = W_2

Peso (g) muestra desecada = W_3

Entonces:

$$\text{Humedad (\%)} = (W_2 / W_1) \times 100$$

$$\text{Sólidos totales (\%)} = (W_3 / W_1) \times 100$$

7.3.1.6.2. Resultados

Vierta todos los datos en la Hoja de Registro:

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Nombre de la Técnica usada | |
| Tipo y nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

7.3.2. Cuantificación de Proteínas (Método Kjendahl)

7.3.2.1. Objetivo

Extraer y cuantificar las proteínas en los alimentos para conocer los principales parámetros usados para establecer la calidad proteica de los alimentos y diferenciar los mejores alimentos proteicos, para implementarlos a la dieta.

7.3.2.2. Fundamento

La función principal de las proteínas presentes en nuestros alimentos es aportar el nitrógeno y los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas corporales y las demás sustancias nitrogenadas.

El metabolismo de las proteínas corporales, puede expresarse por la diferencia entre el aporte y la eliminación de nitrógeno, diferencia que se llama equilibrio nitrogenado. Si es positiva, como la que se produce durante el crecimiento, convalecencia, cicatrización o gestación, entonces la retención de nitrógeno sirve para depósito tisular y síntesis proteica. Si fuese negativa, como la que se produce durante una malnutrición proteica, Heridas, infecciones, etc. entonces se pierde nitrógeno. En el hombre adulto, el equilibrio nitrogenado es igual a 0 pues se mantiene aunque el aporte proteico exceda mucho las necesidades corporales ya que el exceso de proteína se convierte en energía y urea.

Ya que las necesidades proteicas aumentan durante el crecimiento (crianza, embarazo) y la producción de secreciones (mujer lactante, leche de vaca, gallinas en período de puesta) .Las heridas, quemaduras, infecciones, ataques parasitarios, malnutrición anterior y otros factores, también pueden aumentar las necesidades proteicas. Las necesidades proteicas del adulto pueden calcularse determinado el aporte proteico mínimo, necesario para mantener el equilibrio nitrogenado; en la lactancia o en la infancia, se considera como aporte proteico mínimo aquel que permite una tasa del crecimiento óptima. Sin embargo, en el adulto, frecuentemente, las necesidades proteicas se determinan a partir de la inevitable pérdida de nitrógeno, provocada por un régimen desprovisto de proteínas.

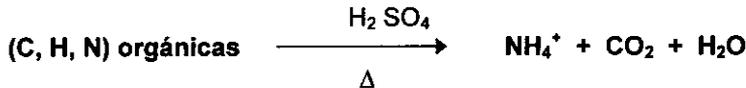
Cuantificación de Proteínas (Método Kjendahl)

Aún se desconocen los efectos que sobre la salud representa a largo plazo un aporte proteico mínimo (funcionamiento de los órganos, resistencia a las enfermedades) y la productividad en el trabajo; parece que los jóvenes adultos, alimentados durante largos periodos con cantidades de proteínas de huevo estrictamente suficientes para mantener el equilibrio nitrogenado, presentan algunas anomalías de carácter bioquímico.

La cuantificación de proteínas y compuestos nitrogenados por el método **Kjeldahl**, desarrollado en 1883 sigue siendo uno de los más exactos y ampliamente utilizados; ésta técnica se resume en tres pasos:

1. Digestión
2. Destilación
3. Titulación o Cuantificación

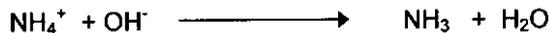
En el primer paso la sustancia nitrogenada se digiere en H_2SO_4 a ebullición, para convertir el nitrógeno en ion amonio y oxidar los demás elementos presentes como se muestra en la reacción



Los compuestos de Hg, Se y Cu catalizan el proceso de digestión. Para incrementar la velocidad de reacción, se eleva el punto de ebullición del H_2SO_4 en una bomba de microondas especialmente útil y sólo requiere de 15 min. el proceso de digestión que se presenta enseguida es aplicable a las aminas y amidas (proteínas). es necesario efectuar modificaciones para compuestos nitro, nitritos, compuestos azo, cianuros y derivados de la hidrazina. (También se recomienda la digestión de Kjendahl para destruir desechos orgánicos altamente tóxicos).

Después de que termina la digestión, la disolución que contienen NH_4^+ se hace básica y el NH_3 formado se destila en un recipiente receptor que contiene una cantidad conocida de HCl.

Destilación de NH_3 :



Colección de NH_3 en HCl:



Cuantificación de Proteínas (Método Kjendahl)

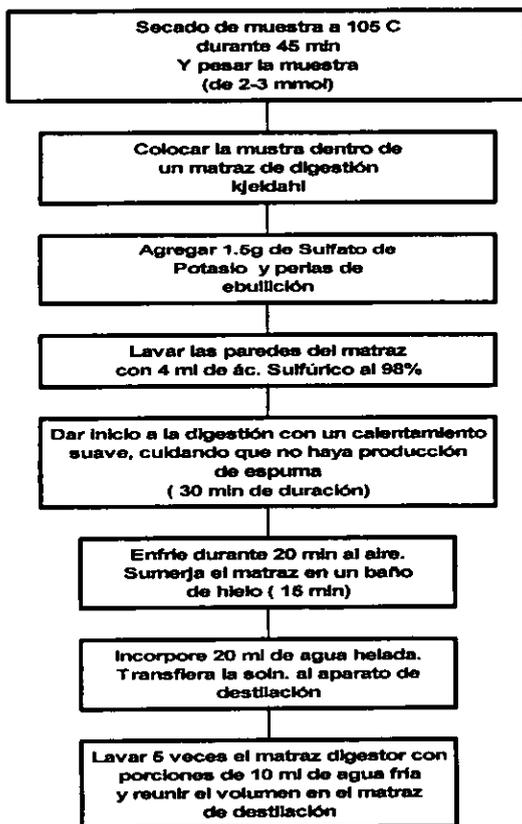
El HCl que no reaccionó se titula con NaOH para determinar cuánto HCl se consumió con NH_3 . Puesto que la disolución por titular contiene tanto HCl como NH_4^+ , es preciso seleccionar un indicador que permita la titulación de HCl sin que comience la de NH_4^+ . El verde de bromocresol (intervalo de transición de 3.8 a 5.4) satisface esta necesidad.

Titulación de HCl:

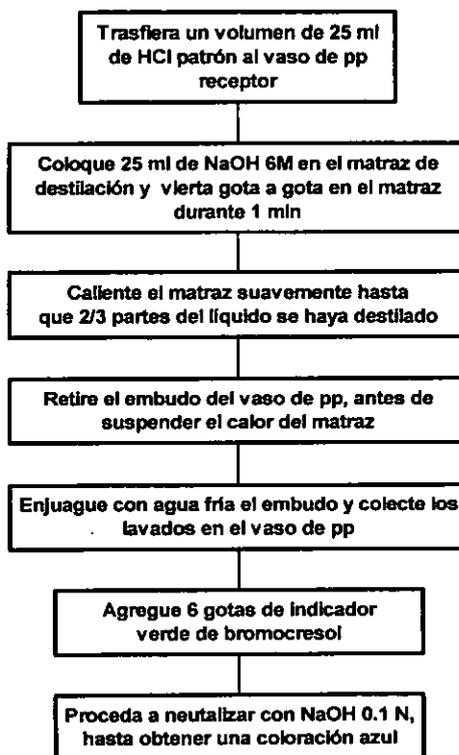


7.3.2.3. Seguimiento Experimental. Cuantificación de Proteínas y Compuestos Nitrogenados

A: Digestión



B: Destilación



7.3.2.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o equipo | Reactivos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Matracas de kjeldahl para digestión • Aparato de destilación con vapor o directa (ver figura) • 1 espátula • 1 balanza analítica • 1 bureta de 50 ml de vidrio con llave de teflón o virio esmerilado • 3 matraces erlenmeyer de 125 ml de vidrio • 1 vaso de precipitado de vidrio de 100 mL 1 soporte universal completo | <ul style="list-style-type: none"> • H₂SO₄ concentrado (93-98%) • HCl de conc. 0.1 N estandarizado • Hg • K₂SO₄ en polvo o anhidro • Disoln. de Na₂SO₄ o sulfuro • Gránulos de cinc • Indicador ácido-base verde de bromocresol • Disoln. de NaOH de conc. 0.1 N |

NOTA:

Los reactivos deben normalizarse valorándolos con patrones primarios titularse luego el uno con el otro. hágase una determinación en blanco sustituyendo por 2 g de sacarosa el peso de la muestra, para efectuar las oportunas correcciones por el contenido en N de los reactivos.

Procedimiento experimental:

A. Digestión

1. Se seca el problema a 105°C durante 45 min. y se pesa con exactitud una cantidad que produzca 2 a 3 mmol de NH₃. Coloque la muestra en un matraz de kjendahl de 500 mL totalmente seco de manera que la menor cantidad posible se adhiera a la pared. se añaden 10 g de K₂SO₄ y un cristal de CuSO₄ (aprox. 0.2 g). se transfieren 25 mL de H₂SO₄ al 98% (p/p), de forma que arrastre el sólido adherido a la pared. (Precaución: El H₂SO₄ concentrado es muy corrosivo. Si cae sobre la piel, debe lavarse de inmediato con una disoln. al 20% de NaHCO₃.)
2. En una campana (vitrina) se colocan los matraces sobre el digestor. Si no se dispone de un digestor el matraz con pinzas a 30° de inclinación, hacia el lado opuesto al operador. Se calienta suavemente con un mechero hasta que cese la producción de espuma y la solución se vuelva homogénea. Se prosigue con una ebullición suave durante otros 30 min.

3. El matraz se deja enfriar durante 30 min al aire y luego se sumerge en un baño con hielo durante 15 min. Con agitación constante se añaden lentamente 50 mL de H₂O helada. se disuelve cualquier sólido que se haya cristalizado. el líquido se transfiere a un matraz para destilación. el matraz de Kjendahl se lava 5 veces con porciones de 10 mL de agua, y se reúnen los lavados en el matraz para destilación.

B. Destilación

1. Se monta un equipo como el de la Fig.7.3.2.1.las conexiones deben ser herméticas. Un volumen de 50 mL de HCl patrón se transfiere con un pipeta al vaso de precipitados receptor, y el embudo se sujeta en su posición por debajo del nivel del líquido.

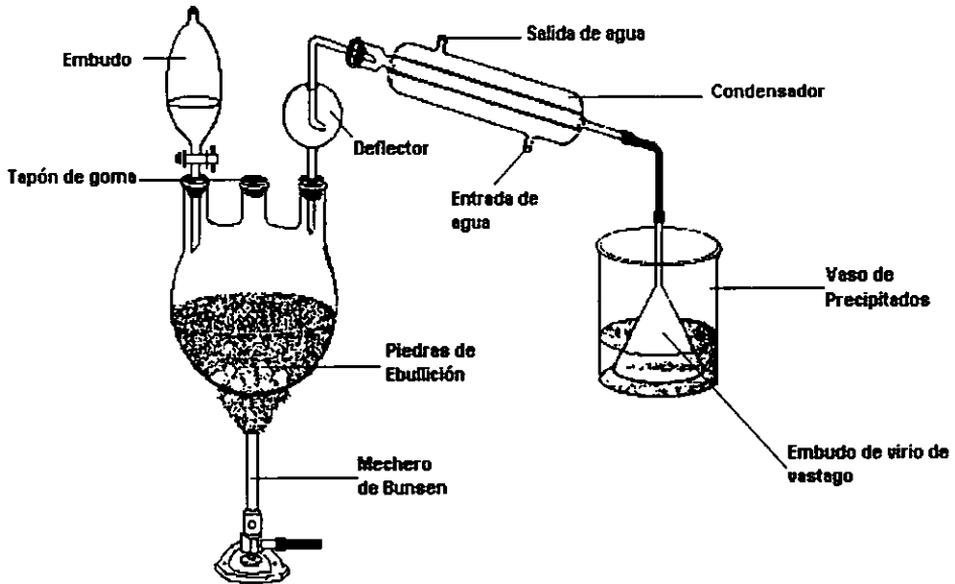


Fig. 7.3.2.1. Montaje de Destilador Kjendahl⁽⁴⁾

2. Vertimos 50 mL de hidróxido de sodio (NaOH) de concentración 6 M, en un embudo de separación, y de aquí se vierten gota a gota en el matraz de destilación durante un periodo de 1 min. No debe dejarse pasar el último mililitro por la llave de paso, de manera que el gas no escape del matraz. se cierra la llave de paso y se calienta el matraz. suavemente hasta que 2/3 partes del líquido hayan destilado.

- Se retira el embudo del vaso de precipitados antes de dejar el mechero del matraz (para evitar que el destilado regrese por vacío hacia el condensador). se enjuaga completamente el embudo con agua destilada y se recogen los lavados en el vaso de precipitados. Agregue 6 gotas de la solución del indicador verde de bromocresol al vaso de precipitados y se titula cuidadosamente con NaOH a conc. 0.1 N hasta el punto final, de color azul. Lo que busca es la primera aparición del color azul pálido.

7.3.2.6. Procesamiento de datos

7.3.4.6.1. Cálculos

Se calcula el porcentaje en peso de nitrógeno en el problema de la siguiente manera:

$$\text{Nitrógeno total (\%)} = \frac{(V_2 - V_1) \times N}{W} \times 1.4$$

$$\text{Proteína bruta (\%)} = \frac{(V_2 - V_1) \times N}{W} \times 1.4 \times 6.25^*$$

Donde:

Peso (g) de la muestra problema = W_1
 Volumen (mL) de soln. De HCl requerido
 para la prueba en blanco = V_1
 Volumen de soln. HCl requerido en la
 muestra problema = V_2
 Normalidad del HCl = N

*El valor de proteína bruta se calcula a partir del nitrógeno total utilizando el factor apropiado: valor general: 6.25; productos cárnicos 6.25; productos lácteos 6.38; productos de cereales 5.70.

7.3.2.6.2. Resultados

Verter todos sus datos de la Hoja de Registro.

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Tipo o nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Nombre de la Técnica usada | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

7.3.3. Cuantificación de Triptófano

7.3.3.1. Objetivo:

Determinar cuantitativamente el contenido de triptófano en diferentes muestras de cereales mediante una técnica espectrofotométrica

7.3.3.2. Fundamento:

Las proteínas son polímeros cuyas unidades básicas son los aminoácidos o iminoácidos y que se encuentran unidos por un enlace peptídico:

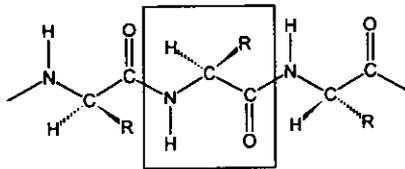


Fig. 7.3.3.1. Enlace Peptídico

Algunos de los aminoácidos requeridos se forman en el cuerpo a medida que se necesitan pero otros sólo pueden obtenerse del alimento. A éstos se llaman *aminoácidos esenciales (indispensables)*. Frecuentemente las proteínas de cereales son pobres en lisina y en algunos casos deficientes en triptófano y treonina usualmente los granos, de oleaginosas y las nueces están escasos de metionina y lisina, mientras que las leguminosas suelen ser pobres en metionina. los aminoácidos indispensables que resultan más deficiente con relación a las necesidades, se llaman "aminoácidos limitantes"⁽⁸⁾

El triptófano fue aislado en 1902 por F:G: Hopkins de un hidrolizado de caseína obtenido con enzimas pancreáticas (Fig.7.3.3.2.). Las proteínas animales lo contienen en cantidades relativamente pequeñas (1 - 2%), siendo todavía menores en las proteínas de cereales (alrededor del 1%). Es de resaltar el contenido extraordinariamente elevado de triptófano de la lisina (7.8%). En la hidrólisis ácida de las proteínas se destruye totalmente. Desde el punto de vista biológico, el triptófano es un aminoácido esencial de extraordinaria importancia, ante todo como precursor del ácido nicotínico.⁽¹¹⁾

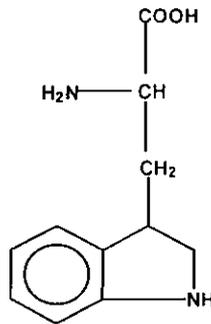


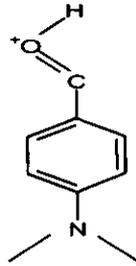
Fig.7.3.3.2. L- Triptófano (Trp).⁽¹¹⁾

Ya que los aminoácidos, péptidos y proteínas son componentes importantes de los alimentos, proporcionan los elementos necesarios para la síntesis proteica. Por otro lado, los aminoácidos y péptidos contribuyen directamente al sabor de los alimentos y son precursores de los componentes aromáticos y las sustancias coloreadas que se forman mediante las reacciones térmicas y/o enzimáticas que ocurren durante la obtención, preparación y almacenamiento de los mismos. Sólo los aminoácidos tirosina, triptófano y fenilalanina contienen dobles ligaduras que absorben energía radiante del ultravioleta en forma máxima de 200 - 230 nm y 250 - 290 nm respectivamente. Al hacer esta determinación hay que recordar que todos los aminoácidos, por su estructura química, absorben a 210 nm. En tales reacciones también pueden participar otros componentes de los alimentos, por ejemplo carbohidratos.⁽¹¹⁾

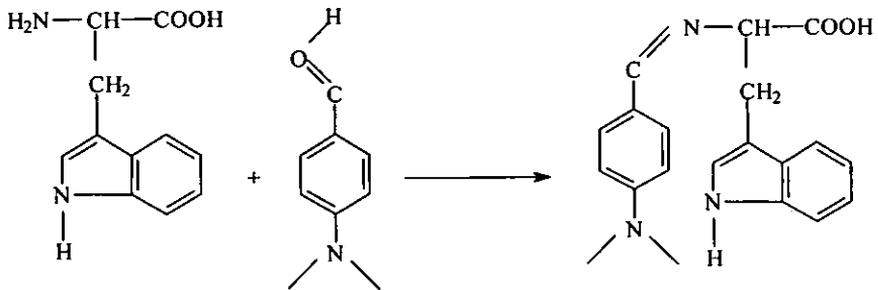
La cuantificación de triptófano se resume en tres pasos:

1. Construcción de la curva patrón
2. Tratamiento de la muestra
3. Desarrollo del color

- A grandes rasgos trataremos de describir lo que sucede en esta técnica; para empezar se pone en contacto el p-dimetilaminobenzaldehido con el H₂SO₄ en una concentración de 16 N lo cual podemos inferir que se forme la base de Schiff:

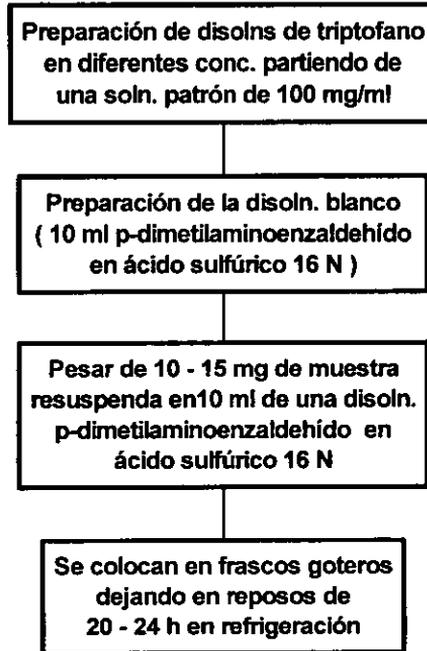


Produciéndose así una entidad que reacciona con el triptófano contenido en la muestra, dando una coloración determinada, debida a la presencia de un grupo NO_2 que contribuye a la presencia de una Sustitución Nucleofílica Aromática y ofrece una deslocalización de las cargas.

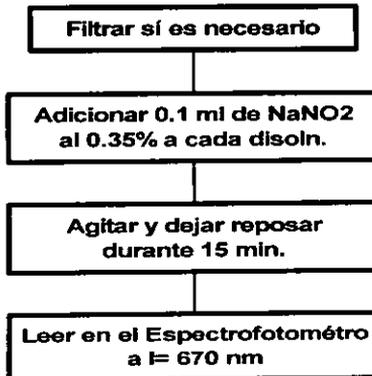


7.3.3.3. Secuencia Experimental: Cuantificación de Triptófano

A. Construcción de Curva Patrón



B. Desarrollo del Color



7.3.3.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o equipo | Reactivos |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • 2 pipetas graduadas de vidrio de 1 mL • 2 matraces volumétricos de 10 mL • 2 pipetas graduadas de 10 mL • 8 frascos goteros color ámbar • 1 espátula • 1 pizeta • 1 balanza analítica • 2 celdas para fotocolorímetro (Klett) • 1 Fotocolorímetro Klett • 1 filtro de color rojo • 1 Espectrofotómetro | <ul style="list-style-type: none"> • H₂SO₄ 16 N • p-dimetilaminobenzaldehído • NaNO₂ 0.35% • Agua destilada • Triptófano |

Muestras Problemas:

Granos de frijol, semillas de soya, harina de maíz, germen de maíz, harina de soya, harina de arroz, formulaciones a base de maíz (soya y arroz soya), aislado de germen de trigo, aislado de soya. Leche entera y descremada en polvo.

Procedimiento Experimental:

A. Construcción de Curva Patrón.

1. Se preparan disoluciones de Triptófano en p-dimetilaminobenzaldehído/ H₂SO₄ (16 N) a las siguientes concentraciones: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 µg de Triptófano por mL, partiendo de una solución patrón de 100 µg/mL. Para esto, se tomarán 0.1ml, 0.3 mL, 0.5 mL, 0.7 mL, 0.9 mL, 1.1 mL, 1.3 mL y 1.5 mL de la solución patrón y se llevarán a 10 mL con una solución de p-dimetilaminobenzaldehído (3 mg/mL) en 10 mL de H₂SO₄ (16 N).
2. La solución blanco se prepara con 0.3mg de p-dimetilaminobenzaldehído por mL de ácido sulfúrico (16N)

3. Para las muestras problema pesar 15 mg de muestra, las cuales se resuspenden en 10 mL disoln. de p-dimetilaminobenzaldehído/ H₂SO₄ (16 N).
4. Estas diluciones y las muestras problema se colocarán en frascos goteros ámbar perfectamente etiquetados dejando de 20 - 24h en reposo y en refrigeración.

B. Desarrollo de Color

6. Una vez transcurrido el tiempo de reposo. Filtrar si es necesario y se le adicionará 0.1 mL de NaNO₂ al 0.35%, a cada uno de los frascos que contienen las diluciones de la curva patrón, el blanco y las muestras problema. Agite y deje reposar durante 15 min.
7. Proceda a leer en el espectrofotómetro a $\lambda = 670$ nm. Si no se cuenta con espectrofotómetro utilice fotocolorímetro (Klett) con filtro de color rojo.

7.3.2.6. Procesamiento de Datos

7.3.2.6.1. Cálculos

Elabore una gráfica en papel milimétrico en el cual graficará las lecturas de absorbancia obtenidas vs. concentración. de Triptófano ($\mu\text{g/mL}$). La curva esperada es una recta.

En ésta curva se va a extrapolar las lecturas obtenidas para las muestras problema encontrando así la concentración de Triptófano para cada sistema.

Reporte los valores encontrados en mg de Triptófano/100 g de muestra. Compare todos los resultados obtenidos por el grupo.

- Si utilizó fotocolorímetro (Klett), recuerde que tiene que hacer una conversión usando, la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = \text{D.O.} = \frac{\text{lectura obtenida}}{500}$$

donde

D.O.: Es la Densidad Óptica = Absorbancia

7.3.2.6.2. Resultados

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Nombre de la Técnica usada | |
| Tipo y nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

7.3.4. Extracción e Identificación de Lípidos

7.3.4.1. Objetivo:

Extraer e identificar lípidos contenidos en algunos alimentos.

7.3.4.2. Fundamento:

Las carnes , huevos, productos lácteos y grasas particularmente la de mantequilla , margarina y aceites de fritura, son las fuentes primarias de los lípidos de la dieta. Los lípidos suministran la mayor proporción de la energía que requiere el hombre, aportando a igualdad de peso más del doble energía que las proteínas o los carbohidratos.⁽³⁹⁾

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza. Están formados por carbono, oxígeno y hidrógeno, en ciertos casos también pueden contener fósforo y nitrógeno; dentro de los compuestos clasificados como lípidos existe una variedad de sustancias que presentan la peculiaridad de que son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua , de hecho, esa es la **definición de lípido:**" compuestos solubles en éter, cloroformo y otros disolventes no polares, pero insolubles en agua".⁽¹¹⁾

La extracción de este tipo de macromoléculas involucra las propiedades de solubilidad, características de este tipo de compuestos. Existen diferentes tipos de métodos para realizar una extracción lipídica, algunos solo contemplan ésta tarea en extractos arrastrados en disolventes orgánicos, como sucede para muestras líquidas en aceites, algunas son más específicas, como la técnica de extracción de lípidos neutros. Este tipo de métodos de estudio y experimentación resultarían incompletos si no fuera seguida de por lo menos un técnica de separación.^(48,49)

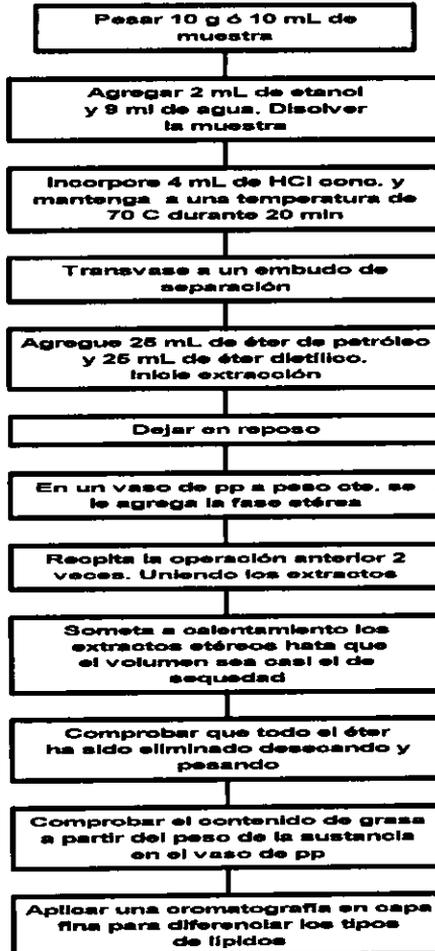
Existe también la posibilidad de recurrir a la utilización de la cromatografía en capa fina (ver la técnica en el apartado correspondiente), que tiene una gran utilidad en la separación de mono, di y triacilglicéridos, que se logran separar fácilmente por esta técnica, pudiendo realizarse también una separación rápida de 1-2 y 1-3 diacilglicéridos, estos compuestos pueden ser separados por cromatografía sobre gel de sílice. Los triacilglicéridos, según su grado de insaturación pueden separarse por cromatografía sobre sílice impregnada con

nitrate de plata. Los triacilglicéridos con el mismo número de enlaces se separan juntos.^(49,50)

La caracterización de los lípidos a través de los diferentes disolventes orgánicos empleados en su extracción puede ser resumida de la siguiente manera:

1. *Lípidos solubles en acetona*: Comprende éste grupo acilglicérido, estéridos, céridos, alcoholes grasos y esteroides.⁽⁴⁹⁾
2. *Insolubles en acetona pero solubles en éter*, que a su vez puede subdividirse en dos grupos: Un primer grupo soluble en etanol (lecitina) y el segundo grupo insoluble en etanol, que comprende fosfatidilinositol y glicofosfátidos.⁽⁴⁹⁾
3. *Lípidos insolubles en éter*, que comprende las esfingomielinas y los cerebrósidos, los cuales pueden separarse entre sí mediante el ácido acético glacial.⁽⁴⁹⁾

7.3.4.3. Secuencia Experimental: Extracción e Identificación de Lípidos



7.3.4.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o Equipo | Reactivos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 1 embudo de extracción de 250 ml• 1 pipeta graduada de 5 ml• 1 vaso de precipitado de 250 ml• 1 tripie con triángulo de porcelana.• 1 vaso de precipitado de 100 ml• 1 parrilla eléctrica• 1 desecador• 1 balanza analítica• 1 placa de cromatografía en capa fina | <ul style="list-style-type: none">• Etanol• ácido clorhídrico conc.• éter de petróleo• éter dietílico• sílica gel |

Procedimiento Experimental:

1. Pesar 10 g de muestra en un vaso de precipitado de 250 mL y agregar 2 mL de etanol y 9 mL de agua. Disolver la muestra
2. Añadir 4 mL de HCl conc. Y mantener a 70° C durante 20 min., enfriar. Transfiera a un embudo de extracción.
3. Agregue 25 mL de éter de petróleo y 25 mL de éter dietílico, agite ligeramente el matraz.
4. Deje en reposo para permitir que se separen las fases.
5. Decantar a un vaso de precipitado previamente desecado y pesado, la capa mixta de éter.
6. Repetir la extracción con la mezcla de éter, dos veces más, combinando los extractos etéreos decantados.

7. Destilar la mezcla de éter.
8. Desechar el matraz en estufa durante 3 h. y, después enfriar en desecador y pesar. comprobar que todo el éter ha sido eliminado desecando y pesando posteriormente.
9. Comprobar el contenido de lípidos a partir del peso de la sustancia en el matraz.
10. Aplicar una cromatografía en capa fina para diferenciar los tipos de lípidos contenidos en la muestra. Para este paso busque lo relacionado con la cromatografía bidimensional o simplemente vea el la propiedades de solubilidad de los lípidos.

7.3.4.6. Procesamiento de Datos

7.3.4.6.1 Cálculos:

Para obtener el valor de los lípidos totales se tiene que realizar el cálculo con la siguiente fórmula:

$$\text{El extracto etéreo} = \frac{100 (b - a)}{M}$$

Donde:

a: Peso del vaso de precipitados vacío

b: Peso del vaso de precipitados + extracto etéreo

M: Peso de la muestra

7.3.4.6.2. Resultados:

Vierta en la Hoja de Registro los resultados obtenidos:

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Nombre de la Técnica usada | |
| Tipo y nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

7.3.5. Cuantificación de cenizas (Mineralización por vía seca)

7.3.5.1 Objetivo:

Realizar una cuantificación de cenizas a diversas muestras alimentarias.

7.3.5.2. Fundamento:

La ceniza de un producto alimentario que es el residuo inorgánico que queda después de quemar la materia orgánica. La ceniza obtenida no tiene necesariamente la misma composición que la materia inorgánica del alimento original, ya que puede haber pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los componentes. Las condiciones de incineración se especifican para diversos materiales en la norma británica (BS 4603: 1970). El valor de cenizas se puede considerar como una medida general de calidad logrado (por ejemplo, en té, harina y gelatina comestible), y a menudo es un criterio útil en la identificación de la autenticidad de un alimento. Cuando un valor alto de cenizas sugiere la presencia de un adulterante inorgánico, es recomendable determinar también las cenizas insolubles en ácido.⁽²⁾

Todos los seres vivos necesitan muchos minerales para sus procesos vitales. en las células vivas se han encontrado virtualmente todos los elementos de la Tabla Periódica, si bien no todos son necesariamente esenciales para la vida. El estudio de la nutrición mineral es importante al igual que las proteínas, carbohidratos y grasas. Los minerales o nutrientes inorgánicos están interrelacionados y equilibrados unos con otros. Por ejemplo, el calcio y el fósforo participan en una relación definida en la formación de huesos y dientes. Los iones

sodio, potasio, magnesio, fosfato y cloruro participan individual y colectivamente en el control de los fluidos corporales. Muchos elementos actúan solos o en conjunción con otros como catalizadores de procesos enzimáticos esenciales que ocurren en el cuerpo.⁽²⁾

El cuerpo requiere siete minerales en cantidades relativamente grandes, del orden de gramos (Ca,Na,Mg,K,P,Cl y S) y amenos otros siete en cantidades traza (Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn). además , aunque no totalmente reconocidos como esenciales, el flúor parece tener una importante acción profiláctica en huesos y dientes, del cromo se ha dicho que es un factor de tolerancia a la glucosa y se ha comprobado que el selenio protege frente a las necrosis de hígado y otros trastornos de los animales.⁽²⁾

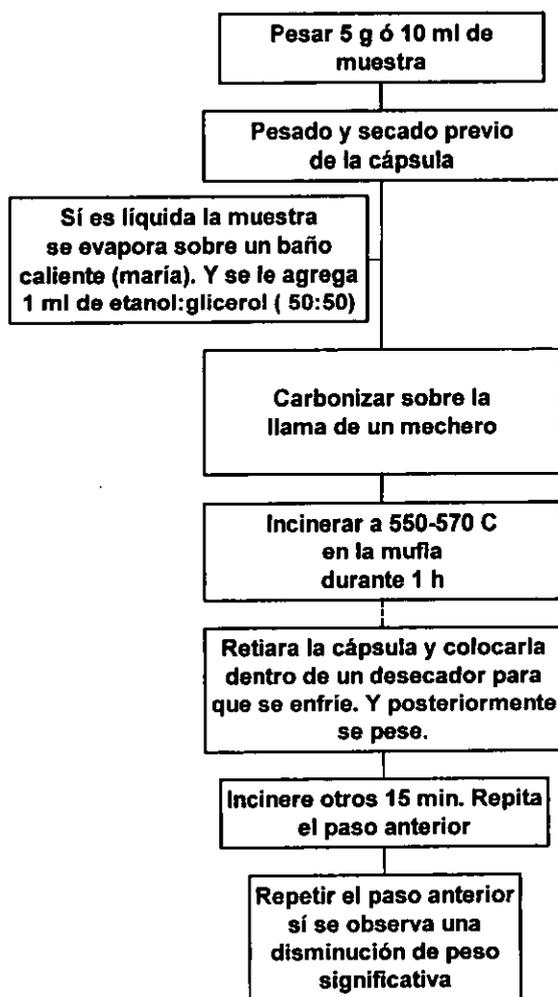
Por lo que podemos decir que los minerales se pueden agrupar en tres clases principales:

- a) los implicados en el control de los líquidos corporales
- b) Los implicados en la formación de estructuras rígidas de soporte del cuerpo
- c) Los que intervienen en las reacciones químicas corporales y como componentes químicos del mismo.

La determinación de los niveles de nutrientes inorgánicos en los alimentos de forma concentrada, separados de cuantas fuentes de interferencia sea posible. invariablemente esto se consigue destruyendo la matriz orgánica del alimento por oxidación húmeda con ácido sulfúrico o nítrico concentrados o por incineración seca, eligiendo las condiciones de forma que se reduzca las pérdidas al mínimo y se obtenga los elementos que se desean medir en la forma más manipulable para la subsiguiente determinación.^(2.)

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

7.3.5.3:Seguimiento Experimental: Cuantificación de Cenizas (Mineralización por Vía Seca)



7.3.5.4. Procedimiento Experimental

| Material Y/O Equipo | Reactivos |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 1 cápsula de platino o porcelana perfectamente desecada.• 1 mechero de bunsen• 1 espátula de acero inoxidable• 1 tela de alambre con centro de asbesto• 1 tripie• 1 triángulo de porcelana• 1 pinzas para cápsula de porcelana o crisol• 1 desecador con cloruro de calcio• 1 balanza analítica• Mufla | <ul style="list-style-type: none">• Etanol : Glicerol (50:50) |

Procedimiento Experimental:

1. Pesar 5 g de muestra sólida o tomar 25 mL de muestra líquida en cápsula de evaporación de platino o porcelana perfectamente desecada.
2. Si la muestra es de naturaleza líquida, evaporar el agua sobre baño de agua caliente. Añadir 1 mL de solución de etanol:glicerol (50:50).
3. Colocar la cápsula conteniendo la muestra en el triángulo de porcelana que es sostenida en el tripie.
4. Inicie la combustión hasta obtener cenizas negras.

5. Sin retirar del fuego proceda a mover la materia carbonizada con la ayuda de una espátula, de vez en vez.
6. Retire la muestra del fuego directo e introduzca la muestra en el Horno-Mufla.
7. Proceda a incinerar a 550-570° C. Esta temperatura aproximadamente se alcanza al aparecer en el interior del horno mufla un color rojo oscuro.
8. Pasada una hora retirar la cápsula y colocarla en un desecador para que se enfríe. Pesar la cápsula
9. Si con éste procedimiento no se logra obtener cenizas exentas de carbón, agítese la masa carbonizada con agua destilada caliente, recójase el residuo, insoluble en un papel filtro de cenizas conocidas, incinérese el papel filtro y el residuo hasta obtener cenizas blancas o casi blancas.
10. Incinerar durante otros 15 min. Y volver a pesar después de enfriar. Repetir si se observa una disminución de peso significativa.

Nota:

* La ceniza del té debe ser gris en lugar de verde.

*Para acelerar la prueba se añade a la ceniza fría 2 gotas de éter de petróleo y se vuelve a incinerar.

7.3.5.6. Procesamiento de Datos:

7.3.5.6.1. Cálculos:

a) Cuando no se usa papel filtro:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(b - c)}{a - c} \times 100$$

Quantificación de Cenizas (Mineralización por vía Seca)

En donde:

a : Peso del crisol más la muestra

b: Peso del crisol más las cenizas

c: peso del crisol vacío

b) Cuando se usa papel filtro:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{(b - c) - d}{a - c} \times 100$$

En donde:

d: Peso de las cenizas del papel filtro

Realice un tratamiento estadístico a los datos de todos los equipos. Aún teniendo el mismo tipo de muestra.

Busque el valor que se encuentra en la literatura e investigue: ¿Qué factores son los que se vieron afectados ? ¿ Qué consecuencias se obtuvieron por éstos factores? etc. Recuerde los puntos fundamentales que debe cubrir el reporte. Y proceda a verter los datos en la Hoja de Registro.

7.3.5.6.2. Resultados:

Verter los datos correspondientes en la Hoja de Registro.

| HOJA DE REGISTRO | |
|----------------------------------|--|
| Nombre de la Técnica usada | |
| Tipo y nombre de muestra | |
| Núm. De la muestra | |
| Fecha de recepción | |
| Fecha del registro | |
| Nombre(s) del analista(s) | |
| Fecha de realización de análisis | |
| Cálculos comprobados por: | |
| Resultados: | |
| Conclusiones: | |

8. Proyecto II:

Leche y Derivados

8.1. Objetivos:

8.1.1. Objetivo General:

Determinar algunos constituyentes importantes de la leche que influyen en su aspecto físico, y en su estabilidad para asegurar el buen aprovechamiento tanto nutricional como tecnológico.

8.1.1. Objetivos Particulares:

- Cuantificará Lactosa en diferentes productos lácteos, mediante una técnica yodométrica, determinando la importancia de ésta en las propiedades de la leche.
- Conocerá las propiedades de la leche como materia prima y también uno de los métodos más antiguos de conservación; elaborando queso, requesón y yogurt
- Mediante la cuantificación de ácido láctico en diversas muestras de leche se comprobará la presencia y la acción microbiana a la que se expone la leche.
- Comprobará el efecto de los procesos de conservación (UTH) en las proteínas del suero de la leche.

8.2. Introducción

La leche es un líquido opaco de color blanco a blanco amarillento (tabla 8.1), color que está determinado por la dispersión y absorción de la luz por las gotitas de grasa y las micelas de proteína. Por eso, la leche descremada (desnatada) es también blanca. El color amarillo o verdoso se debe a los carotenos de la fase oleosa (sobre todo la que proviene de los animales que consumen hierba) y a la riboflavina de la fase acuosa. El sabor de la leche es ligeramente dulce y el olor es característicamente inespecífico⁽¹⁰⁾

| | Composición (g/l) | Estado físico de los componentes |
|--|-------------------|--|
| Agua | 905 | agua libre (disolvente) + agua ligada (3.7%) |
| Glúcidos: lactosa | 49 | Solución |
| Lípidos | 35 | Emulsión de los glóbulos grasos |
| Materia grasa propiamente dicha | 34 | |
| Lecitina (fosfolípidos) | 0.5 | |
| Parte insaponificable (esteroles, tocoferoles, carotenos) | 0.5 | |
| Prótidos | 34 | Suspensión micelar de fosfocaseinato de cal (0.08 a 0.12 micras) |
| Caseína | 27 | |
| Prótidos "solubles" (globulina, albúminas) | 5.5 | Solución (coloidal) |
| Sust. nitrogenadas no proteicas | 1.5 | Solución (verdadera) |
| Sales | | |
| del ácido cítrico | 2 | solución o edo. coloidal (P y Ca) |
| del ácido fosfórico (P ₂ O ₅) | 2.6 | (Sales de K, Ca, Na, Mg, etc.) |
| del ácido clorhídrico (HCl) | 1.7 | |
| Componentes diversos (vitaminas, enzimas, gases disueltos) | trazas | |
| Extracto seco (total) | 127 | |
| Extracto seco desengrasado | 92 | |

Cuadro 8.1. Composición típica de la leche⁽¹⁰⁾

La leche es un sistema fisicoquímico complejo en el que cada componente se encuentra interactuando con los otros; éstas interacciones ejercen una influencia muy marcada en su estabilidad; la calidad química y organoléptica de la leche varía a medida que transcurre el tiempo desde su ordeña y del cuidado con el que se maneja. La composición de la leche varía de modo notable de un animal a otro. En el caso de nuestro trabajo nos interesa sólo la leche de vaca,⁽¹⁰⁾

| Propiedades Físicas | |
|--|---------------------|
| Densidad de la leche completa | 1.032 |
| Densidad de leche descremada | 1.036 |
| Densidad de la materia grasa | 0.940 |
| Poder calórico (por litro), calorías | 700 |
| pH | 6.6 - 6.8 |
| Viscosidad absoluta (15 ^o) | 0.0283 |
| Viscosidad relativa (específica) | 1.6 - 2.15 |
| Índice de refracción | 1.35 |
| Punto de congelación | - 0.55 ^o |
| Calor específico | 0.93 |

Tabla 8.1 propiedades físicas de la leche⁽¹⁰⁾

En la glándula mamaria se efectúa la síntesis de la mayor parte de los componentes orgánicos de la leche: lactosa; materia grasa (triglicéridos); caseínas α , β y α ; β - lactoglobulina y α - lactoalbúmina; ácido cítrico. estas sustancias secretadas representan alrededor de un 92 % del extracto seco de la leche de vaca. Los otros componentes proceden directamente del circuito sanguíneo (sin embargo, en lo que se refiere a las globulinas inmunizantes, en trabajos recientes se indica que una parte de ellas podría sintetizarse en la glándula).⁽¹⁰⁾

Por su gran contenido de nutrientes, la leche como materia prima, permite elaborar diversos productos como el queso (principal derivado), mantequilla, yogurt, crema, concentrados lácteos, leches concentradas y leches en polvo. Ya que es tan importante la leche y que de ella se conoce una industria, podemos decir que también entra en el amplio campo de trabajo que tiene el Q.F.B.; por lo que en este proyecto se buscó dar mayor importancia a algunos componentes que son esenciales de la leche como son:

- Determinación de Lactosa
- Determinación de Turbidez
- Elaboración de queso, requesón y yogurt
- Cuantificación de ácido láctico

BLOQUE II:

METODOLOGIA

8.3.1. Determinación de Lactosa

8.3.1.1. Objetivo:

Determinar el contenido del azúcar reductor (lactosa) presente en la leche industrializada y fresca empleando el método Yodométrico.

8.3.1.2. Fundamento:

El sabor de la leche es originado por la **Lactosa**, la cuál está formada por dos carbohidratos que son glucosa y galactosa, que pueden ser separados por hidrólisis. Su poder edulcorante es seis veces menor que el del azúcar ordinario. Por otra parte, el sabor dulce de la lactosa está enmascarado por la caseína. La lactosa es la única fuente de galactosa para el ser humano. Las principales propiedades químicas de la lactosa son la hidrólisis y el poder de reducción, siendo bastante difícil la primera, ya que es un azúcar que presenta una cierta estabilidad frente a los agentes químicos. Se precisa la acción de los ácidos en caliente para desdoblarla.⁽¹⁰⁾

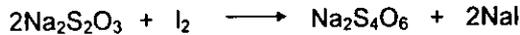


Por poseer un grupo aldehídico libre, la lactosa es un azúcar reductor. reduce especialmente al licor cupro-alcálico de Fehling. Además se ha visto que un grupo de reacciones yodométricas se basan en la acción oxidante del yodo sobre sustancias reductoras; a este grupo se le designa con el nombre de *Métodos yodométricos directos*.⁽³⁵⁾ Este método está basado en la acción oxidante del yodo y reductora de los yoduros, que puede condensarse en la reacción reversible:⁽³⁵⁾

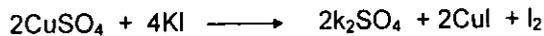


En aquellos casos en que el reductor sea el yoduro de potasio y sobre él se haga reaccionar el oxidante que se desea valorar, el yodo puesto en libertad y cuya cantidad es equivalente a la del oxidante, se valora con una solución titulada de tiosulfato de sodio; esta solución es de uso general en todos los métodos

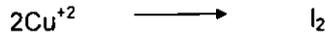
yodométricos en los que se pone yodo en libertad; así pues, la reacción fundamental de estos procesos es la siguiente: ⁽³⁵⁾



Ya que el licor de Fehling es una disolución de sulfato de cobre la reacción es la siguiente:



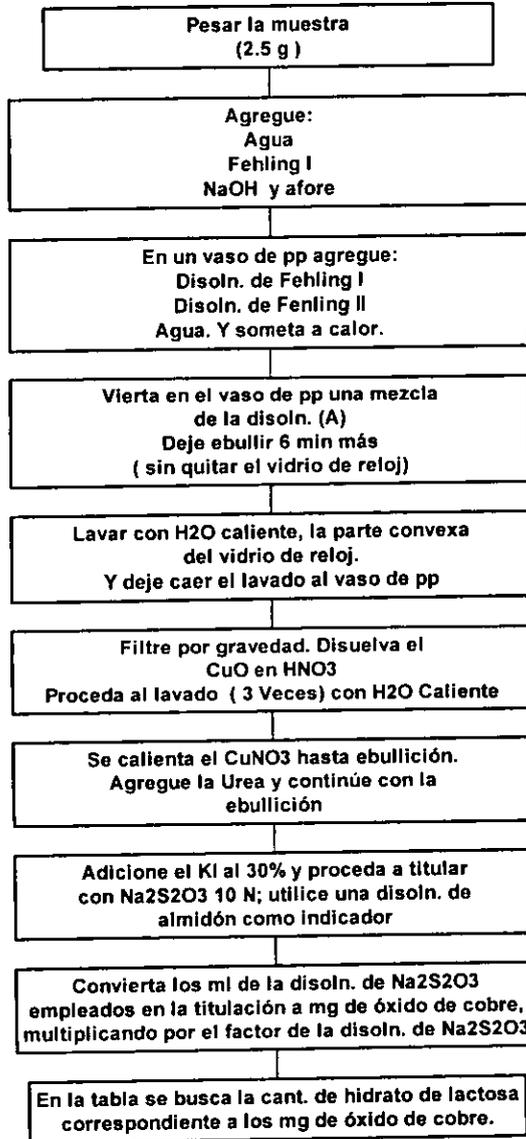
por valoración del yodo libre en esta reacción con solución de tiosulfato, podremos calcular la cantidad de sal de cobre que reaccionó con el yoduro de potasio, teniendo en cuenta que: ⁽³⁵⁾



Teniendo como factor de equivalencia: ⁽³⁶⁾

$$1 \text{ ml de solución de N de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 0.06357 \text{ g de Cu}$$

8.3.1.3: Seguimiento Experimental: **Determinación de Lactosa**



8.3.1.2.Desarrollo Experimental:

Material y/o equipo

- 1 pipeta de vidrio volumétrica de 20 mL
- 1 pipeta de vidrio volumétrica de 50 mL
- 1 vaso de precipitado de vidrio de 100 mL
- 1 vaso de precipitado de vidrio de 150 mL
- 1 matraz de aforo de vidrio de 100 mL
- 1 vidrio de reloj con diámetro de 10 cm
- 1 matraz erlenmeyer de 250 mL
- 1 matraz Kitasato de vidrio de 300 mL con
- 1 bureta de vidrio de 50 ml
- alargadera de hule para embudo büchner
- 1 embudo de filtrado rápido con cuello largo de diámetro de 8.0 cm
- 1 termómetro
- balanza analítica
- Sistema de filtración a vacío
- papel filtro,

Reactivos a utilizar

- Disolución de Fehling I
- Disolución de Fehling II
- Disoln. de NaOH 0.25 N
- HNO₃ 1:1
- HCl 1 N
- Urea cristalizada
- **Disoln. de Na₂S₂O₃ N/10**
- Disoln. de almidón al 1% in situ
- Yoduro de potasio al 30%

Procedimiento experimental:

1. Colocar 2.5 mL de leche en un vaso de precipitados (P).
2. Transvasar la muestra lavando con agua a un matraz aforado de 100 mL y agregar cerca de 40 mL de agua. Mezcle muy bien mediante una agitación suave, evitando la *formación de espuma*.
3. Agregue 3 mL de solución de Fehling I y agite.
4. Incorpore 2 mL NaOH 0.25 N y agite nuevamente.
5. Proceda a aforar a 100 mL. Se mezcla y se filtra. (A).

6. Al mismo tiempo en un vaso de precipitados de 150 mL coloque:
 - 5 mL de Fehling I
 - 5 mL de Fehling II
 - 10 mL de H₂O
7. Cubra el vaso de precipitados con el vidrio de reloj y caliente hasta la ebullición.
8. Se toma una alícuota de 10 mL de la disolución filtrada (A), se vierte en la mezcla Fehling hirviendo, continuando la ebullición durante 6 minutos exactos, sin quitar el vidrio de reloj.
9. Retire el vaso del fuego y se lava con agua la parte convexa del vidrio de reloj, y su contenido se filtra por gravedad, enjuagando el vaso con agua caliente para eliminar las trazas de cobre adheridas al vaso y los lavados se pasan al embudo Büchner filtre también.
10. En el matraz erlenmeyer 250 mL se agregan 1 mL de ácido nítrico 1:1, a un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se calienta, incorpore el papel filtro del filtrado y disuelva los cristales después de la disolución completa, se agrega agua hasta completar 40 mL aproximadamente.
11. Se calienta la solución de nitrato de cobre (volumen total) hasta ebullición, se añaden con cuidado 0.3 g de urea y se continúa la ebullición durante un minuto más.
12. Se deja enfriar, se adicionan 2 mL de yoduro de potasio (KI) al 30% y se titula inmediatamente el yodo liberado con tiosulfato de sodio N/10; hasta el primer punto de neutralización añadiendo al final de la titulación 2 mL de la solución de almidón como indicador. Continuar la titulación hasta que se presenta una coloración blanca.
13. La determinación de la lactosa se realiza por duplicado, partiendo de la solución aforada a 100 mL, y los resultados no deben diferir en más de 0.3%

8.3.1.4. Procesamiento de Datos

8.3.1.4.1. Cálculos:

Se convierten los mL de la solución de tiosulfato de sodio N/10 empleados en la titulación a mg de óxido de cobre, tomando en cuenta que:

$$1 \text{ mL de solución de N/10 de Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 0.06357 \text{ g de Cu}$$

En la tabla se busca la cantidad de hidrato de lactosa correspondiente a los mg de óxido de cobre, hidrato de lactosa por mL de leche pudiendo determinar la cantidad del

$$\% \text{ de lactosa} = \frac{M \times 2}{P} \times 100$$

En donde:

M = Peso en gramos de la lactosa
 P = Peso en gramos de la muestra
 2 = parte de la alicuota

Nota: Todos los datos de la tabla están reportados en mg.

Tabla 8.3.1.1 Conversión de valores⁽³⁶⁾

1) Cu₂O 2) Glucosa 4) sacarosa 5) Hidrato de lactosa

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| 10 | 5.6 | 4.6 | 4.4 | 5.1 | 6.8 |
| 11 | 6.0 | 5.1 | 4.8 | 5.8 | 7.7 |
| 12 | 6.4 | 5.6 | 5.3 | 6.4 | 8.5 |
| 13 | 6.8 | 6.0 | 5.7 | 7.1 | 9.4 |
| 14 | 7.2 | 6.4 | 6.1 | 7.7 | 10.2 |
| 15 | 7.7 | 6.9 | 6.6 | 8.4 | 11.1 |
| 16 | 8.1 | 7.3 | 6.9 | 9.0 | 12.0 |
| 17 | 8.6 | 7.8 | 7.4 | 9.7 | 12.8 |
| 18 | 9.0 | 8.3 | 7.9 | 10.3 | 13.7 |
| 19 | 9.5 | 8.7 | 8.3 | 11.0 | 14.5 |
| 20 | 9.9 | 9.2 | 8.7 | 11.6 | 15.4 |
| 21 | 10.4 | 9.6 | 9.1 | 12.3 | 16.3 |
| 22 | 10.8 | 10.0 | 9.5 | 12.9 | 17.1 |
| 23 | 11.2 | 10.5 | 10.0 | 13.6 | 18.0 |
| 24 | 11.7 | 11.0 | 10.5 | 14.2 | 18.8 |
| 25 | 12.1 | 11.4 | 10.9 | 14.8 | 19.7 |
| 26 | 12.5 | 11.9 | 11.3 | 15.5 | 20.6 |
| 27 | 13.0 | 12.4 | 11.8 | 16.2 | 21.4 |
| 28 | 13.4 | 12.8 | 12.2 | 16.8 | 22.3 |
| 29 | 13.9 | 13.3 | 12.6 | 17.5 | 23.1 |
| 30 | 14.3 | 13.7 | 13.0 | 18.1 | 24.0 |
| 31 | 14.8 | 14.2 | 13.5 | 18.7 | 24.9 |
| 32 | 15.2 | 14.7 | 13.9 | 19.4 | 25.7 |
| 33 | 15.6 | 15.1 | 14.3 | 20.0 | 26.6 |
| 34 | 16.1 | 15.6 | 14.8 | 20.7 | 27.4 |
| 35 | 16.5 | 16.1 | 15.3 | 21.3 | 28.3 |
| 36 | 16.9 | 16.5 | 15.7 | 22.0 | 29.2 |
| 37 | 17.4 | 17.0 | 16.1 | 22.6 | 30.0 |
| 38 | 17.8 | 17.4 | 16.5 | 23.3 | 30.9 |
| 39 | 18.3 | 17.9 | 17.0 | 23.9 | 31.7 |
| 40 | 18.7 | 18.4 | 17.5 | 24.6 | 32.6 |
| 41 | 19.2 | 18.8 | 17.9 | 25.2 | 33.5 |
| 42 | 19.5 | 19.3 | 18.3 | 25.9 | 34.3 |
| 43 | 20.0 | 19.8 | 18.8 | 26.5 | 35.2 |
| 44 | 20.4 | 20.2 | 19.2 | 27.2 | 36.0 |
| 45 | 20.9 | 20.7 | 19.7 | 27.8 | 36.9 |
| 46 | 21.3 | 21.1 | 20.0 | 28.5 | 37.8 |
| 47 | 21.4 | 21.6 | 20.5 | 29.1 | 38.6 |
| 48 | 22.2 | 22.1 | 21.0 | 29.8 | 39.5 |
| 49 | 22.5 | 22.5 | 21.4 | 30.4 | 40.3 |
| 50 | 23.3 | 23.0 | 21.9 | 31.1 | 41.2 |
| 51 | 23.5 | 23.5 | 22.3 | 31.7 | 42.1 |
| 52 | 24.2 | 23.9 | 22.7 | 32.4 | 42.9 |
| 53 | 24.4 | 24.4 | 23.2 | 33.0 | 43.8 |
| 54 | 24.5 | 24.9 | 23.6 | 33.7 | 44.6 |

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| 55 | 25.3 | 25.3 | 24.0 | 34.3 | 45.5 |
| 56 | 25.7 | 25.8 | 24.5 | 34.9 | 46.4 |
| 57 | 26.2 | 26.2 | 24.9 | 35.6 | 47.2 |
| 58 | 26.6 | 26.7 | 25.3 | 36.2 | 48.1 |
| 59 | 27.1 | 27.2 | 25.7 | 36.9 | 48.9 |
| 60 | 27.5 | 27.6 | 26.1 | 37.5 | 49.8 |
| 61 | 27.9 | 28.1 | 26.6 | 38.2 | 50.7 |
| 62 | 28.4 | 28.6 | 27.0 | 38.8 | 51.5 |
| 63 | 28.8 | 29.0 | 27.4 | 39.4 | 52.4 |
| 64 | 29.2 | 29.5 | 27.9 | 40.1 | 53.2 |
| 65 | 29.7 | 30.0 | 28.4 | 40.8 | 54.1 |
| 66 | 30.1 | 30.4 | 28.8 | 41.4 | 54.9 |
| 67 | 30.6 | 30.9 | 29.3 | 42.0 | 55.8 |
| 68 | 31.0 | 31.4 | 29.7 | 42.7 | 56.6 |
| 69 | 31.4 | 31.8 | 30.1 | 43.3 | 57.7 |
| 70 | 31.9 | 32.3 | 30.5 | 44.0 | 58.3 |
| 71 | 32.3 | 32.7 | 31.0 | 44.6 | 59.1 |
| 72 | 32.8 | 33.1 | 31.4 | 45.3 | 60.0 |
| 73 | 33.2 | 33.6 | 31.8 | 45.9 | 60.8 |
| 74 | 33.7 | 34.1 | 32.3 | 46.6 | 61.7 |
| 75 | 34.1 | 34.5 | 32.7 | 47.2 | 62.5 |
| 76 | 34.5 | 35.0 | 33.1 | 47.9 | 63.4 |
| 77 | 35.0 | 35.5 | 33.6 | 48.5 | 64.2 |
| 78 | 35.4 | 35.9 | 34.0 | 49.2 | 65.1 |
| 79 | 35.9 | 36.4 | 34.5 | 49.8 | 65.9 |
| 80 | 36.3 | 36.8 | 34.9 | 50.4 | 66.8 |
| 81 | 36.8 | 37.3 | 35.3 | 51.1 | 67.7 |
| 82 | 37.2 | 37.8 | 35.8 | 51.8 | 68.5 |
| 83 | 37.6 | 38.2 | 36.2 | 52.4 | 69.4 |
| 84 | 38.1 | 38.7 | 36.7 | 53.1 | 70.2 |
| 85 | 38.5 | 39.2 | 37.2 | 53.7 | 71.1 |
| 86 | 39.0 | 39.7 | 37.6 | 54.4 | 72.0 |
| 87 | 39.4 | 40.2 | 38.1 | 55.0 | 72.8 |
| 88 | 39.8 | 40.6 | 38.5 | 55.7 | 73.7 |
| 89 | 40.3 | 41.1 | 38.9 | 56.3 | 74.5 |
| 90 | 40.7 | 41.6 | 39.4 | 57.0 | 75.4 |
| 91 | 41.2 | 42.0 | 39.8 | 57.6 | 76.3 |
| 92 | 41.6 | 42.5 | 40.3 | 58.2 | 77.1 |
| 93 | 42.1 | 43.0 | 40.8 | 58.9 | 78.0 |
| 94 | 42.6 | 43.5 | 41.2 | 59.5 | 78.8 |
| 95 | 43.0 | 43.9 | 41.6 | 60.2 | 79.7 |
| 96 | 43.4 | 44.4 | 42.1 | 60.8 | 80.5 |
| 97 | 43.9 | 44.8 | 42.5 | 61.4 | 81.4 |
| 98 | 44.3 | 45.3 | 42.9 | 62.1 | 82.3 |
| 99 | 44.8 | 45.8 | 43.4 | 62.8 | 83.1 |

Determinación de Lactosa

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|------|------|------|------|------|
| 100 | 45,2 | 46,3 | 43,9 | 63,4 | 84 |
| 101 | 45,7 | 46,7 | 44,3 | 64 | 84,9 |
| 102 | 46,1 | 47,2 | 44,7 | 64,6 | 85,7 |
| 103 | 46,6 | 47,6 | 45,1 | 65,3 | 86,6 |
| 104 | 47 | 48 | 45,6 | 66 | 87,4 |
| 105 | 47,5 | 48,5 | 46 | 66,6 | 88,3 |
| 106 | 47,9 | 49 | 46,5 | 67,2 | 89,1 |
| 107 | 48,4 | 49,5 | 46,9 | 67,9 | 90 |
| 108 | 48,8 | 49,9 | 47,3 | 68,6 | 90,8 |
| 109 | 49,3 | 50,4 | 47,8 | 69,2 | 91,7 |
| 110 | 49,7 | 50,9 | 48,3 | 69,9 | 92,5 |
| 111 | 50,2 | 51,4 | 48,7 | 70,5 | 93,3 |
| 112 | 50,6 | 51,8 | 49,1 | 71,2 | 94,2 |
| 113 | 51,1 | 52,3 | 49,6 | 71,9 | 95 |
| 114 | 51,5 | 52,8 | 50,1 | 72,5 | 95,9 |
| 115 | 52 | 53,2 | 50,4 | 73,2 | 96,7 |
| 116 | 52,4 | 53,7 | 50,9 | 73,8 | 97,6 |
| 117 | 52,9 | 54,2 | 51,5 | 74,5 | 98,4 |
| 118 | 53,3 | 54,7 | 51,9 | 75,1 | 99,3 |
| 119 | 53,8 | 55,2 | 52,3 | 75,8 | 100 |
| 120 | 54,2 | 55,7 | 52,8 | 76,5 | 101 |
| 121 | 54,7 | 56,1 | 53,2 | 77,1 | 102 |
| 122 | 55,1 | 56,5 | 53,6 | 77,7 | 103 |
| 123 | 55,6 | 57 | 54,1 | 78,4 | 104 |
| 124 | 56 | 57,5 | 54,5 | 79,1 | 104 |
| 125 | 56,5 | 58 | 55 | 79,8 | 105 |
| 126 | 56,9 | 58,5 | 55,5 | 80,4 | 106 |
| 127 | 57,4 | 59 | 55,9 | 81 | 107 |
| 128 | 57,8 | 59,4 | 56,3 | 81,7 | 108 |
| 129 | 58,3 | 59,9 | 56,8 | 82,3 | 109 |
| 130 | 58,7 | 60,3 | 57,2 | 83 | 110 |
| 131 | 59,2 | 60,8 | 57,7 | 83,7 | 110 |
| 132 | 59,6 | 61,3 | 58,1 | 84,4 | 111 |
| 133 | 60,1 | 61,8 | 58,6 | 85 | 112 |
| 134 | 61,5 | 62,3 | 59,1 | 85,6 | 113 |
| 135 | 61 | 62,7 | 59,5 | 86,3 | 114 |
| 136 | 61,5 | 63,2 | 59,9 | 87 | 115 |
| 137 | 61,9 | 63,7 | 60,4 | 87,7 | 115 |
| 138 | 62,4 | 64,1 | 60,8 | 88,3 | 116 |
| 139 | 62,8 | 64,6 | 61,3 | 89 | 117 |
| 140 | 63,3 | 65,1 | 61,7 | 89,6 | 118 |
| 141 | 63,7 | 65,6 | 62,2 | 90,3 | 119 |
| 142 | 64,2 | 66 | 62,6 | 91 | 120 |
| 143 | 64,6 | 66,5 | 63,1 | 91,6 | 121 |
| 144 | 65 | 67 | 63,6 | 92,2 | 121 |
| 145 | 65,5 | 67,5 | 64 | 92,9 | 122 |
| 146 | 66 | 67,9 | 64,4 | 93,6 | 123 |
| 147 | 66,4 | 68,4 | 64,9 | 94,3 | 124 |
| 148 | 66,9 | 68,9 | 65,4 | 94,9 | 125 |

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|------|------|------|------|-------|
| 150 | 67,8 | 69,8 | 66,2 | 96,2 | 126,4 |
| 151 | 68,2 | 70,3 | 66,7 | 96,9 | 127,3 |
| 152 | 68,7 | 70,8 | 67,2 | 97,6 | 128,1 |
| 153 | 69,2 | 71,2 | 67,5 | 98,2 | 129,0 |
| 154 | 69,6 | 71,7 | 68 | 98,8 | 130,7 |
| 155 | 70 | 72,2 | 68,5 | 99,5 | 131,5 |
| 156 | 70,5 | 72,7 | 69 | 100 | 132,4 |
| 157 | 71 | 73,2 | 69,4 | 101 | 132,2 |
| 158 | 71,4 | 73,6 | 69,8 | 102 | 133,1 |
| 159 | 71,9 | 74,1 | 70,3 | 102 | 134,9 |
| 160 | 72,3 | 74,6 | 70,8 | 103 | 135,7 |
| 161 | 72,8 | 75,1 | 71,2 | 104 | 136,6 |
| 162 | 73,2 | 75,5 | 71,6 | 104 | 137,4 |
| 163 | 73,7 | 76 | 72,1 | 105 | 137,3 |
| 164 | 74,2 | 76,5 | 72,6 | 106 | 138,1 |
| 165 | 74,6 | 76,9 | 73 | 106 | 139,0 |
| 166 | 75,1 | 77,4 | 73,5 | 107 | 140,8 |
| 167 | 75,6 | 77,9 | 73,9 | 108 | 141,7 |
| 168 | 76 | 78,4 | 74,4 | 108 | 142,5 |
| 169 | 76,5 | 78,9 | 74,9 | 109 | 143,4 |
| 170 | 77 | 79,4 | 75,3 | 110 | 143,3 |
| 171 | 77,4 | 79,9 | 75,8 | 110 | 144,1 |
| 172 | 77,9 | 80,4 | 76,3 | 111 | 145,0 |
| 173 | 78,3 | 80,9 | 76,8 | 112 | 146,8 |
| 174 | 78,8 | 81,4 | 77,2 | 112 | 147,7 |
| 175 | 79,3 | 81,9 | 77,7 | 113 | 148,6 |
| 176 | 79,7 | 82,4 | 78,2 | 114 | 149,4 |
| 177 | 80,2 | 82,8 | 78,6 | 114 | 149,4 |
| 178 | 80,7 | 83,3 | 79 | 115 | 150 |
| 179 | 81,1 | 83,8 | 79,5 | 116 | 151 |
| 180 | 81,6 | 84,3 | 80 | 116 | 152,6 |
| 181 | 82,1 | 84,7 | 80,4 | 117 | 152,9 |
| 182 | 82,5 | 85,2 | 80,8 | 118 | 153,7 |
| 183 | 82,9 | 85,7 | 81,3 | 118 | 154,6 |
| 184 | 83,4 | 86,2 | 81,8 | 119 | 155,4 |
| 185 | 83,9 | 86,6 | 82,2 | 120 | 156,3 |
| 186 | 84,4 | 87,1 | 82,6 | 120 | 157,1 |
| 187 | 84,8 | 87,6 | 83,1 | 121 | 158,0 |
| 188 | 85,3 | 88,1 | 83,6 | 122 | 158,8 |
| 189 | 85,7 | 88,5 | 84 | 122 | 169,7 |
| 190 | 86,2 | 89 | 84,5 | 123 | 160,5 |
| 191 | 86,6 | 89,5 | 84,9 | 124 | 161,3 |
| 192 | 87,1 | 90 | 85,4 | 124 | 162,3 |
| 193 | 87,6 | 90,4 | 85,8 | 125 | 163,0 |
| 194 | 88 | 90,9 | 86,3 | 126 | 164,9 |
| 195 | 88,5 | 91,4 | 86,7 | 126 | 164,7 |
| 196 | 88,9 | 91,9 | 87,2 | 127 | 165,6 |
| 197 | 89,4 | 92,3 | 87,6 | 128 | 166,4 |
| 198 | 89,9 | 92,8 | 88,1 | 128 | 167,3 |

Determinación de Lactosa

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 200 | 90,8 | 93,8 | 89,0 | 129,7 | 169,0 |
| 201 | 91,3 | 94,2 | 89,4 | 130 | 170 |
| 202 | 91,7 | 94,6 | 89,9 | 131,1 | 170,7 |
| 203 | 92,2 | 95,2 | 90,3 | 131,8 | 171,6 |
| 204 | 92,7 | 95,7 | 90,8 | 132,4 | 172,4 |
| 205 | 93,2 | 96,2 | 91,3 | 133,1 | 173,3 |
| 206 | 93,6 | 96,6 | 91,7 | 133,8 | 174,1 |
| 207 | 94,1 | 97,1 | 92,1 | 134,5 | 175,0 |
| 208 | 94,5 | 97,6 | 92,6 | 135,2 | 175,8 |
| 209 | 95,0 | 98,1 | 93,1 | 135,8 | 176,7 |
| 210 | 95,5 | 98,6 | 93,6 | 136,5 | 177,5 |
| 211 | 95,9 | 99,1 | 94,0 | 137,2 | 178,3 |
| 212 | 96,1 | 99,6 | 94,5 | 137,9 | 179,2 |
| 213 | 96,9 | 100,1 | 95,0 | 138,6 | 180,0 |
| 214 | 97,4 | 100,6 | 95,5 | 139,3 | 180,9 |
| 215 | 97,8 | 101,1 | 96,0 | 140,0 | 181,7 |
| 216 | 98,3 | 101,6 | 96,5 | 140,6 | 182,6 |
| 217 | 98,7 | 102,1 | 97,0 | 141,3 | 183,4 |
| 218 | 99,2 | 102,6 | 97,5 | 142,0 | 184,3 |
| 219 | 99,7 | 103,1 | 97,9 | 142,6 | 185,1 |
| 220 | 100,1 | 103,6 | 98,4 | 143,3 | 186,0 |
| 221 | 100,6 | 104,1 | 98,9 | 144,0 | 186,9 |
| 222 | 101,1 | 104,6 | 99,4 | 144,7 | 187,7 |
| 223 | 101,5 | 105,1 | 99,8 | 145,4 | 188,6 |
| 224 | 102,0 | 105,6 | 100,3 | 146,1 | 189,4 |
| 225 | 102,5 | 106,1 | 100,8 | 146,8 | 190,3 |
| 226 | 103,0 | 106,6 | 101,3 | 147,5 | 191,1 |
| 227 | 103,5 | 107,1 | 101,7 | 148,1 | 192,0 |
| 228 | 103,9 | 107,6 | 102,2 | 148,8 | 192,8 |
| 229 | 104,4 | 108,1 | 102,7 | 149,4 | 193,7 |
| 230 | 104,8 | 108,6 | 103,2 | 150,1 | 194,5 |
| 231 | 105,1 | 109,1 | 103,6 | 150,8 | 195,3 |
| 232 | 105,5 | 109,6 | 104,1 | 151,4 | 196,2 |
| 233 | 106,3 | 110,1 | 104,6 | 152,1 | 197,0 |
| 234 | 106,8 | 110,6 | 105,1 | 152,8 | 197,9 |
| 235 | 107,1 | 111,1 | 105,5 | 153,4 | 198,7 |
| 236 | 107,7 | 111,6 | 106,0 | 154,1 | 199,6 |
| 237 | 108,2 | 112,1 | 106,5 | 154,8 | 200,4 |
| 238 | 108,6 | 112,6 | 107,0 | 155,4 | 201,3 |
| 239 | 109,1 | 113,1 | 107,5 | 156,1 | 202,1 |
| 240 | 109,5 | 113,6 | 108,0 | 156,8 | 203,0 |
| 241 | 110,1 | 114,2 | 108,5 | 157,4 | 203,9 |
| 242 | 110,5 | 114,7 | 109,0 | 158,1 | 204,7 |
| 243 | 111,0 | 115,2 | 109,4 | 158,7 | 205,6 |
| 244 | 111,4 | 115,7 | 109,9 | 159,4 | 206,0 |
| 245 | 111,9 | 116,2 | 110,4 | 160,1 | 207,3 |
| 246 | 112,4 | 116,7 | 110,9 | 160,7 | 208,1 |
| 247 | 112,8 | 117,2 | 111,3 | 161,4 | 209,9 |
| 248 | 113,3 | 127,7 | 111,8 | 162,0 | 209,8 |

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 250 | 114,2 | 118,7 | 112,8 | 163,4 | 211,5 |
| 251 | 114,7 | 119,2 | 113,2 | 164,0 | 212,3 |
| 252 | 115,2 | 119,7 | 113,7 | 164,7 | 213,2 |
| 253 | 115,6 | 120,2 | 114,2 | 165,4 | 214,0 |
| 254 | 116,1 | 120,7 | 114,7 | 166,0 | 214,9 |
| 255 | 116,6 | 121,2 | 115,1 | 166,7 | 215,7 |
| 256 | 117,0 | 121,7 | 115,6 | 167,3 | 216,6 |
| 257 | 117,5 | 122,2 | 116,1 | 168,0 | 217,4 |
| 258 | 118,0 | 122,7 | 116,6 | 168,7 | 218,3 |
| 259 | 118,5 | 123,2 | 117,0 | 169,4 | 219,1 |
| 260 | 119,0 | 123,7 | 117,5 | 170,0 | 220,0 |
| 261 | 119,4 | 124,2 | 118,0 | 170,7 | 220,9 |
| 262 | 119,9 | 124,7 | 118,5 | 171,3 | 221,7 |
| 263 | 120,4 | 125,2 | 118,9 | 172,0 | 222,6 |
| 264 | 120,9 | 125,7 | 119,4 | 172,6 | 223,4 |
| 265 | 121,4 | 126,2 | 119,9 | 173,3 | 224,3 |
| 266 | 121,8 | 126,7 | 120,4 | 174,0 | 225,1 |
| 267 | 122,3 | 127,2 | 120,9 | 174,7 | 226,0 |
| 268 | 122,8 | 127,7 | 121,4 | 175,4 | 226,8 |
| 269 | 123,3 | 128,3 | 121,9 | 176,1 | 227,7 |
| 270 | 123,7 | 128,8 | 122,4 | 176,8 | 228,5 |
| 271 | 124,2 | 129,3 | 122,8 | 177,5 | 229,3 |
| 272 | 124,7 | 129,8 | 123,3 | 178,2 | 230,2 |
| 273 | 125,2 | 130,3 | 123,8 | 178,8 | 231,0 |
| 274 | 125,6 | 130,8 | 124,3 | 179,5 | 231,9 |
| 275 | 126,1 | 131,3 | 124,7 | 180,2 | 232,7 |
| 276 | 126,6 | 131,8 | 125,2 | 180,9 | 233,6 |
| 277 | 127,1 | 132,3 | 125,7 | 181,6 | 234,4 |
| 278 | 127,6 | 132,8 | 126,2 | 182,3 | 235,3 |
| 279 | 128,0 | 133,3 | 126,7 | 183,0 | 236,1 |
| 280 | 128,5 | 133,8 | 127,2 | 183,6 | 237,0 |
| 281 | 129,0 | 134,4 | 127,7 | 184,3 | 237,9 |
| 282 | 129,4 | 134,9 | 128,2 | 185,0 | 238,7 |
| 283 | 129,9 | 135,4 | 128,6 | 185,7 | 239,6 |
| 284 | 130,4 | 135,9 | 129,1 | 186,4 | 240 |
| 285 | 130,8 | 136,4 | 129,6 | 187,1 | 240 |
| 286 | 131,3 | 136,9 | 130,1 | 187,8 | 24 |
| 287 | 131,8 | 137,4 | 130,5 | 188,5 | 243 |
| 288 | 132,3 | 137,9 | 131,0 | 189,1 | 243,9 |
| 289 | 132,8 | 138,4 | 131,5 | 189,8 | 244,7 |
| 290 | 133,2 | 138,9 | 132,0 | 190,5 | 245,6 |
| 291 | 133,7 | 139,4 | 132,5 | 191,2 | 246,2 |
| 292 | 132,4 | 140,0 | 133,0 | 191,9 | 247,3 |
| 293 | 134,7 | 140,5 | 133,5 | 192,6 | 248,2 |
| 294 | 135,2 | 141,0 | 134,0 | 193,3 | 249,0 |
| 295 | 135,6 | 141,5 | 134,4 | 194,0 | 249,9 |
| 296 | 136,1 | 142,0 | 134,9 | 194,7 | 250,8 |
| 297 | 136,9 | 142,5 | 135,4 | 195,4 | 251,6 |
| 298 | 237,1 | 143,0 | 135,9 | 196,0 | 252,5 |

Determinación de Lactosa

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| 300 | 138 | 144 | 137 | 197 | 254 |
| 302 | 139 | 145 | 138 | 199 | 256 |
| 303 | 140 | 146 | 138 | 200 | 257 |
| 304 | 140 | 146 | 139 | 200 | 258 |
| 305 | 141 | 147 | 139 | 201 | 259 |
| 306 | 141 | 147 | 140 | 202 | 259 |
| 307 | 142 | 148 | 140 | 202 | 260 |
| 308 | 142 | 148 | 141 | 203 | 261 |
| 309 | 143 | 149 | 141 | 204 | 262 |
| 310 | 143 | 149 | 142 | 204 | 263 |
| 311 | 143 | 150 | 142 | 205 | 264 |
| 312 | 149 | 150 | 143 | 206 | 265 |
| 313 | 144 | 151 | 143 | 207 | 265 |
| 314 | 145 | 151 | 144 | 207 | 266 |
| 315 | 145 | 152 | 144 | 208 | 267 |
| 316 | 146 | 152 | 145 | 204 | 268 |
| 317 | 146 | 153 | 145 | 210 | 269 |
| 318 | 147 | 153 | 146 | 210 | 270 |
| 319 | 147 | 154 | 146 | 211 | 271 |
| 320 | 148 | 154 | 147 | 212 | 271 |
| 321 | 148 | 155 | 147 | 212 | 272 |
| 322 | 149 | 155 | 148 | 213 | 273 |
| 323 | 149 | 156 | 148 | 214 | 274 |
| 324 | 150 | 157 | 149 | 214 | 248 |
| 325 | 150 | 157 | 149 | 215 | 276 |
| 326 | 151 | 158 | 150 | 216 | 277 |
| 327 | 151 | 158 | 150 | 217 | 277 |
| 328 | 152 | 159 | 151 | 217 | 278 |
| 329 | 152 | 159 | 151 | 218 | 279 |
| 330 | 153 | 160 | 152 | 219 | 280 |
| 331 | 153 | 160 | 152 | 220 | 281 |
| 332 | 154 | 161 | 153 | 220 | 282 |
| 333 | 154 | 161 | 153 | 221 | 283 |
| 334 | 155 | 162 | 154 | 222 | 283 |
| 335 | 155 | 162 | 154 | 222 | 284 |
| 336 | 156 | 163 | 155 | 223 | 285 |
| 337 | 156 | 163 | 155 | 224 | 286 |
| 338 | 157 | 164 | 156 | 225 | 287 |
| 339 | 157 | 164 | 156 | 225 | 288 |
| 340 | 158 | 165 | 157 | 226 | 289 |
| 341 | 158 | 166 | 157 | 227 | 290 |
| 342 | 158 | 166 | 157 | 227 | 290 |
| 343 | 159 | 166 | 158 | 227 | 290 |
| 344 | 160 | 167 | 159 | 229 | 292 |
| 345 | 160 | 168 | 159 | 229 | 293 |
| 346 | 161 | 168 | 160 | 230 | 294 |
| 347 | 161 | 169 | 160 | 231 | 295 |
| 348 | 162 | 169 | 161 | 231 | 295 |
| 349 | 162 | 170 | 161 | 232 | 296 |

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L | M |
|-------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| 350 | 162 | 170 | 162 | 233 | 297 |
| 352 | 163 | 171 | 163 | 234 | |
| 353 | 164 | 172 | 163 | 235 | |
| 354 | 164 | 172 | 164 | 236 | |
| 355 | 165 | 173 | 164 | 236 | |
| 356 | 165 | 173 | 165 | 237 | |
| 357 | 166 | 174 | 165 | 238 | |
| 358 | 166 | 174 | 166 | 238 | |
| 359 | 167 | 175 | 166 | 239 | |
| 360 | 167 | 175 | 167 | 240 | |
| 361 | 168 | 176 | 167 | 241 | |
| 362 | 168 | 177 | 168 | 241 | |
| 363 | 169 | 177 | 168 | 242 | |
| 364 | 169 | 178 | 169 | 243 | |
| 365 | 170 | 178 | 169 | 243 | |
| 366 | 170 | 179 | 170 | 244 | |
| 367 | 171 | 179 | 170 | 245 | |
| 368 | 171 | 180 | 171 | 245 | |
| 369 | 172 | 180 | 171 | 246 | |
| 370 | 172 | 181 | 172 | 247 | |
| 371 | 173 | 181 | 172 | 247 | |
| 372 | 173 | 182 | 173 | 248 | |
| 373 | 174 | 182 | 173 | 249 | |
| 374 | 174 | 183 | 174 | 249 | |
| 375 | 175 | 184 | 174 | 250 | |
| 376 | 175 | 184 | 175 | 251 | |
| 377 | 176 | 185 | 175 | 252 | |
| 378 | 176 | 185 | 176 | 252 | |
| 379 | 177 | 186 | 176 | 253 | |
| 380 | 177 | 186 | 177 | 254 | |
| 381 | 178 | 187 | 177 | 254 | |
| 382 | 178 | 187 | 178 | 255 | |
| 383 | 179 | 188 | 178 | 256 | |
| 384 | 179 | 188 | 179 | 257 | |
| 385 | 180 | 189 | 180 | 257 | |
| 386 | 180 | 189 | 180 | 258 | |
| 387 | 181 | 190 | 181 | 259 | |
| 388 | 181 | 191 | 181 | 260 | |
| 389 | 182 | 191 | 182 | 260 | |
| 390 | 182 | 192 | 182 | 261 | |
| 391 | 183 | 192 | 183 | 262 | |
| 392 | 183 | 192 | 183 | 262 | |
| 393 | 184 | 193 | 184 | 363 | |
| 394 | 184 | 194 | 184 | 264 | |
| 395 | 185 | 194 | 185 | 265 | |
| 396 | 185 | 195 | 185 | 265 | |
| 397 | 186 | 195 | 186 | 266 | |
| 398 | 186 | 196 | 186 | 267 | |
| 399 | 187 | 196 | 187 | 267 | |

Determinación de Lactosa

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc | L |
|-------------------|-----|------|-----|-----|
| 400 | 187 | 197 | 187 | 268 |
| 402 | 188 | 198 | 188 | 270 |
| 403 | 189 | 199 | 189 | 270 |
| 404 | 189 | 199 | 189 | 271 |
| 405 | 190 | 200 | 190 | 272 |
| 406 | 190 | 200 | 190 | 273 |
| 407 | 191 | 201 | 191 | 273 |
| 408 | 191 | 201 | 191 | 274 |
| 409 | 192 | 202 | 192 | 275 |
| 410 | 192 | 202 | 192 | 276 |
| 411 | 193 | 203 | 193 | 276 |
| 412 | 193 | 204 | 193 | 277 |
| 413 | 194 | 204 | 194 | 278 |
| 414 | 194 | 205 | 194 | 278 |
| 415 | 195 | 205 | 195 | 279 |
| 416 | 195 | 206 | 195 | 280 |
| 417 | 196 | 206 | 196 | 281 |
| 418 | 196 | 207 | 197 | 281 |
| 419 | 197 | 207 | 197 | 282 |
| 420 | 197 | 208 | 198 | 283 |
| 421 | 198 | 209 | 198 | 284 |
| 422 | 198 | 209 | 199 | 285 |
| 423 | 199 | 210 | 199 | 285 |
| 424 | 199 | 210 | 200 | 286 |
| 425 | 200 | 211 | 200 | 287 |
| 426 | 201 | 211 | 201 | 288 |
| 427 | 201 | 212 | 201 | 288 |
| 428 | 202 | 213 | 202 | 289 |
| 429 | 202 | 213 | 202 | 290 |
| 430 | 203 | 214 | 203 | 291 |
| 431 | 203 | 214 | 203 | 291 |
| 432 | 204 | 215 | 204 | 292 |
| 433 | 204 | 215 | 204 | 293 |
| 434 | 205 | 216 | 205 | 294 |
| 435 | 205 | 216 | 206 | 295 |
| 436 | 206 | 217 | 206 | 295 |
| 437 | 206 | 217 | 207 | 296 |
| 438 | 207 | 218 | 207 | 297 |
| 439 | 207 | 219 | 208 | 298 |
| 440 | 208 | 219 | 208 | 298 |
| 441 | 208 | 220 | 209 | 299 |
| 442 | 209 | 220 | 209 | 300 |
| 443 | 209 | 221 | 210 | 301 |
| 444 | 210 | 221 | 210 | 301 |
| 445 | 210 | 222 | 211 | 302 |
| 446 | 211 | 22,4 | 211 | 303 |
| 447 | 211 | 223 | 212 | 304 |
| 448 | 212 | 224 | 212 | 305 |
| 449 | 212 | 224 | 213 | 305 |

| Cu ₂ O | G | A.I. | Sc |
|-------------------|-----|------|-----|
| 451 | 213 | 225 | 214 |
| 453 | 214 | 227 | 215 |
| 454 | 215 | 227 | 216 |
| 455 | 215 | 228 | 216 |
| 456 | 216 | 228 | 217 |
| 457 | 216 | 229 | 218 |
| 458 | 217 | 230 | 218 |
| 459 | 217 | 230 | 219 |
| 460 | 218 | 231 | 220 |
| 461 | 218 | 232 | 220 |
| 462 | 219 | 232 | 221 |
| 463 | 219 | 233 | 221 |
| 464 | 220 | 234 | 222 |
| 465 | 220 | 234 | 223 |
| 466 | 221 | 235 | 223 |
| 467 | 222 | 236 | 224 |
| 468 | 222 | 236 | 224 |
| 469 | 223 | 237 | 225 |
| 470 | 223 | 237 | 226 |
| 471 | 224 | 238 | 226 |
| 472 | 224 | 239 | 227 |
| 473 | 225 | 239 | 227 |
| 474 | 225 | 240 | 228 |
| 475 | 226 | 241 | 229 |
| 476 | 226 | 241 | 229 |
| 477 | 227 | 242 | 230 |
| 478 | 227 | 242 | 230 |
| 479 | 228 | 243 | 231 |
| 480 | 228 | 244 | 231 |
| 481 | 229 | 244 | 232 |
| 482 | 229 | 245 | 233 |
| 483 | 230 | 246 | 233 |
| 484 | 230 | 246 | 234 |
| 485 | 231 | 247 | 235 |
| 486 | 231 | | |
| 487 | 232 | | |
| 488 | 232 | | |
| 489 | 233 | | |
| 490 | 233 | | |
| 491 | 234 | | |
| 492 | 235 | | |
| 493 | 235 | | |
| 494 | 236 | | |
| 495 | 236 | | |
| 496 | 236 | | |
| 497 | 237 | | |
| 498 | 238 | | |
| 499 | 238 | | |
| 500 | 239 | | |

| Cu ₂ O | G |
|-------------------|-------|
| 502 | 240 |
| 504 | 241 |
| 505 | 241.2 |
| 506 | 241.8 |
| 507 | 242.3 |
| 508 | 242.9 |
| 509 | 243.4 |
| 510 | 243.9 |

8.3.2. Determinación de Turbidez.

8.3.2.1. Objetivo:

Determinar el efecto de procesos de conservación (UTH, pasteurización, ebullición) sobre las proteínas del suero de la leche.

8.3.2.2. Fundamento:

La leche es un buen alimento debido a la alta calidad de sus proteínas, para su estudio, se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su estado de dispersión: las caseínas que representan 80% del total, y las proteínas del suero o seroproteínas que constituyen el 20% restante.^(10,38)

Debido a que las caseínas y las otras proteínas están estabilizadas por diferentes mecanismo en el seno de la leche, es sencillo separarlas mediante la manipulación de diversos parámetros, tales como el pH, la temperatura y la fuerza iónica y mediante el uso de sustancias, como urea, que rompen las uniones que las estabilizan. A diferencia de las caseínas, las proteínas del suero son compactas, globulares, con un peso molecular que varían entre 14000 y 1000 000 de daltones y son solubles en un intervalo de pH muy amplio (incluso a pH ácidos, siempre y cuando no se hayan desnaturalizado por el calor). En estado natural no se asocian con las caseínas, pero en las leches tratadas térmicamente y homogenizadas, hay una tracción que sí lo hace.⁽³⁸⁾

Constan por lo menos de ocho fracciones diferentes, entre las cuales destacan la α - lactoglobulina, la α - lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina y las proteosas-peptonas.⁽¹⁰⁾

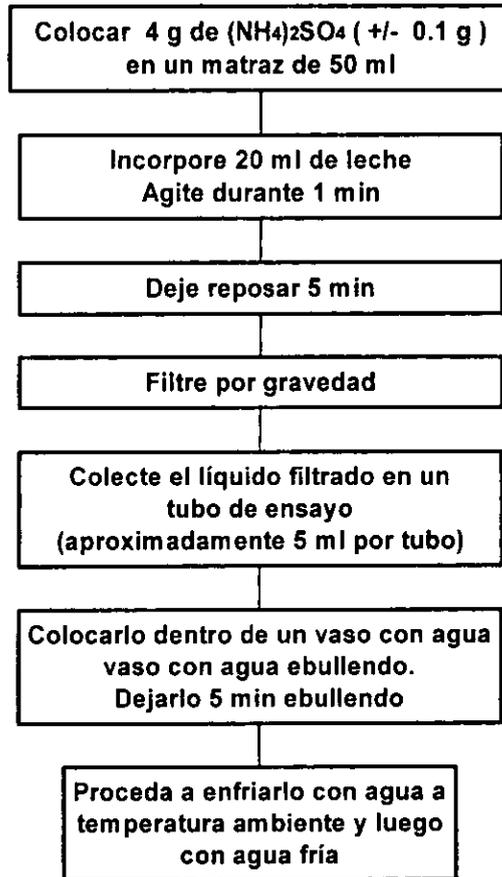
En general son muy sensibles a las temperaturas altas y en menor grado al pH ácido debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica; son las primeras proteínas de la leche en desnaturalizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de oxidación-reducción, que puede llegar a inhibir parcialmente las reacciones de oxidación; contiene la mayoría de los aminoácidos y tienen un mejor balance de éstos que las propias caseínas, por lo que su valor nutritivo es mejor.⁽¹⁰⁾

Ya que se conocen las propiedades de las proteínas que están contenidas en el suero de la leche, podemos determinar cualitativamente proteínas son afectadas al someterse a los tratamientos térmicos; esto se puede llevar a cabo mediante la prueba de la **determinación de turbidez**, se fundamenta en la adición

del sulfato de amonio, al ser una sal que al contacto con el agua contenida en la leche debido a que favorece la precipitación de las caseínas, el gran contenido de sal de amonio, hace que se forme una solución muy saturada y favorezca la precipitación de las proteínas.⁽³⁹⁾

Ya separadas las caseínas tenemos las seroproteínas, sometiendo a temperatura de ebullición, podemos observar la precipitación de ellas. El resultado puede ser diferente en cada caso, ya que influye mucho el tipo de muestra que se utilice. También el precipitado obtenido puede ser de diferente color (de blanco lechoso a blanco-amarillo).⁽³⁹⁾

8.3.2.3. Seguimiento Experimental: **Determinación de Turbidez**



8.3.2.4.Desarrollo Experimental.

| Material / equipo | Reactivos |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 1 matraz erlenmeyer • 1 probeta de 50 ml • 1 agitador de vidrio • 1 vaso de precipitado de 50 ml • 1 filtro de vidrio con cuello largo • 3 tubos de ensayo de vidrio • 1 espátula de acero inoxidable • 1 papel filtro redondo con pliegues • 1 baño maría • 1 termómetro | <ul style="list-style-type: none"> • $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ • Leche • • • • • |

Procedimiento Experimental

1. Pesar 4 (+/- 0.1 g) g de $(\text{NH}_4)_2$ en un matraz erlenmeyer de 50 ml.
2. Incorpore 20 (+/- 0.5 ml) ml de leche al matraz erlenmeyer.
3. Agite durante 1 min. Deje reposar 5 min.
4. Proceda a filtrar a través del papel filtro, 12 pliegues(vea el apartado de filtración). Recolecte el filtrado en un vaso de precipitado de 50 ml.
5. Transfiera el volumen obtenido del filtrado en cantidades iguales en los tres tubos de ensayo (mín. 5 ml c/u)
6. Colocar los tubos de ensayo a baño maría a la temperatura de ebullición durante 5 min.
7. Enfriar con agua a temperatura ambiente y luego con agua fría.
8. Examine la turbidez.

8.3.2.5. Procesamiento de Datos

8.3.2.5.1. Resultados:

Reporte en un tabla como esta:

| Núm. de muestra | Tipo de muestra | Volumen de la muestra | Turbidez |
|-----------------|-----------------|-----------------------|----------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Registros de Turbidez

Donde se vierta el grado apropiado de turbidez encontrado como:

- ◆ =
- ◆◆ =
- ◆◆◆ =
- ◆◆◆◆ =

dando el valor correspondiente ue usted desee.

Inferir en que grado afectan los procesos de conservación en las proteínas de la leche.

8.3.3. Elaboración de Queso

8.3.3.1. Objetivo:

Elaborar un producto derivado de la leche aplicando conocimientos de los cambios bioquímicos que se llevan a cabo en las proteínas de la leche.

8.3.3.2. Introducción

Por contener un gran número de nutrimentos y ser un alimento tan completo, con un pH casi neutro, la leche está sujeta a contaminaciones microbiológicas que la hacen ser un producto altamente perecedero. Los distintos derivados que de ellas se obtienen representan una forma más estable, con una vida de anaquel mucho mayor que la materia prima.⁽³⁸⁾

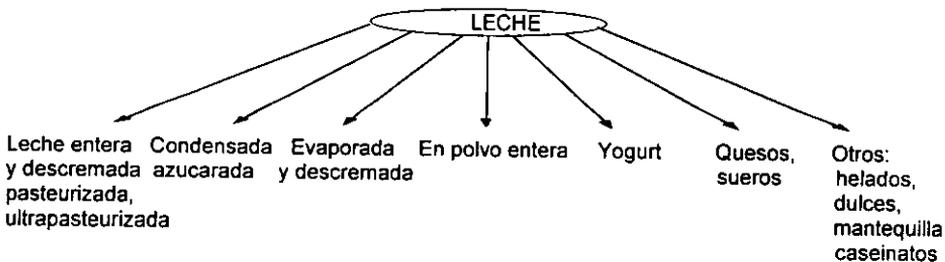


Fig.8.3.4.1 Productos derivados de la leche⁽³⁸⁾

Los quesos son una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa; se obtiene por cuagulación de la leche después del desuerado, en el transcurso del cual el lactosuero se separa de la cuajada.⁽¹⁰⁾

Las formas de preparación diversifican los quesos por la influencia que tienen sobre la estructura y sobre las fermentaciones:⁽¹⁰⁾

- a) Los quesos tienen una "armazón" de paracaseinato de cal; su estructura depende de la forma de coagulación, del desarrollo de la acidez, de la cantidad de agua retenida, de la proporción de la materia grasa y del grado de proteolisis, que le hace perder su rigidez.⁽¹⁰⁾

b) Las posibilidades de fermentación de la caseína y de la materia grasa son diversa; su realización depende de un conjunto de condiciones fisicoquímicas, y de las enzimas presentes. El aspecto de los quesos y su sabor se deben principalmente a la actividad de los microorganismos y a las fermentaciones que experimentan la caseína la materia grasa y la lactosa que queda en la cuajada.⁽¹⁰⁾

Las fases principales de la transformación de la leche en queso se enumeran en la Tabla 8.3.2.1., cuando se obtienen la cuajada por acción del cuajo, lo que representa el caso más general. En las fabricaciones macanizadas, la parte continua del trabajo se detiene, en general, en la fase número 4.⁽¹⁰⁾

| Fases principales | | Acciones y modificaciones |
|--|-----------------------------|---|
| 1. Maduración de la leche (+/- fermento láctico) | Leche | <ul style="list-style-type: none"> Desarrollo limitado de la microflora acidificante y, a veces, de una flora de micrococos que preparan el "terreno" |
| 2. Coagulación (cuajado) (+cuajo) | | <ul style="list-style-type: none"> Formación del gel |
| 3. Corte de la cuajada y desuerado (+/- trabajo mecánico o cocido) | Cuajada fresca + lactosuero | <ul style="list-style-type: none"> Ruptura del gel, aceleración de la sinéresis y separación de la mayor parte del agua. Acidificación láctica que favorece el desuerado e inhibe determinadas bacterias |
| 4. Colocación en molde | Queso fresco | <ul style="list-style-type: none"> Continuación del desuerado y de la destrucción de la lactosa; el contenido en agua debe aproximarse al valor óptimo |
| 5. Salado | Queso salado | <ul style="list-style-type: none"> Secado (complemento del desuerado). Influencia sobre el sabor. Selección de microorganismos Influencia sobre las actividades enzimáticas |
| 6. Maduración | Queso madurado | <ul style="list-style-type: none"> Destrucción completa de la lactosa Neutralización de la pasta Pérdida de agua Proteólisis y lipólisis con formación de productos aromáticos. Formación de la corteza. |

Tabla 8.3.4.1. Fabricación del queso⁽¹⁰⁾

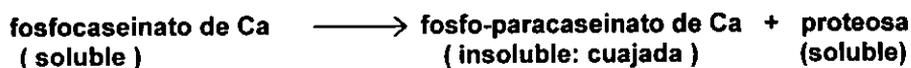
El cuajo es una enzima proteolítica secretada por el estómago de los rumiantes jóvenes, bajo una forma inactiva, el "pro-cuajo", que se transforma en cuajo por un fenómeno autocatalítico de activación; acelerado por los iones H^+ , como en el caso del pepsinógeno. En el curso de la activación, los péptidos ricos en tirosina en la parte N-terminal, se separan de la pro-enzima, y el punto isoeléctrico desciende de 5.0 (pro-enzima) a 4.7 (enzima). La activación es casi instantánea a pH 2.0.⁽¹⁰⁾

El cuajo se segrega en el cuarto compartimiento del estómago de los rumiantes, el abomazo, vulgarmente llamado "cuajar". Generalmente se admite que la secreción se detiene en el momento del destete, cuando se incorporan alimentos sólidos a la ración; entonces se reemplaza por la pepsina.⁽¹⁰⁾

El cuajo puro es una haloproteína, desprovista de metal, que contiene el 15% de nitrógeno; su peso molecular se acerca a 40.000. La composición del cuajo en aminoácidos es netamente diferente a la proteolítica (cuajo 3.8 a 4.0 y pepsina 1.8 a 2.0), y el pH límite de la actividad coagulante (cuajo 7.3-7.5; pepsina 6.6-6.7). El cuajo es muy sensible a las variaciones del pH. No llega a coagular la leche ligeramente alcalina (hacia pH 7.4) y se inactiva irreversiblemente a pH 8.0 (mientras que la proenzima resiste pH más elevados). El cuajo conserva su actividad proteolítica en medio ácido pero debajo de pH 4.8 es poco estable.⁽¹⁰⁾

Acción del cuajo sobre la caseína

La coagulación de la leche por el cuajo, tal como ocurre en la quesería, es consecuencia de una reacción proteolítica limitada, donde la caseína constituye el sustrato. El lacto suero separado de la cuajada contiene una sustancia soluble nueva, denominada "proteosa de Hammarsten" que representa alrededor del 6 % de la caseína original. La reacción se representa habitualmente de la siguiente manera:⁽¹⁰⁾



La caseína modificada se ha denominado "paracaseína", y se distingue de la caseína entera por su insolubilidad en presencia de pequeñas cantidades de calcio.⁽¹⁰⁾

Se ha podido comprobar que el complejo fosfo-paracaseinato de cal lleva una carga mineral más fuerte que el complejo original; sobre este último se fijan, a la vez, calcio y fósforo soluble en el curso de la coagulación de la leche.⁽¹⁰⁾

En el método tradicional, la separación de los componentes de la leche en dos partes se produce en dos tiempos:

1. La coagulación, en el curso de la cual se insolubiliza la caseína.
2. El desuerado, en el que el lactosuero se separa de la leche.

| | Cuagulación por | |
|---|---|---|
| | Acción del cuajo | Acidificación espontánea |
| Proceso bioquímico | Acción enzimática (lactosa no degradada) | Fermentación láctica a expensas de la lactosa |
| Modificación de la caseína | Transformación en paracaseína y separación de una parte no proteica | Sin modificación química de la proteína |
| pH | 6.8 | 4.6 |
| Composición del coágulo | Fosfo-paracaseinato de cal | Caseína pura (desmineralizada) |
| Naturaleza del coágulo | Gel elástico impermeable | Cuajada desmenuzable, sin cohesión |
| Sineresis (retracción natural de la cuajada y expulsión del suero) | Rápida | Lenta |

Cuadro 8.3.3.2.1. Características de las dos formas habituales de coagulación de la leche⁽¹⁰⁾

Los factores que tienen influencia sobre las propiedades de la cuajada y que se pueden manipular:⁽¹⁰⁾

- la acidez de la leche en el momento de la adición del cuajo y su siembra con fermentos apropiados;
- la temperatura;
- la cantidad de calcio soluble;
- la dosis de cuajo

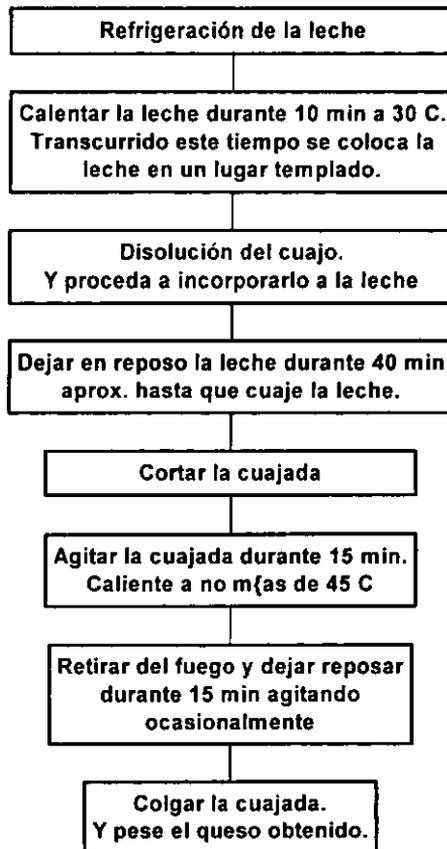
Cuanto más elevada es la acidez en el momento de la adición del cuajo, mayor es el carácter "ácido" o "láctico" de la cuajada: friable y porosa. La duración de la coagulación depende del conjunto de factores mencionados más arriba, y es característica de cada tipo de fabricación.⁽¹⁰⁾

En la práctica se emplean diversos tipos de cuajo:⁽¹⁰⁾

- ◆ Extracto líquido de fuerza 1/10.000, que es más puro desde el punto de vista químico y bacteriológico que el cuajo líquido y conserva mejor su actividad, pero es más delicado de manipular, ya que es una sustancia higroscópica;⁽¹⁰⁾
- ◆ Cuajo en polvo de fuerza 1/100.000 ó 1/150.000, que es más puro desde el punto de vista químico y bacteriológico que el cuajo líquido y conserva mejor su actividad, pero es más delicado de manipular, ya que es una sustancia higroscópica;⁽¹⁰⁾

El cloruro de calcio se emplea de forma irregular como coadyuvante de la coagulación con las leches crudas, y regularmente con las leches pasteurizadas. Un exceso de cloruro de calcio (más de 20 g por 100 g) es inútil desde el punto de vista de la coagulación, y perjudicial en razón de la posible aparición del sabor amargo.⁽¹⁴⁾

8.3.4.3. Seguimiento Experimental: **Elaboración de Queso**



8.3.4.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o equipo | Reactivos a utilizar |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 1 recipiente para calentar la leche con capacidad de 2 litros o más• Fuente de calor (Mechero)• 1 manta de cielo 50 cm x 50 cm aprox.• 1 cuchillo largo• 1 agitador o cuchara larga | <ul style="list-style-type: none">• Leche• Cuajo• NaCl• |

Procedimiento Experimental

1. Refrigeración de la leche. Conservar 2 litros de leche pasteurizada en lugar fresco (10 -15°C) durante una noche; esta leche tendrá aproximadamente 3.2% de grasa y una acidez recomendable que se obtendrá al dejar la leche unos minutos al medio ambiente.
2. Calentar la leche en un vaso de precipitado durante 10 min a 30°C. Una vez transcurrido este tiempo. Colocar la leche en un lugar templado y abrigado contra corrientes de aire frío.
3. En un vaso de predipitado con agua fría, se disuelven media pastilla de cuajo, una cucharada de cloruro de calcio (CaCl) y media cucharadita de sal común. Cuando está totalmente disuelto el cuajo, éste añade a la leche, con agitación uniforme y constante para que la incorporación del cuajo sea lo más completa posible.
4. Dejar en reposo la leche durante 40 min aproximadamente hasta que cuaje la leche. Para saber si ya está firme el cuajo se introduce el agitador; se produce una abertura cuando la cuajada se ha efectuado correctamente, siendo éste el momento oportuno para cortarla.
5. Para cortar la cuajada se utiliza un cuchillo largo, se introduce la hoja verticalmente recorriendo todo el largo de la masa haciendo cortes de 1 cm de separación; después se hacen cortes al sesgo separados unos 2 o 3 cm, profundizarlos, progresivamente.

6. Agite la cuajada durante 15 min. La cuajada se agita con suavidad, los grumos grandes que se formen se cortan cuidadosamente sin desbaratarlos, debe procurarse que el tamaño de los grumos sea uniforme.
7. Calentar lenta y paulatinamente la cuajada durante 20 min hasta obtener una temperatura de 45°C. Durante esta operación debe agitarse la cuajada para evitar la formación de grumos grandes
8. Retire del fuego y deje reposar (evitando corrientes de aire frío) durante 15 min agitando ocasionalmente. Los grumos de la cuajada deben haber adquirido la firmeza y consistencia necesaria, lo cual se verifica comprimiéndolos fuertemente hacia una de las paredes del recipiente y deben desintegrarse fácilmente; es decir los grumos se apartan los unos de los otros sin unirse ni pegarse.
9. En un lienzo de manta , se coloca la cuajada durante 10 min, dándole un movimiento de vaivén para facilitar el escurrimiento del suero. Proceda a salar el queso. Si se desea se coloca dentro de un molde. Proceda a pesar el queso.

8.3.4.6. Procesamiento de Datos

8.3.4.6.1. Cálculos:

Calcule el porcentaje de queso obtenido, recordando que por cada litro de leche se obtienen 200g de queso.⁽¹⁰⁾

8.3.6.2. Resultados:

Los resultados se reportarán en una tabla como la siguiente:

| Tipo de leche | Nombre comercial | Rendimiento Obtenido |
|---------------|------------------|----------------------|
| | | |
| | | |

Recuerde que en la tabla verterá todos los resultados obtenidos del grupo.

8.3.3.2. Elaboración de Requesón

8.3.3.2.1. Objetivo.

Comprobará una de las propiedades de la leche, la Coagulación de sus proteínas séricas. A través de la elaboración de requesón, que es uno de los métodos más antiguos de conservación.

8.3.3.2.2. Fundamento

Sin lugar a duda, el primer queso elaborado por el hombre fue el requesón. Probablemente, ya se conozca desde hace milenios. En el siglo pasado, la gente del campo acostumbraba poner la leche magra que las lecherías le devolvía, en un lugar caliente de la casa, preferentemente junto al fuego. En estas condiciones, se desarrollan las bacterias, y a los pocos días la leche estaba cuajada y acidificada. Se colocaba entonces en un colador o en un paño para provocar la salida del suero. Estos campesinos consumían la cuajada con leche fresca, o la aderezaban con comino, raíces o hierbas, sirviéndose como acompañamiento del pan o de las patatas asadas.⁽⁹⁾

La calidad de un requesón está en función de su sabor y de su consistencia. Lo normal, es que el requesón tenga un uniforme sabor agrio (cuajada agria). Si su sabor es demasiado amargo, es que la transformación de la lactosa en ácido láctico por las bacterias ha sido excesivo. Esto no hubiera ocurrido, si el desuerado se hubiera efectuado en condiciones de refrigeración. Sin embargo, no es efectivo reducir la cantidad de cultivo (fermento iniciador). Otra manera de evitar que el requesón sea tan amargo, es desuerando la cuajada más tempranamente o colocando la leche en un lugar donde las temperaturas no sean tan elevadas. La mejor solución se encuentra siempre experimentando uno mismo los diferentes métodos y viendo cuál es el que mejores resultados ofrece; regla que se puede aplicar a la elaboración casera de cualquier tipo de queso. Se sabe cuando ha llegado el momento de trocear o de escaldar la cuajada, cuando al introducir en la masa un cuchillo, ésta no se vuelve a pegar; o lo que es lo mismo, cuando el cuchillo se extrae limpio, sin restos pegados de cuajada. Una vez que se ha dejado gotear el suero, conviene, lo más rápidamente posible, refrigerar a 5°C el requesón. El requesón sigue siendo un producto relativamente rico en agua, y por esta razón se estropea muy pronto si no se mete en la nevera. Los quesos frescos deben consumirse lo antes posible! Lo que no se debe hacer nunca es congelar un queso fresco: por su alto contenido en agua se alteraría completamente su estructura.⁽⁹⁾

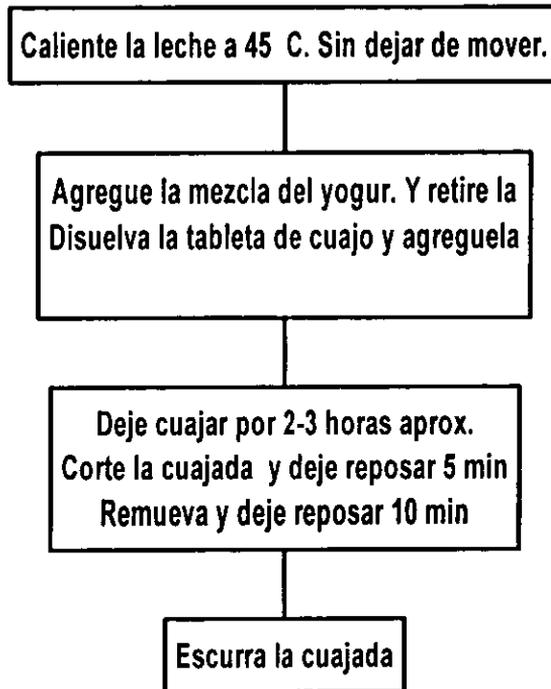
Para preparar requesón se puede utilizar tanto leche entera como leche desnatada. No obstante, al ser la leche tratada con calor mucho más estéril que leche natural o certificada, conviene añadirle siempre un 5% de suero de mantequilla o de cuajada (leche agria). La leche se puede dejar cuajar a la temperatura normal de un habitación (20°C), pero se consigue que la leche cuaje y se agrie con mayor rapidez si la temperatura es de 35°C. Sin embargo, el requesón tendrá mejor sabor y se conservará durante más tiempo si el proceso se realiza a temperaturas más bajas.

Otra posibilidad, es añadirle a la leche, aparte del fermento iniciador, un poco de cuajo; la leche cuajará antes y el requesón tendrá un sabor más suave. Si vamos a usar cuajo, estos son los pasos a seguir: se calienta la leche a la temperatura adecuada; se añade el fermento iniciador y se remueve; y a las 2-3 horas se añade el cuajo, que previamente se ha disuelto en un poco de agua templada. El cuajo agregado se ha de mezclar rápidamente, lo mejor es usar una batidora. Eso, sí parando en seguida el movimiento que hemos provocado al batir.⁽⁹⁾

Una vez que se ha cuajado la leche, se corta la cuajada en dados de 2-3 cm que se dejan reposar media hora. Transcurrido el tiempo, se forra con un paño un colador y se introducen en él los cubillos de cuajada. Ahora se envuelven los cubillos con el paño, y atando los extremos, se convierte en una bolsa. El suero se desprenderá de la pasta y se eliminará por goteo. Conviene recoger el suero exudado; puesto en la nevera y consumido frío es una bebida deliciosa.⁽⁹⁾

Al sacar la cuajada de la cacerola conviene hacerlo cuidadosamente para evitar que se parta en trozos pequeños, los cuales pueden, más tarde, obstruir los poros del paño y dificultar la salida del suero. Tampoco hay que permitir que se elimine la totalidad del suero, ya que en ese caso, el requesón estará demasiado seco. En el paño quedan siempre unos 200-300 gramos de queso fresco que se pueden aprovechar mezclándolos con nata, comino, pimentón, ajo, rábano...; al gusto.⁽⁹⁾

8.3.3.2. Seguimiento Experimental: **Elaboración de Requesón**



8.3.2.5. Material, equipo y reactivos a utilizar

Material y/o equipo

- 1 Cacerola
- 1 Cuchillo
- 1 Termómetro
- 1 paño o manta de cielo

Reactivos

- Leche entera o descremada
- 1 yogur natural (150g)
- 1 tableta de cuajo.

8.3.2.6. Procedimiento Experimental

1. Sin dejar de mover, se calienta la leche en una cacerola hasta que ésta alcanza una temperatura de 45° C.
2. Entonces se le mezcla el yogur.
3. La tableta de cuajo se disuelve en un tercio de taza de agua y se añade rápidamente. En una sola dirección.
4. Una vez hecho esto, se tapa la cacerola; se envuelve en una manta.
5. Después de 2-3 horas más tarde la leche habrá cuajado. Se procede a cortar la cuajada con un cuchillo, y manteniéndolo vertical a la pasta, se hacen de 6 a 8 cortes a lo largo y a lo ancho.
6. Deje reposar 5 minutos y remueva. Nuevamente deje reposar 10 min
7. Se forra un colador con un paño escurrido y se coloca sobre él la cuajada.
8. Anude el paño y cuelgue para dejar escurrir el suero.

NOTA: Si se desea que la cuajada tenga un sabor más agrio, basta con dejar reposar la leche más tiempo.

8.3.3.3. Elaboración de Yogur

8.3.3.1. Objetivo:

Reafirmar como las propiedades de la leche son alteradas por los tratamientos industrializados que sufren para desinfección y provocan inconvenientes en las formación de derivados lácteos como lo es el yogur.

9.3.3.2. Introducción:

El yogur tiene proteínas, fósforo, vitaminas y grasa muy digerible. La acidificación transforma todos estos componentes en el sentido de facilitar su digestión. Muchos nutriólogos opinan, que el yogur es más digestible que la leche dulce, pero eso no está probado. Lo que sí es cierto, es que muchas personas que no toleran la leche pueden tomar yogur sin problemas de ningún tipo (por ejemplo en casos de gastritis). El yogur tienen la propiedad de regular nuestras funciones digestivas; sus bacterias " limpian" el intestino evitando el estreñimiento. También es un alimento que estimula el metabolismo, tranquiliza los nervios y combate el insomnio, la hipertensión y las alergias.⁽⁹⁾

La elaboración del yogur es muy sencilla y siendo un alimento tan provechoso, me extraña que no se elabore más en los hogares. Un yogur hecho en casa cuesta aproximadamente la mitad d lo que cuesta en tiendas. Además, siempre es bueno tener la seguridad de que no contiene aditivos sintéticos.⁽⁹⁾

En el fondo, el yogur no es más que leche acidificada o agria. Su elaboración es muy sencilla. Se prepara añadiéndole a la leche dos tipos de bacterias, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Después se incuba durante algunas horas a 45 °C.⁽⁹⁾

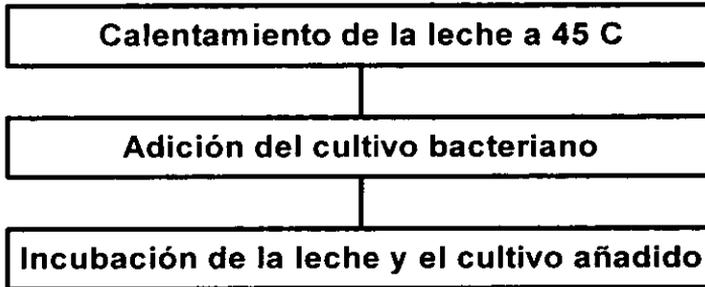
Para elaborar yogur se pueden utilizar prácticamente todos los tipos de leche que hay en los comercios. Según se quiera un yogur rico o pobre en grasa, se puede utilizar leche desnatada (menos del 0.3 % de grasa), semidesnatada (1.5 % de grasa) o entera (3.5 % de grasa).⁽⁹⁾

Da igual que la leche esté homogeneizada, pasteurizada o ultrapasteurizada; el único tipo de leche que no es conveniente utilizar para elaborar yogur es la leche esterilizada debido a que su contenido vitamínico es mucho menor.⁽⁹⁾

Si se prepara con leche fresca de granja, ésta se debe calentar, sin dejar remover, a 80°C y a continuación se enfría a 45°C. La leche se enfría

colocando la cacerola destapada en un lugar fresco. El calentamiento de la leche le confiere al yogur un aspecto homogéneo y un sabor suave. Si se prepara con leche comercial pasteurizada o ultrapasteurizada, ésta debe calentarse a 45°C.⁽⁹⁾

8.3.3.3. Secuencia Experimental: Elaboración de yogur



8.3.3.4. Material, equipo y reactivos a utilizar

| Material y/o equipo | Reactivos |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Cacerola • recipientes de vidrio o de loza • termómetro • horno • agitador | <ul style="list-style-type: none"> • Leche • Cultivo bacteriano (100 g de yogur=3 cucharadas soperas por litro de leche) |

Procedimiento Experimental:

1. Calentamiento de la leche a 45°C

La leche se introduce en una cacerola y, removiendo, se calienta a 45°C. Después se vierta en los recipientes de vidrio o de loza.

2. Adición del cultivo bacteriano

Se añaden a cada recipiente las bacterias lácticas. Estas bacterias se agregan en forma de yogur natural lo más fresco posible, aproximadamente un 10 % (100 g de yogur = 3 cucharadas soperas por litro de leche).

Lo mejor es mezclar el yogur con un poco de leche y después batir la mezcla con el resto de la leche. En los comercios dietéticos se puede comprar un fermento de yogur cuya fuerza es superior al yogur natural.

3. Incubación de la leche y el cultivo añadido.

La incubación puede llevarse a cabo de distintas formas. Se pueden dejar los recipientes en el horno (éste tiene que haber calentado antes a 50-60°C, dejándolo a esta temperatura durante 30 minutos y apagándolo después). Otra posibilidad es construirse una caj de incubación. En ambos casos, la duración es de 12 horas. Durante este tiempo, se han de proteger los recipientes de golpes y vibraciones.

En las tiendas se venden una yogurteras eléctricas cuya capacidad suele ser de 6 recipientes. Si el yogur se incuba en estos aparatos, no es necesario calentar previamente la leche ya que la misma yogurtera se encarga de hacerlo.

SUGERENCIAS: Para hacer que el yogur sea más espeso y su consistencia más compacta, se le pueden agregar a la leche 1-2 cucharadas soperas rebosantes de leche en polvo. Además, tiene la ventaja de que se incrementa el contenido proteico del yogur.

Si se desea que el yogur sea muy dulce, se le mezclan, antes de añadir el cultivo, algunas cucharadas de azúcar.

Para hacer un yogur de frutas, basta con añadir frutas, mermelada o confitura al yogur terminado.

Nota Importante: Una vez preparado el yogur, es conveniente guardar aproximadamente 1 taza del producto. Esta cantidad nos servirá como cultivo de bacterias lácticas para el próximo yogur. Si se utiliza con este fin un yogur de tienda, se puede repetir este proceso 4-5 veces. Si se utiliza un fermento de yogur comprado en una tienda de productos dietéticos, el proceso se puede repetir 10-15 veces.

8.3.4. Cuantificación de Acido Láctico

8.3.4.1. Objetivo

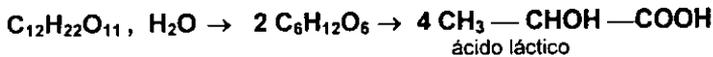
Determinar la cantidad de ácido láctico de diferentes tipos de leche por valoración con NaOH e inferir la importancia de la cantidad de este en la estabilidad de la leche.

8.3.4.2. Fundamento

Lactosa es el componente más lábil frente a la acción microbiana, por lo que experimenta fermentaciones muy variadas:

- a) Transformación en ácido láctico
- b) Transformación en alcohol
- c) Transformación en ácido butírico

La transformación en ácido láctico es con mucho la más importante. Numerosas bacterias realizan esta transformación, cuyo esquema teórico es:



La acidificación espontánea es el hecho más comúnmente observado en la leche conservada a la temperatura ambiente. La acidez se eleva muy lentamente al principio, luego, tras algunas horas (según la temperatura), muy rápidamente; en general, se frena un poco cuando el contenido en ácido láctico llega al 1%. En este momento solamente 1/4 de la lactosa ha sido degradada; ésta detención se debe al efecto inhibitorio del ácido sobre las bacterias. Si se neutraliza el medio, se puede conseguir la transformación de toda la lactosa; en este principio se basa la producción industrial de ácido láctico a partir del suero de quesería.

Antes de llegar a la proporción del 1% de ácido, aproximadamente hacia el 0.6%, se coagula la leche, en lenguaje corriente se "corta". El ácido ha roto el equilibrio entre el estado coloidal y la solución, teniendo como consecuencia primera la insolubilización de la caseína, esto nos ayuda a determinar la estabilidad de la misma.

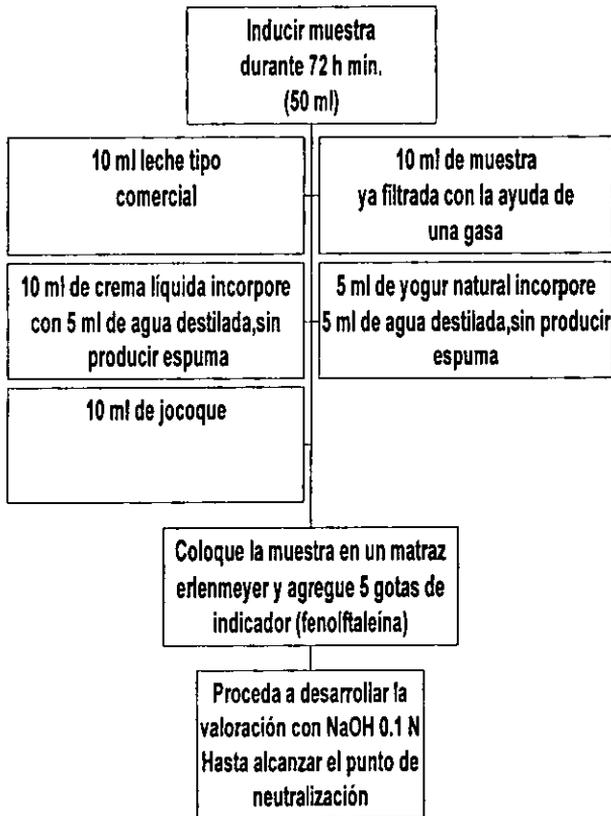
La leche agriada tiene un sabor y un olor distintos al del ácido láctico puro. Como en todas las reacciones bioquímicas, se forman pequeñas cantidades de subproductos junto al producto principal de la fermentación. En general, por cada

100 partes de lactosa transformada, se obtienen 96 de ácido láctico y 5 de subproductos diversos (CO_2 , ácido butírico, acetyl-carbinol, etc.). Algunos de estos productos presentan un olor fuerte.

El ácido láctico puede experimentar también la fermentación propiónica, por ejemplo en el curso del afinado del gruyer.

En la industria, y en el caso de los estreptococos, en que la producción de acidez provoca un descenso del pH que rebasa apenas el punto de coagulación ($\text{pH}=4.6$), se utilizan frecuentemente fermentos no coagulados o apenas coagulados.

8.3.4.3. Secuencia Experimental: **Cuantificación de Ácido Láctico**



8.3.4.4. Desarrollo Experimental

| Material y/o equipo | Reactivos |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ◆ 1 pipeta graduada de 10 mL. ◆ 1 matraz erlenmeyer de 100 mL ◆ 1 bureta graduada de 50 mL ◆ 1 vaso de precipitados de 50 mL ◆ 1 embudo de filtración ◆ 1 gasa | <ul style="list-style-type: none"> ◆ muestras inducidas ◆ NaOH 0.1 N ◆ agua destilada |

Procedimiento Experimental

1. Tipo de muestra:
 - ◆ 10 mL de leche fresca, cualquier marca comercial.
 - ◆ 5 mL de crema
 - ◆ 5 mL de yogur natural cualquier marca comercial
 - ◆ 10 mL de jocoque

2. Colocar una muestra de aproximadamente 50 mL de leche y dejarla expuesta a temperatura ambiente por 72 h como mínimo, cubierta solamente por una servilleta.

3. Proceda a preparar la muestra según sea el caso:
 - a) 10 mL de leche fresca, cualquier marca comercial.
 - b) 10 mL de leche tratada según el punto número dos. Con la ayuda de una gasa realice el filtrado procurando no mezclar lo "cuajado" con la fase acuosa.
 - c) 5 mL de crema líquida con 5 mL de agua destilada, bien incorporada sin producir espuma.
 - d) 5 mL de yogur natural cualquier marca comercial mezclado con 5 mL de agua destilada, sin producir espuma. Si es de búlgaros tomar 10 mL de muestra directamente.
 - e) 10 mL de jocoque

4. Coloque la muestra en un matraz erlenmeyer y agregar 5 gotas de fenolftaleína, como indicador.
5. Proceder con la titulación con NaOH 0.1 N, hasta lograr el punto de neutralización.

8.3.4.5. Procesamiento de Datos

8.3.4.5.1. Cálculos:

Para obtener el contenido de ácido láctico en cada una de las muestras realice los siguientes cálculos:

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \frac{(\text{mL de NaOH } 0.1 \text{ N}) (0.009) (100)}{\text{ml ó g de muestra}}$$

8.3.4.5.2. Resultados

Verter los datos obtenidos en una tabla como la que se sugiere:

| Tipo de muestra | g de muestra | % de ácido láctico |
|-----------------|--------------|--------------------|
| | | |
| | | |

BLOQUE: III

ENZIMAS EN LOS ALIMENTOS

9. Objetivos

9.1.1. Objetivo General:

Comparará la actividad enzimática de tres enzimas, la Polifenoloxidasa, la Peroxidasa y la Bromelaina, obtenidas de diferentes muestras.

9.1.2. Objetivos Particulares:

- Extraer la enzima polifenoloxidasa de la pulpa del aguacate, la piña y la papa.
- Determinar las velocidades de reacción a diferentes valores de pH para los fenoles oxidados por la enzima polifenoloxidasa.
- Conocer el efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción enzimática con los fenoles de trabajo.
- Señalar la influencia de la concentración salina sobre la velocidad de la reacción de oxidación de los fenoles en estudios.
- Realizar un extracto de piña (ananás) para determinar su actividad enzimática de la bromelaina, en gelatina y en leche.
- Inferir la importancia de realizar un estudio de cinética enzimática en los alimentos.

9.2. Introducción

Las enzimas son proteínas que poseen actividad catalítica. Son sintetizadas por las células y actúan en la totalidad de las reacciones químicas de un organismo, las cuales forman un conjunto lo que se conoce como metabolismo. Las reacciones catalizadas por enzimas también se verifican por tanto en muchos alimentos e influyen positiva o negativamente sobre su calidad.⁽¹¹⁾

Con el almacenamiento o el tratamiento térmico de los alimentos puede producirse, bien una inactivación de las enzimas o bien un cambio en su localización subcelular. Debido a que estos cambios se determinan analíticamente con facilidad, las enzimas son especialmente apropiadas para su uso como indicadores de tales tratamientos. Ejemplos típicos son la verificación de la pasteurización de leche, cerveza o miel, o la diferenciación entre carne o pescado fresco y congelado.⁽¹¹⁾

Esta ciencia reviste un especial interés en el fenómeno biológico, pues se sabe que la vida de una célula depende de un complejo conjunto de reacciones químicas catalizadas por enzimas específicas.⁽²²⁾

Las reacciones catalizadas por enzimas se han utilizado desde la antigüedad para el procesado de los alimentos. Las enzimas se encontraban entonces en los alimentos, bien como componentes propios de los mismos, o bien introducidas por microorganismos. Más reciente es, sin embargo, la adición de preparados enzimáticos más o menos enriquecidos y purificados a partir de animales, plantas y, sobre todo, microorganismos. La adición directa de enzimas ofrece una serie de ventajas: la característica especificidad de sustrato y de reacción y la alta velocidad de reacción en condiciones suaves de temperatura y pH permiten un proceso reactivo bien gobernado, rápido y continuo con un esfuerzo tecnológico generalmente pequeño.⁽¹¹⁾

El estudio de las propiedades de las enzimas juegan un papel un papel muy importante, ya que depende de éstas las condiciones de trabajo para la extracción y la actividad enzimática de cada una de ellas. Algunas que recordaremos serán:

Extracción.

La extracción de enzimas a partir de tejidos vegetales presenta un nuevo conjunto de problemas y el número comparativamente pequeño que han sido aisladas es en parte un reflejo de las dificultades que se van a presentar. Las paredes celulares vegetales son un reto importante para el enzimólogo. Las

fuerzas necesarias para destruir esta barrera celular son tan elevadas como para provocar generalmente, durante los procesos, la desnaturalización de las enzimas deseadas. Además, muchos vegetales contienen compuestos fenólicos que son oxidados enzimáticamente (polifenoloxidasas) por la presencia de oxígeno molecular formando productos que pueden inactivar rápidamente un número elevado de enzimas. Sin embargo, existen diversos ejemplos de enzimas útiles que han sido obtenidas a partir de plantas por métodos sencillos mediante procesos biotecnológicos, por ejemplo: la proteasa bromelina (piña) y papaína (papaya).⁽²⁴⁾

El pH, la fuerza iónica y la composición del medio que se utiliza para la extracción de una enzima son de gran importancia en este proceso y en las etapas posteriores de la purificación. Existe una clasificación de reactivos que se han usado en los tampones de extracción ya que minimizan la desnaturalización y la degradación de enzimas, mediante una serie de experiencias piloto se puede llegar a la elección de una combinación apropiada de estos compuestos. Al elegir un compuesto fuera más adecuada seguir un medio de extracción satisfactorio se ha alcanzado una meta, aunque puede ser que otra combinación diferente ⁽²⁴⁾

Algunos métodos para romper la membrana celular son mecánicos, que involucran molinos de arena, licuadoras, prensas de alta presión, agitación a alta velocidad con perlas de vidrio y oscilaciones sónicas o ultrasónicas. Los métodos físicos se relacionan con tratamiento térmicos y shocks osmóticos. Los medios químicos de ruptura son con solventes orgánicos (como la acetona o el butanol) y detergentes. Finalmente, existen medios enzimáticos, que hacen uso de lisozima, de papaína o de una combinación de ambas. La centrifugación es un paso casi de rutina para la separación de dos fracciones: la que contiene la enzima de la que no la contiene. La proteína, de hecho, se puede encontrar solubilidad en la fracción líquida o en forma precipitada, ya sea en forma asociada a otras fracciones subcelulares o libre de éstas.^(22,23)

Cinética Enzimática.

El potencial catalizador de las enzimas se ha estandarizado definiendo para cada enzima lo que se conoce unidad de actividad enzimática. Una Unidad Internacional equivale a la cantidad de enzima capaz de catalizarla, transformación de $1\mu\text{mol}$ de sustrato por minuto a 25°C en condiciones óptimas de medición.⁽²³⁾ Esta definición no siempre es aplicable porque en algunos casos no puede medirse analíticamente la aparición del producto o la desaparición del sustrato.⁽²⁴⁾

Ya que existen factores que son muy importantes que afectan directamente a las enzimas, es muy probable el hecho de poder determinarlos; así mismo, el determinar cual de los factores es el que altera el comportamiento de mi alimento.

Por lo anterior se sugiere los desarrollos experimentales en este bloque , que comprenden:

- Extracción de la Polifenoloxidas
- Actividad de Peroxidasa
- Cinética de Polifenoloxidasa
- Actividad de Bromelaina (En leche y en gelatina)

BLOQUE III:

METODOLOGIA

9.3.1. Extracción y Cinética Enzimática de Polifenoloxidasas

9.3.1.1. Objetivos:

- Efectuar la extracción de la enzima polifenoloxidasas de la pulpa del aguacate y de la pulpa de papa.
- Determinar los valores óptimos de cada uno de los factores que afectan a la Polifenoloxidasas ; como son: pH, Temperatura, tiempo, concentración de sustrato [S] y concentración de enzima [E]
- Analizar el comportamiento experimental de la polifenoloxidasas con cada uno de los factores que afectan su actividad enzimática.

9.3.1.2. Fundamento

La polifenoloxidasas (o-difenol:oxígeno reductasa, 1.10.3.1 en la Clasificación Enzimática) se ha nombrado también como tirosinasa, polifenolasa, fenolasa, catecol oxidasa y catecolasa.⁽²⁵⁾ Esta polifenoloxidasas es un complejo proteína-cobre⁽²⁶⁾ en una relación 1:2.

Por un lado, las polifenoloxidasas tienen un papel útil en el tratamiento de té, café y tabaco. Sin embargo, estas enzimas se conocen mejor por su carácter perjudicial, pues causan el oscurecimiento (pardeamiento) de tejidos vegetales rotos o maltratados, por lo que son determinantes en la calidad de muchas frutas y verduras.⁽²⁵⁾

A diferencia de otras enzimas, la polifenoloxidasas puede catalizar dos tipos muy diferentes de reacción, ambos involucran compuestos fenólicos. Estas reacciones son

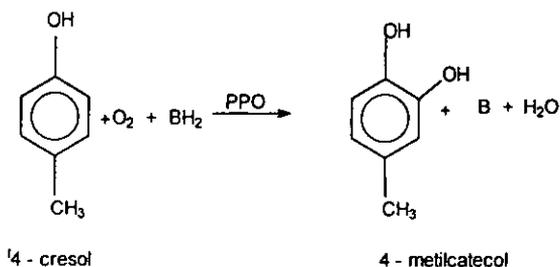
- a) La hidroxilación de monofenoles para dar o-difenoles (actividad de cresolasa).
- b) La oxidación de o-difenoles para dar o-quinonas(actividad de catecolasa).

Aunque, en un principio, la doble actividad de la enzima fue un problema particularmente complejo, ahora se sabe que esto se debe a que la enzima existe en varias formas moleculares múltiples (isoenzimas) que no tienen la las mismas

cantidades de cobre (metal presente en la enzima).^(27,28) Este último paso ya no es de tipo enzimático.

a) Reacciones de hidroxilación.

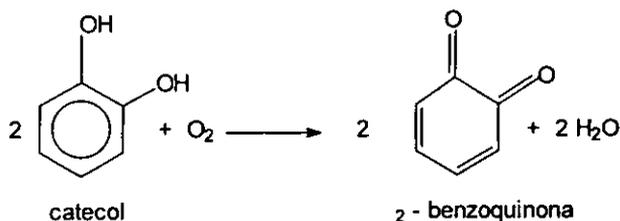
La polifenoloxidasas (PPO) hidroxila monofenoles y frecuentemente se dice que se trata de su actividad de cresolasa, debido a que el sustrato más comúnmente usado para su estudio es el p-cresol.⁽²⁵⁾



Las polifenoloxidasas de algunos productos vegetales no tienen la habilidad de hidroxilar monofenoles. Esto se debe a que requiere de una pequeña cantidad de catecol para dar inicio a la reacción. Algunas enzimas, en ausencia del o-difenol, pueden producir pequeñas cantidades de éste.⁽²⁵⁾

b) Oxidación de o-difenoles.

El segundo tipo de reacciones catalizadas por la polifenoloxidasas es la oxidación de un o-difenol a una benzoquinona. Se dice entonces que la enzima tiene actividad de catecolasa, siendo el catecol el difenol más que oxida la polifenoloxidasas.⁽²⁵⁾



Las cinéticas de reacción se han hecho a diferentes concentraciones de sustrato, distintas concentraciones de la enzima, diferentes valores de pH y varias temperaturas. Se muestran en la Tabla 9.3.1 algunas de las constantes de

Michaelis (k_m , mM) reportadas para varios sustratos en diferentes variedades de aguacate.

| Polifnol | Hibrido | Lerman | Fuerte |
|-------------------|---------|--------|--------|
| catecol | 6.8 | 2.4 | 7.7 |
| 4 - metilcatecol | 2.0 | 1.0 | 0.87 |
| ácido clorogénico | 7.0 | 3.0 | 3.0 |
| catequina | 1.8 | - | - |
| pirogatol | 5.0 | 1.6 | 2.13 |
| dopa | 27 | 3.6 | 6.0 |
| dopamina | 1.1 | 0.5 | 0.25 |
| ácido caféico | - | - | 1.6 |

Tabla 9.3.1 . Parámetros cinéticos para la enzima polifenoloxidasas de aguacates.

Extracción

El método general para la extracción de la enzima a partir de aguacate es el siguiente. Se hacen repetidas lixiviaciones de la pulpa en acetona a -20°C . Con esto, son disueltos principalmente los pigmentos y lípidos del fruto. La materia insoluble se filtra y se seca, recibiendo el nombre de "polvo cetónico".⁽²⁹⁾

El polvo cetónico se agita durante algunas horas en buffer de fosfatos, (pH = 7.0 con una concentración 0.5 M). La enzima polifenoloxidasas pasa a la fase acuosa, que se separa de los insolubles por centrifugación. El líquido resultante es denominado "extracto crudo" y representa una disolución de la enzima impura.⁽²⁹⁾

Inhibición del oscurecimiento enzimático.

Se piensa que los compuestos sulfhídricos inhiben las polifenoloxidasas debido a que remueven quinonas, previniendo su participación en las reacciones de oscurecimiento secundarias, o bien, por una reacción directa con la enzima. También se han probado sales azufradas como el metabisulfito de potasio y el sulfito ácido de sodio. Se cree que tales sales forman un complejo con el fenol parcialmente oxidado, inhibiendo de esta manera el oscurecimiento enzimático.⁽³²⁾

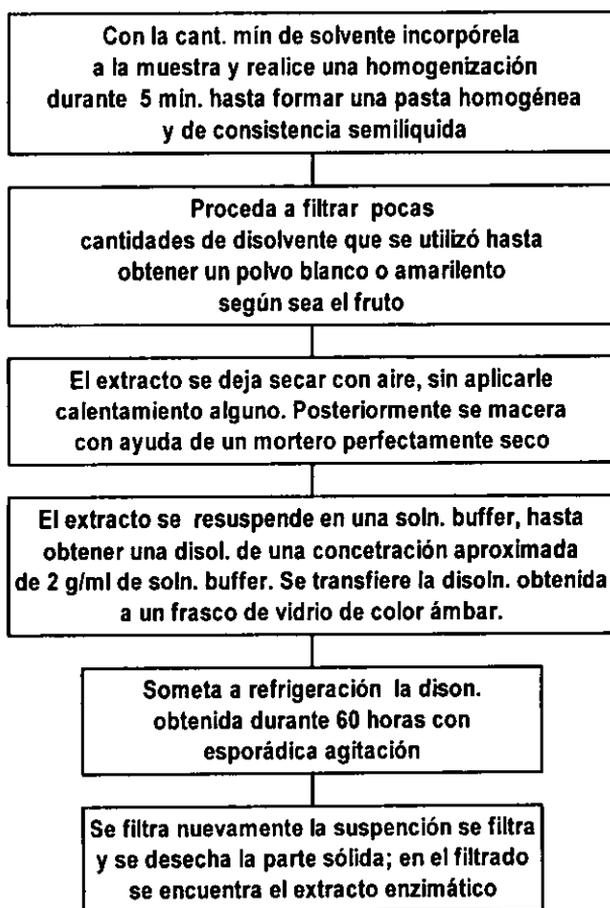
Puede prevenirse su efecto por exclusión de oxígeno molecular (limitación se sustrato), por adición de agentes reductores que previenen la acumulación y polimerización de la o-benzoquinona formada, por medio de agentes complejantes(tales como el fluoruro y azida de sodio) que inactivan la enzima al reaccionar con el cobre de la enzima o por tratamiento térmico (destrucción térmica de la enzima).⁽²⁵⁾

La adición de un agente reductor, el ácido L-ascórbico, que reduce de vuelta la o-benzoquinina formada a la misma velocidad con que se produce. De esta manera, no habrá oscurecimiento mientras esté presente el ácido ascórbico.
(25)

El ácido cítrico en altas concentraciones inhibe en aguacates la actividad enzimática de oxidación. También, se ha encontrado que algunas sales de calcio (el arseniato de calcio dio los mejores resultados) suprimen la oxidación de polifenoles y reducen el contenido total de compuestos fenólicos.⁽³⁴⁾

Conforme a lo expuesto anteriormente podemos estudiar la cinética enzimática de la polifenoloxidasasa, ayudándonos por su efecto de oscurecimiento, ya que éste se puede medir espectrofotométricamente.

9.3.1.3. Seguimiento Experimental: Extracción de la Polifeniloxidasas



9.3.1.4. Desarrollo Experimental

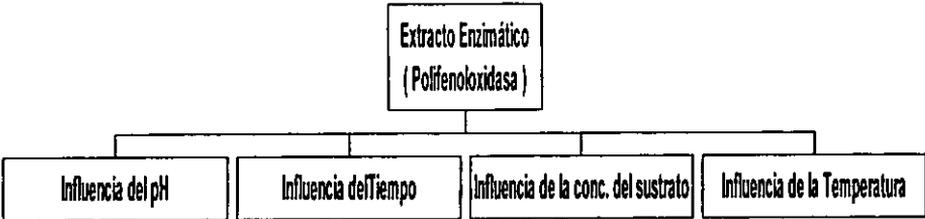
| Material por equipo | Material por grupo | Reactivos |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• 2 vasos de pp de 100 mL• 1 probeta graduada de 50 mL• 2 pipetas graduadas de 1 mL• 2 pipetas graduadas de 5 mL• 2 pipetas graduadas de 10 mL• 1 cristizador 100 x 45 mm• 10 tubos de ensayo de 15 x 200 mm• 1 vidrio de reloj de 10 cm de diám.• 1 gradilla• 1 embudo de vidrio de cuello largo• papel filtro | <ul style="list-style-type: none">• 1 virtiz• 1 matraz kitasato de 1000 mL• 1 embudo büchner grande con alargadera• 1 piseta• 1 bomba de vacío• 1 baño maría• 3 morteros | <ul style="list-style-type: none">• Guayacol al 1%• Solución buffer de fosfatos (pH = 7) con una concentración de 0.05 M,• Solución de peróxido de hidrógeno de 5 vol. |

Procedimiento Experimental

1. Ya escogida la muestra que se va a trabajar, obtenemos la pulpa del alimento a trabajar, desechando cáscara y semilla; sólo hasta que se va a realizar la extracción ya que puede aparecer pardeamiento ("oxidación") u oscurecimiento.
2. Con la mínima cantidad del solvente adecuado,(indicado por el asesor) incorpore poco a poco para realizar una homogenización con ayuda del virtiz o en su defecto con un mortero, con una duración de 5 min. Hasta formar una pasta homogénea y de consistencia semilíquida. (1)

3. Ésta pasta se filtra poco a poco y agregando en pequeñas cantidades el solvente que se utilizó, hasta obtener un polvo blanco o amarillento según sea el fruto.(2)
4. El extracto obtenido se deja secar con aire, sin aplicarle calentamiento alguno. Posteriormente se macera con ayuda de un mortero perfectamente seco.
5. El extracto se somete a una resuspensión con una solución buffer de fosfatos (pH = 7) con una concentración de 0.05 M, hasta obtener una disolución de una concentración aproximada de 2 g/mL de solución buffer. Se transfiere la disolución obtenida a un frasco de vidrio de color ámbar.
6. Se somete la disolución obtenida a 60 horas de refrigeración con agitación. De vez en vez.
7. Después de haber cumplido con el tiempo mínimo, la suspensión se filtra y se desecha la parte sólida; en el filtrado se encuentra el extracto enzimático (polifeniloxidasas).

9.3.3. Secuencia Experimental: Cinética de Polifeniloxidasas



9.3.3.4. Desarrollo Experimental

Material por equipo

- 1 gradilla
- 20 tubos de ensayo para centrifuga
- 10 tubos de ensayo de 15 x 200 mm
- 2 pipetas graduadas de 10 ml c/u
- 2 pipetas de graduadas de 5 ml c/u
- 2 pipetas de graduadas de 2 ml c/u
- 2 pipetas de graduadas de 1 ml c/u
- 1 pipeta volumétrica de vidrio de 10 ml
- 1 vaso de pp de vidrio de 250 ml
- 1 vaso de pp de vidrio de 100 ml
- 1 vidrio de reloj de 100 mm de diámetro
- 1 embudo de vidrio de filtrado rápido con cuello largo
- 1 pizeta

Material por grupo

- 4 pipetas graduadas de 5 ml cada una
- 2 propipetas
- 6 tripies
- 4 vasos de pp de vidrio de 600 ml c/u
- 4 vasos de pp de plástico de 250 ml c/u.
- 1 espectrofotómetro con radiaciones UV
- 4 celdas espectrofotométricas
- 3 pipetas graduadas de 1 ml c/u.
- 4 mecheros de bunsen con manguera de látex
- 4 telas de alambre con centro de asbesto
- 2 balanzas granatarias de dos platos
- 1 homogenizador virtiz
- 3 morteros de porcelana con pistilo c/u de diferentes diámetros.

Reactivos

- Disoln. De Catecol al 0.5%
- Disoln. Buffer de posfatos a pH= 4
- Disoln. Buffer de posfatos a pH= 7
- Disoln. Buffer de posfatos a pH= 8.5
- Disoln. Buffer de posfatos a pH= 10
- Disoln. De Sulfito de sodio al 1%

Procedimiento Experimental

Para llevar a cabo la cinética enzimática, vamos a estudiar y reproducir 4 factores importantes, que intervienen en el desarrollo de las velocidades de reacción de una enzima, como lo son: el pH, tiempo, concentración de sustrato, temperatura.

a) Influencia del pH.

1. Prepare 4 tubos blanco y 4 tubos problema simultáneamente, respetando el orden de adición de cada uno de los reactivos que se indican en las tablas 9.3.3.4.1 y 9.3.3.4.2.
2. Mezcle perfectamente bien los tubos, sin que haya formación de espuma. Deje reposar 3 min.
3. Incorpore 1 mL de disoln. de Catecol 0.5 % a cada uno de los tubos. Mezcle nuevamente sin formar espuma y deje reposar 25 min. A temperatura ambiente.
4. Mezcle perfectamente bien los tubos, sin que haya formación de espuma. Deje reposar 3 min.
5. Incorpore 1 mL de disoln. de sulfito de sodio al 1% a cada uno de los tubos. Mezcle nuevamente sin formar espuma y deje reposar 25 min. a temperatura ambiente.
6. Realice la lectura de todos los tubos, calibrando con el blanco respectivo en espectrofotómetro a una longitud de onda de 390 nm. Si no tiene un espectrofotómetro utilice un fotocolorímetro realizando las lecturas con un filtro de color

Tabla. 9.3.3.4.1. Tratamiento Para Tubos Blanco

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Buffer con pH 4 | 2 mL | | | |
| Buffer con pH 7 | | 2 mL | | |
| Buffer con pH 8.5 | | | 2 mL | |
| Buffer con pH 10 | | | | 2 mL |
| Disoln. De Sulfito de sodio al 1% | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Extracto enzimático | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |

Tabla. 9.3.3.4.2. Tratamiento Para Tubos Problema

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Buffer con pH 4 | 2 mL | | | |
| Buffer con pH 7 | | 2 mL | | |
| Buffer con pH 8.5 | | | 2 mL | |
| Buffer con pH 10 | | | | 2 mL |
| Disoln. De Catecol al 0.5% | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |
| Extracto enzimático | 1 mL | 1 mL | 1 mL | 1 mL |

b) Tiempo

1. Siguiendo el orden de adición que se muestra en las tablas 9.3.3.4.3 y en la 9.3.3.4.4. Prepare 6 tubos blanco y 6 tubos problema simultáneamente, sin alterar el patrón de orden de adición de los reactivos.

Tabla 9.3.3.4.3 Tratamiento Para Tubos Blanco

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) | Tubo 6 (mL) |
|---|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| Disoln. Buffer a pH = 7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Disoln. De sulfito de sodio al 1% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Extracto enzimático | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mezcle perfectamente bien, los tubos sin que haya presencia de espuma. Deje reposar 3 min. Después incorpore a cada uno de los tubos: | | | | | | |
| Disoln. De Catecol 0.5% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mezcle nuevamente c/u de los tubos sin que haya presencia de espuma y deje reposar los siguientes lapsos de tiempo: | 5 min | 10 min | 15 min | 20 min | 25 min | 30 min |

2. Realice la preparación de los tubos problema sin alterar el orden de adición de los reactivos.
3. Finalmente mezcle perfectamente bien y proceda a leer cada uno de los tubos con su respectivo blanco. En un espectrofotómetro con una longitud de onda de 390 nm o en su defecto en un colorímetro con un filtro de color

Tabla 9.3.3.4.5 Tratamiento Para Tubos Problema

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo 3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) | Tubo 6 (mL) |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Disoln. Buffer a pH = 7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Extacto enzimático | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Disoln.de Catecol al 0.5% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mezcle perfectamente bien, los tubos sin que haya presencia de espuma. Deje reposar los siguientes períodos de tiempo: | | | | | | |
| Tiempo de reposo | 5 min | 10 min | 15 min | 20 min | 25 min | 30 min |
| Agregue: Disoln.de Sulfito de sodio al 1% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

c) Influencia de la concentración de sustrato.

1. Siguiendo las instrucciones, que se indican en las tablas 9.3.3.4.6 y 9.3.3.4.7 nuevamente prepare 6 tubos blanco y 6 tubos problema a la par sin modificar el orden de adición de los reactivos.

Tabla 9.3.3.4.6 Tratamiento Para Tubos Blanco

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo 3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) | Tubo 6 (mL) |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Disoln. De buffer de pH = 7 | 3.5 | 3.0 | 2.5 | 2.0 | 1.5 | 1.0 |
| Disoln. De sulfito de sodio 1% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Extracto enzimático | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mezcle perfectamente bien, sin formar espuma y deje reposar 3 min. | | | | | | |
| Agregue: Disoln. De Catecol al 0.5% | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 |

Extracción y Cinética Enzimática de la Polifeniloxidasa

- Haga incorporar perfectamente bien sin producir espuma y deje reposar a temperatura ambiente durante un período de 25 min.
- Mezcle perfectamente bien los tubos sin producir espuma en ellos y dejarlos reposar a temperatura ambiente durante 25 min.
- Incorpore 1 mL de disoln. de sulfito de sodio al 1% a cada uno de los tubos y mezcle perfectamente bien sin producir espuma.
- Proceda a leer inmediatamente en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de o un colorímetro con filtro de color

Tabla 9.3.3.4.6 Tratamiento para Tubos Problema

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo 3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) | Tubo 6 (mL) |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Disoln. De buffer de pH = 7 | 3.5 | 3.0 | 2.5 | 2.0 | 1.5 | 1.0 |
| Extracto enzimático | 110 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Disoln. De Catecol al 0.5% | 0.5 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 | 3.0 |

d) Influencia de la temperatura.

1. Siguiendo las cantidades sugeridas de reactivos contenidos en las tablas 9.3.3.4.7 y 9.3.3.4.8, proceda a la elaboración de 5 tubos blancos y 5 tubos problema simultáneamente. Sin hacer ninguna alteración en el orden.

Tabla 9.3.3.4.7 Tratamiento para Tubos Blanco

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo 3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Disoln. De Buffer a pH = 7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Disoln. Sulfito de Na al 1% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Extracto enzimático | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Temperatura (°C) | 5 | 20 | 30 | 50 | 80 |

2. Mezclar perfectamente sin permitir formación de espuma y dejar reposar 3 min. todos los tubos.
3. Agregar a todos los tubos 1 mL de disoln. de Catecol 0.5%.
4. Mezclar sin formar espuma y dejar reposar 25 min. a temperatura ambiente.
5. Someter a cada tubo a las siguientes temperaturas:
6. Para los tubos problema siga la siguiente tabla:

Tabla 9.3.3.4.8 Tratamiento para Tubos Problema

| | Tubo 1 (mL) | Tubo 2 (mL) | Tubo 3 (mL) | Tubo 4 (mL) | Tubo 5 (mL) |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Disoln. De Buffer a pH = 7 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Extracto enzimático | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Soln. De Catecol al 0.5% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| *Temperatura (° C) | 5 | 20 | 30 | 50 | 80 |

7. Los tubos se tiene que agitar vigorosamente sin permitir que haya formación de espuma y someterlos a una "incubación" de 25 min. a la temperatura que se indica para cada tubo.
8. Después de haber transcurrido el tiempo necesario, se suspende la actividad térmica y se agitan los tubos, evitando la formación de espuma.
9. Por último se procede a leer todos los tubos en espectrofotómetro, a la longitud de onda de 390 nm ;o en un fotocolorímetro con el filtro de color recordando que debe ser primeramente el tubo blanco y después el tubo problema.

9.3.3.5. Procesamiento de Datos

9.3.3.5.1. Cálculos

- ❖ Calcule la K_m de la P.F.O. por el tratado de Lineweaver Burk y Michaelis-Menten

9.3.3.5.2. Resultados

- ❖ Grafique cada uno de los factores vs. D.O. (lectura de absorbancia)
- ❖ Determine los factores óptimos para la P.F.O. (polifenol oxidasa) de acuerdo a los valores obtenidos.

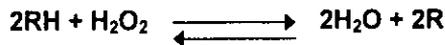
9.3.2. Actividad de Peroxidasa

9.3.2.1. Objetivo.

Determinará la actividad de la enzima peroxidasa que esta contenida en alimentos naturales y procesados mediante una apreciación de la producción del oscurecimiento (pardeamiento) que sufren algunos alimentos al contacto con el aire, y determinará su origen.

9.3.2.2. Fundamento.

Las peroxidasas y las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno. Las peroxidasa catalizan reacciones de oxidación llevadas a cabo por peróxidos:⁽⁴³⁾



mientras que las catalasas catalizan la dismutación del H_2O_2 en oxígeno y agua:⁽⁴³⁾



El peróxido de hidrógeno puede eliminarse también por acción de la glutaciónperoxidasa, y, en los vegetales, por la ácido ascórbicoperoxidasa. Muchos de estas enzimas tienen un átomo de hierro ligado a un grupo de porfirina, como la mioglobina, hemoglobina o citocromos, pero la glutaciónperoxidasa tiene solamente selenio. Los haluro peroxidasa catalizan la halogenación de compuestos orgánicos.⁽⁴³⁾

Las peroxidasas se encuentran en muchos alimentos. Su presencia en los alimentos de origen vegetal es especialmente importante tanto para el industrial como para el consumidor, debido a su elevada estabilidad térmica y a su capacidad para catalizar la oxidación de un amplio grupo de sustancias orgánicas.⁽⁴³⁾

Las peroxidasas de las plantas superiores son glicoproteínas con una proporción variable de carbohidratos. El modo de acción de estas enzimas se

conoce fundamentalmente por las investigaciones llevadas a cabo sobre la peroxidasa del rábano picante, que con un peso molecular de 42.000 tiene un 18% de carbohidrato y dos iones Ca^{2+} por molécula. La molécula tiene ocho grupos de oligosacáridos situados en la superficie y unidos a residuos de asparragina a través de enlaces glicosilamina, y la estructura terciaria de esta proteína monomérica está mantenida por cuatro puentes disulfuro. Por su parte la catalasa existe como una molécula tetramérica de peso molecular mayor de 100.000. La pureza de las peroxidases, al igual que la de los citocromos y de la catalasa, puede determinarse por la relación de absorciones a 403 y 280 nm, que debe ser próxima a 3.55. El grupo hemo de las peroxidases activas enzimáticamente el hierro se encuentra en forma de Fe^{+3} mientras que en la mioglobina, en la que la sexta posición de coordinación del átomo de hierro (Fe^{2+}), por encima y perpendicularmente al anillo de la porfirina, está ocupada por un molécula de agua. Por lo demás, el grupo prostético es idéntico, con la quinta posición de coordinación es ocupada por el grupo imidazol de un residuo de histidina. La sexta posición de coordinación es en las peroxidases el punto de unión del peróxido, y la banda de Soret característica cambia marcadamente al ligarse el sustrato, dando un complejo peroxidasa- H_2O espectralmente distinto.⁽⁴³⁾

La presencia de peroxidasa se determina por la aparición de un color rojizo al contacto de la muestra con el H_2O_2 y guayacol.

9.3.2.2. Secuencia Experimental: **Actividad de Peroxidasa**

Hacer una mezcla de Guayacol al 1%
con una disoln. de peróxido
de hidrógeno de 5 volúmenes

Agregue unas gotas de la disoln.
anterior en las muestras
seleccionadas

Deje pasar 1 min. y observe

9.3.2.4. Desarrollo Experimental

Material y/o equipo

- vidrio de reloj de 8.5 cm de diámetro
- 1 gotero

Reactivos a utilizar

- Disoln. De Guayacol al 1%
- Disoln. De peróxido de hidrógeno al 5%
- Muestra seleccionada

Procedimiento Experimental

1. Se debe contar con una solución acuosa de Guayacol al 1% y una solución de peróxido de hidrógeno de 5 volúmenes. Mezclar volúmenes iguales de cada solución justo antes de realizar el ensayo.
2. Con una trozo pequeño de muestra sin cáscara de aproximadamente 0.5 cc, es colocada en un vidrio de reloj, inmediatamente se le agrega de 1 a 2 gotas de la mezcla anterior.
3. Observe si hay aparición de una coloración roja en la muestra y registre el tiempo en que se presenta la misma. Si no aparece coloración alguna en un lapso de 1 min. No existe actividad de peroxidasa.

9.3.2.5. Procesamiento de Datos

9.3.2.5.1. Resultados

Realice una tabla en la cual pueda decir en cuales alimentos se presenta la actividad de la peroxidasa. Y justifique el origen.

| Tipo de muestra | Presenta Actividad la Peroxidasa | No presenta Actividad de Peroxidasa | Origen |
|-----------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------|
| | | | |
| | | | |

9.3.4. Actividad de la Bromelaina

9.3.4.1. Objetivo:

Realizar un extracto de piña (ananás); que contiene la enzima Bromelaina, la cual se le determinará la actividad enzimática.

9.3.4.2. Fundamento

Los procesos proteolíticos juegan un papel importante en los alimentos, bien sean, como ocurre en la carne, reacciones autolíticas catalizadas por proteinasas propias del tejido, bien se trate, como en el caso del queso, de microorganismos añadidos que realizan una proteólisis más o menos intensa.⁽¹¹⁾

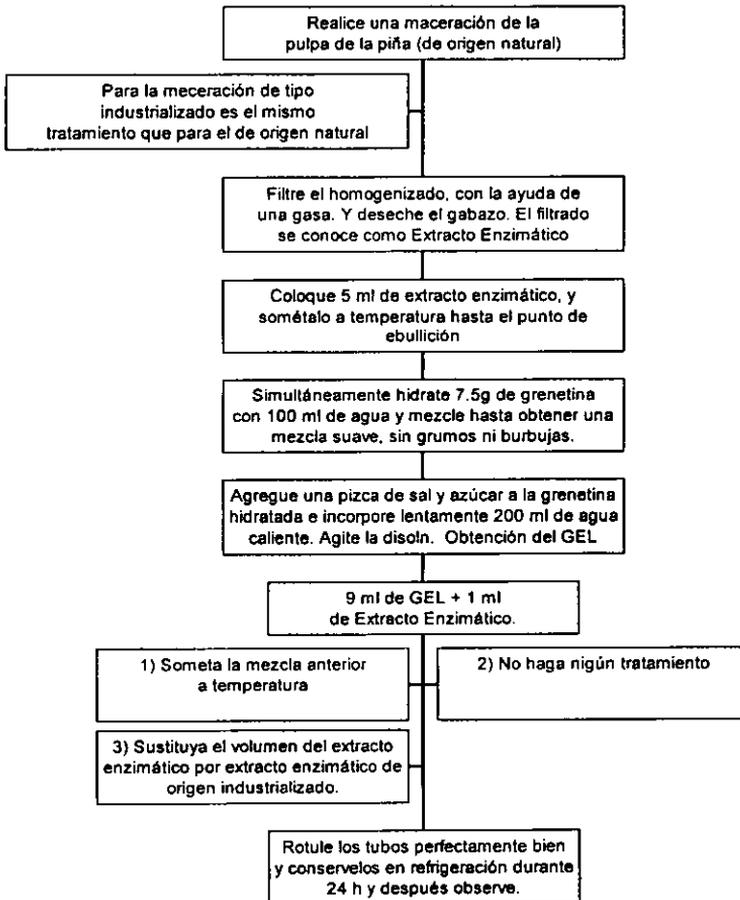
Se consideran dos subgrupos: las peptidasas (exopeptidasas), que escinden secuencialmente los aminoácidos o péptidos a partir de un extremo, y las proteinasas, que atacan las cadenas peptídicas en los enlaces no terminales. Una nueva subdivisión se fundamenta en los grupos existentes en el centro activo. Las enzimas Bromelina, Papaína, Ficina y Catepsina B; pertenecen a la clasificación de enzimas proteolíticas (péptido-hidrolasas); correspondiendo a las Cisteinproteinasas.⁽¹¹⁾

La zona de actividad de esta enzima es muy amplia y se encuentra, dependiendo del sustrato, a pH 4.5 - 10 con un máximo a pH 6 - 7.5.⁽¹¹⁾

El mecanismo de acción es análogo al de las serinproteinasas. En el centro activo existe un resto de cisteína. Por unión covalente se forma un tioéster intremedio. Estas enzimas son muy sensibles a la oxidación. Actúan, en general, en presencia de agentes reductores (por ej., cisteína) y formadores de complejos (por ej., EDTA).⁽¹¹⁾

Se inactivan con agentes oxidantes (suaves: I₂, hexacianoferrato (III) de potasio y fuertes: ácido perbórmico, ácido sulfónico, el ácido cisteínico), iones metálicos y agentes alquilantes (ácido yodoacético, la yodoacetamida, la dimetilaminoazobenzoyodoacetamida, la etilamina y la vinilpiridina). Su especificidad no es muy estricta.⁽¹¹⁾

9.3.4.3. Seguimiento Experimental: Efecto de la Bromelaina en la gelatina



9.3.4.4.Desarrollo Experimental

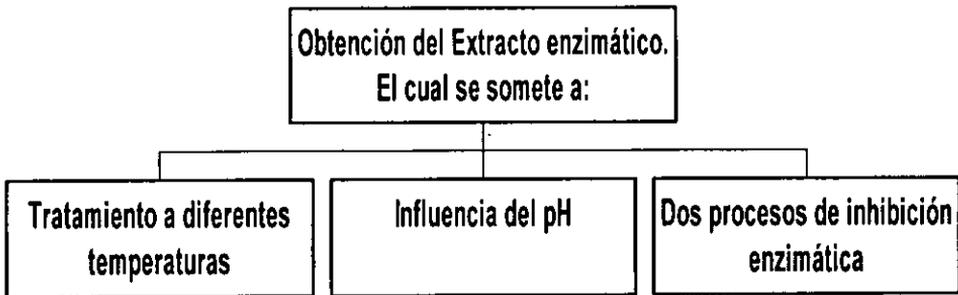
| Material por equipo | Material por grupo | Reactivos |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none">• 4 tubos de ensayo de 15 x 150mm• 1 embudo de filtración de cuello largo de 7cm• gasa la necesaria• 1 artículo cortante•• 1 vaso de pp de vidrio de 800 ml • 1 termómetro de mercurio de 150oC• 1 vaso de pp de vidrio de 500 ml | <ul style="list-style-type: none">• 1 homogenizador vitis• 1 baño maría• 1 refrigerador | <ul style="list-style-type: none">• 9 g de grenetina• 1 piña madura• agua destilada• jugo de piña comercial• disoln. buffer de fosfatos a diferentes pH= 4, 7 y 10• 100 ml de leche, de diferentes tipos de esterilización. |

Procedimiento Experimental

1. Pele y decore una piña, el restante; o sea la pulpa de la piña, se corta en cubos pequeños. Inmediatamente con la ayuda de un homogenizador tipo virtis, realice la maceración de la pulpa.
2. Para muestra de tipo industrializado, (piña en conserva o encurtida) se toman los trozos de piña y se maceran de la misma manera. Continúe con el mismo tratamiento.
3. Filtre el homogenizado obtenido, por medio de una gasa. Y deseche el gabazo (fibra). El filtrado obtenido se conoce como extracto enzimático.
4. Proceda en la brevedad posible a trabajar con el extracto enzimático*.
5. En un tubo de ensayo coloque 5 mL de extracto enzimático y sométalo a temperatura, hasta que alcance el punto de ebullición.
6. Simultáneamente, hidrate 7.5g de grenetina con 100 mL de agua fría y mezcle hasta obtener una pasta suave y sin grumos ni burbujas.

7. Agregue una pizca de sal y azúcar a la gredina hidratada, también incorpore lentamente 200 mL de agua caliente, (NO en ebullición). Agite la disolución hasta que todos los ingredientes estén homogenizados. La disoln. la nombraremos como, GEL.
8. Por separado en tres tubos de ensayo coloque:
 - a) 9 mL de GEL + 1 mL de extracto de piña que sometió a temperatura
 - b) 9 mL de GEL + 1 mL de extracto enzimático
 - c) 9 mL de GEL + 1 mL de extracto de piña en conserva
9. Rotule los tubos perfectamente y guárdelos en el refrigerador durante 24 horas y después observe el efecto que causan los procesos industriales en la actividad de las enzimas.

9.3.4.3b. Secuencia Experimental: **Efecto enzimático de la bromelaina en leche.**



Procedimiento Experimental

a) Tratamiento a diferentes temperaturas.

1. En tres tubos de ensaye vierta 9 mL de leche, etiquételos perfectamente bien.
2. El tubo no.1 será sometido a una temperatura de 5°C durante 3 min.
3. El tubo no.2 será sometido a una temperatura de 30°C durante 3 min.
4. Y el tubo no:3 se calentará a una temperatura de 80°C también durante 3 min.
5. Pasado el tiempo requerido de "incubación", se le agregará 1 mL de extracto enzimático. Con los mismos tratamientos (2-4)
6. Mezcle perfecta e inmediatamente, sin producir espuma.
7. Coloque los tubos de ensaye en una gradilla y mida el tiempo que tarda en coagular la leche, balanceando constantemente los tubos de ensaye.
8. Observe en las paredes del tubo de ensaye la presencia de pequeños coágulos de leche.
9. Concluya el tiempo que tardó en coagular la leche.

b) Influencia del pH

1. Repita el paso no. 1 del anterior procedimiento.
2. Someter los tubos de ensayo a una temperatura de 30°C.
3. Al tubo no. 1, le agregará 3 mL de disoln. buffer a pH = 4.
4. Al tubo no. 2, agregue 3 mL de disoln. buffer a pH = 7.
5. Al tubo no. 3, incorpore 3 mL de disoln. buffer a un pH = 10
6. Manténgalos tubos dentro del baño maría durante 1 min. a la temperatura indicada.
7. Transcurrido el tiempo, incorpore 1 mL de extracto enzimático a cada uno de los tubos
8. Mezcle perfectamente los tubos, sin producir espuma.
9. Inmediatamente mida el tiempo de coagulación, como se describió anteriormente.

c) Con dos procesos diferentes de inhibición enzimática.

1. A cuatro tubos por separado se vierten 9 mL de leche, etiquételos correctamente.
2. Al tubo no. 1 agréguele 1 mL de extracto de piña fresco
3. Al tubo no. 2 añádale 1 mL de extracto de piña sometido a temperatura de ebullición.

4. Al tubo no. 3 agregue 1 mL de extracto de piña en conserva.
5. Y al tubo no.4 agregue 1 mL de jugo de piña comercial.
6. Observe la actividad enzimática agitando el tubo como ya se indicó anteriormente.
7. Reporte la actividad en segundos. Y si hubo ausencia de la misma explique el efecto de los procesos de industrialización que afectan a la actividad enzimática y sus demás consecuencias.

9.3.4.5. Procesamiento de Datos

9.3.4.5.1. Resultados:

Para gelatina:

- ❖ Explique si existe gelificación o no?
- ❖ De los diferentes sistemas de industrialización cuál afectó más a la enzima y por qué?

Para leche:

- ❖ Tiempo en el que aparece la precipitación de la caseína en cada sistema.
- ❖ Cómo afecta el pH, Temperatura y con inhibición en zimática?

10.1. Objetivos:

10.1. Objetivo General:

A través de la cuantificación del Ácido Ascórbico en diferentes muestras se verifica el uso de éste en la industria alimenticia, ya sea como conservador, inhibidor de procesos enzimáticos (antioxidante), y nutrimento.

10.2. Objetivos Particulares:

- Mediante una valoración volumétrica se cuantificará de ácido ascórbico en diferentes muestras de origen natural como industrializado y se evaluará el resultado, así mismo se comparará con lo reportado en la etiqueta y en la bibliografía con respecto a su contenido.

10.2. Introducción

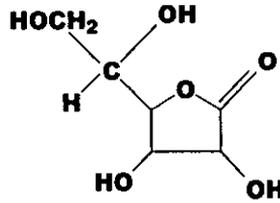
Las **vitaminas** se definen como sustancias orgánicas que el animal debe obtener como nutrimento, por lo general en cantidades pequeñas (cantidades de miligramos o de microgramos μg por día). Se considera que muchos organismos que tienen requerimientos de vitaminas conservan la energía química aprovechando a otros organismos que les suministren estos micronutrientes, evitando en esta forma el costo de biosintetizar las numerosas enzimas que se requieren para producir, mediante el metabolismo, las vitaminas.⁽⁴⁰⁾

Las vitaminas se dividen en hidrosolubles y en liposolubles por este caso nos interesa las vitaminas hidrosolubles, las cuáles son las que se disuelven en agua; en este grupo se encuentran las vitaminas del grupo B y el ácido ascórbico (vitamina C).⁽⁴²⁾

¿Qué es la vitamina C?

La vitamina C también conocida como ácido ascórbico, es un poliol que se encuentra en solución en forma de lactona insaturada (Fig. 10.1). El grupo hidroxilo unido a un átomo de carbono etilénico tiene carácter ácido, con un valor de $\text{pK}_a = 4.1$. Los grupos alqueno y carboxilo están conjugados. El producto inmediato de la oxidación, el ácido dehidroascórbico (Fig. 10.2) es aún biológicamente activo, y se encuentra en solución como una lactona hidratada bicíclica. Durante el pardeamiento enzimático de las frutas y otros vegetales. Las quinonas formadas oxidan rápidamente el ascorbato a dihidroascorbato, que puede ser convertido en cetogulonato por deslactonización. El enzima ascorbato oxidasa, contiene cobre, puede catalizar también la formación de dehidroascorbato. En el pardeamiento no enzimático la primera etapa de la oxidación, del ascorbato a dehidroascorbato, puede ser catalizada por los metales de transición. La hidrólisis de la β -lactona para formar 2,3-cetogulonato, que es biológicamente inactivo, va seguida a menudo por una serie de reacciones químicas que producen sustancias volátiles y coloreadas.⁽⁴³⁾

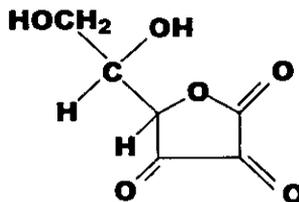
Las frutas y verduras son las principales fuentes de vitamina C, aportando en el Reino Unido 23 y 28 mg por día respectivamente (MAFF, 1984). Desgraciadamente, la vitamina C se disuelve en el agua utilizada para cocinar y se descompone fácilmente por acción del calor. El método químico de análisis de esta vitamina en los alimentos utilizando el 2,6-diclorofenolindofenol únicamente tiene en cuenta el contenido de ácido ascórbico.⁽⁴³⁾

Fig. 10.1. Ácido - L - Ascórbico⁽⁴⁸⁾

El ácido dehidroascórbico puede determinarse en forma separada utilizando el análisis fluorimétrico con o-fenilendiamina, que depende de una reacción de condensación con el grupo α, α -dicarbonilo presente en el dehidroascorbato y en el ácido 2,3-dicetogulónico. No existe un método químico válido para la determinación total de la vitamina C. Sin embargo, utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia es posible determinar tanto el ácido ascórbico como el dehidroascórbico.⁽⁴³⁾

¿Cuáles son sus funciones de la vitamina C?

La vitamina C es un factor de crecimiento y posee una importancia determinante en el funcionamiento normal de todas las células del cuerpo humano debido a que constituye un transportador de hidrógeno para diferentes cadenas de reacciones orgánicas, tales como la degradación de los glúcidos, la oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de los aminoácidos, etc.⁽⁴¹⁾

Fig.10.2. Acido Dehidroascorbico⁽⁴⁸⁾

Esta acción metabólica parece ejercerse más particularmente sobre aquellos procesos en los interviene el oxígeno, por lo que puede considerarse la vitamina C como favorecedora de la respiración celular. Sobre esta propiedad se basa su efecto tónico.⁽⁴¹⁾

Independientemente o paralelamente a su papel catalizador, tiene una influencia reguladora sobre diferentes sistemas fermentativos (fosfatasa, ureasa, etc.) y favorece la asimilación intestinal del hierro. Interviene, además, en el metabolismo y funcionamiento de las glándulas endocrinas (hipófisis, ovarios, tiroides, suprarrenales) así como en sus correlaciones hormonales, dando lugar a sinergia con ciertas hormonas (gonadotropinas) y a antagonismo frente a otras (tiroxina)⁽⁴¹⁾

Tiene un papel importante aumentando la resistencia a las infecciones, inactivando las toxinas, favoreciendo la formación de anticuerpos, elevando el poder fagocitario de los leucocitos y ejerciendo una acción bacteriostática y bactericida. Tiene igualmente propiedades antitóxicas y antialérgicas. Finalmente, influye benéficamente la formación de sustancias intercelulares, como el colágeno del tejido conjuntivo, la oseína y la dentina.⁽⁴¹⁾

Necesidades diarias

El organismo humano no puede sintetizar ni almacenar mucho tiempo esta vitamina, por lo que tiene que ingresarla mediante el aporte alimenticio. Las necesidades diarias para un adulto normal oscilan entre los 40 y los 70 mg.. Estas necesidades son menores en los niños pequeños pero son mayores en determinadas épocas de la vida. También las necesidades de esta vitamina son mayores en los meses de abril y mayo y, sobre todo, al iniciarse el invierno.⁽⁴²⁾

Trastornos producidos por la falta de esta vitamina

Cuando el aporte de vitamina C es insuficiente, la formación de la sustancia fundamental de diversos tejidos mesenquimatosos sufre perturbaciones de orden cualitativo y cuantitativo. Esto se traduce en un aumento de la permeabilidad capilar, difícil cicatrización de las heridas, insuficiente retención del calcio, defectuosa formación de los huesos, dentina y esmalte dentario. Las funciones celulares se perturban dando lugar a fatiga anormal disminución de la capacidad de esfuerzo, falta de apetito, trastornos digestivos y notable disminución de la resistencia a las infecciones. En los niños se produce, además un retraso en el crecimiento.⁽⁴¹⁾

Cuando las avitaminosis o carencia de vitaminas es intensa, puede aparecer la anemia hipocrómica y, finalmente, el escorbuto en jóvenes y adultos o la enfermedad de Barlow en el lactante.⁽⁴⁴⁾

Aporte de la vitamina C en los alimentos

La vitamina C se halla en numerosos alimentos pero su aporte al organismo no depende solamente de la cantidad contenida en ellos, sino también de su caducidad y del modo de preparar dichos alimentos.⁽⁴¹⁾

Hay que tener en cuenta, además, que no toda la vitamina que se ingiere es aprovechada por el organismo, toda vez que un 50% de la misma es destruida a causa de la alcalinidad del medio intestinal.⁽⁴¹⁾

Aparte de esto, de todas las vitaminas, la C es la más delicada e inestable. No sólo no aporta determinadas manipulaciones culinarias (cocción, salazón, fermentación, etc.), sino que se disuelve fácilmente en el agua y se pierde también si está en contacto con el aire. Es por ello que caduca mucho más rápidamente en las hojas de las verduras que en el interior de las frutas.⁽⁴⁴⁾

Efectos de la manipulación culinaria.

La vitamina C resiste bastante bien la congelación y la desecación pero, en cambio, no resiste la temperatura elevada ni la cocción prolongada.

He aquí los efectos de diversas formas de preparación culinaria:

| Alimento | Presentación | % de Pérdida de vitamina C |
|-------------------|---|----------------------------|
| Patatas (papas) | (Fritas en rodajas muy delgadas (chips) | casi total |
| Patatas (papas) | Fritas en rodajas de un centímetro de grueso (chips) | 50 |
| Pimiento (ají) | No sufren prácticamente pérdida ni al cocerlos ni al asarlos, pero si se frien. La escasa pérdida que se produce al cocerlos se recupera casi totalmente en las aguas de cocción. | 70 |
| Tomates | Al freirlos pierden más | 40 |
| Coliflor | Al cocerla (5 min) pierden | 40 |
| Espinacas | Al cocerla | 35 |

Tabla. 10.1 Ejemplos de manipulación culinaria

En general puede decirse que la pérdida de vitamina es proporcional al tiempo de acción, a la temperatura y a la superficie exterior de los vegetales (cuanto más pequeños son los trozos, mayor es la superficie expuesta). Si al cocer los vegetales se les añade bicarbonato, la vitamina que pasa al agua de cocción queda totalmente destruida.⁽⁴¹⁾

La importancia que la vitamina C tiene para la salud, es ya de dominio público. En cambio, es curioso comprobar el despiste que existe, en general, con respecto a las fuentes de esta vitamina. Si se pregunta a una persona cuál es el alimento más rico en vitaminas C, lo más corriente es que responda: ¡El limón!. El limón, en efecto, es rico en esta vitamina. Pero lo son más los pimientos, el perejil y los berros, que llegan a proporcionar hasta 200 mg por 100 g. Pues bien: hay otros tres vegetales cuya riqueza en vitamina C está muy por encima por encima de esta cifra. Son las acerolas, las actinidias.⁽⁴⁴⁾

10.3.1. CUANTIFICACIÓN DE ACIDO ASCORBICO

10.3.1.1. Objetivo

Se cuantificará de ácido ascórbico en diferentes muestras de origen natural como industrializado, mediante una valoración volumétrica. Así mismo se evaluará y comparará el resultado con lo reportado en la etiqueta y en la bibliografía con respecto a su contenido.

10.3.1.2. Fundamento:

La vitamina para la cual es una valerosa investigación sencilla es el ácido ascórbico (Vitamina C). Esta investigación puede utilizarse para indicar la presencia de ácido ascórbico en un alimento y también puede usarse para calcular la cantidad que el mismo existe.

No es posible utilizar este método con alimentos fuertemente coloreados por ejemplo ciruelas negras.

El ácido ascórbico es una sustancia que actúa naturalmente como reductor. Por esta acción reductora, decolora la tintura azul de diclorofenol-indofenol, con la que se une, produciéndose una solución problema, es una medida de la cantidad de ácido ascórbico presente en la solución. Existen dos tipos de encontrar el contenido de ácido ascórbico:

- a) Para indicar la presencia de ácido ascórbico.
- b) Para determinar la cantidad de ácido ascórbico presente en los alimentos.

Para el primer caso se tiene una cantidad de una solución de un alimento, añadirle unos pocos cm^3 de ácido acético diluido u unas pocas gotas de solución de la tintura de azul de diclorofenol-indofenol. La decoloración de la tintura azul indica la presencia de ácido ascórbico.

En el segundo caso se necesitan hacer tipos de pruebas las cuales son:

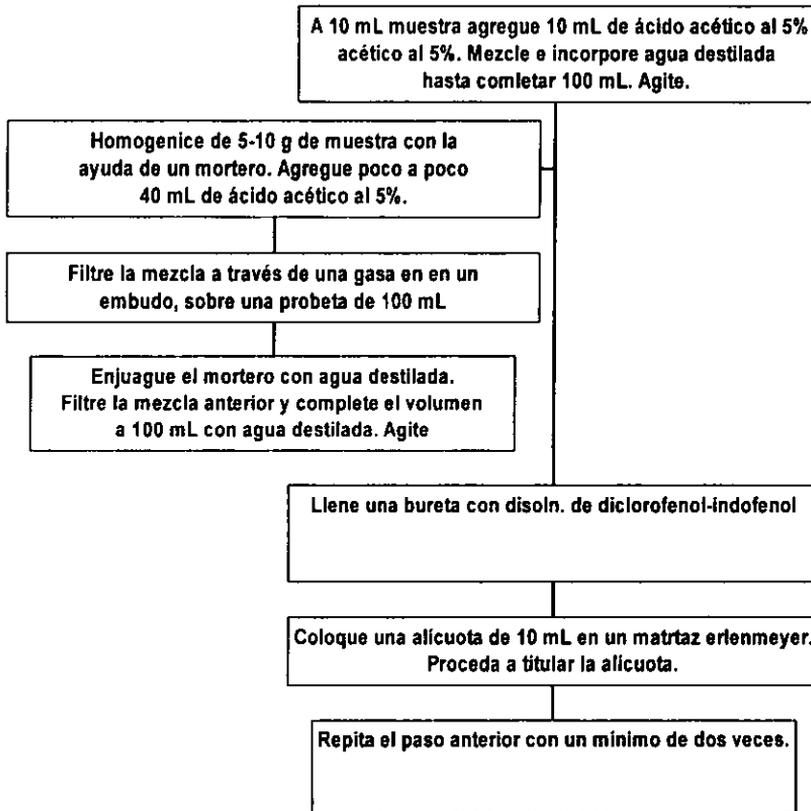
❖ Prueba I. Ácido acórbico contenido en zumo de frutas

Para este tipo de prueba se le recomienda los siguientes zumos; zumo fresco de naranjas, limones, toronja, pulpa de frutas y otros productos de zumo, por ejemplo zumos enriquecidos con ácido ascórbico.

❖ Prueba II. Ácido ascórbico contenido en hortalizas y frutas.

Alimentos apropiados para la prueba: col, papa, manzana etc. En este caso se incorpora al ácido acético para inactivar la enzima ascorbico-oxidasa, presente de forma natural en el alimento, el cual destruiría de otro modo el ácido ascórbico.

10.3.3. Seguimiento Experimental: **Cuantificación de Ácido Ascórbico**



10.3.4. Desarrollo Experimental

- | Material y/o equipo | Reactivos a utilizar |
|---|---|
| • 1 vaso de precipitado de 50 mL | • Disolución de Ácido acético - Ácido Fosfórico |
| • 1 filtro de vidrio de cuello largo | • Disolución de 2,6-diclorofenolindofenol |
| • 3 metracas erlenmeyer | • Agua destilada |
| • 1 bureta de 50 mL | • Muestras sólidas y líquidas |
| • 1 soporte universal con nuez y pinzas para bureta | |
| • gasa o papel filtro | |
| • probeta graduada de 100 mL | |
| • mortero con mano | |

Procedimiento Experimental

❖ Prueba I: Ácido ascórbico contenido en zumo de frutas

1. Con la pipeta, poner 10 mL de zumo dentro de la probeta de 100 mL, y añadir 10 mL de disolución de ácido acético al 5%. Completar con agua destilada hasta los 100 mL. Agitar.
2. Poner el número necesario de tabletas de tintura de diclorofenol-indofenol dentro del matraz aforado (utilizar 1 mg por cada 50 mL de agua), y llenar el matraz hasta la señal con agua destilada. En un principio, hacer 50 mL o 100 mL de solución de tintura.
3. Llenar la bureta con la disolución de tintura, utilizando un embudo. Leer el nivel de la solución en la bureta.
4. Con pipeta, poner 10 mL de la disolución de zumo ya preparada, dentro de un matraz erlenmeyer, y añadir entonces la solución de tintura azul se pondrá rosada, al contacto con la solución ácida de zumo, y se decolorará seguidamente por el ácido ascórbico. Continuar la adición de solución de tintura, hasta formación de una débil coloración rosada, que persista durante 10 segundos. En este momento, se ha añadido una suficiente solución de tintura, para que reaccione con todo el ácido ascórbico presente. Anotar el volumen de solución de tintura utilizada.
5. La valoración deberá repetirse al menos dos veces, y tendrá que existir estrecha concordancia para los resultados de un mismo zumo.

❖ **Prueba II: Ácido ascórbico contenido en frutas y hortalizas**

1. Tomar 5 g de fruta u hortaliza (10 g si se sabe que es pobre en ácido ascórbico). Poner el alimento en un mortero con 10 mL de ácido acético al 5%, triturar hasta que la mezcla esté desmenuzada; durante esta operación ir añadiendo poco a poco 40 mL de ácido acético al 5%. Es importante que el alimento esté homogeneizado completamente.
2. Filtrar la mezcla a través de una gasa colocada en un embudo situado sobre una probeta de 100 mL, lavar la mano de mortero y el mortero con agua destilada y filtrar las aguas de lavado a través del embudo. Lavar el residuo de la gasa con un poco de agua destilada. Finalmente, completar con agua destilada los 100 mL de la probeta. Agitar para mezclar.
3. Utilizar esta solución como si fuera la solución de zumo, continuando como en la Prueba I (pasos 2-6).

Indicaciones adicionales

- a) Determinar el ácido ascórbico de col cruda, cocer una muestra y repetir el experimento con col cocida. Determinar el ácido ascórbico en el agua de cocción.
- b) Tomar una muestra de col. Partirla por la mitad; dejar una mitad sin tocar y desmenuzar cuidadosamente la otra mitad. Deje todo expuesto al aire durante unas pocas horas. Determine el ácido ascórbico contenido en las dos muestras.

10.3.5. Procesamiento de Datos

10.3.5.1. Cálculos:

Para calcular el contenido de ácido ascórbico se recuerda que por 1 mg de ácido ascórbico es equivalente 1 mg de diclorofenol-indofenol.

❖ **Prueba I: Contenido de ácido ascórbico de los jugos de frutas:**

También se conoce el volumen en que se disolvió el diclorofenol-indofenol (50 mL de agua destilada). Por tanto 50 mL de solución de tintura equivalen a 1 mg de

ácido ascórbico. Consecuentemente, 1 mL de disolución de tintura equivale a $1/50$ mg de ácido ascórbico.

Para los resultados de la valoración se tiene lo siguiente; El volumen de solución de tintura es necesario para neutralizar una determinada solución de jugo es = X mL. Por tanto X mL de solución de tintura equivale a $(1/50)(X)$ mg de ácido ascórbico).

Luego 10 mL de disolución de zumo contienen $(1/50)(X)$ mg de ácido ascórbico). Pero el jugo fue diluido 10 veces (10 mL en una probeta de 100 ml).

Por tanto 100 mL de jugo puro contienen $(1/50)(X)$ mg de ácido ascórbico)(10)(10 mg).

❖ Prueba II: **Contenido de ácido ascórbico de frutas y hortalizas.**

Resultados de la valoración:

El volumen de disolución de tintura necesario para neutralizar una muestra es Y = mL.

1 mL de disoln. De tintura equivale a $1/50$ mg de ácido ascórbico. Luego, 10 mL de disoln. De fruta/hortaliza contienen $(1/50)(Y)$ mg de ácido ascórbico).

Por tanto, la totalidad de los 100 mL de la disoln. De la muestra contienen $(1/50)(Y)(10)$ mg de ácido ascórbico). Si la disoln. Contiene el ácido ascórbico correspondiente a 10 g de alimento en los 100 mL de la disoln., entonces 10 g de alimento contienen $(1/50)(Y)(10)$ mg de ácido ascórbico). Por tanto el ácido ascórbico en 100 g de fruta/hortaliza es $(1/50)(Y)(10)(10)$ mg).

11. CONCLUSIONES

- ❖ Se considera que el presente trabajo ha logrado cumplir el objetivo general para el cual fue planteado, ya que en este documento ha sido posible englobar los aspectos fundamentales del laboratorio de Bioquímica de Alimentos, y creemos que puede ser un material de gran apoyo, tanto para los estudiantes de la asignatura como para los profesores de la misma.
- ❖ Las prácticas que se han incluido en el Manual son sencillas y rápidas y cumplen con el objetivo de que el alumno aplique los conocimientos adquiridos en el teoría, logrando de esta forma un acoplamiento teórico-práctico de la materia.
- ❖ También las prácticas que se proponen en este Manual tienen la característica de poder ser adaptadas o modificadas para diferentes tipos de muestra y diferentes aplicaciones según sean requeridas por lo alumnos.
- ❖ Además con este Manual se puede ver que hay un necesidad de incrementar el tiempo de laboratorio para poder tener mayor libertad de ingenio y no ser tan mecanizado el procedimiento de las técnicas.
- ❖ Este manual representa una arma útil para que el alumno de manera eficaz rápida lleve a cabo o realice las prácticas de laboratorio aún en el poco tiempo con que se cuenta (Ajustando a las 2 h de las sesiones experimentales y a las existencias de reactivos, material y equipo de la sección); por lo que a corto plazo se buscará la edición del Manual por el Fomento Editorial UNAM, a través de Comité Editorial de la Facultad)

12. Referencias

- 1 Ott, B., Dana. Manual de Laboratorio de la ciencia de los Alimentos:-- España:Acribia;1992.--223 p.
- 2 Kirk, R: S: y Sawyer, R. Composición y Análisis de los Alimentos de Pearson:--2.--México: CECSA; 1996.--777 p.
- 3 Cheftel, J: C :y Besancon, P .Introducción a la Bioquímica y al a Tecnología de los Alimentos:--1 y 2 vol.--España:Acribia;1977.--895 p
- 4 Harris, Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo.--México;1992--886 p
- 5 Hart, Leslie y Fischer, Harry. Análisis Moderno de los Alimentos:--España: Acribia; 1984.--619p
- 6 Lees, R. Análisis de los Alimentos: Métodos Analíticos y de Control de Calidad: --3 --España: Acribia;1980.--288 p
- 7 Osborne, D. R. y Voogt, P. Análisis de los nutrientes de los Alimentos:-- España:Acribia;1986.--258 p
- 8 Cheftel, J. C .y Cuq, J. L. Proteínas Alimentarias:--España: Acribia; 1989.--346 p
- 9 Schmdt,K.F.Elaboración Artesanal de mantequilla,yogur y queso:-- España:Acribia;1995.--116 p
- 10 Alais,Charles.Ciancia de la leche, principio de técnica lechera-- México:Continental;1984--594 p.
- 11 Belitz,H.D.y Grosch. Química de los Alimentos:Acribia;1997.--813 p
- 12 García,Mariano y Quintero,R.Rodolfo. Biotecnología Alimentaria:-- México:Limusa;1993.--636 p
- 13 Salfield, J.R.Experimental Work in Food Sciencie:--Inglaterra:Heinemann Educational Books Ltd.; 1997.--154 p
- 14 Luquet, M.Francois.Lече y Productos Lácteos de Vaca-Oveja-Cabra: Transformación y Tecnología.:--2 v--España:Societé Scientifique D'Hygiène Alimentaire; 1993.--524 p.

- 15 Dilajan, D.Ch. Fundamentos de la elaboración del Queso:--España:Acribia; 1984.-- 127 p.
- 16 Varnam, Alan H. Y Sutherland, Jane P. Leche y Productos Lacteos. Tecnología Química y Microbiología:--España:Acribia; 1995. -- 476 p.
- 17 Scott, R. Fabricación de Queso:--2--España:Acribia; 1991.-- 520 p
- 18 Braverman, N. Norman. Introducción a la Bioquímica de los Alimentos:-- México:El Manual Moderno; 1980.-- 358 p.
- 19 Potter, La Ciencia de los Alimentos:--México: EDOTEX; 1992.-- 750 p.
- 20 Gasparic, J. Y Churacek, J. Laboratory Handbook of Paper and Thin-Layer Chromatography:-- U.S.A: Chichester Ellis Horwood; 1980-- 315 p
- 21 Brewster, R.Q., van der Werf. Curso Práctico de Química Orgánica:--2-- España:Alhambra;1986.—352 p.
- 22 López, A. Y Quintero, R. (compiladores). Tecnología Enzimática. Aplicaciones en Alimentos y medicina:--México: U.N.A.M.;1987.--
- 23 Lehninger, A. Biochemistry:--2.—U.S.A.: Worth Publishers, Inc.;1975. – 111350 p
- 24 Wiseman, Alan. An Introducción to Food Science, Nutritión and Microbiology:--3.--England:Pergamon Press; 1990.-- 445 p
- 25 Whitaker, J. Principles of eEnzymology for the Food Sciencie:--U.S.A.: Marcel Dekker, Inc.; 1972.
- 26 Mason, H., Fowls y Peterson, E. Oxygen Transfer and Electron Transport by the phenolase complex. *J. Am. Chem. Soc.*, 77:1955. P 2914
- 27 Smith, J. Y Krueger, R. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *J. Biol. Chem.*, 237:1962. P. 1121
- 28 Bouchilloux, S. P. McMahon y H. Mason. The multiple forms of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 238: 1963. P. 1699
- 29 Dizik, N. Y F. Knapp. Avocado polyphenoloxidase: purification, and fractionation on sephadex thin layers. *J. Agric. Food Chem.*, 25 (6): 1997. P. 1253

- 30 Kahn, V. Polyphenol oxidase isoenzymes in avocado. **Phytochem.**,15:1976. P. 267
- 31 Kahn, V. Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. **J. Sci. Fd. Agric.**, 28:1977. P.233
- 32 Kahn, V. Some biochemical properties of polynoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. **J. Food Sci.**, 42:1977. P.38
- 33 Kahn, V. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. **J. Food Sci.**,50:1985. p.111.
- 34 Van Rensburg, E. Y A. Engelbrecht. Effect of calcium salts on susceptibility to browning of avocado fruit. **J. Food Sci.**,51(4):1986. p.1067
- 35 Orozco, Análisis Químico Cuantitativo México Porrúa 320 p
- 36 Norma de calidad de Determinación de Lactosa
- 37 Methods for the determination of vitamins in food, recommended by cost 91:-England: BYG. Brubacher; 1985.-- 166p
- 38 Badui, D. Salvador. Química de los Alimentos:--México:Alhambra; 1990.-- 648p
- 39 Pearson, David. The Chemical Analysis of Foods:--7.--England:Churchill Livingstone; 1982.-- 575p.
- 40 Horton, H. Robert...et al. Bioquímica:--México:Prentice-Hall Hispanoamericana; 1995.
- 41 Diccionario de los alimentos:--2.--México: EDITIA Mexicana; 1984.--756p
- 42 Muller, H.G. y Tobin, G. Nutrición y Ciencia de los Alimentos:--España: Acribia; 1991.—321 p.
- 43 Robinson, S. David. Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos: --España: Acribia; 1991.-- 516 p.
- 44 Pastora, Lila y Esther Casanueva. Uso y abuso de las Vitaminas. **Cuadernos de Nutrición**. sep-oct. 1984. P. 10.

- 45 Sbdio, A.O. ET. Al. Simultaneous interaction of Ph, CaCl₂ addition, temperature and enzyme concentration on milk coagulation properties. **Food Science and Tec. Int.**, 3:1997. P.291 -298
- 46 Remes, Alfredo. Las conservas de Frutas y vegetales: sus alteraciones y el control para asegurar su calidad. **Ind. Alimentaria**, ener-feb 1996.p.33-36
- 47 Wong, W. S. Dominic, Química de los Alimentos Mecanismos y Teoría
- 48 Lenhinger, Bioquímica
- 49 www.giga.com/Quinoa.htm
- 50 www.giga.com/Informa.htm
- 51 www.giga.com/Amareinfo.htm
- 52 www.giga.com/~nacondor/Kiwigen/Informa.htm.
- 53 www.giga.com/~nacondor/Kiwigen/Quinoa.htm.
- 54 www.ag.uiuc.edu/~s-tratsoy/soyhealth.htm
- 55 www.stratsoy.ag.uiuc.edu/~strat-soy