

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**ELABORACION DE UNA GUIA DE METODOLOGIAS DE ANALISIS  
FISICOQUIMICOS Y SENSORIALES PARA ALIMENTOS  
PROCESADOS SEGUN NORMATIVAS SALVADOREÑAS**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
LAURA ESTEFANIA FUENTES ZALDAÑA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**OCTUBRE 2013**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LICDO. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

## **COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADORA GENERAL**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORAS DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS QUIMICOAGRICOLA**

#### **QUIMICA AGRICOLA**

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

Mae. MARIA ELISA VIVAR DE FIGUEROA

### **DOCENTES DIRECTORES**

Licdo. Oscar Raúl Avilés Flores

Licdo. Juan Agustín Cuadra Soto

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios todopoderoso por permitirme alcanzar esta meta, por brindarme vida y salud hasta este momento, y por concederme la sabiduría, perseverancia y fortaleza para finalizar esta etapa de mi vida.

A mis queridos docentes directores Oscar Raúl Avilés Flores y Juan Agustín Cuadra Soto por todo el apoyo brindado, por motivarme a continuar y compartir sus conocimientos y por la valiosa amistad demostrada en el paso de los años.

A mis apreciables asesoras: Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, MAE. María Elisa Vivar de Figueroa y MSc. Ena Edith Herrera Salazar, por su contribución en el fortalecimiento de este trabajo de graduación.

A mi familia: abuelos, padres, hermanos, tíos y tías por el apoyo incondicional en todo momento.

A mis amigos y amigas en los cuales he encontrado palabras de aliento siempre y un apoyo en los momentos de necesidad.

A todas las personas que estuvieron a mí alrededor apoyándome en todo sentido para poder finalizar esta meta.

## **DEDICATORIA**

A Dios, que para Él es la gloria y la honra por permitirme finalizar satisfactoriamente una etapa más en mi vida.

A mis padres: Victor Manuel Fuentes López y Sonia Guadalupe Zaldaña de Fuentes por todo el apoyo brindado en mi vida, por el sacrificio, comprensión y por proveer lo necesario para poder culminar con esta meta.

A mis hermanos: Victor Manuel Fuentes y Samuel Eduardo Fuentes por ser la voz de mi conciencia y exigir de mí siempre ser una mejor persona.

A mi familia: mama Carmen (que en paz descanse), abuelo Sergio, abuela Toñita y tía Vilma por ser incondicionales, por estar siempre al pendiente de mis necesidades y por sus oraciones de intercesión por mí.

A mis tíos y tías: por haber sido un gran apoyo, por quererme y haberme acogido en sus hogares en el periodo de estudio.

A todas mis amistades por ser parte importante de mi vida, por darme sus consejos, apoyo y motivación para continuar.

Muchas Gracias

## INDICE

	Página
<b>Resumen</b>	
<b>Capítulo I</b>	
1.0 Introducción	xv
<b>Capítulo II</b>	
2.0 Objetivos	18
2.1 Objetivo General	18
2.2 Objetivos Específicos	18
<b>Capítulo III</b>	
3.0 Marco Teórico	20
3.1 Generalidades	20
3.2 Sistema Jurídico de El Salvador	21
3.2.1 Constitución de la República de El Salvador	23
3.2.2 Tratados Internacionales	23
3.2.3 Leyes Secundarias	23
3.2.4 Decretos	24
3.2.5 Reglamentos	24
3.2.6 Ordenanzas Municipales	24
3.3 Ley de Protección al Consumidor	25
3.4 Normas Salvadoreñas Obligatorias	26
3.5 Normas Salvadoreñas Recomendadas	26
3.6 Reglamento Técnico Centroamericano	26
3.7 Pruebas Sensoriales	27
3.7.1 La Vista	29

3.7.2	El Olfato	29
3.7.3	El Gusto	29
3.7.4	El Tacto	30
3.7.5	El Oído	31
3.7.6	Pruebas Objetivas	32
3.7.7	Pruebas Hedónicas	34
3.7.8	Factores para la realización adecuada de un análisis sensorial	34
3.8	Análisis Químico de los Alimentos	36
3.8.1	Sal	37
3.8.1.1	Usos de la Sal	37
3.8.1.2	Sales de calidad alimentaria	39
3.8.1.3	Sal yodada	40
3.8.1.4	Sal Fluorada	40
3.8.2	Café	41
3.8.2.1	Proceso de obtención de café	42
3.8.2.2	Usos de café	43
3.8.2.3	Composición química del café	43
3.8.3	Carnes	44
3.8.3.1	Procesos de producción	46
3.8.3.2	Composición química de la Carne	47
3.8.4	Embutidos	48
3.8.5	Mantequilla	51
3.8.5.1	Proceso de elaboración de la mantequilla	53
3.8.5.2	Diferencia entre mantequilla y margarina	55
3.8.6	Helados	55
3.8.6.1	Clasificación de los Helados	56
3.8.6.2	Energía	57
3.8.6.3	Proteínas	58
3.8.6.4	Carbohidratos	58

3.8.6.5 Grasas	59
3.8.6.6 Vitaminas	60
3.8.6.7 Calcio	60
3.8.7 Jalea Real	60
3.8.7.1 Composición química	61
3.8.8 Yogurt	62
3.8.8.1 Composición del yogurt	64
<b>Capítulo IV</b>	
4.0 Diseño metodológico	65
4.1 Tipo de estudio	66
4.2 Investigación bibliográfica	66
4.3 Investigación de campo	66
<b>Capítulo V</b>	
5.0 Resultados	68
<b>Capítulo VI</b>	
6.0 Discusión de resultados	313
<b>Capítulo VII</b>	
7.0 Conclusiones	316
<b>Capítulo VIII</b>	
8.0 Recomendaciones	318
Bibliografía	319

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°</b>	<b>Página</b>
1. Composición media de los granos de café tostado (Porcentaje en base seca)	44
2. Análisis químico proximal de jamón cocido	50
3. Análisis químico proximal de salchichas	51
4. Análisis químico proximal de chorizos	51
5. Composición media de la mantequilla	52
6. Composición química de la jalea real	62

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>	<b>Página</b>
1. Orden Jurídico de El Salvador	22
2. Sensograma de los Alimentos	28

## **RESUMEN**

## RESUMEN

En El Salvador dentro de su marco regulatorio cuenta con herramientas para la evaluación y control de los alimentos que se fabrican y comercializan en él, entre los que se encuentran Ley de Protección al Consumidor, Normas Salvadoreñas Obligatorias, Normas Salvadoreñas Recomendadas, Reglamento Técnico Centroamericano y Catálogo de Normas Salvadoreñas. El presente trabajo consistió en la elaboración de una guía de metodologías de análisis fisicoquímicos y sensoriales para alimentos procesados según las Normas Salvadoreñas Obligatorias dentro de los que se contemplaron Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carne y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt, productos para los cuales a la fecha de elaboración de esta guía no cuentan con un Reglamento Técnico Centroamericano.

Cada Norma Salvadoreña Obligatoria detalla el alcance, definiciones, pruebas organolépticas, métodos de análisis fisicoquímicos y microbiológicos específicos para cada componente, los límites de los mismos, tipos de muestreo, almacenamiento, transporte, así como las referencias bibliográficas. Utilizando esta información, se propone una guía de metodologías de análisis fisicoquímicos y sensoriales para los productos antes mencionados que incluye una portada, introducción, objetivo de la guía, abreviaturas utilizadas, alcance por producto, los métodos de análisis organolépticos y fisicoquímicos para cada uno de ellos, fundamento de los métodos, especificaciones de los límites para cada componente evaluado y su referencia bibliográfica, además de, el material, equipos, reactivos y cristalería necesaria para el análisis de estos.

La información recopilada resulta de mucha importancia debido a que en la investigación bibliográfica realizada se encontró que actualmente no se dispone de un material que incluya todas las metodologías de análisis y

especificaciones organolépticas y fisicoquímicos para los productos seleccionados, dados por las Normas Salvadoreñas Obligatorias.

Se tomó como referencia el libro de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) en su edición número dieciséis, del cual se hizo la respectiva traducción al idioma español para mejorar la comprensión de la información por todos los usuarios interesados en esta guía y facilitar la implementación en los laboratorios destinados al estudio y análisis de alimentos.

Se recomienda utilizar la guía como una herramienta de trabajo para el análisis de los productos seleccionados en el laboratorio.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

En la actualidad una parte esencial en las industrias es la producción, elaboración y procesamiento de alimentos. Debido a las mayores demandas de los consumidores se genera la necesidad de adaptarse a los requisitos del mercado, por tanto, las empresas u organizaciones se ven en la obligación de producir mayores cantidades y de mejor manera, permitiendo la optimización de los recursos humanos y materiales, por esta situación las exigencias de salud, control y seguridad, así como los requisitos legales y las leyes del mercado, obligan a la industria a incorporar el concepto de “calidad”, por lo que la implementación de programas de Control y Garantía de la Calidad, apoyados en la Buenas Prácticas de Laboratorio, HACCP, Buenas Prácticas de Manufactura, Guías Nacionales e Internacionales de Calidad de Alimentos, son los instrumentos más apropiados para asegurar la validez del trabajo.

En el país los laboratorios encargados de velar por la calidad de los alimentos fabricados y comercializados se rigen por leyes, normas y reglamentos tales como Ley de Protección al Consumidor, Normas Salvadoreñas Obligatorias, Normas Salvadoreñas Recomendadas, Reglamento Técnico Centroamericano y Catálogo de Normas Salvadoreñas. El presente trabajo hace una recopilación de las metodologías de análisis y especificaciones fisicoquímicas y sensoriales de los productos procesados Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt, que las Normas Salvadoreñas Obligatorias exigen, debido a que al momento de realizar esta investigación son los únicos documentos válidos para llevar a cabo el análisis de los mismos.

Se consultaron libros internacionales oficiales recomendados por las Normativas Salvadoreñas tales como la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) y el Codex Alimentarius, entre otros. De acá surge la propuesta de una guía de metodologías de análisis fisicoquímicos y sensoriales para los productos antes mencionados que incluye una portada, introducción, objetivo de la guía, abreviaturas utilizadas, alcance por producto, los métodos de análisis organolépticos y fisicoquímicos para cada uno de ellos, fundamento de los métodos, especificaciones de los límites para cada componente evaluado y su referencia bibliográfica, así como el material, equipos, reactivos y cristalería necesaria para el análisis de estos.

Debido a que las metodologías del libro oficial Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) se encuentran en el idioma inglés se hizo la respectiva traducción al idioma español, para mejorar la comprensión de la información por todos los usuarios interesados en esta guía y facilitar la implementación en los laboratorios destinados al estudio y análisis de alimentos.

Dicho trabajo se realizó entre los meses de Septiembre de 2012 a Octubre de 2013.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Proponer una guía de metodologías de análisis fisicoquímicos y sensoriales para alimentos procesados según Normativas Salvadoreñas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 2.2.1 Recopilar las metodologías analíticas de los productos Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt establecidos en la Norma Salvadoreña Obligatoria (NSO).
- 2.2.2 Traducir las metodologías y procedimientos de análisis recomendados por la Normativa Salvadoreña Obligatoria (NSO) de los productos Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt.
- 2.2.3 Elaborar una guía de metodologías analíticas que incluya los métodos de los libros oficiales y las especificaciones recomendadas por las Normas Salvadoreñas Obligatorias (NSO).

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1. Generalidades

La industria alimentaria puede dividirse en diferentes sectores, cada uno de los cuales comprende una combinación de ingredientes primarios, como la harina, aceites vegetales y productos de valor añadido como pastelería y helados. En términos de su valor, la más importante es el sector de la carne, alimento rico en proteínas que representa cerca de un 20% del gasto en comida. Le sigue, en términos de valor, la industria del pan. Con un 15% del gasto otros alimentos ricos en proteínas, que son los productos lácteos, y que van desde una amplia gama de leches (enteras, semidesnatadas, desnatadas) hasta los postres con leche y yogurt. En contra de la idea de que todos los microorganismos son dañinos, el yogurt, la cerveza y los quesos son ejemplos de alimentos que contienen microorganismos, por ejemplo, agriar la leche y producir yogurt, y la levadura de la cerveza. De un tamaño más o menos similar es el sector de frutas y verduras, en el que los productos pueden estar fritos (por ejemplo las papas), enlatados, congelados. <sup>(25)</sup>

Dedicamos aproximadamente un 10% de nuestros gastos a la compra de azúcar, confituras, mermeladas y productos de confitería y repostería, cuyo elevado contenido en azúcar y el correspondiente bajo contenido en agua contribuye a su conservación, a menudo durante varios meses. Las bebidas con y sin alcohol representan también algo menos de un 10% del gasto, con una gama cada vez más variada de presentaciones en cartones, botellas y latas. El sector de grasas y aceites de la industria alimentaria fabrica una variedad cada vez mayor de productos, incluyendo la mantequilla y las margarinas de alto contenido en grasa, algunas de las cuales contienen grandes cantidades de grasas poliinsaturadas. Hay además toda una gama de productos para untar, llamados *light* (o de dieta), bajos en grasas, con diferentes contenidos en éstas

y composiciones variadas, disponible para los consumidores de las sociedades desarrolladas. El pescado y sus derivados, muchos de los cuales se venden capeados y congelados, representan un 5% de la industria alimentaria, y todos los demás alimentos representan un porcentaje menor. En los países en vías de desarrollo el crecimiento de la población y la prosperidad requerirán mayores inversiones y un aumento de la producción para hacer frente a la demanda <sup>(25)</sup>. Con este aumento se hace necesario que las producciones de alimentos sean en cantidades mayores e industriales, esto conlleva a un mayor control de calidad en la fabricación de los alimentos así como en el análisis, para esto existen normas nacionales e internacionales que dan una guía metodológica para el análisis y las especificaciones de los contenidos de las sustancias involucradas que deben o no estar presentes en dichos productos alimenticios.

En el plano internacional Las Directrices de las Naciones Unidas para la Protección al Consumidor, en su numeral 28 establecen que: “Los gobiernos deberán, según proceda, formular o promover la formulación y aplicación, en los planos nacional e internacional, de normas, voluntarias o de otra índole, de seguridad y calidad de los bienes y servicios y dar a dichas normas la publicidad apropiada...” <sup>(13)</sup>

La Ley de Protección al Consumidor de El Salvador establece como una de las competencias de La Defensoría, velar por el cumplimiento de las normas obligatorias de seguridad, información, etiquetado, calidad, pesos y medidas de los bienes y servicios que se comercializan en el mercado. <sup>(11)</sup>

### **3.2. Sistema Jurídico de El Salvador** <sup>(29)</sup>

Se le conoce como Orden Jurídico al conjunto de normas positivas vigentes relacionadas entre sí y escalonadas o jerarquizadas, que rigen en cada momento la vida y las instituciones de todas clases dentro de una nación

determinada. Esas normas están formadas no solo por la constitución y por las leyes, sino también por los tratados internacionales, las leyes especiales, los decretos, los reglamentos, ordenanzas municipales, por las disposiciones de las autoridades administrativas, por las sentencias judiciales, y hasta por los contratos en cuanto regulan las relaciones entre las partes contrarias. Lo más importante de recalcar, es que cada una de esas normas es diferente y va de mayor a menor, por la cual las inferiores toman su fundamento o están subordinadas a la de más jerarquía, este orden de jerarquía se muestra en la siguiente figura:

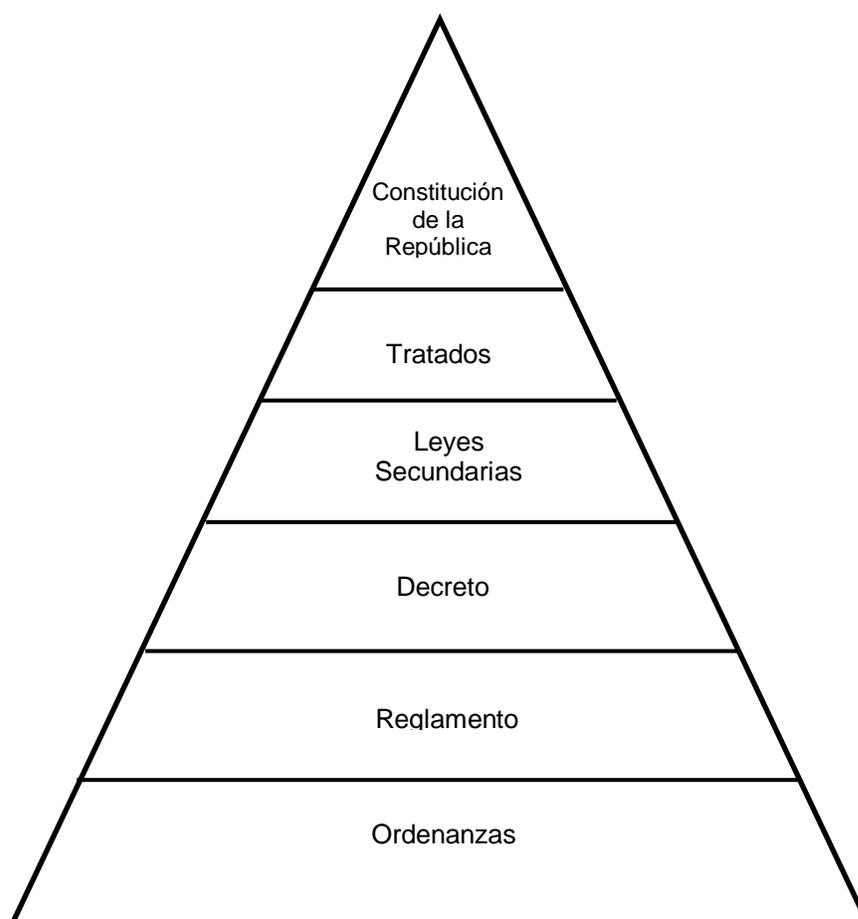


Figura No 1: Orden Jurídico de El Salvador (Pirámide de Kelsen) <sup>(29)</sup>

### **3.2.1. Constitución de la República de El Salvador** <sup>(10)</sup>

La finalidad de la Constitución de la República es hacer valer los derechos de las personas y sus obligaciones. Fomentar una sociedad organizada en la consecución de la justicia, implementar una base de normas o disposiciones para la seguridad jurídica, junto con la organización de un Estado soberano para un bien común. Haciendo valer los fundamentos de la convivencia humana, el respeto a la dignidad de la persona y la construcción de una sociedad más justa.

Referente al control de calidad de productos alimenticios, la Constitución de la Republica de El Salvador dice en el artículo 69: “el Estado controlará la calidad de los productos alimenticios y las condiciones ambientales que puedan afectar la salud y el bienestar”.

### **3.2.2. Tratados Internacionales** <sup>(10)</sup>

En cuanto a los tratados internacionales, la Constitución de la Republica de El Salvador en uno de sus artículos dice lo siguiente:

Artículo 144 de la Constitución de la República: Los tratados internacionales celebrados por El Salvador con otros estados o con organismos internacionales, constituyen leyes de la República al entrar en vigencia, conforme a las disposiciones del mismo tratado y de esta Constitución. La ley no podrá modificar o derogar lo acordado en un tratado vigente para El Salvador. En caso de conflicto entre el tratado y la ley, prevalecerá el tratado.

### **3.2.3. Leyes Secundarias** <sup>(10)</sup>

Las leyes secundarias son las que están relacionadas directamente con los derechos humanos y su protección, entre las cuales se encuentran: Código de Trabajo, Código de Familia, Código Electoral, Código de Salud, etc.

La Constitución de la República de El Salvador describe en el artículo 247 del Código de Familia la definición legal de alimentos: “Son las prestaciones que permiten satisfacer las necesidades de sustento, habitación, vestido, conservación de la salud y educación del alimentario”. <sup>(8)</sup>

#### **3.2.4. Decretos** <sup>(7)</sup>

Los decretos son resoluciones que toma el Gobierno en circunstancias especiales para la toma de decisiones, ejemplo: Decreto de Creación de los Tribunales de Familia.

#### **3.2.5. Reglamentos** <sup>(7)</sup>

Disposición legislativa expedida por el Poder Ejecutivo en uso de sus facultades constitucionales para hacer cumplir los objetivos de la Administración Pública. Su objeto es aclarar, desarrollar o explicar los principios generales contenidos en la ley a la que se refiere, para hacer más asequible su aplicación. También es definido como una colección de órdenes y reglas impuestas por autoridad competente.

#### **3.2.6. Ordenanzas Municipales** <sup>(7)</sup>

Son un instrumento jurídico de aplicación local, el cual contribuye a la buena administración y a la solución de los problemas que aquejan a la población y es de cumplimiento obligatorio para cualquier persona dentro del municipio, por ejemplo: Ordenanza Reguladora de las Tasas por Servicios Municipales de San Salvador.

Los principales marcos regulatorios de las instituciones que conforman el Sistema Nacional de Protección al Consumidor y las Normas Salvadoreñas Obligatorias son: <sup>(11)</sup>

- Ley de Protección al Consumidor
- Normas Salvadoreñas Obligatorias (NOS)
- Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA)
- Catálogo de Normas Salvadoreñas (CONACYT)

### **3.3. Ley de Protección al Consumidor** <sup>(11)</sup>

La finalidad de la ley de protección al consumidor es proteger efectivamente los derechos de los consumidores y consumidoras, facilitando la solución de conflictos en materia de consumo, acercando los servicios, profundizando la vigilancia de los proveedores, promoviendo la educación y la participación ciudadana y coordinando la acción conjunta con otras instituciones del Estado, para contribuir a un mejor funcionamiento del mercado y ejercicio de ciudadanía. Para esto se crea un Consejo Nacional de Seguridad integrado por diferentes organismos: Organismo Salvadoreño de Normalización (OSN), Organismo Salvadoreño de Acreditación (OSA), Centro de Investigaciones de Metrología (CIM) y Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica (OSARTEC).

Según como dicta en el Diario Oficial N°158 Tomo N°392 publicado en San Salvador el día viernes 26 de Agosto de 2011:

Artículo 33 de la Ley de Creación del Sistema Salvadoreño para la Calidad: Cuando en una ley se mencione a CONACYT para ejercer en materia de normalización, reglamentación, acreditación o metrología, conforme a lo establecido en la presente Ley, se entenderá que la referencia es al OSN, al OSA, al CIM y al OSARTEC según corresponda. <sup>(12)</sup>

Por tanto, según Decreto N° 287 de la Asamblea Legislativa de la República de El Salvador se decreta la Ley del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología que define:

### **3.4. Normas Salvadoreñas Obligatorias** <sup>(9)</sup>

Artículo 30 de Ley del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Las normas obligatorias se identificarán con las iniciales NSO "Normas Salvadoreñas Obligatorias", seguida del número que le corresponda y de las dos últimas cifras del año de su aprobación. Serán Normas Obligatorias:

- a) Las que rigen el Sistema Internacional de Unidades (SI);
- b) Las que se refieren a materiales, procedimientos, productos y servicios que puedan afectar la vida, la seguridad y la integridad de las personas, de otros organismos vivos y las relacionadas con la Protección del medio ambiente;
- c) Las que se establezcan por considerar el Ejecutivo, a propuesta del Consejo, que convienen a la economía o son de interés público.

### **3.5. Normas Salvadoreñas Recomendadas** <sup>(9)</sup>

Artículo 31 de Ley del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Las Normas Salvadoreñas Recomendadas se identificarán con las iniciales NSR "Normas Salvadoreñas Recomendadas", seguida del número que le corresponda y de las dos últimas cifras del año de aprobación, y se referirán a las normas de materiales, procedimientos, productos y servicios no comprendidos en el artículo anterior. Son optativas en las negociaciones privadas, pero tendrán carácter obligatorio en todas las adquisiciones de bienes y servicios, que efectúen las entidades estatales, autónomas o descentralizadas, en las cuales tanto el proveedor como los responsables de la compra, quedan obligados a su estricto cumplimiento y aplicación respectivamente.

### **3.6. Reglamento Técnico Centroamericano** <sup>(9)</sup>

Los respectivos Comités Técnicos de Normalización o Reglamentación Técnica a través de los entes de Normalización o Reglamentación Técnica de los países Centroamericanos y sus sucesores, son los organismos encargados de realizar

el estudio o la adopción de los Reglamentos Técnicos. Están conformados por representantes de los sectores Académico, Consumidor, Empresa Privada y Gobierno, como son:

- Ministerio de Economía y Comercio, MINECO
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, MIFIC
- Secretaría de Industria y Comercio, SIC
- Ministerio de Economía, Industria y Comercio, MEIC

Estas normas y reglamentos describen los diversos requisitos que deben cumplir los productos alimenticios para poder ser liberados al mercado, definen los alimentos involucrados y detallan las especificaciones y características que deben evaluarse: características sensoriales, características químicas, características microbiológicas, condiciones sanitarias, envasado y etiquetado, incluyendo hasta las condiciones de transporte y almacenamiento óptimas o adecuadas para el tratamiento de los productos alimenticios.

### **3.7. Pruebas Sensoriales** <sup>(20)</sup>

La evaluación sensorial no es una disciplina reciente, ya que existen escritos sobre olores, aproximadamente del año 320 a.c. En la literatura en la cual se habla de los alimentos principalmente se trata de las características y naturaleza de los olores. Esta disciplina se ha venido estableciendo a través de investigaciones realizadas a evaluaciones sensoriales informales.

La evaluación sensorial se basa en la psicofísica, que es la ciencia que estudia la relación entre el estímulo y la respuesta que da el sujeto a ese estímulo. Pero el análisis sensorial no podía quedarse en la respuesta psicofísica por lo que se ha realizado estudios para la perfección de cada uno de los métodos empleados y hacerlos más objetivos.

La evaluación sensorial surge como disciplina para medir la calidad de los alimentos, conocer la opinión y mejorar la aceptación de los productos por parte del consumidor. Además la evaluación sensorial no solamente se tiene en cuenta para el mejoramiento y optimización de los productos alimenticios existentes, sino también para realizar investigaciones en la elaboración e innovación de nuevos productos, en el aseguramiento de la calidad y para su promoción y venta.

Se puede definir la evaluación sensorial como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído”. En la figura N°2 se muestran las diferentes formas en como el ser humano puede detectar los diferentes aspectos sensoriales en base a los sentidos.

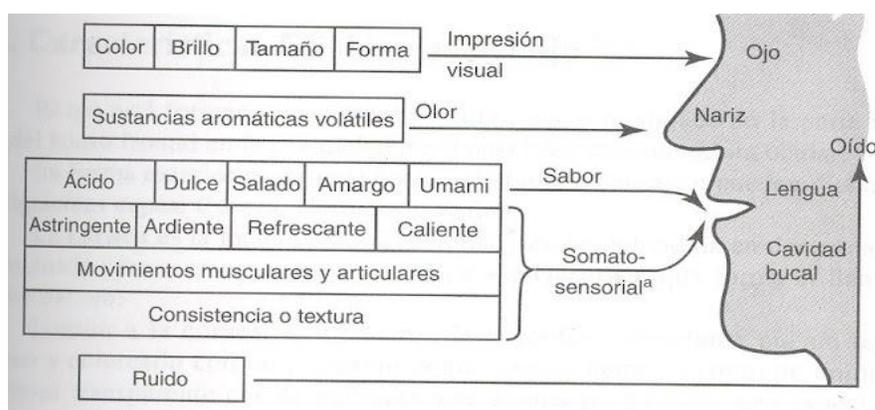


Figura N°2: Sensograma de los Alimentos (20)

Normalmente, el consumidor tiene gustos muy definidos y asocia determinados caracteres a la calidad o satisfacción que produce un alimento, por lo que espera encontrarlos cuando lo adquiere y consume. La dificultad radica en que los gustos acostumbran ser muy personales, aunque los factores culturales pueden marcar tendencias.

En la apreciación de un alimento, los sentidos tienen una importancia distinta a la que reciben en otros aspectos de la vida. Así, los llamados sentidos "químicos" como el olfato y el gusto suelen ser determinantes en una valoración subjetiva del alimento, mientras que los "físicos", vista, oído y tacto, más importantes en la vida rutinaria, juegan un papel secundario. Posteriormente, aroma y sabor definirán la elección futura del consumidor.

### **3.7.1. La Vista** <sup>(20)</sup>

A través de este sentido se percibe las propiedades sensoriales externas de los productos alimenticios como lo es principalmente el color, aunque también se perciben otros atributos como la apariencia, la forma, la superficie, el tamaño, el brillo, la uniformidad y la consistencia visual (textura). Los colores se relacionan por lo general con varios sabores, no importa que sean agradables o no, esto se debe a la experiencia que tenga cada individuo.

### **3.7.2. El Olfato** <sup>(20)</sup>

Los atributos que se perciben con el sentido del olfato son el olor y el aroma, el primer atributo tiene que ver con el producido por los alimentos por la volatilización de sustancias que se esparcen por el aire llegando hasta la nariz y el segundo consiste en la percepción de sustancias aromáticas de un alimento después de colocarlo en la boca. Al igual que el sentido de la vista las sensaciones percibidas pueden ser agradables o desagradables de acuerdo a las experiencias del individuo.

### **3.7.3. El Gusto** <sup>(20)</sup>

El sentido del gusto hace referencia a los sabores en los alimentos. Este atributo hace referencia a la combinación de tres propiedades: olor, aroma y gusto. Cuando un individuo o catador se encuentra resfriado no puede percibir olores ni sabores, es por esto que cuando se realice una evaluación sensorial

de sabor, no sólo se debe tenerse en cuenta que la lengua del panelista este en perfectas condiciones sino además que no tenga problemas con la nariz y con la garganta. El sabor de un producto que se evalúa debe ser enmascarado, ya que este se ve influenciado por otras propiedades como el color y la textura, evitándose así que el catador se vea influenciado en sus respuestas, por estas propiedades.

#### **3.7.4. El Tacto** <sup>(20)</sup>

La sensibilidad sensorial del tacto se percibe en la piel y en la lengua, a través de este sentido se detecta en un alimento: la textura, el tamaño, la forma, la viscosidad, la adhesividad, la untuosidad, la dureza, etc. Las características de textura se clasifican en: mecánicas, geométricas y de composición.

Mecánicos: Los atributos mecánicos tienen que ver con el comportamiento mecánico del alimento frente a la deformación y se clasifican en primarios como dureza, cohesividad, elasticidad, adhesividad y viscosidad; y secundarios como fragilidad, masticabilidad, gomosidad, pegosteosidad y crujido.

Geométricos: En su definición los atributos geométricos son aquellos que están relacionados con la forma y orientación de las partículas del alimento, como la fibrosidad, la granulosidad, la cristalinidad, la porosidad, la esponjosidad, etc.

De Composición: Los atributos de composición tienen que ver con la presencia aparente de un componente en el alimento como la humedad, la granulosidad, la harinosidad, entre otras.

La textura se ha clasificado de acuerdo a tres fases elaboradas por Brandt, M.A. 1963:

- Fase inicial: las calidades texturales se perciben con el primer bocado, antes de que la saliva disuelva o modifique la forma o disposición de las partículas.
- Fase de masticación: se percibe durante la masticación.
- Fase residual: cambios texturales que se llevan a cabo durante la masticación y efectos que producen recubrimiento del paladar, por lo general, después de haberse deglutido la muestra del alimento.

La fase de masticación es la más importante para cuando se está catando un producto alimenticio, ya que cuando se está realizando este proceso se envía información al cerebro a través de impulsos nerviosos, el cual la relaciona con la información almacenada, emitiendo una respuesta sobre la textura del alimento que se está masticando. En el proceso de masticación intervienen los dientes, la lengua, el paladar, las encías, los músculos de la mandíbula, las glándulas salivales, los labios, y cada una de las articulaciones.

### **3.7.5. El Oído** <sup>(20)</sup>

El efecto sonoro de los alimentos crujientes y todos los aspectos sonoros previos y posteriores a la degustación son fácil y rápidamente asociados a la percepción y deben considerarse como constituyentes de una sensación compleja al evaluar un alimento.

La aceptación intrínseca de un alimento es la consecuencia de la reacción del consumidor ante las propiedades físicas, químicas y texturales del mismo. De hecho, una de las múltiples definiciones de análisis sensorial obedece al examen de las propiedades organolépticas de un producto por los órganos de los sentidos, es decir, el conjunto de técnicas que permiten percibir, identificar y apreciar un cierto número de propiedades características de los alimentos.

Las utilidades del análisis sensorial son numerosas y dentro de ellas es posible mencionar:

- Caracterización hedónica de productos realizando estudios de consumidores y obteniendo el grado de aceptación de los mismos.
- Comparación con los alimentos competidores del mercado con un propósito claro: marcar las preferencias del consumidor.
- Establecimiento de criterios de calidad: desarrollo de un perfil sensorial.
- Control del proceso de fabricación. Un análisis sensorial, metódico y planificado, resulta de especial interés cuando se ha modificado algún ingrediente o materia prima o simplemente se dan cambios en las condiciones de procesamiento: modificación del tiempo de cocción, incremento o descenso de la temperatura ambiente, introducción de nuevos equipos instrumentales, etc.
- Verificación del desarrollo del producto. El estudio organoléptico en cada etapa o punto crítico de la fabricación puede ayudar a subsanar problemas, de forma rápida y eficaz.

El análisis sensorial de los alimentos puede realizarse a través de diferentes pruebas, según la finalidad para la que estén diseñados. A grandes rasgos, pueden definirse dos grupos:

- Pruebas objetivas que se subdividen en discriminativas y descriptivas.
- Pruebas no objetivas también denominadas hedónicas.

### **3.7.6. Pruebas Objetivas** <sup>(21)</sup>

Una de las principales metas perseguidas por el análisis sensorial de alimentos es el desarrollo de una metodología, idealmente objetiva, para la determinación de parámetros organolépticos en los alimentos. Hasta la fecha, y pese a numerosos intentos, el hombre no ha conseguido crear un instrumento que sustituya al análisis sensorial. Dicho instrumento debería englobar todos los

métodos analíticos encaminados a evaluar el aspecto exterior, el sabor y el aroma de nuestros alimentos.

De entre las metodologías instrumentales consideradas objetivas el color es la única propiedad sensorial que puede ser medida, de forma instrumental, más efectivamente que visual. Otros aparatos como los texturómetros universales y la gran variedad de test encaminados a determinar parámetros reológicos como la dureza, fibrosidad, harinosidad, adhesividad, jugosidad. Existen otras evaluaciones instrumentales, también de gran uso en laboratorios alimentarios, denominadas técnicas semiobjetivas, se incluyen dentro de este grupo a las cromatografías y las valoraciones físico-químicas y bioquímicas, indicadoras de la composición cualitativa del producto (sus vitaminas, elementos minerales, proteínas, ácidos y azúcares, colorantes, edulcorantes artificiales) aspecto íntimamente ligado a las propiedades sensoriales y al margen de aceptabilidad del alimento. Todas estas técnicas pueden, en el mejor de los casos, llegar a tener una buena correlación en sus medidas con el juicio sensorial, pero parece muy difícil que puedan sustituir al ser humano. En última instancia son las personas las que deben valorar la calidad de un alimento, expresar la compleja apreciación sensorial y valorar su grado de satisfacción al ser degustado.

Se puede decir que hoy en día no existe ninguna técnica capaz de simular las sensaciones que un catador experimenta, por lo que es necesaria una valoración sensorial de los alimentos por un equipo de personas.

Los análisis objetivos se dividen en dos grandes grupos:

- Pruebas discriminativas: Tienen como objeto detectar la presencia o ausencia de diferencias de atributos sensoriales entre dos o más productos.

- Pruebas descriptivas: Su utilidad es muy diversa, desde la determinación de diferencias sensoriales entre un producto y sus competidores en el mercado, hasta la caracterización de aromas, un tema de gran interés para las empresas de alimentación, dada la disparidad de criterios entre el productor y el cliente con relación a su estabilidad.

### **3.7.7. Pruebas Hedónicas** <sup>(21)</sup>

Es aquella en la que el juez catador expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, si lo prefiere a otro o no. Son pruebas difíciles de interpretar ya que se trata de apreciaciones completamente personales, con la variabilidad que ello supone. Los estudios de naturaleza hedónica son esenciales para saber en qué medida un producto puede resultar agradable al consumidor. Pueden aplicarse pruebas hedónicas para conocer las primeras impresiones de un alimento nuevo o profundizar más y obtener información sobre su grado de aceptación o en qué momento puede producir sensación de cansancio en el consumidor.

### **3.7.8. Factores para la realización adecuada de un Análisis Sensorial** <sup>(26)</sup>

Uno de los mayores problemas asociados al análisis sensorial de los alimentos es conseguir que la respuesta humana sea precisa y reproducible dado que el aparato sensorial humano muestra grados de variación de sensibilidad de persona a persona, que cada mundo individual de sensaciones es muy diferente dependiendo del nivel de desarrollo y que la sensibilidad puede ser influenciada fácilmente por cuestiones externas o del medio. Existen numerosos elementos determinantes en la aceptabilidad o preferencia de un producto, elementos que deben ser tenidos en cuenta al momento del diseño del análisis sensorial. Se pueden subdividir en dos grandes grupos: características del alimento o bebida y características del consumidor.

#### a) Características del Alimento

- Disponibilidad: Resulta básico que sea fácil encontrar el producto en las zonas habituales de compra para el consumidor, de ahí que uno de los objetivos mayoritarios de todas las empresas de alimentos sea ampliar sus puntos de venta.
- Utilidad: Por alimento útil se entiende aquel que resulta imprescindible en una dieta, por el aporte de vitaminas, nutrientes esenciales, proteínas o carbohidratos, que puede ejercer un efecto beneficioso sobre nuestra salud o nuestro aspecto físico o que puede ayudar a reducir una enfermedad.
- Conveniencia: La conveniencia se diferencia básicamente de la utilidad porque se introducen factores económicos.
- Precio: Sin duda alguna es uno de los factores más limitantes para la libertad con la que el consumidor escoge el producto y puede ser origen de una diferenciación social. El hombre tiene una disponibilidad limitada de recursos económicos para el consumo, determinada por su nivel de renta y por la existencia de unos precios que debe pagar para acceder a aquello que desea
- Uniformidad, estabilidad y almacenamiento: Los productos poco estables, que requieren de unas condiciones de almacenamiento y conservación peculiares suelen tener poco éxito entre la población.
- Valor nutricional: Existe un nuevo perfil de consumidor cada vez más preocupado por el valor cualitativo y dietético de los alimentos.

#### b) Características del Consumidor

- Preferencias regionales, por nacionalidad o raza: Está claro que en determinadas zonas existe una especial predilección por algunos alimentos, ya sea por tradición o porque la producción es abundante.

- Edad y sexo: La edad puede afectar a la preferencia por ciertos productos: dulces en niños, salados y amargos en adultos, mientras que la influencia del sexo depende del producto y de la cultura a la que pertenezca el individuo.
- Religión y educación: Todos conocemos las recomendaciones y orientaciones, en materia alimenticia, de algunas religiones. Se trata de una opción libre y como tal la entendemos. En cuanto a la educación se convierte en un factor primordial.
- Motivación psicológica: Engloba creencias propias y ajenas, actitudes y expectativas y se encuentra innegablemente condicionada por la publicidad.
- Motivación fisiológica: Incluye determinadas necesidades fisiológicas. Es indudable que tener sed o hambre eleva, por encima de otras prioridades, la necesidad de adquirir una bebida o una comida.

### **3.8. Análisis Químico de los Alimentos <sup>(1)</sup>**

El análisis de alimentos es la disciplina que se ocupa del desarrollo, uso y estudio de los procedimientos analíticos para evaluar las características de los alimentos y de sus componentes. Esta información es crítica para el entendimiento de los factores que determinan la calidad de los alimentos, así como la habilidad para producir alimentos que sean consistentemente seguros, nutritivos y deseables para el consumidor. Existe un número considerable de técnicas analíticas para determinar una propiedad particular del alimento. De ahí que es necesario seleccionar la más apropiada para la aplicación específica. La técnica seleccionada dependerá de la propiedad que sea medida, del tipo de alimento a analizar y la razón de llevar a cabo el análisis, ya que un alimento no contiene exclusivamente componentes nutricionales aun cuando estos representan en algún caso hasta el 90% del extracto seco del mismo. Junto a las sustancias potencialmente nutritivas existen una serie de

componentes que no poseen ese carácter, además en el alimento pueden aparecer otros componentes como sustancias contaminantes de distinta naturaleza: toxinas, mohos, fertilizantes, compuestos inorgánicos, metales pesados, u otras que se agreguen deliberadamente con unos fines concretos. Asimismo es frecuente que en los alimentos elaborados aparezcan residuos de algunas sustancias que han favorecido el proceso tecnológico de elaboración. Por todo ello es importante la realización de análisis para determinar la composición nutricional de los alimentos, para esto no existe un modelo único para abordar el análisis químico y nutricional de los alimentos. La naturaleza y la finalidad del producto servirán de guía para ver qué tipo de análisis se realizará. El objetivo del análisis puede ser la aptitud o capacidad de determinado alimento para producir determinado rendimiento o bien cumplir con determinadas exigencias legales, higiénicas o nutricionales.

### **3.8.1. Sal** <sup>(22)</sup>

La sal es el condimento más antiguo usado por el hombre y su importancia para la vida es tal que ha marcado el desarrollo de la historia en sus distintas etapas, alcanzando grandes repercusiones económicas, políticas y culinarias a lo largo de las diferentes civilizaciones que han ido puliendo nuestra cultura y formas de vida. Es un producto cuyo uso está generalizado en toda la gastronomía y la industria mundial, bien sea como condimento, como conservante esencial para los alimentos o en sus usos no alimentarios. Su historia ha estado tan unida a las grandes transacciones comerciales que su legado aún hoy se conserva en los nombres de lugares como la prehistórica Route du Sel en Francia o la Via Salaria de la antigua Roma.

#### **3.8.1.1. Usos de la Sal** <sup>(22)</sup>

La sal como ingrediente básico en la dieta y como materia prima de multitud de procesos industriales, tiene un campo de aplicaciones muy amplio cuyos

beneficios revierten de forma directa en el bienestar y en la calidad de vida de las personas. Sus tres grandes aplicaciones pueden dividirse entre uso alimentario, uso industrial y uso en control de hielo en carreteras.

La sal es fundamental para resaltar y potenciar de forma natural el sabor de los alimentos. Además de esta cualidad organoléptica que la ha hecho universalmente popular, la sal tiene otras muchas propiedades:

- La capacidad de la sal como conservante y preservativo ha sido fundamental para el desarrollo humano a lo largo de la historia, ya que permitía la preservación de los alimentos.
- Actúa como aglutinante de otros ingredientes en los procesos alimentarios.
- Funciona como sustancia que permite controlar los procesos de fermentación de determinados alimentos.
- La sal se utiliza para dar textura a los alimentos y así hacerlos más agradables al tacto y visualmente más atractivos y apetitosos.
- Se utiliza para desarrollar el color de múltiples alimentos, haciéndolos más agradables a la vista.
- La sal es un agente deshidratador y ablandador de muchas materias primas alimentarias.

De forma particular sus usos más comunes, tanto para la industria alimentaria como a nivel doméstico, están relacionados con:

- a) Carnes: La sal se agrega a las carnes principalmente como un ingrediente conservante que inhibe el crecimiento de bacterias. Su papel como agente aglutinante, ablandador y capaz de proporcionar color permite ofrecer al consumidor una presencia más compacta y atractiva en todos los embutidos tradicionales y en las carnes frescas preparadas y aliñadas.

- b) Panificadoras y productos de Panadería y Pastelería: Los fabricantes de cereales y harinas de trigo y arroz emplean la sal como corrector del sabor, tanto si esta materia prima va destinada al sector panadero como al pastelero. A su vez, la sal resulta un ingrediente fundamental en la elaboración del pan para controlar el grado de fermentación de la masa.
- c) Productos Lácteos: En la elaboración de estos productos básicos en la dieta como quesos, margarinas, mantequillas o cremas, la sal se utiliza para controlar la fermentación y para mejorar el color, textura y sabor de estos preparados.
- d) Conservas, Encurtidos, Ahumados y Salazones: Estos sectores, íntimamente ligados al empleo de la sal desde su existencia, utilizan este ingrediente para garantizar la conservación natural y la seguridad alimentaria de sus preparados. El característico sabor que les aporta la sal a estos productos es también una de las cualidades más apreciadas por los consumidores.
- e) Alimentación Animal: La sal también se emplea como ingrediente en la fabricación de piensos para todo tipo de animales, desde el ganado hasta los animales de compañía.

#### **3.8.1.2. Sales de Calidad Alimentaria** <sup>(22)</sup>

Para que sea de calidad alimentaria, la concentración de cloruro sódico de la sal no debe ser nunca inferior al 97%, sobre producto seco, con exclusión de los micronutrientes. La denominación para la venta de sal de calidad alimentaria es “sal alimentaria”, “sal de mesa” o bien “sal de cocina”. Además, el consumidor también podrá encontrar el etiquetado “sal yodada” y “sal fluorada”, enriquecida con estos nutrientes y recomendada por la OMS.

### **3.8.1.3. Sal Yodada** <sup>(22)</sup>

La OMS y UNICEF pusieron en marcha, en su congreso anual celebrado en Ginebra en 1993, una política de yodación universal de la sal como medio masivo de prevención de la deficiencia de yodo en la población. Se estimó que un 36.5% (285 millones) de los escolares no consumían la cantidad necesaria de yodo. La extrapolación de esta prevalencia a la población general llevó a considerar en casi 2000 millones las personas con aporte insuficiente de yodo.

La importancia de esta resolución se debe a que la carencia de yodo constituye una importante amenaza para la salud y el desarrollo de la población mundial, especialmente para los niños y las embarazadas. Cuando no se aporta la cantidad necesaria de yodo, el tiroides puede volverse incapaz de sintetizar hormonas tiroideas en cantidad suficiente. La baja concentración sanguínea de hormonas tiroideas es el principal factor responsable de una serie de alteraciones funcionales y del desarrollo de enfermedades que reciben el nombre genérico de Trastornos por Deficiencia de Yodo (TDI). El cretinismo, el bocio y el hipotiroidismo son las manifestaciones más extremas de la carencia de yodo, pero la principal motivación que hay detrás de la actual campaña mundial para eliminar la deficiencia de yodo son las alteraciones mentales y neurológicas más sutiles que reducen el rendimiento escolar, la capacidad intelectual y la capacidad de trabajo.

La sal yodada constituye el método más efectivo para la erradicación de los trastornos por deficiencia de yodo. La incorporación de los yoduros o los yodatos en la sal se realiza en los márgenes que están acordes con las recomendaciones de la OMS, expresados en mg/kg de yodo. Debe estar etiquetado correctamente como “sal yodada” y cumplir con las especificaciones fijadas por las autoridades competentes en materia de seguridad alimentaria.

#### **3.8.1.4. Sal Fluorada** <sup>(22)</sup>

La sal, como conductor importante del flúor, fue considerada en el cuadro de la prevención de la caries dental creado por la OMS en 2005. Se determinó que la sal también puede ser enriquecida con flúor con el fin de prevenir las caries dentales, muy especialmente en los menores en edad escolar. En este caso, el etiquetado debe llevar la mención “sal fluorada” o “sal yodada y fluorada”. La incorporación de fluoruros debe estar realizada en las proporciones que se establezcan por las autoridades sanitarias, expresadas en mg/kg de fluor, y utilizando fluoruros de potasio o de sodio de calidad alimentaria.

#### **3.8.1.5. Procesos de Obtención de Sal** <sup>(4)</sup>

Sal solar o sal marina: En términos generales consiste en obtener agua de mar y proceder a evaporarla a través de la acción combinada de energía solar y viento. Cuando la salmuera alcanza su punto de saturación da inicio a la cristalización del cloruro de sodio.

Sal refinada: esta se obtiene mediante vacío y consta esencialmente de evaporadores e intercambiadores de calor, también se le conoce como refinería. Una de las ventajas del proceso de producción de sal por medio de refinación es que se puede obtener sal muy cristalina, blanca y de alta pureza (99.5%).

#### **3.8.2. Café** <sup>(23)</sup>

El café es una bebida que se obtiene de las semillas tostadas de las plantas del café o cafetos (*Coffea pps*). Los cafetos son arbustos de hoja perenne de la familia de las Rubiáceas. Existen muchas especies, entre ellas está la arábica y la robusta. Sus flores de color blanco crecen en grupos en las axilas de las hojas y son aromáticas. A partir de ellas se producen sus frutos, que son drupas, de color rojizo y de un tamaño similar a una cereza. La parte exterior

del fruto es carnosa y en su interior contienen dos semillas o granos de café, estos son la parte que contiene más cafeína.

### **3.8.2.1. Proceso de Obtención de Café** <sup>(23)</sup>

Cosecha: Cuando los frutos se encuentran maduros se inicia el proceso de cosecha, la que se puede realizar de manera manual seleccionando los frutos que están maduros (Recolección) o por el método Despalillado que consiste en raspar las ramas del cafeto, manual o mecánicamente, para desprender los frutos todos a la vez.

Eliminación de las capas externas: después de la cosecha debe eliminarse las capas externas, tanto de la capa de pulpa que protege la semilla como la capa papirácea que rodea directamente la semilla. Para ello existen dos métodos:

- Método Seco: se realiza por medio de la acción de rayos solares extendiendo los frutos sobre una superficie, los frutos se secan y se descortezan mecánicamente.
- Método Húmedo: consiste en que los frutos fermenten dentro de tanques especiales con la acción de microorganismos como el *Bacillus lactis aerogenes*, la pulpa se ablanda y disgrega, luego los frutos se lavan y raspan mecánicamente lo que elimina la pulpa.

Clasificación y Filtrado: se realiza según el tamaño de los granos y además se eliminan las impurezas que hayan quedado del proceso anterior.

Pulido: el café verde se pule para eliminar una capa de color blanco plateado que cada grano posee.

Almacenamiento y Envejecimiento: para acentuar el sabor del café, se almacena dentro de sacos de fibra en un lugar fresco y seco durante un periodo que oscila entre uno y tres años. Con ello se consigue que el café envejezca y presente un sabor y aroma más agradables.

Descafeinado: el café verde tiene un contenido demasiado elevado de cafeína por lo que para evitar efectos perjudiciales debe quitarse parte de su contenido. Los granos se someten a un proceso de hidratación y posteriormente, se elimina parte de la cafeína mediante solventes orgánicos o carbón activado.

Tostado: este proceso proporciona sabor y aroma, se realiza en un horno a temperaturas entre los 200 y 250°C, con ello se consigue descomponer el ácido cafetánico que parece ser el responsable de su aspereza. En este proceso aparece el aceite esencial rico en cafeona que es quien proporciona un agradable sabor.

### **3.8.2.2. Usos del Café** <sup>(23)</sup>

La planta del café se utiliza principalmente para producir semillas de las cuales se extrae, una vez el grano tostado, molido, mediante el método de infusión por disolución en agua caliente la bebida del café. También se utiliza para dar sabor y aroma a muchos preparados alimenticios como helados, caramelos, pastelería, etc. El café posee usos curativos como analgésico, diurético y antioxidante y en la industria farmacéutica se utiliza la cafeína en la composición de diversos medicamentos principalmente analgésicos. Los restos de café pueden ser usados como abono en jardinería.

### **3.8.2.3. Composición Química del Café** <sup>(18)</sup>

El café es una bebida de una gran complejidad química y biológica en el que se han reconocido más de mil sustancias químicas las cuales están determinadas

por la variedad, el manejo agrícola, el grado de tostión, concentración y preparación; posee múltiples componentes en cada grano, y los granos de café crudos tienen una composición diferente entre la variedad Arábica y la Robusta, como se muestra en la tabla N°1:

Tabla N°1: Composición de los granos de café tostado medio (Porcentaje en base seca) <sup>(18)</sup>

<b>Componente</b>	<b>Variedad Arábica</b>	<b>Variedad Robusta</b>
Cafeína	1,3	2,4
Minerales	4,5	4,7
Lípidos	17,0	11,0
Trigonelinas	1,0	0,7
Proteínas	10,0	10,0
Acidos alifáticos	2,4	2,5
Acidos clorogenicos	2,7	3,1
Carbohidratos	38,0	41,5
Aromas Volátiles	0,1	0,1
Melanoidinas	23,0	23,0

### **3.8.3. Carnes** <sup>(19)</sup>

La calidad de la carne no resulta fácil de definir, pero pueden considerarse tres aspectos fundamentales que la describen: Nutrición, Seguridad y Satisfacción. La seguridad está determinada por la ausencia de microorganismos, antibióticos, hormonas y otros compuestos químicos que pueden ser perjudiciales para la salud del consumidor. Los factores nutrimentales se relacionan con la composición de la carne, cuyo consumo se considera esencial para el buen desarrollo de nuestro organismo. En cuanto al valor nutricional, en relación a las proteínas, la calidad que posee la carne de cerdo es muy

considerable, ya que la digestibilidad es muy elevada y la proporción de aminoácidos es adecuada de acuerdo con las exigencias nutricionales de la dieta. Finalmente, la satisfacción, el placer de consumir, que está relacionado con las características físicas de la carne (textura, color, sabor, firmeza).

La importancia de la carne no deriva solo de su atractivo sensorial, sino también de su elevado valor nutritivo. El valor está basado en su contenido en minerales, vitaminas y proteínas. El valor o balance de una proteína depende del tipo y cantidad de aminoácidos que contiene y representa una medida de la eficiencia con que puede ser utilizada por el organismo. Una proteína equilibrada, o de alta calidad, contiene aminoácidos esenciales en proporciones aproximadas a las que son reportadas en las tablas que expresan necesidades humanas. La producción de carne y su industrialización posterior constituyen parte importante de la industria alimentaria del mundo. En su conjunto, esta actividad económica incluye la crianza de animales y su posterior procesamiento industrial, que comprende la matanza, la producción de carne y el procesamiento de subproductos y desechos para su reaprovechamiento. Las principales materias primas utilizadas en los mataderos son los animales que serán faenados, siendo los más comunes los vacunos, cerdos, ovinos y aves. En la manufactura de productos cárneos (cecinas crudas frescas, cecinas crudas maduradas, cecinas crudas acidificadas y cecinas cocidas), la materia prima proviene de los mataderos. Adicionalmente, en la elaboración de carnes suelen agregarse los siguientes insumos: fosfatos, ácidos grasos y proteínas de soya, que posibilitan una mezcla homogénea, colorantes naturales, como carmín de cochinilla, nitritos, azúcar, dextrosa, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, etc. Está prohibido el uso de sulfitos, que puedan ocultar la descomposición de los productos cárneos; también se prohíbe el uso de sustancias amiláceas, salvo a las que se expendan enlatadas, en cuyo caso se permitirá hasta un 5%; los colorantes artificiales también serán prohibidos en

carnes, pastas, tripas naturales, artificiales semipermeables empleadas en la elaboración de cecinas, salvo si se utilizan en membranas artificiales no comestibles y siempre que el colorante no difunda en el contenido. Para dar sabor y olor, suele utilizarse sal, azúcar, especias, hierbas, ácidos orgánicos y glutamato de sodio.

### **3.8.3.1. Procesos de Producción** <sup>(19)</sup>

La industria procesadora de carne incluye los mataderos, la manufactura de una gran variedad de productos de carne, como cecinas y productos cárneos envasados y el proceso de recuperación de descartes, tales como grasa, huesos, cabezas, sangre y vísceras. Los mataderos deberán disponer de un área para el sistema de tratamiento o destrucción de decomisos, la que deberá estar separada del área de faenamiento. En los mataderos, se prohíbe el sacrificio y faenamiento de animales destinados para consumo humano en locales o recintos no autorizados por la autoridad sanitaria. No debe existir presencia alguna, en las salas de faenamiento, de personas ajenas a las tareas propias del matadero, la mantención de otros animales que no estén destinados al sacrificio, y no se permitirá la salida o retiro de animales vivos del recinto. En los mataderos, los animales son faenados para separar las partes comestibles, a ser procesadas según la forma en que se consumirán. Los principales procesos involucrados son:

- Corrales: Se recibe el ganado, este debe encerrarse con 6 horas de antelación al sacrificio y así permitir reposar al animal y efectuar los exámenes ante - mortem. Sólo en casos justificados, previo a la autorización del médico - veterinario del Servicio de Salud, se podrá disminuir el tiempo de reposo.

- Aturdimiento: Generalmente se les aplica un disparo con pistola neumática y/o una descarga eléctrica. Posteriormente, se provoca su muerte por desangrado.
- Sangría: En este proceso, mediante un corte en las arterias del cuello, se provoca su muerte por desangrado.
- Descuerado: Luego de desangrar al animal, se le corta la cabeza y cuernos y se procede a descuerar con la precaución de no desgarrar músculos ni ocasionar cortes en el cuero.
- Faenamiento: Corte longitudinal en el pecho para extraer vísceras y demás órganos.
- Evisceración: Clasificación, inspección y lavado de vísceras, desinfección y enfriamiento.
- Trozado en dos canales: Corte longitudinal con sierra eléctrica, a lo largo de la columna del animal, en dos partes.
- Lavado, inspección y pesaje: Se lava, clasifica y pesa el animal.
- Enfriamiento: Incorporación del animal tibio a una cámara de frío.
- Almacenamiento post-mortem: La carne se almacena en un cuarto frigorífico por 3 días.

El dictamen final y definitivo respecto de la aptitud para consumo de las carnes y subproductos, se hará de acuerdo a las normas que para tales efectos dicte en Ministerio de Salud.

### **3.8.3.2. Composición Química de la Carne** <sup>(27)</sup>

Las características a nivel sensorial que debe presentar la carne son débil olor a ácido láctico comercial, un color rojo brillante y un límite máximo de nitrógeno amoniacal de 200mg por 100g de muestra, y un intervalo de pH de 6.5 a 6.8. La cantidad de agua varía de acuerdo a la especie, edad, sexo y zona anatómica del tejido. La cantidad de agua está directamente relacionada con la cantidad

de grasa. El porcentaje de agua en la carne oscila entre el 60 y 80% y está relacionado con la jugosidad y los atributos sensoriales, como la textura, el color y la dureza de la carne. El contenido de Proteínas es alrededor del 15 al 20% y son de alta calidad biológica por la aportación de aminoácidos esenciales, a pesar de que son sometidos a otros tratamientos de conservación. La grasa se presenta en un amplio intervalo, dando lugar a una clasificación según su contenido. Así las carnes magras presentan un contenido de grasa menor a 5%, la semigrasas entre el 5 y 10%, y las grasas entre el 10 y 30%. El contenido de colesterol se sitúa entre 50 a 75mg por 100g de carne. Existen numerosos factores que influyen en el contenido de grasa, como la especie, la edad, parte del animal y tipo de alimentación, entre otros. La grasa es principalmente saturada (Ácido Palmítico, Esteárico), aunque también posee ácidos grasos saturados como el Linoléico y Oleico. La cantidad máxima de carbohidratos que pueden existir en el músculo es de 1%, la forma más importante es el glucógeno que es la fuente de energía del músculo. Las vitaminas más importantes son las del complejo B (Tiamina, Riboflavina, Piridoxina, Cianocobalamina, Niacina). Las vitaminas liposolubles (A y D) son prácticamente inexistentes, salvo en el caso de las vísceras. La carne es un alimento muy completo con respecto al aporte de minerales. En ella encontramos Cinc, Hierro, Cobre, Fosforo, Potasio, Magnesio y Selenio.

#### **3.8.4. Embutidos** <sup>(26)</sup>

Los embutidos son alimentos preparados a partir de grasa de cerdo y carnes picadas, condimentadas y embutidas en una porción de intestino delgado (tripa) del cerdo, la cual es obtenida después de su sacrificio. En el caso de los embutidos comerciales estos son curados con nitratos y nitritos, con el fin de fijar su coloración y conservación. El embutido también puede prepararse con otras carnes, como la de bovino, borrego, pollo y pavo las cuales deben ser mezcladas con grasa de cerdo lo más homogéneamente. Para incrementar sus

olores y sabores se le agregan condimentos, especias y sazonzadores <sup>(24)</sup>. Una forma de clasificarlos es desde el punto de vista de la práctica de elaboración, reside en referir al estado de la carne al incorporarse al producto. En este sentido, los embutidos se clasifican en:

- Embutidos crudos: aquellos elaborados con carnes y grasa crudos, sometidos a un ahumado o maduración. Por ejemplo: chorizos, salchicha, salami.
- Embutidos escaldados: aquellos cuya pasta es incorporada cruda, sufriendo el tratamiento térmico (cocción) y ahumado opcional, luego de ser embutidos. Por ejemplo: mortadelas, salchichas tipo frankfurt, jamón cocido, etc. La temperatura externa del agua o de los hornos de cocimiento no debe pasar de 75-80°C. Los productos elaborados con féculas se sacan con una temperatura interior de 72-75°C y sin fécula 70-72°C.
- Embutidos cocidos: cuando la totalidad de la pasta o parte de ella se cuece antes de incorporarla a la masa. Por ejemplo: morcillas, paté, queso de cerdo, etc. La temperatura externa del agua o vapor debe estar entre 80 y 90°C, sacando el producto a una temperatura interior de 80 - 83°C.

La industria productora y empacadora de carnes frías y embutidos realiza varias actividades, que comprenden desde la matanza del ganado, transformación, industrialización y venta de productos como salchichas, jamones y chorizos, y otros alimentos procesados. Existen diversidad de embutidos llamados también Productos Cárnicos, dentro de los cuales tenemos: Salchichas, Jamones, Mortadela, Chorizos, Longanizas, etc. Las salchichas es un término que alude a los productos alimenticios elaborados básicamente con no menos de 60% de carne de res y cerdo, mezclados con grasa de cerdo, emulsificados y sometidos

a curación (pueden ser ahumados o no), cocción y enfriamiento, empacados en materiales adecuados para su distribución y conservación en refrigeración. Los jamones es un término que puede utilizarse indistintamente para denominar un producto alimenticio elaborado exclusivamente ya sea con carne de las piernas traseras de los cerdos o con carne de los muslos de los pavos o pollos. La mortadela es un alimento que se obtiene de la mezcla de carne de res, carne grasa de cerdo salada, sometida a proceso de curación, molienda, embutido, cocción y ahumado. Los chorizos es un embutido preparado con carnes de especies animales aptas para el consumo humano. Por lo regular, tiene color rojo y forma cilíndrica y alargada, se condimenta con pimentón y otras especies, posteriormente se cura. Suele presentarse seccionado en tramos generalmente de 10 a 15cm separados por un cordel, y pueden ser ahumados y estar adicionados con cultivos lácticos. La longaniza consiste en un pedazo largo de tripa estrecha llena con carne de cerdo, picada y adobada. Se diferencia del chorizo en la calidad de las carnes, en los condimentos empleados, en la adición de cultivo láctico y, naturalmente, el sabor. En la tabla 2, 3 y 4 se muestran el análisis químico proximal del jamón, salchichas y chorizos respectivamente.

Tabla N°2: Análisis químico proximal de Jamón Cocido <sup>(26)</sup>

<b>Determinación</b>	<b>De Cerdo</b>	<b>De Pavo</b>
Energía (Kcal)	298	123
Humedad	55.30%	71.40%
Cenizas	---	---
Proteína Bruta	15.40%	18.90%
Carbohidratos	0.60%	0.40%
Lípidos	26.00%	5.10%

Tabla N°3: Análisis químico proximal de Salchichas <sup>(26)</sup>

<b>Determinación</b>	<b>De Cerdo</b>	<b>De Pavo</b>
Energía (Kcal)	214	539
Humedad	55%	67%
Cenizas	2%	5%
Proteína Bruta	12%	23%
Carbohidratos	10%	15%
Lípidos	14%	43%

Tabla N°4: Análisis químico proximal de Chorizos <sup>(26)</sup>

<b>Determinación</b>	<b>De Cerdo</b>	<b>De Pavo</b>
Energía (Kcal)	277	549%
Humedad	22%	50%
Cenizas	3%	5%
Proteína Bruta	14%	24%
Carbohidratos	8%	12%
Lípidos	21%	45%

### 3.8.5. Mantequilla <sup>(14)</sup>

La mantequilla es un derivado lácteo, que tiene importancia como alimento por la grasa que contiene, nutricionalmente esta grasa es importante porque transmite las vitaminas liposolubles de la leche como son la Vitamina A, D y E principalmente, en cuanto a su valor energético es equivalente al de otras grasas y aceites. La producción de mantequilla se remonta a los inicios del proceso de transformación de la leche. La nata se separaba en forma natural y la mantequilla se elaboraba en forma manual en mantequeras de madera. Gradualmente se fueron mejorando los métodos de elaboración de mantequilla,

con lo cual aumentó la calidad del producto y su rendimiento económico. En las últimas décadas se ha producido un rápido desarrollo tecnológico en todas las áreas. La producción actual de mantequilla se basa en procesos tecnológicos modernos y en rigurosos controles de calidad total. Desde el punto de vista legal la mantequilla se define como el producto graso obtenido exclusivamente de leche o crema de vaca higienizada. Técnicamente la mantequilla es una emulsión del tipo “agua en aceite”, obtenida por batido de la crema, y que contiene no menos del 82% de materia grasa y no más del 16% de agua. En la tabla N°5 se muestra de manera más detallada la composición de la mantequilla.

Tabla N°5: Composición media de la mantequilla <sup>(14)</sup>

COMPONENTES	%	CONTENIDO
Fase Grasa	82	Triglicérido 82%
		Fosfátidos 0,2 –1 %
		Caroteno 3-9 ppm
		Vitamina A 9-30 ppm
		Vitamina D 0,002-0,040 ppm
		Vitamina E 8-40 ppm
Agua	< 16	
Extracto Seco Magro	< 2	Lactosa 0,1 – 0,3%
		Ácido Láctico (fermentada) 0,15 %
		Materias Nitrogenadas 0,2-0,8 %
		Caseína 0,2 -00,6 %
		Lactoalbúmina 0,1-0,05 %
		Trazas de: Proteínas de la membrana, Péptidos, Aminoácidos
		Sales (=NaCl) 0,1 %
		Citratos 0,02 %
		Vitamina C. 3 ppm
		Vitamina B2 0,8 ppm

### **3.8.5.1. Proceso de Elaboración de la Mantequilla** <sup>(14)</sup>

La crema es la materia prima para la obtención de la mantequilla, el nivel graso de la crema debe ser de 35 a 40%. El tratamiento de la crema comprende operaciones básicas importantes para el proceso de elaboración de mantequilla, estas operaciones son la normalización; neutralización, en el caso que la crema esté ácida; pasteurización y maduración de la crema.

- Normalización: Consiste en regular el nivel graso de la crema, normalmente la crema es obtenida con un nivel de grasa mayor al establecido para el proceso, la crema debe ser normalizada de 35 a 40% de grasa. La crema se normaliza generalmente con leche descremada.
- Neutralización: reducción de la acidez en las cremas ácidas. Esta operación, se convierte en una práctica corriente en las fábricas, cuando la acidez de las cremas es elevada.
- Pasteurización: La pasteurización de la crema se realiza con el objeto de destruir los gérmenes patógenos, así como destruir enzimas como las peroxidasas y lipasas que son perjudiciales para la conservación de las grasas. La pasteurización se efectúa a temperaturas superiores a 85°C, normalmente a 90°C por 20 minutos, esta temperatura favorece el aporte de sustancias antioxidantes, disminuye el nivel de cobre en la grasa y elimina CO<sub>2</sub> y otros ácidos volátiles presentes en la crema.
- Maduración de la Crema: La crema no debe batirse inmediatamente después del descremado, sea espontáneo o mecánico, porque se obtendría una mantequilla dulce, de buen gusto, pero sin aroma ni consistencia.
- Batido: El batido tiene por finalidad soldar los glóbulos grasos recogidos bajo forma de crema separados unos de otros por el suero que los rodea. La batidora junta los glóbulos de grasa con golpes repetidos hasta constituir masas que van creciendo sin cesar, invisibles primero a causa

de su pequeñez, pero que en un momento dado se presentan bajo forma de pequeñas granulaciones en el medio del líquido en el cual nadan. A partir de este momento, los granos más grandes sufren mejor el efecto que los choques y se sueldan en masas cada vez más voluminosas y el ruido del líquido que salía de la batidora es reemplazado por un ruido más sordo, que indica que ya se ha formado la mantequilla.

- Desuerado: Cuando se produce la inversión de las fases, la grasa se separa de la fase no grasa que constituye el suero de mantequilla o mazada, que es separado, operación que se denomina desuerado. La grasa presente constituye los granos de mantequilla con la cual se continúa el proceso.
- Lavado de la Crema: Cuando la mantequilla comienza a formarse, algunos técnicos acostumbran a parar la batidora, con el fin de añadir una cantidad de agua (cerca del 5% del volumen de la batidora) a una temperatura entre 2-3°C más baja que la temperatura de la crema. Cuando la mantequilla se ha formado, se deja salir el suero por la llave de la batidora, mejor si se hace a través de un filtro para evitar pérdida de granos de mantequilla. Cuando ha salido todo el suero, se vierte en la batidora una cantidad de agua que permita alcanzar el flotamiento total de toda la mantequilla. Es oportuno que la temperatura del agua añadida se encuentre cerca de 3°C más baja que la temperatura de la crema. Luego se pone en rotación la batidora durante 15 a 20 rotaciones y después se pasa y se deja salir el agua de lavado.
- Amasado de la Mantequilla: Tiene por objeto purgar la mantequilla de las últimas trazas de suero y de agua de lavado que contenga y de homogeneizar la pasta tanto como sea posible.
- Salado: Es una operación opcional debido a que se produce mantequilla con sal y sin sal.

- Moldeado y Envasado de la Mantequilla: La mantequilla para ser envasada debe estar seca y fría, se recomienda dejar una noche en cámara de refrigeración y antes del envasado se debe efectuar un control de la dispersión del agua. Para la presentación se pueden emplear moldes de madera, de diferentes pesos. Los bloques de mantequilla son cuidadosamente envueltos en papeles o telas especiales antes de remitirles en cajas o moldes

### **3.8.5.2. Diferencia entre Mantequilla y Margarina** <sup>(24)</sup>

En la mantequilla la grasa de leche es su componente mayoritario (80 por ciento como mínimo); cualquier producto que ostente la denominación "mantequilla" debe tener un máximo de 16% de agua, de 2 a 4% de sólidos no grasos de leche (suero), y algunos pueden contener hasta un 3% de sal. La margarina tiene un contenido de grasa del 80%, pero a diferencia de la mantequilla, la grasa puede ser de origen animal o vegetal (no necesariamente de leche), además debe contener hasta 18.6% de agua. Estos productos aceptan un mínimo de 1.4% de suero de leche y el contenido de sal no debe ser mayor del 2.5%.

### **3.8.6. Helados** <sup>(17)</sup>

Los helados son los productos obtenidos a partir de la mezcla pasteurizada, homogeneizada, batida y refrigerada por medios manuales o mecánicos que tengan en su composición ingredientes principales como son: Leche, constituyentes lácteos y productos lácteos, pasteurizados, concentrados, deshidratados, fermentados, reconstituidos o combinados. Aceites comestibles y grasas comestibles no lácteas autorizadas, proteínas comestibles no lácteas. Edulcorantes como sacarosa, jarabe de maíz o glucosa, azúcar invertida, dextrosa, fructosa, lactosa o mezcla de ellas y edulcorantes artificiales, agua

potable, huevos y productos derivados de los mismos libres de sabores y olores extraños. Frutas y productos derivados de las mismas. <sup>(17)</sup>

### **3.8.6.1. Clasificación de los Helados** <sup>(17)</sup>

De acuerdo con sus características y/o a los ingredientes empleados en su elaboración, los helados se clasifican en:

- a) Helados de agua o Sorbetes: esta denominación corresponde a los productos en los que el componente básico es el agua. Deberán responder a las siguientes exigencias:
  - Extracto seco, Mín: 20.0% p/p
  - Materia grasa de leche, Máx: 1.5% p/p
- b) Helados o Helados de leche: esta denominación corresponde a los productos que han sido elaborados a base de leche. Deberán responder a las siguientes exigencias:
  - Sólidos no grasos de leche, Mín: 6.0% p/p
  - Materia grasa de leche, Mín: 1.5 % p/p
- c) Helados de crema: esta denominación corresponde a los productos que han sido elaborados a base de leche y han sido adicionados de crema de leche y/o manteca. Deberán responder a las siguientes exigencias:
  - Sólidos no grasos de leche, Mín: 6.0 % p/p
  - Materia grasa de leche, Mín: 6.0 % p/p

Los helados de base láctea tienen un valor nutritivo significativo, debido, principalmente, a su aporte en proteínas de alto valor biológico y calcio altamente biodisponible. También nos suministran azúcares, grasas, fósforo, magnesio y potasio. Su valor nutritivo proviene de la leche que contienen. En consecuencia, los que cuentan con una proporción más elevada de leche, como

los helados crema, serán los más nutritivos. Los helados lácteos pueden contener también huevo, frutos secos, chocolate y añadir las cualidades nutricionales de estos ingredientes al helado de base. En cambio, los helados de agua tan sólo nos proporcionan las calorías provenientes de su elevado contenido en azúcar (20-30%). Los sorbetes tienen unas características nutricionales similares a los helados de agua y pueden realizar un pequeño aporte de fibra o algunos micronutrientes si están elaborados con un mínimo de un 30% de fruta o zumo.

### **3.8.6.2. Energía** <sup>(17)</sup>

Los helados de agua y sorbetes tienen un contenido energético medio/bajo (68-138 kcal), una ración de 100g no aporta ni un 10% de las necesidades energéticas diarias, pero son calorías vacías. Dentro del grupo de helados de base láctea, y aunque hay algunos helados muy energéticos, la mayoría de helados crema y helados pueden clasificarse como alimentos de contenido energético moderado, es decir, inferior a 300 kcal/100g. Los helados de leche pertenecerían al grupo de contenido energético medio/bajo (alrededor de 150 kcal/100g). Los helados crema serían los más energéticos, pero algunos ingredientes, como el chocolate y derivados, mermeladas, frutos secos o barquillo, aumentan el valor energético del producto. A modo de ejemplo, un 30% de chocolate blanco en la fórmula duplica el contenido energético del helado al que se incorpora. Aun así, el helado crema básico de 100 g aportará el 12% de la energía que debe ingerir diariamente un niño, algo muy razonable. Aunque pueda tenerse una percepción diferente, una ración de helado de base láctea tiene un aporte energético superior al de la leche entera, pero más próximo al de los productos lácteos que a otros alimentos ingeridos como postres o meriendas, como los productos de pastelería o los bocadillos, incluso en el caso de los helados crema.

### **3.8.6.3. Proteínas** <sup>(17)</sup>

El contenido de proteínas en los helados crema, leche y helados es similar al de la leche y, como en su caso, tienen un valor biológico elevado. En los helados elaborados a partir de leche en polvo desnatada y en los mantecados, el contenido proteico aumenta y destaca el aporte de lisina, aminoácido limitante de muchas proteínas. La incorporación de caseinatos aumentará el contenido proteico del producto, así como el chocolate o los frutos secos, que pueden triplicar el contenido proteico de la fórmula base.

### **3.8.6.4. Carbohidratos** <sup>(17)</sup>

El valor energético de los helados de base láctea se debe fundamentalmente a los azúcares que contienen (16.4-41.6%) y son el principal motivo por el que no deben consumirse en exceso. Estos azúcares son, principalmente, lactosa y azúcares añadidos (sacarosa y, a veces, jarabe de glucosa). A pesar del elevado contenido en azúcar, la fracción grasa del propio producto puede retrasar el vaciamiento gástrico y provocar que estos azúcares no sean de absorción tan rápida como en otros alimentos muy azucarados y exentos de grasa, con los helados de agua y sorbetes. Contienen lactosa, que es el azúcar simple de absorción más lenta y facilita la absorción del calcio del producto. Los helados y otros postres lácteos, como flanes, arroz con leche o natillas, contienen una cantidad de glúcidos de rápida absorción similar. Una ración de 100g de helado puede representar entre el 3 y el 6% del total de glúcidos de absorción rápida recomendado para adultos (10%).

Actualmente, no se considera necesario prohibir el consumo de helados de base láctea a los diabéticos, ni siquiera a los insulino dependientes. Para insulino dependientes se considera que raciones de 100g de producto son totalmente compatibles con su dieta y que 3-4 unidades de insulina rápida 30 minutos antes de la ingesta previenen el incremento glucémico. La existencia

de helados edulcorados también puede facilitar su incorporación a una dieta que, en cualquier caso, debe estar siempre controlada por un facultativo. En el caso de los helados que incorporan frutos secos, aumentará el porcentaje de hidratos de carbono complejos y fibra. Algunos helados incorporan inulina y con ello una fibra especialmente saludable.

#### **3.8.6.5. Grasas** <sup>(17)</sup>

Los helados de agua y sorbetes no contienen grasas, esto los haría adecuados para personas que necesitan una restricción en la ingesta lipídica, pero su elevado contenido en azúcares de absorción rápida limita esta recomendación. La grasa que contienen los helados de base láctea es mayoritariamente saturada. En los helados de leche y en los de crema es grasa láctea (60% en la fracción grasa), mientras los helados tienen un contenido mayor (80%) y es grasa de coco, palma, y grasas hidrogenadas, es decir grasas vegetales pero altamente saturadas. La grasa de los helados crema con cobertura de chocolate es menos hipercolesterolemizante incluso que la de la leche entera, puesto que la manteca de cacao es rica en ácido esteárico y ácido oleico, lo que mejora el perfil lipídico del producto, a pesar de aumentar ligeramente su valor energético.

El contenido graso de los helados de base láctea es muy variable, tanto entre diferentes tipos como dentro de uno mismo. Mientras los helados de leche tienen un contenido graso moderado (<5%), los helados crema (14.8%) y los helados (12,5%) tienen un contenido más elevado. Respecto al contenido en colesterol, los helados crema son los que contienen una proporción de colesterol más elevada (30 mg/100g helado). Pero teniendo en cuenta que la ingesta máxima recomendable es de 300 mg/día, un helado crema de 100 g aporta un 10% de ese valor, menos que 100g de carne.

#### **3.8.6.6. Vitaminas** <sup>(17)</sup>

El contenido de vitamina B<sub>2</sub> en los helados de base láctea, y especialmente en los helados de leche, resulta especialmente significativo para cubrir los requerimientos de los niños.

#### **3.8.6.7. Calcio** <sup>(17)</sup>

El contenido de calcio en los helados de base láctea oscila entre 148 mg/100g de media en los helados de leche a 89 mg/100g en los helados crema. Hay una gran variabilidad dentro de cada grupo y algunos helados crema o helados pueden llegar a tener contenidos de calcio superiores a la mayoría de helados de leche. El contenido de calcio de los helados de leche es similar al del yogur natural, flanes y natillas; el doble del aporte realizado por helados y helados crema. El calcio de los helados de base láctea, como el de la leche y del resto de derivados lácteos, es mucho más biodisponible y asimilable para el organismo que el del resto de alimentos.

La relación calcio/fósforo en el alimento es determinante para la absorción de ambos minerales y en estos helados es óptima. Tanto su contenido en lactosa como en proteína láctea o en vitamina D favorecen la asimilación del calcio. Los helados realizan un aporte de calcio realmente significativo y es su rasgo nutricional más interesante. Cabe reseñar que 100g de helado de leche proporciona una cantidad de calcio similar al de la misma cantidad de leche entera. La contribución del resto de helados de base láctea a las necesidades diarias del mineral suele encontrarse alrededor del 10%.

#### **3.8.7. Jalea Real** <sup>(32)</sup>

La jalea real es una sustancia secretada por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras jóvenes. Su consistencia es líquida, lechosa y viscosa, con cerca de un tercio de su contenido compuesto de

materia seca, y de color amarillenta o blanca cremosa. Las abejas a partir de los tres días de edad comienzan la actividad de sus glándulas hipofaríngeas para producir jalea, estando su mayor actividad entre los cinco y 15 días y su tasa máxima de síntesis proteica entre los 10 y 14 días de edad. Por su alto contenido proteico este producto es sintetizado durante la digestión del polen, aunque también se agrega miel a la secreción. Se trata de una sustancia cremosa, de color blanco lechoso, altamente nitrogenada, con olor levemente picante y un sabor amargo y ácido. La jalea real es utilizada por las abejas jóvenes llamadas nodrizas para alimentar a la reina desde su estado larval y durante toda su vida, y también a las abejas obreras y zánganos durante sus primeros estados larvales. Aunque, también es usada por las nodrizas para alimentar a otros adultos dentro de la colmena.

#### **3.8.7.1. Composición Química** <sup>(34)</sup>

Tratándose de una secreción animal, su composición es muy variable, dependiendo de diversos factores: Zona de procedencia de la colmena, Período de recolección y Naturaleza o edad de las larvas. Así, por ejemplo, en el análisis químico de jalea real procedente de muestras de China, Taiwán y Japón, en un estudio comparativo, se demostró que estas últimas contenían más proteínas que las demás analizadas. En cuanto a la época de recolección se ha comprobado un incremento del ácido 10-hidroxidecanoico (ácido graso más importante presente en la jalea real y de comprobada acción antibiótica). Por último, otra variación observada es la referida a la jalea real fluida que las obreras jóvenes reciben, rica en prótidos, conteniendo un número de granos de polen mucho más elevado que la jalea real segregada para reinas.

Teniendo en cuenta la complejidad química de este producto y los factores condicionantes que intervienen sobre él, la composición media de este producto se muestra en la tabla N°6.

Tabla N°6: Composición química de la Jalea Real <sup>(34)</sup>

Componentes	Porcentaje
Agua	68%
Prótidos	12%
Azúcar	8.5%
Lípidos	5.6%
Cenizas	0.8%

Además tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales en estado libre (20 tipos, incluidos los 7 esenciales para mantener la vida) , como son entre otros: alanina, ácido aspártico, lisina, serina, arginina, ácido glutámico, fenilalanina, treonina, cistina, leucina, triptófano, tirosina. También todas las vitaminas del complejo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>8</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub>), así como considerables dosis de vitamina A, C, D y E. Actúa como neurotransmisor pues contiene 1mg/g de acetilcolina, en la jalea real fresca. Como factor antibiótico porque contiene ácido hidroxí-10-deceno-2-transoico, que es activo con el *Estaphilococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Salmonella typhy* y *Bacilus de Köch*. Posee minerales y oligoelementos tales como: cobre, calcio, hierro, zinc, fósforo, silicio, potasio y magnesio. Contiene Estradiol, sistilbestrol, progesterona y testosterona (hormonas masculinas y femeninas perfectamente equilibradas).

### 3.8.8. Yogurt <sup>(34)</sup>

El yogurt es una de las leches fermentadas más antiguas que se conocen. Ha sido desde hace mucho tiempo un alimento de importancia en países del medio oriente, en especial en aquellos de la costa oriental del mediterráneo. Las leches fermentadas son productos acidificados por medio de un proceso de fermentación. Como consecuencia de la acidificación por las bacterias lácticas, las proteínas de la leche como la caseína (80%), beta-lactoglobulina (10%), alfa-lactoglobulina (2%) y otras (8%), se coagulan y precipitan. Luego estas

proteínas pueden dissociarse separando los aminoácidos, lo que probablemente mejora la digestibilidad de las leches fermentadas. Muchas de las propiedades de la leche mejoran al ser fermentadas:

- Aumenta el valor biológico de las proteínas. La lactosa se convierte en ácido láctico que es un antiséptico digestivo.
- Se sintetiza vitamina B por parte de las bacterias de la leche fermentada.
- Aumenta la cantidad de Riboflavina (Vitamina B<sub>2</sub>)
- Aumenta la cantidad de ácido fólico y folínico.
- Aumenta la cantidad de Vitamina B<sub>12</sub>
- Aparece un gran efecto bactericida.
- Bacteriostático.

Dependiendo del tipo de yogurt se acepta la presencia de agregados como frutas, azúcar y miel, así como saborizantes, colorantes y estabilizadores permitidos. Los productos con fruta agregada deben contener al menos 75% de yogurt.

El yogurt puede considerarse el primero de los alimentos funcionales, ya que proporcionan múltiples beneficios para la salud, derivados de algunos de sus componentes: Bacterias Probióticas, Péptidos Bioactivos, Acido Linoléico, etc.

No se podrá denominar como yogurt a los productos que los contengan como uno de sus ingredientes, pero podrá incluirse como parte de su denominación. Estos productos pueden o no tratarse térmicamente. El etiquetado de los envases de los yogures debe contener la clase de leche que se emplea en su elaboración: entera, parcialmente descremada o descremada, y el porcentaje de grasa de leche que contiene, hoy día se encuentra en el mercado yogures de todo tipo: Desnatados, con Soya, Fibra, Vitaminas y Minerales, Leches fermentadas que ayudan a regular la presión arterial gracias a su contenido de péptidos lácteos entre otros. Este es un alimento que se utiliza como funcional y

al que se le añaden más nutrientes funcionales. Entre sus efectos beneficiosos cabe destacar la salud cardiovascular y la mejora del sistema gastrointestinal, entre otros.

#### **3.8.8.1. Composición del Yogurt** <sup>(34)</sup>

Yogurt Natural: es aquel que tiene un pH igual o inferior a 4.6, con un contenido mínimo de grasa de 2% y un extracto seco magro de leche mínimo del 8.5%

Yogurt Azucarado: corresponde a la composición del yogurt natural pero al que se le ha añadido azúcar o azúcares comestibles.

Yogurt Edulcorado: es el que corresponde a la composición de yogurt natural pero se le han añadido los edulcorantes que rigen las normas.

Yogurt con frutas, zumos u otros productos naturales: es el que corresponde a la composición de yogurt natural al que se le han añadido frutas, zumos u otros productos naturales. La cantidad mínima de yogurt en el producto terminado será de 70%.

Yogurt Aromatizado: es el que corresponde a la composición de yogurt natural pero se le han añadido agentes aromáticos autorizados. La cantidad mínima de yogurt en el producto final será del 80%.

Todos los yogures definidos anteriormente que tengan en su parte láctea un contenido máximo de materia grasa láctea del 0.5%, deberán llevar de más la mención “Desnatado”.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## **4.0 DISEÑO METODOLOGICO**

### **4.1 Tipo de Estudio**

El tipo de estudio que se realizó es de carácter bibliográfico documental, enfocado a la recopilación de métodos de análisis de los alimentos seleccionados, basándose en las exigencias de las Normativas Salvadoreñas.

### **4.2 Investigación bibliográfica.**

Se realizó una búsqueda tomando en cuenta aportes de libros de texto oficiales y no oficiales, sitios de Internet de carácter científico como KNOVEL, visitas a las siguientes bibliotecas de la Universidad de El Salvador: Biblioteca Central, biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia “Dr. Benjamín Orozco”, biblioteca de la Facultad de Ciencias Agronómicas, biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, y bibliotecas de las siguientes universidades privadas: Universidad Alberto Masferrer (USAM), Universidad Nueva San Salvador (UNSSA), biblioteca “P. Florentino Idoate S.J.” de la Universidad Centroamericana “José Simeón Cañas” (UCA).

### **4.3 Investigación de Campo.**

Primeramente se buscaron las Normas Salvadoreñas para el análisis de los productos Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos; Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt, encontrándose vigentes y disponibles al público solamente las Normativas Salvadoreñas Obligatorias. Se procedió a buscar en la bibliografía

dada por cada una de ellas el método de análisis correspondiente para el tratamiento de los parámetros establecidos para cada componente. El libro de mayor referencia es la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) en su edición número dieciséis, del cual se hizo la respectiva traducción al idioma español para mejorar la comprensión de la información por todos los usuarios interesados en este trabajo y facilitar la implementación en los laboratorios destinados al estudio y análisis de alimentos.

Posteriormente se recopiló la información en una guía de métodos de análisis fisicoquímicos y sensoriales que incluye los parámetros de calidad recomendados por las Normativas Salvadoreñas Obligatorias y se ordenaron de acuerdo a lo mencionado en cada norma. La guía incluye una portada, introducción, objetivo de la guía, abreviaturas utilizadas, alcance por producto, los métodos de análisis organolépticos y fisicoquímicos para cada uno de los productos en estudio, fundamento de los métodos, especificaciones de los límites para cada componente evaluado y su referencia bibliográfica, así como el material, equipos, reactivos y cristalería necesaria para el análisis de estos.

Dicho trabajo se realizó entre los meses de Septiembre de 2012 a Octubre de 2013.

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

GUIA DE METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y  
SENSORIALES PARA ALIMENTOS PROCESADOS SEGÚN  
NORMATIVAS SALVADOREÑAS

AÑO 2013

**Autora**

Laura Estefanía Fuentes Zaldaña

**Docentes Directores**

Oscar Raúl Avilés Flores

Juan Agustín Cuadra Soto

**Comisión Revisadora**

Ena Edith Herrera Salazar

María Elisa Vivar de Figueroa

María Concepción Odette Rauda Acevedo

## INDICE

	Página
Introducción	viii
Objetivo	9
Normas para la Consulta	10
Abreviaturas	11
Métodos de Análisis para Sal Fortificada con Yodo	13
Métodos de Análisis para Café Soluble Instantáneo	66
Métodos de Análisis para Carnes y Productos Cárnicos	
Embutidos Crudos y Cocidos	84
Métodos de Análisis para Productos Lácteos: Mantequilla	136
Método de Análisis para Helados y Mezclas de Helados	161
Método de Análisis para Jalea Real	194
Método de Análisis para Productos Lácteos: Yogurt	219
Referencias	
Anexo: Estandarización de reactivos	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°</b>		<b>Página</b>
I.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de sal fortificada con yodo	14
II.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para Sal fortificada con yodo	15
III.	Volúmenes de soluciones madres de cobre II	29
IV.	Volúmenes y concentraciones de estándar de ditizona	40
V.	Grados de flujo y presiones para determinaciones de arsénico y selenio	59
VI.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.20.01:05 para sal fortificada con yodo	65
VII.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de café soluble instantáneo	68
VIII.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para café soluble instantáneo	68
IX.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.31.03:04 para café soluble instantáneo	83
X.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de carne y productos cárnicos, embutidos crudos y cocidos	86
XI.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para carne y productos cárnicos, embutidos crudos y cocidos	87
XII.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.02.13.98 para carne y productos cárnicos, embutidos crudos y cocidos	134

XIII.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de mantequilla	137
XIV.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para Mantequilla	138
XV.	Eficacia del método para la determinación del índice de yodo por el método de Wijs usando como solvente tetracloruro de carbono o ciclohexano-ácido acético (1+1)	144
XVI.	Pesos de muestra para índice de yodo	148
XVII.	Valores de repetibilidad y reproducibilidad para la determinación del ácido butírico en grasas	159
XVIII.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.01.12:07 para mantequilla	160
XIX.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de helados	163
XX.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para helados	163
XXI.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.01.11:04 para helados	193
XXII.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de jalea real	195
XXIII.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para jalea real	196
XXIV.	Relación entre el índice de refracción y contenido de agua en miel	198
XXV.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.38.03:05	218
XXVI.	Resumen de métodos analíticos para cada prueba de yogurt	221

XXVII.	Resumen de métodos de análisis según AOAC para Yogurt	221
XXVIII.	Tabla de corrección para gravedad específica de la Leche (lactómetro Quevenne)	230
XXIX.	Tabla para la determinación de sólidos totales en leche desde cualquier gravedad específica tomada y porcentaje de grasa (Shaw y Eckles), resultados expresado como porcentaje total de sólidos	231
XXX.	Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.01.10:08	234
XXXI.	Volúmenes de solución de NaOH (1+1) requeridos para preparar soluciones de diferente normalidad	241
XXXII.	Volúmenes de solución de HCl concentrado requeridos para preparar soluciones de diferente normalidad	243

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>		<b>Página</b>
I.	Vaso de digestión	53
II.	Generador de hidruros	53
III.	Generador hibrido y conexión montada a la línea auxiliar del espectrofotómetro	59
IV.	Aparato para análisis de absorción atómica sin llama	63
V.	Ensamblaje de bombeo y destilación	128
VI.	Cromatografía liquida de una solución estándar de mezclas de N-nitrosaminas	130
VII.	Aparato para la determinación de los valores de Polenske – Reichert Meissl	152
VIII.	Aparato overflow can	165
IX.	Desecador plástico modificado	167

## **INTRODUCCION**

La presente Guía de Metodologías de Análisis Físicoquímicos y Sensoriales para Alimentos procesados según Normativas Salvadoreñas ha sido elaborada utilizando las Normas Salvadoreñas Obligatorias debido a que los productos en estudio, no se encuentran en el Reglamento Técnico Centroamericano. La guía tiene como propósito ser un instrumento claro y específico para que las personas interesadas accedan a las metodologías de los análisis recomendados por las Normas Salvadoreñas Obligatorias vigentes para Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carne y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Mantequilla, Helados, Jalea Real y Yogurt.

La guía contempla el tratamiento para cada producto, su metodología de análisis, fundamento, especificaciones dadas por las Normativas Salvadoreñas, reactivos, aparatos y cristalería, así como las recomendaciones de equipos específicos para los análisis involucrados.

## **OBJETIVO**

Proporcionar una recopilación de las metodologías de análisis fisicoquímicos y sensoriales y el tratamiento de cada producto, incluye las especificaciones dadas por las Normas Salvadoreñas Obligatorias, reactivos, cristalería, material y equipo para los alimentos Café Soluble Instantáneo, Sal Fortificada con Yodo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt.

## **NORMAS PARA LA CONSULTA**

- NSO 67.20.01:05 “Sal Fortificada con Yodo”
- NSO 67.31.03:04 “Café Soluble Instantáneo”
- NSO 67.02.13:98 “Carne y Productos Cárnicos. Embutidos Crudos y Cocidos”
- NSO 67.01.12:07 “Productos Lácteos: Mantequilla”
- NSO 67.01.11:04 “Helados y Mezclas de Helados”
- NSO 67.38.03:05 “Jalea Real”
- NSO 67.01.10:08 “Productos Lácteos: Yogurt”

## ABREVIATURAS

AOAC:	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
AAS:	Espectrofotometría de absorción atómica
ASV:	Voltamperometría de disolución anódica
USP:	Farmacopea de los Estados Unidos de América
A:	Absorbancia
a:	Absortividad
cms:	Centímetros
g:	Gramos
Grado ACS:	Reactivo grado analítico
h:	Horas
kPa:	Kilo Pascal
L:	Litros
LC:	Cromatografía Líquida
M:	Molar
meq:	Miliequivalente
mg:	Miligramos
mL:	Mililitros
mm:	Milímetros

mmHg:	Milímetro de Mercurio
min:	Minutos
mV:	Milivoltios
mΩ:	Miliohmio
N:	Normalidad
p/p:	Peso sobre peso
seg:	Segundos
T:	Tramitancia
V:	Voltios
μA:	Micro Amperios
μg:	Microgramos

**METODOS DE ANALISIS PARA  
SAL FORTIFICADA CON YODO**

## SAL FORTIFICADA CON YODO

**Norma Consultada:** NSO 67.20.01:05 Sal Fortificada con Yodo.

### **Alcance:**

Aplica a toda las Sal producida y comercializada en el país para consumo humano y animal, así como a la sal importada o donada. Dentro de las sales se encuentran: Sal gruesa o sal gorda, Sal molida, Sal refinada y Sal de mesa.

### **Pruebas Organolépticas:**

- **Aspectos:** Cristales de granulación uniforme, de acuerdo con el tipo de sal (ver tabla N° VI)
- **Color:** Blanco.
- **Olor:** Sin olor.
- **Sabor:** Salino

### **Pruebas Fisicoquímicas:**

**Tabla N° I:** Resumen de métodos analíticos para cada prueba recomendada de Sal fortificada con Yodo

<b>Prueba</b>	<b>Método Analítico</b>
Humedad	Perdida por Secado
Materias Insolubles en Agua	Solubilización
Cloruro de Sodio	Volumétrico
Cobre	Fotométrico
Yodo	Volumétrico
Cenizas	Pérdida por Secado
Arsénico Total	Colorimétrico

**Tabla N° I: Continuación**

<b>Prueba</b>	<b>Método Analítico</b>
Plomo	Método General de Ditizona
Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc	ASV (Cd y Pb) y AAS (As, Se y Zn)
Mercurio	Método Espectrofotométrico de Absorción Atómica (sin llama)

**Tabla N° II: Resumen de métodos de análisis según AOAC para Sal fortificada con Yodo**

<b>Prueba</b>	<b>Método AOAC</b>	
Humedad, Sustancias Insolubles	925.55	11.2.01
Yodo en sal yodada	925.56	11.2.02
Cenizas	923.03	32.1.05
Arsénico Total	957.22	5.1.13
Plomo	934.07	9.2.20
Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc	986.15	9.1.01
Mercurio	971.21	9.2.22

**Prueba 1: Humedad <sup>(i)</sup>****A. Fundamento**

Una cantidad de muestra exactamente pesada se somete a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra.

#### B. Material y Equipo

- Tamiz N° 20 y N° 80
- Balanza analítica
- Estufa

#### C. Cristalería

- Cápsula de porcelana
- Termómetro
- Mortero y pistilo

#### D. Procedimiento

Triturar la muestra en un mortero con pistilo para que pase a través de un tamiz N° 20, evitar la trituración excesiva de modo que sea retenido en el tamiz N°80. Mezclar la muestra en cuatro partes y pesar todas las porciones necesarias en una balanza analítica. Tarar una cápsula de porcelana, pesar 10.0g de muestra y distribuir uniformemente. Calentar en estufa por períodos de 1h cada uno a aproximadamente 105°-110°C. Hacer 2 pesadas consecutivas en balanza analítica. Ocasionalmente agitar la cápsula para que la muestra se seque uniformemente. Reportar la pérdida de peso como humedad.

#### E. Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = ([\text{g de muestra húmeda} - \text{g de muestra seca}] / \text{g muestra}) \times 100$$

### **Prueba 2: Sustancias Insolubles en Agua <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

La muestra se solubiliza en agua y se filtra a través de un filtro de poro fino que retiene las sustancias insolubles, y se evapora el agua retenida. La diferencia

de los pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de sustancias insolubles en agua.

B. Material y Equipo

- Estufa
- Bomba de vacío
- Balanza analítica

C. Reactivos

- Solución saturada de nitrato de plata

D. Cristalería

- Beaker 250 mL
- Agitador de vidrio
- Filtro Gooch
- Probeta 25 mL, 50 mL y 250 mL

E. Procedimiento

Pesar en una balanza analítica 10.0 g de muestra en un beaker de 250 mL, medir en una probeta 200 mL de agua destilada a temperatura ambiente y adicionar el agua destilada al beaker con la muestra, dejar reposar por 30 min, agitar con frecuencia. Filtrar a través de filtro Gooch previamente pesado. Transferir el residuo del filtro Gooch con ayuda de un agitador de vidrio, utilizando un total de  $\leq 50$  mL de agua destilada. Lavar el residuo con aproximadamente 10 porciones de 10 mL de agua destilada, hasta que 10 mL del filtrado muestren una turbidez leve tras la adición de algunas gotas de una solución saturada de nitrato de plata. Secar el contenido en un crisol hasta peso constante (110°C). Reportar el aumento de peso del filtro Gooch como “materias insolubles en agua” y reportar los resultados en porcentaje.

#### F. Cálculos

$$\% \text{ Sustancias insolubles en agua} = ([A + C] - [B + C] / A + C) \times 100$$

Dónde: A = peso de la muestra, B = peso de residuo y C = peso del filtro Gooch

### **Prueba 3: Cloruro de Sodio** (v)

#### A. Fundamento

Se basa en la titulación de una muestra de sal, en donde se valoran los cloruros con una solución valorada de nitrato de plata, empleando cromato de potasio como indicador.

#### B. Material y Equipo

- Balanza analítica
- Hot plate

#### C. Reactivos

- Solución valorada de nitrato de plata 0.1N ( $\text{AgNO}_3$ )
- Solución de cromato de potasio al 5% ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ )

*Nota:* Ver estandarización de reactivos en anexo 1

#### D. Cristalería

- Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta graduada 25.0 mL
- Pipeta volumétrica 1.0 mL
- Probeta 100 mL
- Termómetro

#### E. Procedimiento

Pesar en balanza analítica 0.15-0.17 g de muestra y colocar en un erlenmeyer de 250 mL, añadir con probeta 75 mL de agua destilada hirviendo, dejar reposar de 10 a 15 min, agitando de vez en cuando hasta alcanzar una temperatura de 50-55°C (temperatura de valoración). Añadir con pipeta volumétrica 1.0 mL de solución indicadora de cromato de potasio al 5%, agitar. Adicionar con bureta nitrato de plata 0.1N gota a gota sin dejar de agitar hasta la aparición de un color pardo naranja permanente. Llevar un blanco.

#### D. Cálculos

$$\% \text{ de Cloruro de sodio} = ([V_a - V_b] \times N \times 0.0585 / m) \times 100$$

Dónde: N = Normalidad de la solución de nitrato de plata 0.1N,  $V_a$ = mL gastados de nitrato de plata en la titulación,  $V_b$ = mL gastados de nitrato de plata en el blanco, m = Masa en gramos de la muestra y 0.0585 = miliequivalente del cloruro de sodio.

#### **Prueba 4: Yodo** <sup>(i)</sup>

##### A. Fundamento

El yodato (como yodato de potasio) agregado a la sal para consumo humano se cuantifica por titulación redox con tiosulfato de sodio. El yodato es un oxidante fuerte y reacciona cuantitativamente con el tiosulfato. La reacción se desarrolla en medio ligeramente ácido y en presencia de un exceso de iones de yodo.

##### B. Material y Equipo

- Hot plate
- Balanza analítica
- Frasco lavador

### C. Reactivos

- Agua de bromo: Para el método alternativo, determinar la concentración aproximada (mg de Br/mL) mediante la adición de volúmenes medidos con bureta a un erlenmeyer que contiene 50 mL de agua destilada, 5 mL de solución de yoduro de potasio al 10% y 5 mL de ácido sulfúrico (1+9), y valorando el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0.1N.
- Tiosulfato de Sodio 0.1N: pesar 15.81 g de tiosulfato de sodio y diluir a 1L.
- Tiosulfato de sodio 0.005N: Preparar diariamente mediante la dilución a partir de una solución al 0.1N.
- Solución de almidón al 1%: Mezclar 1g de almidón soluble con agua destilada lo suficientemente fría para hacer una pasta fina, añadir 100mL de agua destilada en ebullición y hervir aproximadamente 1min con agitación. Preparar antes de su uso.
- Solución control de yoduro de potasio: 0.3270 g de yoduro de potasio en 250 mL de agua destilada. Diluir 50 mL a 250 mL con agua destilada y usar 5 mL para el control (5 mL = 1.0 mg de yodo y 1.308 mg de KI).
- Ácido sulfúrico (1+9): medir 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y 9 mL de agua destilada.
- Ácido sulfúrico 2N: medir aproximadamente 54.34 mL de ácido sulfúrico concentrado y diluir a 1L.
- Fenol al 5%: pesar 5.0 mg de fenol y diluir a 100 mL.
- Yoduro de potasio al 5%: pesar 5.0 mg de yoduro de potasio y diluir a 100 mL
- Cloruro de sodio al 20%: pesar 20.0 mg de cloruro de sodio y diluir a 100mL.
- Ácido salicílico en cristales
- Ácido fosfórico al 85%

*Nota:* Ver estandarización de reactivos en anexo N°1

#### D. Cristalería

- Bureta 50.0 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Pipetas volumétricas de 1.0 mL, 5.0 mL, 25.0 mL y 50.0 mL
- Beaker 100 mL
- Agitador de vidrio
- Balón volumétrico 50.0 mL y 250.0 mL
- Beaker 600 mL
- Termómetro

#### E. Preparación de la Muestra

Pesar en balanza analítica 50.0 g de muestra y disolver en agua destilada, diluir a volumen en un balón volumétrico de 250 mL.

#### F. Determinación

Medir con pipeta volumétrica una alícuota de 25.0 mL de la muestra en un erlenmeyer de 500 mL y diluir hasta aproximadamente 300 mL. Neutralizar a naranja de metilo agregando ácido fosfórico al 85% y añadir 1.0 mL en exceso. Agregar un exceso de agua de bromo y calentar a ebullición en hot plate la solución suavemente hasta que se vuelva incolora, ebullición por 5 min más. Agregar unos pocos cristales de ácido salicílico y enfriar la solución a aproximadamente 20°C. Agregar con pipeta volumétrica 1.0 mL de ácido fosfórico 85% y 0.5 g yoduro de potasio y titular el yodo con tiosulfato de sodio 0.005N. Equivalencia para el cálculo: 1 mL  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.005N = 0.1058 mg de yodo

- Método alternativo. No aplicable en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ :

Medir con pipeta volumétrica 50.0 mL de la solución muestra y transferir a un erlenmeyer de 250 mL. Neutralizar a naranja de metilo con ácido sulfúrico

2N. Añadir agua de bromo gota a gota por medio de una bureta en cantidad equivalente a 20 mg de bromo. Después de unos minutos destruir la mayor parte de bromo libre remanente mediante la adición de una solución de tiosulfato de sodio al 1% gota a gota mientras se agita. Lavar el cuello y los lados del erlenmeyer con agua destilada y completar la eliminación de bromo mediante la adición de 1 o 2 gotas de solución de fenol al 5%. Añadir 1.0 mL de ácido sulfúrico 2N y 5.0 mL de solución de yoduro de potasio 10% y valorar el yodo liberado con una solución de tiosulfato de sodio 0.005N, agregar 1.0 mL de indicador de almidón casi al final de la titulación. Realizar determinaciones de control, utilizando 50.0 mL de solución de cloruro de sodio al 20%, a la que debe de agregar cantidades apropiadas de solución de yoduro de potasio. Equivalencias para el cálculo: 1 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.005N = 0.1058 mg de yodo y 1 mL de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0.005N = 0.1384 mg de KI.

### **Prueba 5: Cenizas** <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

La muestra se incinera hasta obtener cenizas. La diferencia de los pesos antes y después de la incineración permite la estimación del contenido de cenizas.

#### B. Material y Equipo

- Balanza analítica
- Mufla
- Desecador
- Crisol de porcelana

#### C. Procedimiento

Pesar en balanza analítica 3.5 g de muestra en un crisol de porcelana, previamente tarado, enfriado en desecador y pesado al alcanzar la temperatura

ambiente. Incinerar en mufla a 550°C aproximadamente (a color rojo oscuro) hasta obtener una ceniza de color gris claro o hasta peso constante. Enfriar en desecador y pesar poco después de llegar a temperatura ambiente.

#### D. Cálculos

$$\% \text{ Ceniza} = (\text{g ceniza} / \text{g de muestra}) \times 100$$

### Prueba 6: Arsénico Total <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

El arsénico se reduce a arsina en solución ácida, la arsina es pasada a través de un depurador y después a un tubo absorbente para la formación de un complejo rojo soluble cuyo color es proporcional al contenido de arsénico en la muestra.

#### B. Materiales y Equipos

(No limpiar el aparato y el material de vidrio con detergentes, ya que esto interfiere con el desarrollo del color)

- Aparato de generación de arsina: Doblado con un tubo de vidrio de 6mm de diámetro en un ángulo de 120° a 10 cm desde un extremo y en ángulo de 60° a 15 cm desde el otro extremo. Conecte el extremo más corto de fibra de vidrio impregnada con una solución saturada de acetato de plomo e insertar en el tapón de goma, colocado en la parte superior de un erlenmeyer 125 mL de modo que el final de las proyecciones del tubo justo debajo sean tapados. Conecte el otro extremo con fibra de vidrio impregnado y conectar a través de un tubo de goma al tubo de vidrio ajustado en el extremo inferior del que llega la parte inferior al frasco volumétrico 50.0 mL, o si prefiere, a un tubo de centrífuga de 50mL, marcado exactamente en 50 mL y aproximadamente a 20 mL.

- Balanza analítica
- Papel whatman N° 30
- Estufa
- Mufla
- Baño maría
- Espectrofotómetro ultravioleta visible

### C. Reactivos

- Trióxido de arsénico: NIST  $\text{As}_2\text{O}_3$  SRM 83, o su equivalente.
- Suspensión de Óxido de magnesio (MgO) y nitrato de magnesio ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ): Suspender 75.0 g de MgO y 105.0 g de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en suficiente agua destilada para hacer 1L. Agitar vigorosamente antes de agregar a la muestra.
- Solución de cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ): Disolver 40.0 g de  $\text{SnCl}_2$  hidratado libre de arsénico en ácido clorhídrico y diluir a 100 mL con ácido clorhídrico.
- Solución de absorción: Transferir con una probeta 25.0 mL de solución de cloruro de mercurio al 1.5% y con bureta 3.75 mL de ácido sulfúrico 6N y 3.75 mL de permanganato de potasio 0.03N dentro de un balón volumétrico 250 mL. Diluir con agua destilada y mezclar. Utilizar la solución recientemente preparada.
- Reactivo molibdato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ): Disolver 1.0 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  en 100 mL de ácido sulfúrico 5.4N.
- Reactivo de sulfato de hidracina ( $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 0.15%. Disolver 0.15 g de  $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  en 100 mL de agua destilada.
- Ácido clorhídrico (1+1): a 1 mL de ácido clorhídrico agregar 1 mL de agua destilada.
- Hidróxido de sodio al 10%: pesar 10 g de hidróxido de sodio, disolver con agua destilada y diluir a 100 mL.

#### D. Cristalería

- Cápsula de porcelana
- Probeta 25 mL
- Beaker 250 mL
- Bureta 10.0 mL y 25.0 mL
- Erlenmeyers 125 mL
- Balón volumétrico 50.0 mL, 250.0 mL y 1.0L
- Pipetas volumétricas 1.0 mL y 10.0 mL
- Vidrio reloj
- Varilla de vidrio

#### E. Preparación de la solución muestra

Pesar en balanza analítica la muestra utilizando una cápsula de porcelana como porta muestra. Añadir aproximadamente 10.0 mL de suspensión reactivo mezclada y suficientemente agua destilada y mezclar bien con un agitador de vidrio. Enjuagar el agitador y secar la muestra a 100°C. Las cenizas se forman en 2-4 h aproximadamente a 550-600°C. (Los residuos leves de carbono no interfieren. Tener cuidado para evitar la pérdida de ceniza). Enfriar y humedecer el residuo con agua destilada. Cubrir con un vidrio reloj y añadir 15mL de ácido clorhídrico (1+1). Dejar reposar durante la noche, o calentar en un baño de agua con agitación hasta que se disuelva la ceniza. Filtrar a través de papel Whatman N°30 en un erlenmeyer de 125 mL. Enjuagar el filtro con bastante agua destilada caliente y con varias porciones hasta obtener aproximadamente 60 mL de filtrado.

#### F. Preparación de la curva estándar

Disolver 0.66 g de trióxido de arsénico en 25.0 mL de solución de hidróxido de sodio al 10%, diluir a 1L con agua destilada, mezclar. Tomar una alícuota de 10 mL y diluir a 1L con agua destilada (1 mL=5 µg Arsénico). Transferir alícuotas

de 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, y 14.0 mL desde una bureta en erlenmeyers de 125 mL. Diluir cada uno a 60mL con agua destilada y proceder como en **G**. Trazar A contra  $\mu\text{g}$  de Arsénico.

#### G. Generación de arsina.

Añadir 10.0 mL de ácido clorhídrico, 2.0 mL de solución de yoduro de potasio 15% y 0.5 mL de solución de cloruro de estaño. Agitar, calentar en un baño de agua por 5 min y enfriar. Teniendo todas las piezas del aparato de generación de arsina listas para un montaje inmediato, con aproximadamente 20 mL de la solución de absorción en un frasco volumétrico de 50.0 mL o tubo de centrifuga marcado en 50.0 mL. Añadir 5-6 g de zinc, pasando por un papel Whatman N°30 la solución digerida, insertar rápidamente un tapón que contiene un tubo de vidrio en el erlenmeyer y colocar el tubo de entrega contra la parte inferior del frasco aforado o tubo de centrifuga de manera que las burbujas sean pequeñas. Utilice unas gotas de agua destilada para comprobar si hay fugas entre el tapón de goma y el erlenmeyer. La conexión del tubo de vidrio debe ser lo suficientemente grande como para que las burbujas no trasladen compuestos de plomo del tapón de fibra de vidrio impregnado dentro del frasco de absorción.

#### H. Desarrollo de color

Después de 30 min, desconectar la tubería, dejando el tubo de suministro en el recipiente de recepción de modo que cualquier arsenuro de mercurio en el tubo este expuesto a los reactivos de desarrollo del color. Añadir 1.0 mL de reactivo de molibdato de amonio y mezclar haciendo pasar aire a través del tubo de entrega. Añadir 1.0 mL de reactivo de sulfato de hidracina y mezclar de nuevo. Calentar en un baño de agua en ebullición por 20 min. Enjuagar el tubo de entrega con agua destilada y retirar. Enfriar a temperatura ambiente, diluir a 50.0 mL y mezclar. Filtrar a través de un filtro de fibra de vidrio hermético y

centrifugar. (No utilice papel filtro, porque el color puede ser adsorbido). Leer  $A$  contra agua destilada a  $\geq 750$  nm. El valor de  $A$  es máximo a una longitud de onda de 840 nm. Determinar el contenido de arsénico desde la curva estándar.

As  $\times$  2.90 = ácido arsanílico; As  $\times$  2.24 = bencenoarsenoso; As  $\times$  3.51 = ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsonico; As  $\times$  3.3 = ácido 4-nitrofenilarsonico; As  $\times$  3.47 = ácido p-ureidobencenoarsónico.

### **Prueba 7: Cobre** <sup>(iv)</sup>

#### A. Fundamento

La muestra se diluye en ácido clorhídrico. Se extrae el complejo de color formado por la reacción del cobre con dibencilditiocarbamato de zinc en tetracloruro de carbono. Se realizan mediciones fotométricas de la materia orgánica extraída a una longitud de onda de aproximadamente 435nm. La determinación es selectiva en un medio ácido, el cual suprime las interferencias, especialmente de hierro, manganeso, níquel y cobalto. El método es aplicable a productos con un contenido de cobre igual o mayor de 0.01mg/kg de sal.

#### B. Material y Equipo

- Espectrofotómetro ó
- Fotocolorímetro equipado con un filtro para asegurar la transmisión máxima entre 430 y 440 nm.
- Hot plate
- Balanza analítica

### C. Reactivos

- Tetracloruro de carbono bidestilado
- Ácido clorhídrico GR
- Dibencilditiocarbamato de zinc: 0.5 g/L de solución en tetracloruro de carbono.
- Solución madre de cobre I,  $\beta_{(Cu)} = 1000$  mg/L, solución estándar o preparar de la siguiente manera: Disolver 1.0 g de cobre (metal 99.9%) en una mezcla de 20.0 mL de ácido nítrico [ $\rho \approx 1.40$  g/mL, 65%(m/m) solución] y 60.0 mL de agua destilada. Diluir a 1L con agua destilada.
- Solución madre de cobre II,  $\beta_{(Cu)} = 1$  mg/L. Transferir 1.0 mL de la solución madre de cobre I, en un balón volumétrico de 1L, aforar y mezclar. Preparar esta solución inmediatamente antes de su uso.

### D. Cristalería

- Balones volumétricos de 500.0 mL y 1.0L
- Pipeta volumétrica 1.0 mL
- Beaker de 600 mL
- Probetas 50 mL y 500 mL
- Embudos de separación de 500 mL

### E. Procedimiento

Pesar 100.0 g de muestra en balanza analítica, diluir con 350 mL de agua destilada y 50 mL de ácido clorhídrico en un beaker de 600 mL. Calentar a ebullición en hot plate hasta disolución completa. Enfriar, transferir cuantitativamente a un balón volumétrico de 500.0 mL, aforar y mezclar. *Nota:* Si la solución es turbia, debe ser filtrada antes de transferir al balón volumétrico de 500.0 mL). Solución blanco: Solución que contiene 100.0 mL de ácido clorhídrico por litro de solución.

#### F. Calibración

Soluciones de calibración: Estas soluciones se utilizan para la medición fotométrica en celdas de 4 o 5 cm de espesor óptico. Transferir 25.0 mL de ácido clorhídrico y los volúmenes de la solución madre II de cobre, como se indica en la **tabla N° III** en una serie de cinco embudos de separación de 500.0mL y diluir a 250.0 mL con agua destilada medida en probeta y mezclar.

**Tabla N° III:** Volúmenes de soluciones madre de cobre II

Solución de Calibración N°	Solución madre de cobre II (mL)	Correspondiente masa de cobre, µg
1*	0	0
2	2.5	2.5
3	5.0	5.0
4	7.5	7.5
5	10.0	10.0
*cero de la solución de calibración		

*Nota:* Si se requiere la calibración se puede extender. La curva es lineal hasta al menos 50mg de cobre.

#### G. Formación de complejos y extracción

Proceder para cada uno de los cinco embudos de separación: Añadir 25.0mL de la solución de zinc dibencilditiocarbamato y agitar bien durante un minuto, después de la separación de las capas, filtrar por gravedad la capa orgánica inferior a través de un papel hidrofóbico en un beaker de 600mL.

#### H. Mediciones fotométricas

Ajustar el aparato a cero de absorbancia con tetracloruro de carbono. Para evitar cualquier evaporación del solvente orgánico, llevar a cabo las mediciones fotométricas inmediatamente en el espectrofotómetro, establecido el máximo

de absorción (longitud de onda alrededor de 435nm) o en el fotocolorímetro equipado con el filtro adecuado.

#### I. Curva de calibración

Restar la absorbancia del cero de la solución de calibración de cada una de las otras soluciones de calibración y trazar un gráfico que muestra las cantidades de cobre en microgramos, contenidos en las soluciones de calibración en las abscisas y las correspondientes absorbancias corregidas en el eje de las ordenadas.

#### J. Determinación

Formación de complejos y extracción: Transferir 250.0mL de la solución prueba o de solución blanco en un embudo separador de 500mL y continuar como se describe en **G**.

Mediciones fotométricas: Efectuar las mediciones fotométricas de las dos soluciones obtenidas anteriormente, de acuerdo con las instrucciones establecidas en el punto **H**.

#### K. Cálculos

$$\omega_{(Cu)} = (m_1 - m_0 / m) \times (V_1 / V_2)$$

Dónde:  $\omega_{(Cu)}$  = es el contenido de cobre, en miligramos por kilogramo de sal,  $m$  = es la masa, en gramos, de la muestra,  $m_1$  = es la masa de cobre, en microgramos, analizada en la solución final para la prueba solución prueba,  $m_0$  = es la masa de cobre, en microgramos, analizado en la solución final para la solución blanco,  $V_1$  = es el volumen en mililitros de la solución de ensayo,  $V_2$  = es el volumen en mililitros de la solución de prueba.

## **Prueba 8: Plomo** <sup>(i)</sup>

(Estaño y Bismuto ausente)

### A. Fundamento

El método se basa en la extracción del plomo con cloroformo y formación del compuesto colorido de ditizonato de plomo. (Aplicable a materiales tales como carbohidratos, cereales y productos de cereales, el cacao y los productos lácteos, alimentos, carnes, pescado, material de plantas, frutas y productos de frutas, verduras frescas, etc. y en general a todos los materiales orgánicos (excepto grasas) en la que no se encuentran estaño y bismuto. Para los productos que contienen estaño [alimentos enlatados] o bismuto, proceder como en **I-K**).

### B. Material y Equipos

- Embudo Büchner
- Estufa
- Balanza analítica
- Baño maría
- Hot plate
- Papel filtro
- Papel tornasol
- Papel pH rango de 1 a 14
- Bomba de vacío
- Equipo fotométrico
- Cámara de gases
- Digestor Kjeldahl

### C. Reactivos

- Soluciones Estándar de Plomo (Pb): (1) Solución Madre: 2.0 mg de Pb (3.197 mg de nitrato de plomo/mL en ácido nítrico al 1%. Preparar a

partir de nitrato de plomo purificado [El nitrato de plomo puede ser purificado de la siguiente manera: Disolver 20-50 g en una porción de agua destilada caliente y enfriar con agitación. Filtrar los cristales con succión en un pequeño embudo Büchner, disolver y cristalizar. Secar los cristales a 100-110°C hasta peso constante. Enfriar en desecador y guardar en un frasco bien tapado. (2) Solución de trabajo: Preparar cuando sea necesario diluyendo la solución madre con ácido nítrico 1%.

- Ácido nitrato al 1%: Diluir 10.0 mL de ácido nítrico (Sp gr 1.40) a 1L con agua bidestilada.
- Solución "Ash-aid": Disolver 40.0 g de nitrato de aluminio y 20.0 g de nitrato de calcio en 100 mL de agua destilada.
- Solución de ácido cítrico: solución concentrada libre de plomo, 1 mL = 0.5 g de ácido cítrico.
- Ditizona: Disolver 1.0 g de reactivo en 50-75 mL de cloroformo y filtrar si hay material que permanece sin disolver. Extraer en un embudo separador con cuatro porciones de 100 mL de hidróxido de amonio (1+99) libre de metal (bidestilado) (la ditizona pasa dentro de la fase acuosa para dar un color naranja a la solución). Filtrar el agua existente en un embudo separador a través de una compresa de algodón insertada en el tallo del embudo. Acidificar ligeramente con ácido clorhídrico diluido y extraer el precipitado de ditizona con dos o tres alícuotas de 20 mL de cloroformo. Combine los extractos en el embudo separador y lavar 2 o 3 veces con agua destilada. Transferir el cloroformo a un beaker y evaporar, calentar suavemente en baño de vapor, evitando salpicaduras cuando la solución vaya secando. Elimine las últimas trazas de humedad por calentamiento de 1 h a  $\leq 50^{\circ}\text{C}$  en vacío. Guarde el reactivo seco en la oscuridad en un frasco bien tapado. Preparar las soluciones reactivos para la extracción que contengan 100, 50, y 10 mg/L en cloroformo bidestilado y almacenar en

un lugar oscuro a 5-10°C. (La solución madre de ditizona en cloroformo contiene 1 mg/mL es estable y puede usarse para realizar diluciones).

- Mezcla de amonio-cianuro: a 100 mL de fosfato libre de cianuro de potasio recristalizado al 10%, colocar en un balón volumétrico de 500mL, añadir una cantidad suficiente de hidróxido de amonio bidestilado, adicionar 19.1 g de amoniaco y diluir a volumen con agua bidestilada.
- Estaño metálico puro: Se granula el estaño tan finamente como sea posible por fusión y vertiendo muy lentamente en agua destilada. Determinar el contenido de plomo de la siguiente manera: Disolver 1-2.0g de muestra en ácido bromhídrico o ácido clorhídrico y volatilizar el estaño por evaporación del solvente a sequedad y tratar con varias porciones de 5 mL de mezcla de bromo-ácido bromhídrico, evaporar hasta sequedad en baño de vapor después de cada tratamiento. Recolectar con 2-3 mL de ácido nítrico, evaporar a sequedad para eliminar el bromo, recoger con aproximadamente 50mL de agua destilada caliente. Filtrar y proceder como en **H o I**.
- Mezcla de ácido bromhídrico-bromo: A 250 mL de ácido bromhídrico bidestilado al 40% añadir 35 mL de bromo líquido bidestilado.
- Solución de polisulfuro de sodio: Se disuelven 480.0 g de polisulfuro de sodio y 40.0 g de hidróxido de sodio en agua destilada, añadir 16.0 g de azufre en polvo, agite hasta que el azufre se disuelva, filtrar y diluir a 1L.
- Solución de ácido clorhídrico-cítrico: Agregar un volumen de reactivo solución de ácido cítrico equivalente a 50 g de ácido cítrico a 50 mL de ácido clorhídrico y diluir a 250 mL.
- Solución de oleato de sodio al 10%: A 45 mL de una solución de hidróxido de sodio al 30% y 400 mL de agua destilada en un beaker de 1.5L, añadir lentamente, mientras se calienta y agita, 90.0 g de ácido

oleico. Calentar mezclando sobre un baño de vapor hasta que se disuelve por completo. Enfriar, diluir a 1L, mezclar y filtrar.

- Solución de amoníaco-cianuro-citrato: Disolver 10.0 g de fosfatos libre de cianuro de potasio y 10.0 g de ácido cítrico en 250 mL de hidróxido de amonio y diluir a 1L.
- Lavado de papel de filtro: Remojar 9cm de papel durante la noche en ácido nítrico al 1%. Lavar con grandes volúmenes de agua destilada en embudo Büchner para eliminar el ácido y trazas de plomo.

#### D. Cristalería

- Probetas 10 mL y 25 mL
- Balón volumétrico de 50.0 mL, 100.0 mL, 250.0 mL, 500.0 mL y 1L
- Ampolla de separación 250 mL
- Embudo de vidrio
- Beaker 50 mL, 250 mL, 400 mL y 2000 mL
- Capsula de porcelana
- Vidrio reloj
- Erlenmeyer 500 mL
- Pipetas volumétricas de 5.0 mL, 10.0 mL y 50.0 mL
- Agitador de vidrio
- Tubos de ensayo
- Tubos Nessler
- Kitazato de 500 mL
- Matraz kjeldahl

#### E. Preparación de la Muestra (Incineración)

Pesar en balanza analítica 5-200.0 g de muestra en una cápsula de porcelana. Las muestras húmedas se secan en un baño de vapor o en

estufa. Añadir con pipeta 2.0-5.0 mL de solución "ash-aid" a la muestra, mezclar bien y secar en baño de vapor o en estufa.

Carbonizar la gelatina en alimentos ricos en carbohidratos como mermelada y otros productos que tienden a hincharse excesivamente al ser calentados con precaución sobre el hot plate. (La elevación del volumen puede controlarse jugando con un pequeño flujo de aire caliente sobre la superficie de la muestra en la cápsula). No dejar que el material se queme. Leche, dulces, etc., pueden ser carbonizados sin la ignición añadiendo pequeñas porciones de la muestra al momento que la cápsula este caliente sobre el hot plate. Cuando las muestras están secas o carbonizadas, colocar en estufa a temperatura controlada y elevar la temperatura lentamente a 500°C sin quemar.

Si la muestra contiene grasa, "los humos" se eliminan calentando lo suficiente a aproximadamente 350°C. Cubrir el horno con una pieza de asbesto o una placa de óxido de silicio de modo que la muestra reciba la mayor parte de calor por radiación desde los lados y el techo del horno y no por conducción desde el piso más caliente del horno.

Si el horno tiene control automático, carbonizar toda la noche a  $\leq 500^{\circ}\text{C}$ . Si la muestra no ha sido incinerada por completo a la mañana siguiente o si las cenizas a 500°C no están avanzando satisfactoriamente a la mañana siguiente, retire la cápsula, enfríe y humedezca las cenizas con 2.0-5.0 mL de "ash-aid". Secar el contenido de la cápsula completamente seco con precaución y vuelva a colocar en el horno. Si la calcinación no es completa, repetir rápidamente después de 30 min, retirar la cápsula, enfriar y con precaución añadir 2.0-3.0 mL de ácido nítrico. Secar, colocar en la estufa y continuar la incineración hasta prácticamente quede libre de carbono. Evite el uso excesivo de la solución de "ash-aid" y en particular de ácido nítrico. Si la muestra

contiene aún mucha mezcla de carbono, se debe a un sobrecalentamiento local o la deflagración que puede resultar, especialmente hay mucho potasio presente en la ceniza. Cuando se obtiene la ceniza limpia, enfriar y cubrir la cápsula con el vidrio de reloj y agregar cuidadosamente 15-20 mL de ácido clorhídrico. Enjuagar el vidrio reloj con agua destilada y calentar en baño de vapor. Si no se obtiene una solución clara, evaporar de nuevo hasta sequedad y repetir la adición de ácido clorhídrico. Si la materia insoluble persiste, evaporar el ácido clorhídrico y deshidratar el óxido de silicio calentando hasta que aparezcan humos con 5-10 mL de ácido perclórico 60% (bidestilado). Si utiliza ácido perclórico, puede ser necesaria una cantidad de agua destilada (200 mL) para poder disolver completamente el perclorato de potasio, como cuando se utiliza el Tiocianato de potasio en la extracción con ditizona de plomo. Diluir con agua destilada y filtrar la solución cuando sea necesario con succión a través de un embudo de vidrio. Recolectar el filtrado en un erlenmeyer 500 mL bajo una cámara de extracción de gases. Filtrar el material insoluble dentro del filtro sucesivamente con pocos mililitros de ácido clorhídrico caliente, solución de ácido cítrico-HCl caliente y solución de acetato de amonio 40% caliente.

En ciertos casos tomar las siguientes precauciones especiales:

- Si la cantidad de material insoluble (óxido de silicio) que queda en el filtro es excesivo, enjuagar dentro de una capsula de porcelana con agua destilada, evaporar y tratar los residuos con una o dos porciones de 5.0 mL de ácido fluorhídrico. Evaporar a sequedad, tomar el residuo con agua destilada y unas gotas de ácido clorhídrico o ácido perclórico y añadir a la masa de cenizas filtrado.
- Cuando la incineración es de larga duración, y no se ha usado el “ash-aid”, o la ceniza natural es reducida, con poco volumen de cenizas, se puede quemar el plomo en la capsula. Para eliminar el plomo, añada

algunas perlas (2-3 g) de hidróxido de sodio y se disuelven en pocos mL de agua destilada caliente. Incline la capsula para que la solución residual moje completamente la parte del interior originalmente ocupada por la muestra, luego calentar poco tiempo en baño de vapor, pero no llevar a sequedad (el sobrecalentamiento con hidróxido de sodio concentrado puede resultar en eliminar algunos  $\mu\text{g}$  de plomo de la cápsula. La porcelana conserva menos el plomo a medida que lo hace el óxido de silicio pero puede contener pequeñas cantidades de plomo). Lavar el residuo con agua destilada y agregarlo directamente al filtrado. Finalmente enjuague la capsula con pocos mL de ácido clorhídrico caliente seguido de agua destilada caliente.

#### F. Aislamiento de plomo: Fundamento

El método **H**, puede ser rápido y conveniente, si se limita a materiales que, con ayuda de ácido cítrico, producen una solución amoniacal clara requerida para cuantificar la extracción de plomo con ditizona. El plomo se obstruye fácilmente por muchos precipitados alcalinos (magnesios y fosfatos de calcio, aluminio e hidróxidos de hierro y silicatos). Muchos materiales alimenticios pueden ser manejados de esta manera porque las cantidades de origen natural de estas sustancias no son excesivas. Sin embargo, algunos materiales contienen más de estas sustancias que se pueden mantener en solución bajo condiciones alcalinas con cualquier cantidad razonable de ácido. En estos casos proceder como en **F**. La dificultad del precipitado amoniacal puede algunas veces superarse mediante la limitación del tamaño de la muestra en caso de que el muestreo no sea un problema.

#### G. Extracción de Ditizona

(Aplicable a la mayoría de carbohidratos y alimentos de cereales, frutas y productos de fruta, leche, verduras frescas, materiales vegetales, etc)

Transferir la solución de cenizas a una ampolla de separación de 300 mL y añadir reactivo de ácido cítrico, equivalente a 10.0 g de ácido cítrico. Hacer ligeramente alcalina la solución al papel tornasol con hidróxido de amonio manteniendo la solución reciente y dejar reposar 1-2 min. Si se forma precipitado disolver de nuevo con ácido clorhídrico y aislar el plomo como en **F**. Si no se forma precipitado añadir 5.0 mL de solución de tiocianato de potasio al 10% (puede ser necesario una mayor cantidad si están presentes grandes cantidades de zinc, cobre, cadmio, etc.) y comprobar el pH de la solución añadiendo unas gotas de solución azul de timol y observar el color en cada adición (pH debe ser  $\geq 8.5$ , azul-verde a azul con el azul de timol).

Si la ceniza es muy coloreada, mantener bajo el pH de la solución, debido a que un pH  $\geq 10$  en presencia de hierro puede causar oxidación de la ditizona. Inmediatamente extraer con porciones de 20 mL de reactivo ditizona, usando soluciones más diluidas a menos que estén presentes grandes cantidades de plomo. Agite 20-30 seg, dejar separar la capas y ver el color de la fase de cloroformo. (El complejo plomo-ditizona es de color rojo, pero el color puede ser enmascarado por un exceso de ditizona color verde, dando matices intermedios de púrpura y carmesí. El color de cloroformo extraído da la primera indicación de que hay plomo presente y el proceso de extracción puede ser señalado por el color en extractos sucesivos).

Trasferir los extractos directamente a un pequeño embudo de separación conteniendo 25.0 mL de ácido nítrico al 1%. Cuando se haya completado la extracción, agitar los extractos alcalinos combinados en pequeños embudos separadores y drenar la capa de ditizona verde dentro de otro embudo de separación que contenga una porción de 25.0 mL de ácido nítrico al 1%. Agitar, dejar que las capas se separen y desechar la capa clorofórmica. Filtrar los extractos ácidos que contienen plomo a través de una serie de compresas

pequeñas de algodón húmedo insertado en el tubo de un embudo de vidrio, dentro de una probeta de 50mL graduado, utilizando un segundo extracto de ácido para enjuagar el separador en el que se realizó la primera extracción del ácido (este procedimiento elimina los glóbulos de cloroformo). Compensar cualquier deficiencia en el volumen con ácido nítrico al 1% y mezclar. Proceder como en **I**.

#### H. Separación de Sulfuro

(Aplicable a todos los productos y suele ser necesario en el caso de productos del cacao, té, sardinas y todos los productos alimenticios que contienen alta proporción de álcalis fosfatos de tierra, especialmente los de magnesio, que promueven la formación de precipitados en solución de citrato amoniacal).

Enfriar la solución ácida de ceniza, añadir la solución de ácido cítrico, equivalente a 10.0 g de ácido cítrico y se ajusta a pH 3.0-3.4 (azul de bromofenol) con hidróxido de amonio. Si hay suficiente hierro presente, la solución es de color intenso, haga el ajuste final con la ayuda de una placa de punto (los precipitados de fosfatos por la acción local de hidróxido de amonio pueden ser redissueltos por agitación y enfriamiento). Si la cantidad de plomo es pequeña, añadir 5-10 mg de sulfato de cobre puro a la solución para actuar como coprecipitante. Precipitar los sulfuros pasando sulfuro de hidrogeno hasta que la solución se sature (3-5min). Inmediatamente filtrar al vacío con succión.

No lavar previamente y disolver los sulfuros con 5 mL de ácido nítrico caliente, drenando la solución en el matraz original, lavar con agua caliente, tapar, agitar y hervir para eliminar el sulfuro de hidrogeno. Trasladar a un embudo separador de 200 mL, añadir una solución de ácido cítrico equivalente a 5 g de ácido cítrico, llevarla a reacción amoniacal, extraer y determinar el plomo como en **G e I**.

I. Determinación colorimétrica de Ditizona  
(0.001 hasta 0.200mg de plomo)

El plomo es extraído de la solución acuosa bajo condiciones estándar de volumen y pH, con un volumen definido de solución clorofórmica de ditizona de concentración estándar. El pH óptimo de la operación es 9.5-10.0. El plomo se lleva en la fase clorofórmica en forma de complejo rojo y no se combina con la parte color verde de ditizona entre las fases acuosa y clorofórmica y modifica el color del extracto de acuerdo con las cantidades relativas de plomo y ditizona. Por lo tanto, pueden presentarse una serie de colores de rojo a verde con intermedios colores carmesíes, morados y azules. Los colores producidos con cantidades estándar de plomo proporcionan una base para cuantificar el estándar por medio de comparación. Los volúmenes y concentraciones de estándares de ditizona para varios rangos son de la siguiente manera cuando se utiliza una celda de 1 cm:

**Tabla N° IV:** Volúmenes y Concentraciones de Estándar de Ditizona

Rango de Pb ( $\mu\text{g}$ )	Concentración (mg/L)	Volumen (mL)
1-10	8	5
0-50	10	25
0-200	20	40

Ajuste de color: Preparar 10 estándares cubriendo etapas iguales en el rango de concentración deseado, de la siguiente manera: Utilice soluciones estándar de plomo, en ácido nítrico al 1%, 1.0mL de las cuales es igual a una fracción simple o múltiple de 1  $\mu\text{g}$  de plomo. Los volúmenes medidos representan diferentes niveles del rango en una serie de embudos de separación y se añade ácido nítrico al 1% de manera que el volumen total sea siempre 50mL. (Agregar ácido primero para que la solución de plomo no se pierda por la llave de paso del separador). Agregar 10 mL de una mezcla de amoníaco-

cianuro y mezclar. El pH resultante debe ser aproximadamente 9.7. Añada inmediatamente el volumen apropiado de solución estándar de ditizona, que depende del rango a cubrir (véase la **tabla N° IV**) y agitar 1min. Separar las capas inferiores en una serie de tubos o viales y organizar en orden. Para los rangos más bajos, es decir, <20 µg de plomo, la comparación se hace mejor viendo longitudinalmente en pequeños frascos de fondo plano de 75 mm de largo. Para los rangos más altos, 20-50 µg y por encima de, la profundidad de la columna debe ser reducida y la comparación se hace más conveniente viendo transversalmente en tubos Nessler de diámetro iguales, porque incluso las soluciones de ditizona puras aparecen de color rojo por la luz transmitida si la concentración o la profundidad de la columna se incrementa más allá de cierto punto. Si los estándares se mantienen cubiertos cuando no están en uso, estas deben durar ≥1 día.

Para la determinación, tomar una alícuota o la cantidad completa de los 50mL de ácido nítrico al 1% en el que el plomo se ha aislado, **G** o **H**, en la ampolla de separación, y si se toma una alícuota, diluir a 50 mL con ácido nítrico al 1%. Añadir 10 mL de la mezcla de amoníaco-cianuro y mezclar. Desarrollar inmediatamente el color agitando 1 min con una cantidad adecuada de solución estándar de ditizona. Escurrir la capa inferior en el tubo o usar un vial similar al usado con los estándares y comparar. Si se excede el rango, repetir con una alícuota menor o re-extraer con un exceso de ditizona antes de drenar del embudo separador, aislar una vez más en 50 mL de reactivo ácido nítrico al 1% y comparar con estándares que cubren un rango más alto. La interpolación entre los pasos de varios rangos debe hacerse fácilmente.

Si se toma la alícuota de 50 mL de ácido nítrico al 1% en el que el plomo se ha aislado, restar sólo la cantidad correspondiente del total del reactivo blanco de la cantidad de plomo encontrado.

Métodos fotométricos: Los espectros de absorción de 2 componentes en el extracto de ditizona (complejo de plomo-ditizona y ditizona libre) muestran una marcada diferencia en la capacidad de absorber la luz a 510 nm, el complejo de plomo rojo se absorbe fuertemente y el verde de la ditizona se transmite libremente. Por lo tanto, cuando la absorción de luz de estas longitudes de onda se determinan fotométricamente se observa una relación lineal entre la cantidad de plomo y  $A$ . En la realización de mediciones el espectrofotómetro fijado en esta longitud de onda o fotómetro equipado con filtro azul-verde centrada aproximadamente en este punto puede ser utilizado.

Las soluciones estándar de ditizona como sigue: Usando volúmenes apropiados y concentraciones de soluciones específicas para diferentes rangos en embudos separadores, preparar estándares de colores como en el procedimiento de comparación visual de colores, saturar las soluciones estándar de plomo y ácido nítrico al 1% con cloroformo antes de su uso, de este modo se eliminan las diferencias en el volumen de extracto entre estándares y muestras (No es necesario preparar 10 pasos completos del rango, el número de estándares pueden limitarse a 5 o 6). Desarrollar los colores por agitación de los embudos separadores por 1 min, dejar reposar unos minutos y filtrar los extractos a través de papeles especialmente preparados (montando 9 cm de papel directamente dentro de la boca de un beaker de 50 mL se elimina la necesidad de un embudo en la operación del filtrado). Llenar la celda con el filtrado extraído y determinar  $A$  para varios pasos del rango.

Trazar de nuevo la cantidad de plomo para obtener la curva estándar para el lote particular de ditizona. Preferiblemente calcular la pendiente de la línea que conecta los puntos de estándar e interceptos sobre la línea del eje de  $A$ , haciendo cálculos por el método de mínimos cuadrados.

Determinar el contenido de plomo desconocido que cae dentro del rango de determinación de *A*, usando estándar de ditizona y la misma celda con la cual las lecturas de estándares fueron hechas y calcular el plomo a partir de la ecuación  $X = (Y / b) - (a / b)$ , usando los valores de *a* y *b* determinados previamente. Si se protege de la evaporación y la luz solar directa, los factores estándar de las soluciones de ditizona no deben cambiar apreciablemente durante  $\geq 1$  mes. Para la determinación de la muestra proceder como en el ajuste de color, excepto para el filtrado extraído a partir de los papeles preparados antes en la medición fotométrica. Determinar *A*, utilizando estándar de ditizona con la misma celda utilizada en la elaboración de la curva estándar y leer la cantidad de plomo a partir de esta curva estándar o calcular a partir del factor de la solución de ditizona. Si el rango es excedido, repetir con una alícuota menor o re-extraer y repetir con un estándar de ditizona para cubrir el rango más alto. Si la alícuota de 50mL de ácido nítrico 1% en el que plomo se ha aislado es tomada, restar sólo la cantidad correspondiente del total del blanco reactivo de la cantidad de plomo encontrado.

#### J. Interferencias

Las interferencias en el método colorimétrico de ditizona están limitadas por cianuro de potasio a estaño (II), bismuto y talio. La rareza del talio hace que su interferencia sea poco probable en la determinación y no existe un método de extracción. La ditizona es destruida en si misma por agentes oxidantes fuertes tales como halógenos libres y grandes cantidades de hierro férrico, bajo condiciones de extracto de ditizona de plomo.

#### K. Eliminación de estaño

El estaño se hace problema en el análisis de los alimentos envasados, en cantidades  $>150$  ppm por lo general aparecen en las soluciones de cenizas como suspensión lechosa de óxido de estaño. Se debe disolver para facilitar la

filtración y para liberar el plomo ocluido. Las cantidades de estaño de este orden pueden causar problemas por la precipitación bajo condiciones de ditizona cuando se extrae el plomo, **G**. Se proporcionan dos métodos para la eliminación de cantidades grandes de estaño: (a) Volatilización como bromuro de estaño de la solución ácida de ceniza, y (b) Lixiviación mezclando sulfuros con una solución de polisulfuro de sodio, cuando el método de aislamiento de sulfuro **H**, se aplica. Estos métodos no pueden eliminar el estaño por completo. El estaño estánico no se extrae con ditizona y como pequeñas cantidades de estaño residual pueden estar en forma de estaño (IV), el aislamiento final de plomo por extracción con ditizona puede eliminar el estaño completamente.

En general, cantidades <100 mg no deben interferir en los métodos colorimétricos de ditizona-plomo, la determinación provista de estaño en la forma de estaño (IV) y aislamiento preliminar con ditizona se efectúa, por lo que este método de aislamiento debe aplicarse siempre que sea posible.

Volatilización como bromuro de estaño desde la solución ácida de cenizas: después de casi obtener las cenizas libres de carbono, agregar 15-20 mL de ácido bromhídrico al 40% redestilado. Si se utilizan nitratos como "ash aid", cubrir la cápsula con el vidrio de reloj y calentar en baño de vapor hasta que la evolución de bromo disminuya, luego enjuague el vidrio con agua destilada y llevar a ebullición para completar la expulsión de bromo (este proceso destruye los nitratos no descompuestos). Agregar más ácido bromhídrico si es necesario para disolver las cenizas y examinar las soluciones para la claridad. Si hay residuos insolubles de óxido de estaño, añadir 50-100 mg de estaño puro, calentar suavemente la solución de ácido bromhídrico de ceniza y dejar que se disuelva. (El estaño metálico es el mejor agente para llevar a ignición el óxido de estaño dentro de la solución. Para ser eficaz, la solución de ceniza

debe estar en su estado reducido. El óxido de hierro a veces se convierte en "noble" durante la calcinación y se disuelve con dificultad, pero el tratamiento con estaño metálico también lo disuelve en solución. El tratamiento con estaño es necesario sólo con contenedores de latas malas oxidadas.)

Cuando la solución de cenizas está libre de la lechosidad debida al óxido de estaño, añadir 20 mL de ácido perclórico al 60% (bidestilado), mezclar lo oxidado con pocos mililitros de mezcla ácido bromhídrico-bromo y luego añadir 15 mL adicionales de reactivo en porciones, mientras la solución se evapora a humos blancos de ácido perclórico (150°C) en un hot-plate. Repita con 10 mL adicionales en porciones de mezcla de ácido bromhídrico-bromo si >100 mg de estaño fueron utilizados para disolver las cenizas (el ácido perclórico caliente ayuda a mantener las sales de ceniza en solución y con bromo se mantiene al estaño como volátil al bromuro de estaño). Cuando el ácido bromhídrico y bromo se volatilizan por completo, enfriar y recoger con agua destilada caliente (200mL pueden ser necesarios si hay presente un exceso de perclorato de potasio). Filtrar para eliminar cualquier pequeña cantidad de óxido de silicio deshidratado, extraer el residuo dos veces con 5mL de reactivo ácido cítrico-ácido clorhídrico caliente y agua destilada caliente, si es necesario tratar la capsula con hidróxido de sodio como en **D**, y aislar el plomo por extracción con ditizona como en **G**, o por separación de sulfuro, **H**, finalmente determinar el plomo como en **I**.

Con polisulfuro de sodio: (Recomendado para alimentos enlatados). Aislar el plomo por precipitación con sulfuro, **H**, filtrar y lavar el matraz y filtrar con 3-6 porciones de 5 mL de cada una de solución de polisulfuro de sodio caliente (el estaño, arsénico, y sulfuros de antimonio se disuelven, el sulfato de cobre puede ser parcialmente disuelto y reprecipitado en el filtrado). Lavar el frasco y los sulfuros residuales varias veces con solución tiosulfato de sodio al 3%

ajustado a pH 3.0-3.4 y saturar con ácido sulfhídrico, y proceder como en **H**, comenzando con "Disolver los sulfuros, con los lavados previos..." cuando las cenizas contengan mucho estaño, como cuando estaño metálico ha sido añadido para disolver los óxidos metálicos insolubles, los precipitados de sulfuro serán tan voluminosos que serán difíciles de manejar, y siendo necesario utilizar el método de volatilización antes de la sulfuración. Para la determinación colorimétrica de ditizona de plomo, extraer la solución de ácido nítrico de sulfuros disueltos y proceder como en **H** y **I**.

#### L. Detección y eliminación de bismuto

Por ditizona a pH 2.0 después de la extracción preliminar de ditizona a un pH de 8 a 11: (Este método elimina por completo las pequeñas cantidades de bismuto). Extraer metales desde cloroformo ditizona extracto con 50mL de ácido nítrico al 1% como en **G**. Ajustar el extracto ácido a pH 2.0 (indicador metacresol púrpura) con solución de hidróxido de amonio al 5% y agitar vigorosamente por 1 min con 10 mL de cloroformo la solución de ditizona (200-250 mg/L). Dejar las capas separar y si el extracto de cloroformo es de color rojo anaranjado a rojo (Bismuto), escurrir y extraer agregando 10 mL de solución de ditizona. Si tonos de verde o púrpura se visualizan, indica un exceso de ditizona, filtrar el extracto de cloroformo y extraer la fase acuosa una vez más con 5 mL de solución de ditizona (la agitación debe prolongarse 3-5 min) para garantizar la extracción completa de Bismuto). Continuar la extracción hasta que el extracto de ditizona permanezca verde. Ajuste la solución acuosa a pH 8.5 con hidróxido de amonio, añada tiocianato de potasio y extraer con ditizona como en **G**. Determinar el plomo colorimétricamente como en **I**.

Método de Bambach y Burkey: separar pequeñas cantidades de bismuto desde el plomo agitando con solución de cloroformo de sus ditizonatos mixtos con

una solución acuosa buffer a pH 3.4, el bismuto permanece como ditizonato en la fase clorofórmica, mientras que el plomo se encuentra en la fase acuosa y puede separarse y ser libre de bismuto. Solo un ligero exceso de ditizona libre debe estar presente en la mezcla clorofórmica de ditizonatos, de lo contrario el plomo no se habría eliminado.

De soluciones ácidas de sulfuros: (Destinado para cantidades pequeñas de bismuto, particularmente cuando es necesario separar el sulfuro) Disolver la mezcla de sulfuros, **H**, con ácido nítrico caliente y separar el bismuto y plomo como en la extracción preliminar de ditizona a pH 2.

Condiciones especiales: (Para productos que contienen grandes cantidades de bismuto). Disolver compuestos de bismuto inorgánicos directamente en ácido bromhídrico-bromo. Preparar compuestos de bismuto orgánicos o preparar mezclas de bismuto con materia orgánica conteniendo pequeñas cenizas, como en **E**, y disolver el residuo en ácido bromhídrico-bromo. Si la muestra contiene materia orgánica con apreciable cantidad de cenizas que no sean compuestos de bismuto, proceder como en **E** o **N**, aplique la separación de sulfuro, **H**, y disolver la mezcla de sulfuros en ácido nítrico. Evaporar la solución de ácido nítrico de sulfuros hasta sequedad en una cápsula de porcelana y tratar con pequeñas porciones de una mezcla de ácido bromhídrico-bromo. Evaporar el contenido de una cápsula conteniendo bismuto y disolver en ácido bromhídrico-bromo, después de utilizar cualquiera de los métodos anteriores de preparación, en baño de vapor para volatilizar el estaño y convertir otros metales a bromuros. Evaporar hasta sequedad, introducir en el horno con temperatura controlada, y elevar la temperatura gradualmente a 300°C (el bromuro de arsénico y bromuro de estaño se volatilizan primero a 100°C o antes, el bromuro de bismuto se volatiliza como humo denso de color naranja a 300°C). Después de 5 min, o cuando los humos cesen, retire la

cápsula, enfriar y tratar de nuevo con pequeñas porciones de ácido bromhídrico-bromo. Una vez más evaporar hasta sequedad y calentar aumentando cada 5 min a 300-325°C (el bromuro de plomo no se volatiliza apreciablemente a <350°C). Retire la cápsula, enfriar y disolver los residuos en ácido nítrico caliente. Proceder a la eliminación de los últimos vestigios de bismuto a pH 2.0 y determinar el plomo como en la extracción preliminar de ditizona a pH 2.

### **Métodos Especiales de Preparación de Muestras**

#### M. Solución en ácidos

(Aplicable a químicos solubles en agua o ácidos, por ejemplo, fosfatos, sulfatos, etc. y productos orgánicos de tipo de tartratos y citratos.)

Disolver 5-100 g de muestra, de acuerdo con su naturaleza y cantidad de plomo esperado, en ácido clorhídrico en un beaker de 400 mL. Con fosfatos de calcio utilizar 10-50 g. Disolver en el volumen más pequeño posible de solución por calentamiento y añadir poco a poco pequeñas cantidades de agua destilada caliente y ácido clorhídrico. Filtrar al vacío la solución y cualquier residuo de lixiviación con 10-25 mL de ácido clorhídrico caliente-ácido cítrico, seguido de 10-25 mL de solución hidróxido de amonio al 40% caliente. Enjuague el beaker y filtrar con agua destilada caliente y enfriar la solución. Proceda como en **G**. Si interfiere la formación de precipitado, acidificar nuevamente y aislar el plomo por precipitación de sulfuro, **H**. Si es difícil obtener soluciones claras con los fosfatos de calcio a pH 3.0-3.4 (el precipitado de sulfuro se puede contaminar con un exceso de fosfatos), redissolver el precipitado, agregue más solución de ácido cítrico, reajuste el pH y reprecipitar los sulfuros, o hacer un precipitado de sulfuro, disolver los sulfuros en ácido nítrico caliente, hervir el sulfuro de hidrogeno y extraer el

plomo con ditizona, **G**. A veces las dificultades por la formación de precipitado en **G** se pueden evitar mediante el uso de muestras más pequeñas para la extracción y determinación colorimétrica. Si se sospecha la presencia de estaño y bismuto, eliminar por los métodos descritos en **K** e **L**. Por último determinar el plomo aislado colorimétricamente, como en **I**.

#### N. Digestión Completa

(Aplicable a la mayoría de alimentos de productos biológicos, con dificultad para las grasas y aceites, productos oleosos, etc.)

Digerir una muestra de 5-50 g de acuerdo al contenido de humedad en el matraz Kjeldahl como sigue: Añadir 25-50 mL de ácido nítrico, luego agregar cuidadosamente 40 mL de ácido sulfúrico (20 mL, si se utiliza el método Gutzeit). Coloque el frasco sobre material de asbesto con agujeros de 5 cm. Calentar ligeramente y dejar el calentamiento si hay una excesiva formación de espuma. Cuando la reacción ha disminuido, calentar con precaución el frasco y girar de vez en cuando para prevenir el apelmazamiento de la muestra sobre la parte del vidrio expuesto a las llamas. Mantener la oxidación en el frasco en todo momento de la digestión por la adición de pequeñas cantidades de ácido nítrico, cada vez que se mezcla se torna marrón o se oscurece. La digestión continúa hasta que se destruye todo el material orgánico y los humos de óxido de azufre evolucionan (la solución final debe ser incolora, en su mayoría de color pálido claro). Destilar el arsénico, si se desea, como cloruro de arsénico. Si no se puede destilar el arsénico, añada 100 mL de agua destilada y suficiente ácido clorhídrico al matraz para disolver cualquier sulfato de calcio en el residuo. Filtrar, pulverizando cualquier residuo insoluble (óxido de silicio o sulfato de bario anhidro) con una espátula. Disolver cualquier sulfato de plomo en el matraz y los residuos de lixiviación en el filtro con 10 a 20 mL de solución ácido clorhídrico-ácido cítrico caliente, seguido de 10-20 mL de acetato de

amonio 40% caliente. Por último enjuague tanto el matraz como el filtro con agua caliente. Aislar el plomo por los métodos de ditizona, **G**, o precipitado de sulfuro, **H** (En general, el método de sulfuro es más adecuado, especialmente cuando están presente el sulfato de bario o excesivo sulfato de calcio, como sulfatos insolubles que fácilmente pueden ocluir el plomo). Si están presentes el bismuto y el estaño, eliminarlos como en **K** o **L**. Después del aislamiento, determinar el plomo por el método colorimétrico, **I**.

### **Prueba 9: Cadmio** <sup>(i)</sup>

*Nota:* esta prueba es utilizada en el análisis de Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc

#### A. Fundamento

La muestra se digiere con ácido nítrico en un sistema cerrado. El cadmio y plomo son determinados por voltamperometría de disolución anódica (ASV). El arsénico, selenio y zinc son determinados por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) después de la generación de hidruros metálicos (por arsénico y selenio).

#### B. Material y Equipo

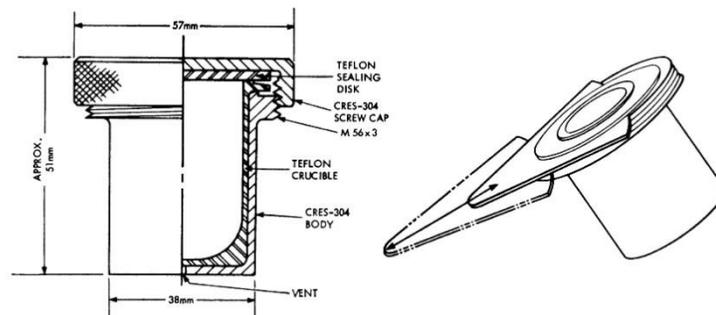
- Polarímetro: Con los accesorios de disolución anódica. Típicos parámetros de operación del Princeton Applied Research Modelo 174 con electrodos colgantes de mercurio, que son: grado de lectura 5 mV/s, dirección de escaneo +, Rango de escaneado 1.5V, potencia inicial – 0.7V; modulación de amplitud 25mV, modo de operación de pulso diferencial, pantalla de dirección "--", tiempo de goteo 0.5 segundos, filtro bajo de paso off; selector, off; botón de presión, inicial; desplazamiento de salida, off y el rango actual 5-10  $\mu$ A, o como sea

necesario (otros instrumentos y electrodos tales como cera impregnada grafito se pueden utilizar de acuerdo a las instrucciones del fabricante).

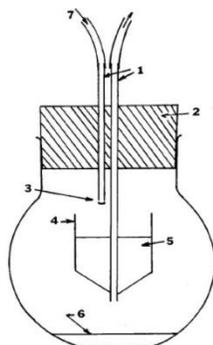
- Espectrofotómetro de absorción atómica: Con lámparas de cátodo hueco de zinc, arsénico y selenio o lámparas de descarga sin electrodos de arsénico y selenio, 3 ranuras, 10cm de cabezal del quemador Bolling, aire -C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> – llamas de arrastre de aire y arco de deuterio correctores de background.
- Balanza analítica
- Hot plate
- Estufa
- Cámara de gases
- Mufla
- Cronometro
- Agitador magnético
- Electrodos de Calomel
- Generador de hidruro: Ver **figura N° II**. Construido de la siguiente manera: (1) Matraz de fondo plano: vidrio de borosilicato de 50mL (Corning N°5160, o equivalente). (2) Accesorios para tapar: con dos agujeros (1 a través del centro), tapón de caucho N° 9, equipado con tubo de salida de gas de 100mm×1/8" (3 mm) de diámetro interno, tubo de polietileno a través del agujero central.

Coloque la parte inferior del tubo de salida de gases a través de un corte inferior de 1" segmento de 5/8" tubo de ensayo de polietileno con el agujero en la parte inferior para que 3 mm del tubo sobresalga a través del tubo de ensayo. Inserte a través del segundo agujero de 75 mm×1/8" (3 mm) id, el tubo de polietileno con el tubo de entrada de nitrógeno. Sellar la parte inferior del tubo con un quemador y luego perforar varios agujeros en el extremo sellado con una aguja de calibre 21. Alternativamente, preparar un tubo de polietileno de 500 mm×1/16" (1.5 mm) id y mantenerlo en su lugar

en el tope con el agujero a través del tabique. Conecte el otro extremo del tubo al espectrofotómetro AA con 500 mm de tubo Tygon cortando una línea auxiliar de aproximadamente 75 mm de la cámara de mezcla y colocar la tubería. (3) Montaje del generador: (Opcional), 64 mmx0.5" id de tubo asegurado a un anillo de laboratorio por medio de un soporte de pinzas. Inserte la extensión de soporte en el tubo y coloque otra pinza en la parte posterior de la abrazadera para sujetar en su lugar y para servir como mango; la abrazadera ahora está libre para girar 180°. Coloque el tapón de goma del hidrogenerador la pinza de extensión con alambre y la posición justo a nivel de mordazas de sujeción rígida. En funcionamiento, colocar el frasco de generador entre las mordazas de la pinza de extensión, inserte el tapón firmemente en el cuello del frasco, luego apriete las pinzas de sujeción alrededor del cuello del matraz. La unidad puede ser invertida rápidamente y de manera uniforme haciendo girar el mango de la pinza de extensión, permitiendo que la muestra y el borohidruro de sodio se mezclen rápidamente y de forma reproducible.



**Figura N° I:** Vaso de Digestión



**Figura N° II:** Generador de Hidruro, 1-Tubo de Polietileno, 2-Tapón, 3-Llama sellada en tubo de Polietileno con agujeros en un extremo, 4-Taza reactivo, 5-Solución de borohidruro de sodio, 6-Solución muestra, 7-Entrada de nitrógeno desde la línea "auxiliar" de AAS.

### C. Reactivos

(Utilice agua doblemente destilada. Enjuagar toda la cristalería con ácido nítrico [1+1] seguido por un minucioso enjuague con agua destilada. Descontaminar los vasos de digestión con los reactivos para ser utilizados en la digestión. La descontaminación es necesaria para reducir los espacios en blanco, especialmente para plomo, a un nivel aceptable)

- Ácidos: (1) ácido nítrico bidestilado. (2) ácido perclórico al 70%, el doble se destila a vacío. (3) ácido clorhídrico 8M. Diluir 66 mL de ácido clorhídrico a 100 mL con agua destilada.
- Solución Nitrato: solución equimolar de nitrato de potasio y nitrato de sodio. Disolver 54.3 g de nitrato de potasio y 45.7 g de nitrato de sodio en agua destilada en un matraz graduado de 200 mL, diluir a volumen y mezclar. Para purificar aún más, añadir 1-2 gotas de hidróxido de amonio a una alícuota de 25 mL y extraer con 2 mL de 10 µg de ditizona/mL de tetracloruro de carbono hasta que la capa de solvente más baja es incolora.

- Soluciones de magnesio: (1) solución de cloruro de magnesio: 37.5mg/mL. Disolver un total de 3.75 g de óxido de magnesio USP, mediante la adición de pequeñas cantidades a la vez a 100 mL de ácido clorhídrico 8M. (2) solución de nitrato de magnesio: 75 mg/mL. Mezclar 3.75 g de magnesio USP, con aproximadamente 30 mL de agua destilada, agregue lentamente ácido nítrico para disolver (10 mL), enfriar y diluir a 50 mL con agua destilada.
- Solución de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ): 4.0 g de  $\text{NaBH}_4$ /100 mL de hidróxido de sodio al 4%.
- Solución de yoduro de potasio: Disolver 20 g de yoduro de potasio en agua destilada y diluir hasta 100 mL. Preparar inmediatamente antes de su uso.
- Polvos de metales: Pureza 99.99% + % de cadmio, plomo, zinc; y 99.99% de selenio.
- Soluciones estándar de cadmio: (1) Solución madre 1 mg/mL. Disolver 1.0 g de cadmio en polvo en 20 mL de ácido nítrico (1+1) en un matraz volumétrico de 1L y diluir a volumen con agua destilada. (2) Solución de trabajo: 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pipetear 10mL de solución madre en un frasco volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada. Pipetear 2mL de solución diluida a un frasco volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada.
- Soluciones estándar de Plomo: (1) Solución madre: 1 mg/mL. Disolver 1.0 g de plomo en polvo en 20 mL de ácido nítrico (1+1) en un frasco volumétrico de 1L y diluir a volumen con agua destilada. (2) Solución de trabajo: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pipetear 1 mL de solución madre en un matraz volumétrico de 200 mL y diluir a volumen con agua destilada.
- Soluciones estándar de Zinc: (1) Solución Stock: 1 mg/mL. Disolver 1.0g de polvo de zinc en 20 mL de HCl (1+1) en un frasco volumétrico de 1L y diluir a volumen con agua destilada. (2) Soluciones de trabajo: 0.2, 0.5,

1.0 y 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pipetear 1 mL de solución madre en un frasco volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada. Pipetear 2, 5, 10, y 15 mL de solución diluida en frascos volumétricos separados de 100 mL cada uno, que contienen 1 mL de  $\text{HClO}_4$  y diluir a volumen con agua destilada.

- Soluciones estándar de arsénico: (1) solución madre: Disolver 1.320 g de  $\text{As}_2\text{O}_3$  en un volumen mínimo de hidróxido de sodio 20% en un frasco volumétrico de 1L, acidificar con ácido clorhídrico (1+1), y diluir hasta volumen con agua destilada. (2) Soluciones de trabajo: 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pipetear 10 mL de solución stock en un frasco volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada. Pipetear 1, 2, 3, 4, y 5 mL de solución diluida en matraces volumétricos de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada.
- Soluciones estándar de selenio: (1) solución Stock: 1 mg/mL. Disolver 1.0 g de polvo de selenio en un volumen mínimo de ácido nítrico en un beaker de 200 mL y se evapora a sequedad. Añadir 2 mL de agua destilada y evaporar a sequedad. Repita la adición de agua destilada y evaporar a sequedad dos veces. Disolver en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (1+9) en un frasco volumétrico de 1L y diluir a volumen con ácido clorhídrico (1+9). (2) Soluciones de trabajo: 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Pipetear 10 mL de solución madre en un matraz volumétrico de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada. Pipetear 1, 2, 3, 4 y 5 mL de solución diluida por separado en frascos volumétricos de 100 mL y diluir a volumen con agua destilada.

#### D. Cristalería

- Vaso de descomposición: 70 mL. (Ver **figura N° I**)
- Pipetas: Micropipetas Eppendorf de 50 y 100  $\mu\text{L}$ , o equivalentes.
- Beaker 250 mL

- Probetas 25 mL y 50 mL
- Balones volumétricos 10.0 mL, 50.0 mL, 100.0 mL, 200.0 mL y 1.0L
- Pipetas volumétricas 1.0 mL, 2.0 mL, 10.0 mL y 25.0 mL
- Bureta 10 mL
- Ampolla de separación 250 mL
- Crisol de porcelana

#### E. Sistema de Digestión Cerrado

(No exceder las especificaciones del fabricante de 0.3 g de sólidos con vasos de 70 mL. Proceda con precaución con los nuevos y no probados. Las muestras se colocan en ácido nítrico durante la noche o el calentar en hot plate con precaución hasta que cualquier reacción vigorosa disminuya. A continuación, proceder con el vaso de digestión cerrado. Destape el vaso en la campana y los óxidos de nitrógeno son liberados)

Pesar en balanza analítica 0.3 g de muestra (base seca) en los vasos de descomposición descontaminados, añadir 5.0 mL de ácido nítrico, cerrar el recipiente con la tapa, y calentar en horno a 150°C por 2 h. Enfriar dentro de la campana, retire el vaso de la envoltura y transferir el contenido a un matraz volumétrico de 10.0 mL. Añadir 4 mL de agua destilada al recipiente, cubra con tapa y mientras mantiene la tapa firmemente contra el borde, invertir varias veces, y agregar los enjuagues al matraz. Diluir a volúmen con agua destilada y mezclar.

#### F. Voltametría de redisolución anódica

(Para Cadmio y Plomo)

Pipetear una alícuota de la solución de la muestra digerida en un crisol Vycor descontaminado de 50.0 mL y añadir 2.0 mL de solución de nitrato. Llevar el blanco de reactivo al mismo tiempo. Calentar en hot plate a baja temperatura

para secar y a continuación aumentar el calor hasta el máximo (375°C). Las sales de nitrato se funden y digieren la materia orgánica en 15-20 min. Coloque los crisoles en un horno a 450°C para oxidar cualquier materia carbonosa restante (10-20 min). La digestión es completa cuando la masa fundida es clara. Dejar enfriar, añadir 1 mL de ácido nítrico (1+1) a la masa fundida solidificada y calentar en hot plate a sequedad para expulsar los carbonatos y nitratos y para controlar la acidez. Se disuelven en 5.0 mL de ácido nítrico (0.5mL/L), calentando en hot plate para acelerar la solución. Transferir a la celda polarigráfica con 5.0 mL de agua destilada. Burbujas de oxígeno libres de nitrógeno pasan a través de la solución 5 min, luego nitrógeno directo en la solución. Ajustar el selector de gotas de mercurio en divisiones de 4 mm. Agitar la solución con un agitador magnético a una velocidad constante y reproducible para que el goteo de mercurio no se altere. Deslice el selector de "Ext. Cell" y medir el tiempo de 120 seg con el cronómetro. Apague el agitador y deje reposar 3 seg. Pulse el botón "Scan" para obtener los picos correspondientes a cadmio y plomo en aproximadamente -0.57 y -0.43V, respectivamente, frente al electrodo de calomel saturado. Agregar volúmenes conocidos de cada estándar a la solución muestra en la celda con una pipeta Eppendorf. Cantidades adicionadas deben ser 1x, 2x, etc. de cantidad de metal presente inicialmente en la celda, y cada suma no debería cambiar el volumen original de manera significativa. Después de cada adición, burbujas de nitrógeno pasan a través de la solución brevemente y realizar la extracción y operaciones exactamente como para la solución original. Trazar los µg de metal añadido en el eje de las x contra la altura del pico en el eje de las y. Extrapolar una línea lineal al eje x para obtener los µg de metal en la celda.

$$\mu\text{g de metal} / \text{g de muestra} = [(M - M') / \text{g de muestra}] \times 10 / \text{alícuota en mL}$$

Donde  $M$  y  $M'$  = µg de metal de la curva estándar para la muestra y blanco, respectivamente.

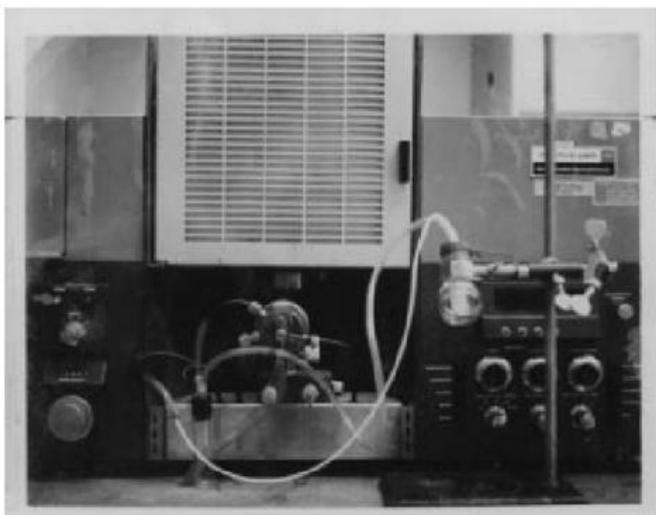
G. Espectroscopia de absorción atómica  
(Para Arsénico, Selenio y Zinc)

Arsénico: Pipetear una alícuota de solución de la muestra digerida dentro de un frasco redondo descontaminado de 50 mL, de borosilicato con fondo plano y añadir 1 mL de solución de nitrato de magnesio. Calentar en un hot plate lentamente hasta la sequedad, entonces incrementar el calentamiento al máximo (375°C). Colocar el frasco en horno a 450°C para oxidar cualquier materia carbonosa y para descomponer el exceso de nitrato de magnesio ( $\geq 30$ min). Enfriar, disolver los residuos en 2.0 mL de ácido clorhídrico 8M, agregue 0.1 mL de yoduro de potasio al 20% para reducir arsénico (V) a arsénico (III) y dejar reposar  $\geq 2$  min. Llevar un blanco de reactivo con la muestra.

Preparar los estándares de la siguiente manera: A seis frascos de 50 mL (el mismo tipo que es utilizado para la muestra) añadir 2.0 mL de solución cloruro de magnesio y a 5 frascos añadir alícuotas de 50  $\mu$ L de las respectivas soluciones estándar de trabajo a fin de que las series contengan 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25  $\mu$ g de arsénico (otras cantidades pueden ser utilizadas en función de la sensibilidad del sistema) Añadir 0.1 mL de yoduro de potasio al 20% a cada matraz, mezclar y dejar reposar  $\geq 2$  min. Conectar el generador al instrumento como se muestra en la **figura N° III** y ajustar las presiones y los flujos como en la **tabla N° V**. Operar el instrumento de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la lámpara en su lugar y la grabadora configurada para 20 mm/min.

**Tabla N° V:** Grados de flujo y presiones para determinaciones de Arsénico y Selenio

Gas	Tanque (psi)	AA control Caja (psi)	Perkin Elmer Modelo 403 Flujómetro, divisiones
H <sub>2</sub>	20	10	20 (4 L/min)
N <sub>2</sub>	40	30	25 (10 L/min)



**Figura N° III:** Generador híbrido y conexión montada a la línea auxiliar del espectrofotómetro. Tubo de prueba ácido entrampado conectado entre el generador y el instrumento no está incluido en el método

Añadir 2.0 mL de solución borohidruro de sodio al 4% al dispensador generador de reactivo e insertar el tapón de goma con fuerza en el cuello del frasco que contiene la muestra o estándar. Con un movimiento rápido, suave, invertir el frasco, dejando mezclar con solución de muestra o estándar (esta operación debe ser de forma reproducible). Aparecerá inmediatamente un pico A estrecho y puntiagudo. Cuando el lápiz registrador regresa a la línea base, retire el tapón del frasco, y enjuague dispensador de reactivo con agua

destilada apretando la botella, luego succionar el agua destilada. Proceda con la siguiente muestra o estándar. Cuando la serie este completa, enjuagar la cristalería completamente. Interpolar en una curva de calibración de los  $\mu\text{g}$  de arsénico contra  $A$ , y obtener los  $\mu\text{g}$  de arsénico en la alícuota de la muestra desde esta curva. Corregir con un blanco.

Selenio: Proceder como para arsénico usando lámparas y estándares de selenio, pero omitir la adición de solución de yoduro de potasio. El yoduro de potasio reduce al selenio a su estado elemental y causar la pérdida de la señal. En su lugar, cubrir con un pequeño frasco de vidrio de reloj y colocar en un baño de vapor 10min, y enfriar a temperatura ambiente.

Zinc: Pipetear una alícuota de 1.0 mL de solución de la muestra digerida en un erlenmeyer descontaminado de 25 mL y añadir 0.1 mL de ácido perclórico. Calentar en hot plate hasta generar humos blancos de ácido perclórico. La muestra es completamente digerida cuando se indica por una solución clara, prácticamente incolora. Si la muestra no es limpia, añadir porciones de 0.5 mL de ácido nítrico y calentar de nuevo hasta que humos blancos aparezcan. Por último, calentar hasta sequedad pero no quemar. Enfriar y disolver el residuo en 3.0mL de ácido perclórico (1+99).

Operar el instrumento de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando aire y llama de acetileno y medir  $A$  de la muestra y los estándares. Diluir la solución muestra con ácido perclórico (1+99) si la solución es demasiado concentrada. Interpolar en una curva de calibración de  $\mu\text{g}$  de zinc frente a  $A$ , y obtener los  $\mu\text{g}$  de zinc en la alícuota de la muestra de esta curva. Corregir con un blanco.

## Prueba10: Mercurio <sup>(i)</sup>

### A. Fundamento

Las muestras se digieren con ácido sulfúrico y se oxidan con permanganato. El mercurio en la digestión se determina por espectrometría de absorción atómica.

### B. Material y Equipo

- Espectrofotómetro de absorción atómica: (Instrumentation Laboratory, Inc., 113 Hartwell Ave, Lexington, MA 02173, Modelo 153 [o sucesores], o equivalente) Equipado con una lámpara de cátodo hueco de mercurio y celda con flujo de gas (**figura N° IV**), 25 (id) × 115 mm con ventanas de cuarzo cementados en su lugar. Condiciones de funcionamiento: Longitud de onda de 253.7 nm, anchura de la ranura 160 μm, lámpara corriente de 3 ma y escala de sensibilidad 2.5.
- Bomba de diafragma: (Neptuno Dyna-bomba, o equivalente). Cubierta del diafragma y partes internas de la bomba rociadas con plástico tipo acrílico. Utilice tubos de teflón calibre 16 en todas las conexiones.
- Condensador de agua: 12-18 (Id) × 400 mm de borosilicato, 24/40 cono conjunto estándar, modificadas para contener anillos Raschig de 6mm. Llenar el condensador con anillos Raschig hasta una altura de 100mm, y luego colocar una capa de 20 mm de perlas de vidrio de diámetro 4mm en la parte superior de los anillos.
- Adaptador de entrada de gas: cono estándar 24/40, por ejemplo, Kontes Glass Co. N°181000.
- Frasco de digestión: Matraz de fondo plano de 250 mL en conjunto con un cono estándar 24/40.
- Perlas de ebullición
- Hot plate

- Balanza analítica
- Frasco lavador

#### C. Reactivos

- Solución reductora: Mezclar 50 mL de ácido sulfúrico con aproximadamente 300 mL de agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente y disolver 15 g de cloruro de sodio, 15 g de hidroxilamina sulfato y 25 g de cloruro de estaño en solución. Diluir hasta 500 mL.
- Solución diluyente: a un frasco volumétrico de 1L conteniendo de 300-500 mL de agua destilada, añadir 58 mL de ácido nítrico y 67 mL de ácido sulfúrico. Diluir a volumen con agua destilada.
- Perclorato de magnesio: Secar el agente colocando en el matraz de filtración (**figura N° IV**). Reemplace según sea necesario. [*Precaución*: el cloruro de magnesio es explosivo al entrar en contacto con sustancias orgánicas]
- Soluciones estándar de mercurio: (1) Solución madre: 1000 µg/mL. Disolver 0.1354 g de cloruro de mercurio en 100.0 mL de agua destilada. (2) Solución de Trabajo: 1 µg/mL. Diluir 1 mL de la solución madre a 1L con ácido sulfúrico 1N. Prepare la solución todos los días.

#### D. Cristalería

(Enjuague toda la cristalería antes de usar con ácido nítrico [1+9])

- Balón volumétrico 100.0 mL, 500.0 mL y 1.0L
- Probeta de 25 mL
- Beaker 250 mL

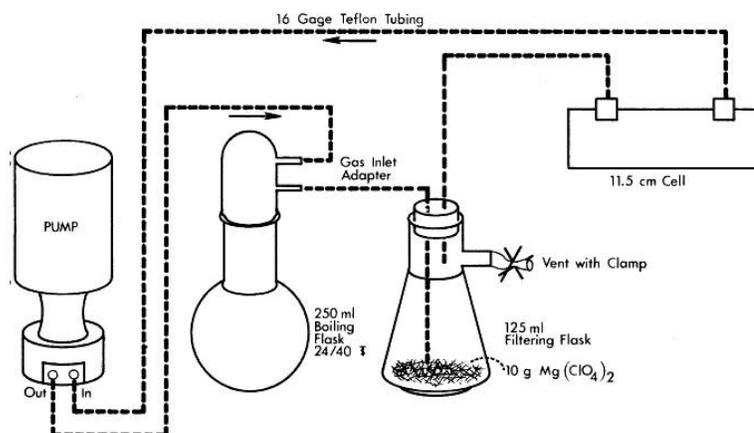


Figura N° IV: Aparato para análisis de absorción atómica sin llama

### E. Determinación

Pesar en balanza analítica 5.0 g de muestra en un matraz de digestión, añadir 25 mL de ácido sulfúrico 18N, 20 mL de ácido nítrico 7N, 1 mL de solución de molibdato de sodio al 2% y 5-6 perlas de ebullición. Conectar el condensador (con agua destilada que circula a través de él) y aplicar calor suave por 1h. Quite de calor y deje reposar 15 min. Añadir 20 mL de ácido nítrico-ácido perclórico (1+1) a través del condensador. Apague el agua destilada que circula a través del condensador y hervir vigorosamente hasta que humos blancos aparezcan en el matraz. Continuar calentando 10 min. Enfriar y cuidadosamente añadir 10 mL de agua destilada a través del condensador, mientras se agita el líquido en el matraz. Ebullición la solución por 10 min. Quite de calor y lavar el condensador con tres porciones de 15 mL de agua destilada. Enfriar la solución a temperatura ambiente. Transferir completamente la muestra digerida con agua destilada a un matraz volumétrico de 100.0 mL y diluir a volumen con agua destilada. Transferir una alícuota de 25.0 mL de cada muestra a otro matraz de digestión. Ajuste el volumen a aproximadamente 100.0 mL con la solución de dilución.

Ajuste la salida de la bomba a 2L de aire/min mediante la regulación de la velocidad de bombeo con transformador variable. Conectar el aparato como en la **figura N° IV**, excepto para el adaptador de entrada de gas. Con la bomba de trabajo y espectrofotómetro a cero, añadir 20 mL de solución diluida a la alícuota diluida. Conectar inmediatamente el adaptador de entrada de gas y airear por 3 min (ajustar el tiempo de aireación para obtener la máxima *A*). Registre *A*, desconecte la presión sobre "out" al lado de la bomba y de abrir la ventilación en el matraz de filtración para enjuagar el sistema. Prepare un blanco de reactivo y una curva del estándar agregando 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg de mercurio a la serie de frascos de digestión. A cada frasco añadir 100 mL de solución diluyente. Por último, añadir la solución de reducción y airear los estándares como a las muestras. Plotear la curva estándar de mínimos cuadrados de regresión lineal de *A* contra µg de mercurio. Determine los µg de mercurio en la alícuota desde la curva. Si los µg de mercurio que se determinan están fuera de la calibración, repetir la determinación con una alícuota menor de la solución muestra, para llevar los µg de mercurio a la región de la curva estándar. A partir del tamaño de la alícuota tomada, determine el total de los µg de mercurio en la muestra original.

$$\text{ppm Hg} = \mu\text{g de Hg} / \text{g de muestra}$$

**Tabla N° VI:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.20.01:05 para Sal Fortificada con Yodo

<b>Características</b>	<b>Sal Molida</b>	<b>Sal Refinada</b>	<b>Sal de Mesa</b>
Granulaciones	Los cristales deben pasar totalmente por un tamiz N°16 (1mm de abertura)	Los cristales deben pasar totalmente por un tamiz N°20 (0.841mm de abertura) y en lo mínimo 25% deben pasar por un tamiz N°60 (0.25mm de abertura)	Los cristales deben pasar totalmente por un tamiz N°20 (0.841mm de abertura) y en lo mínimo 25% deben pasar por un tamiz N°60 (0.25mm de abertura)
Humedad a 105 – 110°C máximo	3%	2%	0.5%
Sustancias Insolubles en agua máximo	3%	0.2%	0.2%
Cloruro de sodio (sobre la sustancia seca)	96.5%	98.5%	98.5%
Contenido de yodo para los 3 tipos de sal	Mínimo 30mg/kg – Máximo 100mg/kg		
Arsénico	No más de 0.5mg/kg expresado como As		
Cobre	No más de 2.0mg/kg expresado como Cu		
Plomo	No más de 2.0mg/kg expresado como Pb		
Cadmio	No más de 0.5mg/kg expresado como Cd		
Mercurio	No más de 0.1mg/kg expresado como Hg		

**METODO DE ANALISIS PARA  
CAFÉ SOLUBLE INSTANTÁNEO**

## CAFÉ SOLUBLE INSTANTANEO

**Norma Consultada:** NSO 67.31.03:04 Café Soluble Instantáneo

### **Alcance:**

Aplica al café soluble instantáneo que se produce en el país y al importado. Café soluble instantáneo, Café soluble instantáneo descafeinado, Café soluble instantáneo neutralizado, Café soluble instantáneo semineutralizado, Café soluble instantáneo en polvo, Café soluble instantáneo aglomerado y Café soluble liofilizado.

### **Pruebas Organolépticas:**

#### **Prueba de Taza**

##### A. Material y Equipo

- Taza de porcelana o de vidrio de 200 mL.
- Cuchara de metal plateado, de forma redonda de 100 mL de capacidad y de 40 mm de diámetro.
- Probeta graduada de 200 mL de capacidad.
- Agua a 85°C, de sabor neutro, con una dureza menor de 100 mg de CaCO<sub>3</sub>.
- Cucharas

##### B. Preparación de la Muestra:

Se pesan 2.0 g de café soluble instantáneo, se colocan directamente en la taza y se adicionan 150 mL de agua, medidos en probeta, entre 85 y 90°C. La calidad organoléptica del café soluble instantáneo se determina sobre 5 muestras.

### C. Procedimiento

Se remueve lentamente con la cuchara y se evalúa el aroma, aspecto y color. Se toma con la cuchara una porción de la bebida caliente y se succiona el líquido de modo que se reparta en el interior de la boca para evaluar el sabor, acidez y cuerpo. La bebida menos caliente se degusta por segunda vez para evaluar si se mantiene su calidad organoléptica. La expresión de los resultados se hará utilizando el término “Aceptación o Rechazo”, comparándola con la muestra de referencia.

### Pruebas Fisicoquímicas:

**Tabla N° VII:** Resumen de métodos de análisis para cada prueba de Café Soluble Instantáneo

Prueba	Método Analítico
Humedad	Perdida por Secado
Cafeína	Espectrofotométrico UV
Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc	ASV (Cd y Pb), AAS (As, Se y Zn)
Carbohidratos en Café Soluble Instantáneo	Cromatografía de intercambio aniónico Método de detección amperométrica pulsada
Ocratoxina A	Cromatografía de Capa Fina
pH	Potenciométrico

**Tabla N° VIII:** Resumen de métodos de análisis según AOAC para Café soluble Instantáneo

Prueba	Método AOAC	
Humedad (Pérdida por secado)	968.11	30.1.19
Cafeína	979.11	30.1.12
Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc	986.15	9.1.01

**Tabla N° VIII:** Continuación

Prueba	Método AOAC	
Carbohidratos en Café Soluble (Instantáneo)	995.13	30.1.23
Ocratoxina A	975.38	49.5.02

**Prueba 1: Humedad** <sup>(i)</sup>

A. Fundamento

La muestra se somete a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra.

B. Material y Equipo

- Cápsulas de aluminio: diámetro 70 mm, altura 30 mm con cubierta ajustada.
- Desecador hermético: El CaO reincinerado es el agente desecador satisfactorio.
- Horno de vacío: Conectar a una bomba capaz de mantener el vacío parcial en el horno con presión equivalente a  $\leq 25$  mm de mercurio (3.3 kPa) y provisto con un termómetro dentro del horno de tal manera que las muestras estén cerca del bulbo. Conectar una botella con gas seco de ácido sulfúrico al horno para permitir el paso de aire seco al vacío.
- Desecador
- Estufa
- Balanza analítica

### C. Determinación

Usar la muestra directamente sin triturar. Pesar exactamente 5.0 g de muestra en una balanza analítica, en una cápsula previamente tarada a 98-100°C, enfriar en desecador y pesar junto con la tapa, al alcanzar la temperatura ambiente. Calentar en el horno, apoyar la tapa en la cápsula y calentar hasta peso constante (5.5 h) a 98-100°C a presión  $\leq 25$  mm de mercurio. Durante el calentamiento permitir corriente de aire lento en el horno. Con cuidado dejar entrar aire seco en el horno hasta llevar a presión atmosférica. Cubrir el plato, transferirlo al desecador y pesar poco después que se alcance la temperatura ambiente.

### D. Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = ([\text{g de muestra} - \text{g de muestra seca}] / \text{g muestra}) \times 100$$

## Prueba 2: Cafeína <sup>(1)</sup>

### A. Fundamento

El método espectrofotométrico mide la radiación monocromática absorbida por la cafeína causante de desplazamientos electrónicos a capas superiores, estas transiciones determinan la región del espectro en la que tiene lugar la absorción. (Aplica en café regular y descafeinado)

### B. Material y Equipo

- Espectrofotómetro ultravioleta visible
- Balanza analítica
- Baño maría
- Hot plate
- Columnas cromatográficos

### C. Reactivos

Solución estándar de Cafeína: 10, 20 y 30  $\mu\text{g}$  de cafeína/mL. Pesar exactamente 100 mg de cafeína anhidra USP en un frasco volumétrico de 100.0 mL, disolver en cloroformo y diluir a volumen con cloroformo. Diluir una alícuota de 10.0 mL de esta solución en un balón volumétrico de 100 mL con cloroformo. Diluir las siguientes alícuotas 10, 20 y 30 mL en balones volumétricos de 100.0, 100.0 y 50.0 mL respectivamente con cloroformo.

### D. Cristalería

- Beakers 100 mL y 250 mL
- Balones volumétricos 50.0 mL y 100.0 mL
- Probeta 25 mL
- Pipetas volumétricas 3.0 mL y 5.0 mL

### E. Preparación de la muestra

- Café verde y tostado: Pesar en una balanza analítica exactamente 1.0 g de muestra molida, transferir a un beaker de 100 mL, agregar 5 mL de hidróxido de amonio (1+2), y calentar sobre un baño de agua hirviendo por 2 min. Enfriar y transferir a un frasco volumétrico de 100.0 mL y diluir a volumen con agua destilada. A una alícuota de 5.0 mL de la solución turbia agregar 6 g de Celite 545 y mezclar cuidadosamente.
- Café descafeinado verde y tostado: Pesar exactamente 1 g de muestra molida. Transferir a un beaker de 100 mL, agregar 5 mL de hidróxido de amonio (1+2) y calentar sobre un baño de agua hirviendo por 2 min. Agregar 6 g de Celite 545 y mezclar cuidadosamente.
- Café soluble: Proceder como para café verde y tostado, excepto: usar 0.5 g de muestra y una alícuota de 3.0 mL.

- Café soluble descafeinado: Proceder como para café descafeinado verde y tostado, excepto: usar 0.5 g de muestra.

#### F. Preparación de la Columna.

- Columna ácida: Coloque un tapón de fibra de vidrio fino en la base del tubo de 25x250 mm. Añadir 3 mL de ácido sulfurico 4N a 3.0 g de Celite 545 y mezclar bien compactando con una espátula. Trasladar al tubo y compactar, usando presión suave hasta que sea uniforme. Coloque un tapón de fibra de vidrio pequeño por encima de la superficie.
- Columna básica: Capa I: Mezclar 3 g de Celite 545 y 2 mL de hidróxido de sodio 2N y colocar en un tubo de 25x250 mm un tapón de fibra de vidrio. Capa II: Transfer la muestra más la mezcla de Celite, en porciones de 2 g al tubo directamente sobre la capa I, compactando antes de añadir la siguiente porción de la muestra, hasta que la capa sea homogénea y compacta. Lavar y secar un beaker con aproximadamente 1 g de Celite 545, trasladar al tubo y compactar la masa uniforme. Lavar y secar el beaker con el tapón de fibra de vidrio y trasladarlo a la parte superior de la columna básica.

#### G. Determinación.

Monte la columna básica sobre la columna ácida. Pasar 150 mL de agua destilada saturada de éter de forma secuencial a través de la columna básica a la columna ácida y desechar el éter. A continuación, pasar 50 mL de agua destilada saturada de éter a través de columna ácida y desechar el éter. Colocar un balón volumétrico de 50.0 mL bajo la columna ácida. Pasar 48 mL de agua destilada saturada de éter a través de columna de ácido, lavar la punta de la columna con las primeras porciones. Diluir el contenido del balón volumétrico a volumen con agua destilada saturada de cloroformo, mezclar y leer A a 276 nm con agua destilada saturada de cloroformo como blanco,

mediante el escaneo de 350 a 250 nm. Determine A, de estándares y calcular a a 276 nm para el espectrofotómetro utilizado, y verificar de vez en cuando. Calcular el contenido de cafeína de las muestras de un promedio a.

### **Prueba 3: Arsénico, Cadmio, Plomo, Selenio y Zinc <sup>(1)</sup>**

Ver metodologías de Sal Fortificada con Yodo.

### **Prueba 4: Carbohidratos en Café Soluble Instantáneo <sup>(1)</sup>**

#### A. Fundamento

Carbohidratos Libres: La muestra de café se disuelve en agua. La solución se filtra a través del cartucho desechable C<sub>18</sub>, y luego a través de filtro de membrana de 0.2 mm. La solución filtrada se inyecta en el sistema LC. Los carbohidratos se separan en una pelicular columna de intercambio aniónico y es detectada por el detector amperométrico pulsado. La identificación y cuantificación de los carbohidratos se realiza por comparación con soluciones estándar.

Carbohidratos Totales: La muestra de café se hidroliza con ácido clorhídrico 1.0N. La solución se pasa a través de papel de filtro plegado y luego se pasa a través del cartucho de intercambio catiónico disponible en forma de plata, para neutralizar la solución y eliminar el anión cloruro. La solución neutralizada se filtra a través de filtro de membrana de 0.2 mm antes de la inyección en el sistema LC.

#### B. Material y Equipo

- Balanza analítica

- Sistema de filtración al vacío: Aspirador con dispositivo de regulación. El sistema debe incluir: frasco de pared gruesa para filtrar con cuello y cuello esmerilado de 1L, embudo con fondo de vidrio común de 300 mL, clip de aluminio para montaje, conexión con salida de vacío, portafiltro de 47 mm de diámetro, y filtros de membrana extraíbles de bajo consumo de agua de 0.2 µm porosidad y 47 mm de diámetro.
- Papel filtro: cualitativo, plegado, de filtración medio-rápida.
- Cartuchos C<sub>18</sub>: silica octadecil (10% C), cartucho de 6 mL, capacidad de mantener 500 mg de muestra, desechable, condiciones y uso de los cartuchos de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Cartuchos de catión cambiante: resina a base de estireno, en forma de plata, capacidad del cartucho de 1.8-2.0 meq, desechable. Condiciones y uso de los cartuchos de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Filtros de membrana: porosidad de 0.2 µm, 25 mm de diámetro, descartable, polipropileno.
- Baño de agua: capacidad de mantener 98°C±2°C
- Cromatógrafo Líquido (LC): libre de metales, compatible con 300 mM de NaOH con computador integrado. Condiciones de operación: fase móvil isocrática, temperatura ambiente para la columna, flujo 1.0 mL/min, solvente de post columna 300 mM de hidróxido de sodio a 0.6 mL/min, configuración del detector de acuerdo a los parámetros óptimos recomendados por el fabricante.
- Columna LC: diámetro 250x4 mm, empacada con sustrato de poliestireno divinilbenzeno (10 µm id), aglomerado con microperlas aminocuaternarias funcionalizadas con latex (350 µm de diámetro), 5% reticulado.
- Detector amperométrico pulsado: equipado con un electrodo de oro, llenar celda de referencia con 300 mM de hidróxido de sodio.

Seleccionar el rango del detector para evitar la saturación del pico mayor en el cromatograma.

- Guarda columna: 50x4 mm de diámetro, empacado con el mismo material de la columna analítica.
- Post-columna del sistema de distribución del solvente: compatible con 300 mM de hidróxido de sodio.

### C. Reactivos

Utilizar agua desmineralizada de 18 MΩ x cm en todo:

- Hidróxido de Sodio: solución acuosa 50% p/p, conteniendo una cantidad mínima de carbonato de sodio y mercurio. No agitar ni mezclar la solución antes de usar.
- Solución de ácido clorhídrico: solución estándar volumétrica de 1.0N.
- Eluente A: agua desmineralizada de 18 MΩ x cm, filtrar a través de un filtro de membrana de 0.2 mm. Desgasificar pasando helio por 20-30 minutos.
- Eluente B: 300 mM de hidróxido de sodio. Pipetear 15.6 mL hidróxido de sodio 50% a 985 mL de eluente A. Desgasificar pasando helio por 20-30 minutos. El eluente B es estable por 2 días si se guarda en una habitación con temperatura baja a la presión del helio.

*Nota:* es crítico remover todo el dióxido de carbono de los eluentes. El carbonato actúa como un fuerte compactador sobre la columna, resultando en una drástica disminución de la resolución.

Solución estándar de Carbohidratos: (1) Solución Stock estándar de carbohidratos: solución stock acuosa 1 mg/mL de arabinosa, fructosa, fucosa, galactosa, glucosa, manosa, monohidrato de ramnosa, ribosa, xilosa, sucrosa, manitol. Pesar 100 mg de cada carbohidrato con una precisión de 0.1 mg en

balones volumétricos separados, disolver con agua y diluir a volumen con agua. (2) Solución estándar de mezcla de carbohidratos: Diluir y mezclar las soluciones stock de carbohidratos para alcanzar concentraciones de carbohidratos similares a los encontrados en las soluciones muestra de café hidrolizado o no hidrolizado. Mezclar las soluciones estándar de carbohidratos. También se pueden preparar a partir de soluciones stock individuales. Pasar las soluciones estándar de carbohidratos diluidas a través de filtro de membrana de 0.2 mm antes de la inyección en una columna LC.

Nota: Si la resolución de ramnosa a partir de arabinosa es difícil lograr, no agregue ramnosa a la solución estándar mezclada.

#### D. Cristalería

- Balón de fondo redondo 250 mL
- Balones volumétricos 100.0 mL y 1000.0 mL
- Pipetas volumétricas 5.0 mL
- Probetas 50 mL y 100 mL
- Embudos de vidrios

#### E. Preparación de la muestra.

Usar el café sin moler u homogenizar:

Carbohidratos Libres: pesar en una balanza analítica 300 mg de muestra de café en un balón volumétrico de 100.0 mL. Agregar 70 mL de agua destilada y agitar hasta disolución completa. Diluir la solución a volumen. Filtrar de 5-10mL de solución a través de un filtro C<sub>18</sub>. Descartar el primer 1 mL. Pasar el filtrado a través de filtro de membrana de 0.2 mm antes de la inyección LC.

Carbohidratos Totales: pesar en una balanza analítica 300 mg de muestra de café en un balón volumétrico de 100.0 mL. Añadir 50 mL de ácido clorhídrico

1.0N y agitar. Colocar el balón en un baño de agua hirviendo durante 2.5 h. (Nota: Mantenga siempre el nivel de la solución en el frasco debajo del baño de agua. Agitar el contenido del balón manualmente durante 30 min. Enfriar a temperatura ambiente bajo el agua del grifo. Diluir la solución a 100.0 mL y filtrar a través de papel de filtro plegado. Pase 3.0 mL del filtrado a través del cartucho de intercambio de cationes. Descartar el primer 1 mL. Filtrar la solución neutralizada a través de filtro de membrana 0.2 mm antes de la inyección LC.

#### F. Determinación LC.

Inyectar volúmenes iguales de estándar (10-20 µL) y las soluciones prueba a partir de **D** en la columna de LC.

*Nota:* Los tiempos de retención y la resolución tienden a variar de columna a columna. Iniciar la secuencia de limpieza y reequilibrar sólo cuando el monosacárido pasado (ribosa) se haya eluido. Puede ser necesario realizar 2-3 inyecciones de solución estándar de carbohidratos o aumentar el tiempo de reequilibrio con el fin de lograr una buena separación de glucosa, sacarosa y xilosa. En condiciones normales los tiempos de retención aproximados de los carbohidratos son: manitol 4 min, fucosa 7 min, ramnosa 15 min, arabinosa 16 min, galactosa 22 min, glucosa 25 min, sacarosa 27 min, xilosa 30 min, manosa 32 min, fructosa 40 min y ribosa 43 min.

#### G. Cálculos

Calcular la concentración de carbohidratos en solución de la muestra como sigue:

$$\% \text{ Carbohidratos} = (R_1/R_2) \times [(C \times V) / W] \times 100$$

Dónde:  $R_1$  = respuesta de pico de carbohidrato en solución de la muestra,  $R_2$ = respuesta de pico de carbohidrato en la solución estándar de carbohidratos,  $C$ =

Concentración de carbohidratos en la solución estándar de carbohidratos en mg/mL,  $V$ = volumen de la solución de la muestra en mL,  $W$  = peso de la muestra mg. Expresar los resultados como % libre ó % total de carbohidratos libres (tal cual).

### **Prueba 5: Ocratoxina A <sup>(i)</sup>**

#### **A. Fundamento**

La toxina se extrae del suelo, de los granos de café verde con cloroformo. La ocratoxina A es atrapado en la tierra básica de diatomeas, se eliminan las interferencias con hexano y cloroformo, y la ocratoxina A se eluye con benceno-ácido acético. La ocratoxina A se determina a partir de la intensidad de fluorescencia en cromatografía de capa fina.

#### **B. Material y Equipo**

- Tubos cromatográficos.
- Aparatos para cromatografía de capa fina.
- Viales
- Embudo Büchner: de vidrio, 90 mm, equipado con papel de fibra de vidrio Reeve Ángel, o equivalente.
- Mortero y pistilo
- Balanza analítica
- Perlas de ebullición
- Baño maría
- Lámpara UV

#### **C. Reactivos.**

- Solventes: grado ACS en vidrio, ácido acético, Benceno, cloroformo y Metanol.

- Solución alcohólica de Bicarbonato de Sodio.
- Bicarbonato-mezcla de tierra de diatomeas: Añadir 25 mL de solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5% a 50 g de tierra de diatomeas lavada con ácido, y mezclar bien. Puede ser almacenada durante 2-3 semanas en contenedores adecuadamente cerrados.
- Solución estándar de Ocratoxina: 1 µg/mL
- Sílica gel para cromatografía de capa fina

#### D. Cristalería

- Erlenmeyer de 500 mL con tapón de vidrio
- Probeta de 100 mL
- Bureta de 25.0 mL

#### E. Preparación y Extracción de la muestra.

Triturar una porción de la muestra en un mortero. Pesar en la balanza analítica 25.0 mg de muestra triturada dentro de un erlenmeyer de 500 mL con tapón de vidrio. Agregar 12.5 mL de agua destilada y mezclar hasta humedecer la muestra. Agregar 125 mL de cloroformo. Agitar por 30 min con la ayuda de un agitador magnético, y filtrar con papel de 18.5 cm de fibra de vidrio en polvo o embudo a través de 9 cm de papel de fibra de vidrio, utilizando Büchner.

#### F. Columna Cromatográfica.

Colocar un tapón de lana de vidrio en el fondo del tubo cromatográfico. Pesar 6g de una mezcla de bicarbonato de sodio-tierra de diatomeas, trasladar al tubo, y compactar firmemente. Añadir 50 mL de extracto de cloroformo a la columna, y se diluye hasta que el menisco alcanza la parte superior de la columna. Lavar con 70 mL de hexano seguido de 70 mL de cloroformo, desechando los lavados. Se eluye con 100 mL de ácido acético-benceno (2+98), recogiendo lo eluido en un erlenmeyer de 125 mL. Evaporar casi hasta

sequedad en baño de vapor bajo nitrógeno y transferir cuantitativamente con  $\text{CHCl}_3$  a un vial dram 4. Evaporar bajo nitrógeno, y se añaden 500 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ -benceno (1+99). Agitar hasta disolver con agitador Vortex.

#### G. Cromatografía de Capa Fina.

Análisis Visual: Usar sílica gel apropiada para resolución de Ocratoxinas. Diluir ocratoxinas A y B con 75 mL de una mezcla recién preparada de ácido fórmico-cloroformo (1+99) y recoger en un erlenmeyer de 250 mL. Inmediatamente agregue 2 perlas de ebullición, evaporar casi hasta sequedad en baño de vapor y traspasar los residuos para un tubo de centrifuga cónico de 15 mL con cloroformo. Evaporar a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno en baño de vapor (*Nota:* la tardanza en la evaporación de ácido fórmico-cloroformo puede resultar en la pérdida de ocratoxinas), disolver en 750  $\mu\text{L}$  de ácido acético-benceno (1+99). Inyectar 3, 5, 7.5, y 10 mL. En la misma placa inyectar 10 mL del extracto superpuesto con 10 ng de cada solución estándar de ocratoxina A y B como patrón interno. También inyectar 5, 7.5, y 10 mL de solución estándar de ocratoxina A y B. Desarrollar la placa a la línea de parada solvente, por <90 min con tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico (5+4+1), tanque no saturado. Retire la placa, dejar que el solvente se evapore a temperatura ambiente, y ver en la oscuridad bajo lámparas UV de onda larga y onda corta.

Las Ocratoxinas A y B debe encontrarse en el rango de  $R_f$  de 0.4-0.8 con la ocratoxina A antes que B, típicamente a 0.65 y 0.5 respectivamente. La ocratoxina A posee mayor intensidad fluorescente bajo la luz ultravioleta de onda larga, mientras que la ocratoxina B es más brillante bajo la luz de onda corta. Examine la mancha fluorescente de la muestra que tienen valores y apariencia similar a los estándares. Comparar las intensidades de fluorescencia de la mancha de ocratoxina A de la muestra con los de las manchas del estándar y determinar si el estándar y la muestra coinciden

estrechamente, interpolar si fuera necesario. Si la concentración de la muestra está fuera del rango del estándar, concentrar o diluir el extracto de la muestra y repetir el recorrido. Calcular la concentración de ocratoxina A en mg/kg. Esprayar la placa con una solución de bicarbonato de sodio alcohólica, secar a temperatura ambiente y ver en la oscuridad bajo la luz UV de onda larga. La fluorescencia debe cambiar de color azul verdoso a azul e incrementar en intensidad. Nuevamente estimar la ocratoxina A en la muestra. En caso de desacuerdo usar la estimación obtenida antes de esprayar.

#### H. Confirmación

Rocíe la laca con solución alcohólica de bicarbonato de sodio o solución alcohólica de cloruro de aluminio (20 g cloruro de aluminio en 100 mL de alcohol) o esponga la placa a vapores de amoníaco. La fluorescencia de la ocratoxina bajo luz UV de onda larga cambia a azul brillante y el aumento de la intensidad.

### **Prueba 6: pH** <sup>(viii)</sup>

#### A. Fundamento

El pHmetro mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata /cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ión hidrógeno. El pH es la concentración de iones hidronio ( $H_3O^+$ ) presentes en la muestra.

#### B. Material y Equipo

- pHmetro
- Balanza analítica

C. Cristalería

- Beaker 100 mL
- Agitador de vidrio
- Probeta 100 mL

D. Determinación

Se hace por el método potenciométrico en una dilución de 10 mg de café soluble en 100 mL de agua.

**Prueba 7: Solubilidad en Minutos** (viii)

A. Fundamento

Determinar la solubilidad de la muestra en un tiempo determinado.

B. Material y Equipo

- Termómetro
- Agitador de vidrio
- Balanza analítica

C. Cristalería

- Beaker 100 mL
- Balón volumétrico 100 mL

D. Determinación

En agua destilada fría a  $16 \pm 2^\circ\text{C}$  de una mezcla preparada al 1.5% p/v se agita manualmente y se observa la solubilidad en tiempo, anotando la lectura.

**Tabla N° IX:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.31.03:04 para Café Soluble Instantáneo

Requisitos	En polvo		Aglomerado (granulado)		Liofilizado	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Humedad, % (m/m)	-	3.5	-	5.0	-	3.5
Cafeína, % (base seca)	2.3	-	2.3	-	2.3	-
Café soluble descafeinado % cafeína residual	-	0.3	-	0.3	-	0.3
pH de una solución al 1.5% masa/volumen de la muestra	4.9	5.3	4.9	5.3	4.9	5.3
Solubilidad <sup>(1)</sup> en minutos	-	3.0	-	3.0	-	3.0
Cobre (mg/kg)	-	20	-	20	-	20
Plomo (mg/kg)	-	1	-	1	-	1
Zinc (mg/kg)	-	50	-	50	-	50
Arsénico (mg/kg)	-	0.5	-	0.5	-	0.5
Cadmio (mg/kg)	-	0.1	-	0.1	-	0.1
Mercurio (mg/kg)	-	0.1	-	0.1	-	0.1
Glucosa total, % (m/m)	-	2.6	-	2.6	-	2.6
Fructosa libre, % (m/m)	-	1.0	-	1.0	-	1.0

Nota 1. En agua fría a  $16\pm 2^{\circ}\text{C}$  de una mezcla al 1.5% masa/volumen, con agitación manual.

**METODO DE ANALISIS PARA  
CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS  
EMBUTIDOS CRUDOS Y COCIDOS**

## **CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS – EMBUTIDOS CRUDOS Y COCIDOS**

**Norma Consultada:** NSO 67.02.13:98 Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos

### **Alcance:**

Aplica para todos los productos de carne y productos cárnicos, además de embutidos crudos y cocidos tales como: Salami, Mortadela, Salchicha, Salchichón, Chorizo, Jamón, Butifarra y Paté.

### **Pruebas Organolépticas:**

Para verificar el cumplimiento del producto con los requerimientos para su aspecto interior, se somete a observación visual el producto entero. Se realizan cortes en el producto en forma de rodajas y se comprueba su conformidad con las características organolépticas:

- **Sabor y Olor:** el producto deberá presentar sabor y olor característicos uniforme, estarán libres de manchas, coloración verduzca y decoloraciones anormales.
- **Color:** deberá presentar color característico uniforme, estará libre de manchas, coloración verduzca y decoloraciones anormales.
- **Aspecto exterior:** Los embutidos deberán presentar o no la envoltura completamente adherida, su superficie no estará húmeda ni pegajosa; no exudará líquido, no presentará enmohecimiento, a excepción de

aquellos productos en que es característico de ellos. Ciertos tipos de embutidos podrán presentar un resecamiento característico. El embutido no presentará deformación por acción mecánica y será razonablemente uniforme en tamaño y forma.

- **Aspecto interior:** Los embutidos presentarán el aspecto interior que los caracteriza, de acuerdo al tipo de producto. Ejemplos:
  - El chorizo presentará un moteado uniforme de trocitos de grasa;
  - La mortadela mostrará una distribución uniforme de trozos de grasa dura; y
  - La jamonada presentará una distribución uniforme de trozos de carne.
  
- **Consistencia:** La consistencia deberá ser la que es característica para cada embutido, no será ni muy blanda ni excesivamente firme y de cortarse el producto en rodajas, estas deberán presentar un corte nítido. El paté constituye una excepción y su consistencia deberá ser la de una pasta untable.

**Pruebas Fisicoquímicas:**

**Tabla N° X:** Resumen de métodos de análisis para cada prueba de Carne y productos Cárnicos y Embutidos Crudos y Cocidos

Prueba	Método Analítico
Humedad en Carne	Pérdida por Secado
Humedad en Carne y Productos Avícolas	Pérdida por Secado (Microondas Eléctrico)
Agua en Salchichas	Pérdida por Secado

**Tabla N° X: Continuación**

Grasa Cruda en Carne y Productos Cárnicos	Sumersión
Grasa Cruda en Carne	Extracción con Éter/Microondas, Gravimetría
Cloruro de Sodio en Carne	Volumétrico
Fósforo en Carne y Productos Cárnicos	Volumétrico
Nitrógeno en Carne	Espectrofotométrico UV
Proteína Cruda en Carne	Kjeldahl
Nitratos y Nitritos en Carne	Xilenol
N-nitrosaminas (Volátiles) de tocino frito	Método analizador de energía de aceite mineral
N-nitrosopirrolidina en Tocino Frito	Método de Columna seca- energía térmica

**Tabla N° XI: Resumen de métodos de análisis según AOAC para Carne y productos Cárnicos y Embutidos Crudos y Cocidos**

Prueba	Método AOAC	
Preparación de Muestra	983.18	39.1.01
Humedad en Carne	950.46	39.1.02
Humedad en Carne y Productos Avícolas	985.14	39.1.03
Agua (Agregada) en Salchichas	928.07	39.1.04
Grasa Cruda en Carne y Productos Cárnicos	991.36	39.1.08
Grasa (Crudo) o Extracto de Éter en Carne	960.39	39.1.05
Grasa Cruda en Carne	976.21	39.1.06
Grasa (Cruda) en Carne y Aves	985.15	39.1.07
Sal (Cloro como Cloruro de Sodio) en Carne	935.47	39.1.10
Fósforo Total en Carne	969.31	39.1.11
Fósforo en Carne y Productos Cárnicos	991.27	39.1.12
Nitrógeno en Carne	928.08	39.1.15

**Tabla N° XI: Continuación**

Proteína Cruda en Carne y Productos Cárnicos	992.15	39.1.16
Proteína Cruda en Carne	981.10	39.1.19
Nitratos y Nitritos en Carne	935.48	39.1.20
N-nitrosaminas (Volátiles) de Tocino Frito	982.22	39.1.22
N-nitrosopirrolidina en Tocino Frito	984.18	39.1.23

- **Preparación de muestra (Carne y Productos de Carne) <sup>(i)</sup>**

Carnes frescas, carnes secas, embutidos, carnes ahumadas, etc.: Separar completamente como sea posible cualquier hueso, pasar rápidamente 3 veces a través de máquina de picar alimentos con aberturas de la placa  $\leq 1/8"$  (3 mm), mezclando bien después de cada molienda y comenzar todas las determinaciones con prontitud. Si se produce cualquier retraso, enfriar la muestra para inhibir la descomposición. También puede utilizar un cortador de tazón para preparación de muestras (modelo 1/2HP, 14 pulg, 22 rpm, dos cuchillos de 3.5 pulg, 1725 rpm, Modelo 84145, Hobart Corp., 711 Pennsylvania Av., Troy, OH, 45374 o equivalente). Enfriar todas las piezas de corte antes de la preparación de cada muestra.

Precortar la muestra, hasta 2 lb, dimensión máxima de  $\leq 2$  pulg, y transferir a un tazón para su procesamiento. Incluir cualquier líquido separado. Procesar 30 seg, luego limpie la pared lateral interior y el fondo del tazón con una espátula (uso doméstico de plástico o espátula de goma con aproximadamente 2x4 pulg), reunir todo el material y transferir para hacer el cuerpo de la muestra. Continuar procesando otros 30 seg y limpiar como antes. Repita la secuencia para obtener el total de 2 min de procesamiento y 3 limpiezas. Tenga cuidado especial con ciertos tipos de carne como la carne de res molida para asegurar la distribución uniforme de grasa y tejido conectivo. En cada intervalo limpie y

reincorpore la muestra usando una espátula para eliminar la grasa de las superficies interiores del recipiente y del tejido conjuntivo alrededor de cuchillas. Si la muestra se consolida como bola por encima de las cuchillas, interrumpir el procesamiento de la muestra y presione hasta el fondo del tazón con una espátula antes de continuar.

Carnes enlatadas: Pase todo el contenido de la lata al procesador de alimentos, tazón o cortador de alimentos, como para carnes frescas.

Salchichas: Retirar las cubiertas y pasar al procesador de alimentos, tazón o cortador de alimentos, como para carnes frescas.

Secar las muestras, no es necesario realizar el análisis de inmediato, ya sea por medio de vacío <math>60^{\circ}\text{C}</math> o por evaporación en baño de vapor 2 o 3 veces con alcohol. Extraer la grasa de producto seco con éter de petróleo (punto de ebullición <math>60^{\circ}\text{C}</math>) y dejar que se evapore el éter de petróleo espontáneamente, finalmente eliminar las trazas por calentamiento de corto tiempo en baño de vapor. No calentar la muestra o grasa separada más tiempo del necesario debido a la tendencia a descomponerse. Conservar la muestra en lugar fresco para su posterior análisis.

### **Prueba 1: Humedad en Carne <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

La muestra se somete a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra.

## B. Material y Equipo

- Estufa
- Balanza analítica
- Termómetro
- Desecador
- Procesador de alimentos
- Vidrio reloj

## C. Secado al vacío a 95-100°C

Secar en estufa una cantidad de muestra que contenga aproximadamente 2.0 g de material seco a peso constante a 95-100°C bajo presión  $\leq 100$  mmHg por 5h. En los alimentos con alto contenido de melaza, use la temperatura  $\leq 70^\circ\text{C}$  y la presión  $\leq 50$  mmHg. Utilice un recipiente cubierto de aluminio de  $\geq 50$  mm de diámetro y 40 mm de profundidad. Reportar la pérdida de peso como Humedad (No se recomienda para productos de alto contenido en grasa como salchichas de cerdo).

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = ([\text{g de muestra} - \text{g de muestra seca}] / \text{g muestra}) \times 100$$

## D. Secado con aire

Sin tapadera, secar una muestra que contenga aproximadamente 2.0 g de material seco durante 16-18h a 100-102°C en estufa con aire. Utilice recipientes cubiertos de aluminio de  $\geq 50$  mm de diámetro y  $\leq 40$  mm de profundidad. Enfriar en desecador y pesar. Informe la pérdida de peso como Humedad.

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = ([\text{g de muestra} - \text{g de muestra seca}] / \text{g muestra}) \times 100$$

## **Prueba 2: Humedad en Carne y Productos Avícolas <sup>(1)</sup>**

### A. Fundamento

Se elimina la humedad (evaporando) de la muestra mediante el uso de microondas eléctrico. La pérdida de peso es determinado por lecturas en una balanza electrónica antes y después del secado y se convierte en contenido de humedad por microprocesador con lectura porcentual digital.

### B. Aparatos

- Microondas analizador de humedad: sensibilidad de 0.2 mg, rango de humedad/sólidos 0.1-99.9%, resolución de 0.01%. Incluye una tara automática en la balanza electrónica, sistema de secado de microondas y una computadora digital con control microprocesador. El platillo de la balanza electrónica es situado dentro de la cámara de secado.
- Almohadillas de fibra de vidrio: almohadillas rectangulares de 9.8x10.2 cm de fibra de vidrio (CEM Corp.), o equivalente.
- Balanza analítica

### C. Determinación

Para preparar las muestras ver "Preparación de Muestras de Carne". Colocar 2 almohadillas rectangulares de fibra de vidrio en el platillo de la balanza en la cámara de secado de microondas analizador de humedad y tarar. Retirar las placas de la cámara, rápidamente deposite uniformemente 4.0 g de muestra bien mezclada en el lado áspero de una almohadilla. Colocar la segunda almohadilla sobre la muestra y vuelva a colocar las almohadillas y la muestra

en el platillo de la balanza. Secar la muestra con las almohadillas de 3-5 min a potencia de 80-100%, dependiendo del tipo de producto. Completar el ciclo de secado del microondas, leer el porcentaje de humedad que se muestra en el panel de lectura digital. Ciertas clases de productos requieren la adición de un factor de ajuste de lectura para obtener resultados precisos, como sigue: embutidos cocidos, pre-mezclas/emulsiones, curado/carnes cocidas, factor = 0.55%.

### **Prueba 3: Agua (Agregada) en Salchichas <sup>(i)</sup>**

Procedimiento:

$$\% \text{ agua agregada} = (W - 4P) / (1 - 0.01W + 0.04P)$$

Dónde: W = % de agua y P (% Proteína) = 6.25 x %N (corregido si es necesaria para proteínas en sustancias añadidas)

*Nota:* para realizar esta prueba es necesario consultar prueba 1 (Humedad en Carne) y prueba 11 (Nitrógeno en Carnes)

### **Prueba 4: Grasa Cruda en Carne y Productos Cárnicos <sup>(i)</sup>**

Eficacia del Método:

Porcentaje de grasa 4.34%

$s_r = 0.106$ ;  $s_R = 0.112$ ;  $RSD_r = 2.44\%$ ;  $RSD_R = 2.59\%$

Porcentaje de grasa 27.29%

$s_r = 0.534$ ;  $s_R = 0.637$ ;  $RSD_r = 1.95\%$ ;  $RSD_R = 2.33\%$

Porcentaje de grasa 27.95%

$s_r = 0.648$ ;  $s_R = 0.793$ ;  $RSD_r = 2.32\%$ ;  $RSD_R = 2.84\%$

Porcentaje de grasa 34.51%

$s_r = 0.764$ ;  $s_R = 0.799$ ;  $RSD_r = 2.21\%$ ;  $RSD_R = 2.31\%$

Porcentaje de grasa 33.57%

$s_r = 0.340$ ;  $s_R = 0.516$ ;  $RSD_r = 1.01\%$ ;  $RSD_R = 1.53\%$

Porcentaje de grasa 26.20%

$s_r = 0.406$ ;  $s_R = 0.613$ ;  $RSD_r = 1.55\%$ ;  $RSD_R = 2.34\%$

#### A. Fundamento

El material soluble se extrae de las muestras secas de carne y productos de alimentos cárnicos por tratamiento de 2 pasos con el solvente éter de petróleo. El solvente se recupera por condensación, dejando extraída el material soluble que se determina por peso después del secado.

#### B. Material y Equipos

- Sistema de extracción: Capacidad de extracción simultánea de 6 muestras. La unidad de extracción por la adición de solvente a las tazas es un proceso de extracción de 2 etapas y el ciclo de recuperación de solventes. La unidad de servicio de suministro de aceite caliente pasa a través de un tubo aislado para el sistema de extracción y la bomba de aire para evaporación de las últimas trazas de solvente de las tazas.
- Hot plate
- Dedales y soporte: 26x60 mm, cartuchos de celulosa y soporte para sostener 6 dedales.
- Copas de extracción: Aluminio de 44 mm de diámetro interior, 60 mm de altura.
- Cuentas de vidrio: 3-4 mm de diámetro.
- Horno de convección mecánica: Capaz de mantener  $125 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Balanza Analítica
- Estufa

#### C. Cristalería

- Probeta de 25 mL y 50 mL
- Agitadores de vidrio

#### D. Reactivos

- Éter de petróleo: GR
- Arena: 0.004 g extraíbles/5 g
- Algodón: Desgrasado

#### E. Determinación

Pesar aproximadamente 3.0 g de muestra en un dedal. Agregar arena a la muestra y mezclar con un agitador de vidrio. Colocar el dedal en soporte y secar por 1h en horno a 125°C. Retirar del horno y dejar enfriar. Aflojar la mezcla de muestra con arena usando un agitador de vidrio. Limpiar el agitador de vidrio con una pequeña cantidad de algodón y coloque el algodón en la parte superior de dedal. Transferir el dedal a la unidad de extracción.

Pesar la taza de extracción que contiene algunas perlas de vidrio. Extraer la muestra con 40 mL de éter de petróleo hirviendo durante 25 min en hot plate y enjuagar durante 30 min. Ajustar la temperatura de la unidad de servicio para asegurar el grado de condensación  $\geq 5$  gotas/seg. Al finalizar la extracción, cierre las válvulas del condensador y recuperar el éter. Secar la taza y el contenido por 30 min en un horno a 125°C. Dejar enfriar y pesar.

#### F. Cálculo

Calcular el porcentaje de grasa en la muestra de la siguiente manera:

$$\text{Contenido de grasa \%} = [(B - C) \times 100] / A$$

Donde  $A$  = peso de la muestra,  $B$  = peso de la taza de extracción después del secado, y  $C$  = peso de la taza de extracción antes de la extracción.

### **Prueba 5: Grasa (Cruda) o Extracto de Éter en Carne <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

La muestra se extrae con éter el cual se evapora. El peso de la muestra extraída a peso constante indica la presencia o ausencia de grasa.

#### B. Material y Equipo

- Balanza analítica
- Estufa
- Condensador
- Papel filtro

#### C. Cristalería

- Agitador de vidrio
- Beaker 50 mL
- Embudo buchner
- Kitazato

#### D. Procedimiento

Pesar 3.0-4.0 g de muestra en balanza analítica tomando en cuenta que contiene una pequeña cantidad de polvo. Mezclar con agitador de vidrio y pasar a un beaker de 50 mL y secar en estufa por 6h a 100-102°C ó 1.5h a 125°C. Extraer 2 g de muestra seca con éter anhidro. Utilice un filtro con porosidad adecuada para que permita el paso rápido de éter. El período de extracción puede variar desde 4h con una condensación de 5-6 gotas hasta

16h con una condensación de 2-3 gotas. Secar el extracto a peso constante a 100°C, enfriar y pesar, ó:

Pesar 3.0-4.0 g de muestra en diferentes capsulas de aluminio pequeñas, añadir arena y mezclar, extender la mezcla en el fondo de la capsula con vidrio o una paleta de aluminio. Secar en horno por 6h a 100-102°C ó 1.5h a 125°C. En los bordes del plato insertar un dedal. Extraer 2 g de muestra seca con éter anhidro. Utilice un filtro con porosidad adecuada para que permita el paso rápido de éter. El período de extracción puede variar desde 4h con una condensación de 5-6 gotas hasta 16h con una condensación de 2-3 gotas. Secar el extracto seco hasta peso constante a 100°C, enfriar y pesar. El éter de petróleo se puede utilizar en lugar de éter anhidro, si se desea.

### **Prueba 6: Grasa Cruda en Carne <sup>(1)</sup>**

#### **A. Fundamento**

La grasa se extrae de la muestra con  $C_2Cl_4$  usando un motor con propulsión para un agitador orbital en presencia de un agente secante para absorber la humedad. El extracto se filtra y la gravedad específica del filtrado se mide a 37°C por un hidrómetro accionado magnéticamente. La lectura digital se convierte en contenido de grasa, utilizando la carta pre-calibrada.

#### **B. Material y Equipos**

- Analizador de grasa Foss Let: Incluye un agitador orbital, unidad de lectura de gravedad específica, dispensador de solvente, aceite estándar de referencia (gravedad específica a 23°C=0.915, para la revisión periódica de la calibración del potenciómetro), taza de acero con tapa y martillo de bronce de 8 mm de diámetro, dispositivo de filtración a presión y la conversión de gráfico (Foss Food Technology Corp.).

- Papel Whatman N°1 y N°50
- Balanza analítica

#### C. Reactivos

- Agente de secado: Yeso de París (disponible a nivel local a través de pintura o distribuidores de materiales de construcción), malla Drierite 8 ó  $\text{CaSO}_4$  anhidro.
- Tetracloroetileno: grado técnico (distribuido localmente a través de proveedores de dry cleaning o Fisher Scientific Co., No. C-182).

#### D. Cristalería

- Probeta 100 mL y 250 mL
- Termómetro

#### E. Determinación

Para preparar las muestras ver “Preparación de Muestras de Carne”. Comprobar la calibración del potenciómetro Foss-let a diario utilizando tetracloroetileno solo para establecer el punto cero y la mezcla de 22.5 g de aceite estándar de referencia y 120 mL de tetracloroetileno (Gravedad específica de la mezcla a  $37^\circ\text{C}=1.4763$ ) para ajustar el punto de grasa del 50% en 850.0.

Utilizando cualquier equilibrio de carga superior o de tres brazos con 0.1 g de sensibilidad, tarar el vaso de Foss-let, después de establecer el martillo de bronce sobre su eje, analizar los productos que contienen  $\leq 60\%$  de grasa, pesar 45.0 g de muestra, para los productos que contienen  $>60\%$  de grasa pesar 22.5g. Añadir aproximadamente 80.0 g de Yeso de París (o aproximadamente 60.0 g de sulfato de calcio anhidro). Vierta 120 mL de tetracloroetileno en el vaso. Presionar la cubierta sobre el beaker e instalar en

agitador orbital. Establecer al agitador el tiempo de 2 min y encender la unidad. Mientras que la extracción se produce, monte el dispositivo de filtración a presión, colocando papel de filtro perforado de 7 cm para producir un filtrado transparente sin gotas de humedad, para muestras muy húmedas, primero retener la mayor humedad en papel Whatman N°50 o equivalente, y después separar las fases en papel Whatman N°1 PS o equivalente. Después de 2 min de extracción, retire el beaker de la agitación, levante la cubierta y extraiga el martillo de cobre amarillo del vaso. Sumergir el beaker en un baño de hielo por 0.4 min mientras se agita el contenido con el termómetro hasta llegar de 47-52°C a 40°C aproximadamente. Limpie el agua de la superficie exterior del beaker y vierta el contenido en el filtro montado. Colocar el pistón en la parte superior de dispositivo de filtración y presione lentamente el extracto a través del sistema de medición. Oprima el botón de la válvula de drenaje cuando el extracto aparece en el tubo de rebose y deje de drenar, luego suelte el botón de la válvula. Repetir el llenado y vaciado 2 veces más hasta que 40-50 mL de extracto hayan fluido, conservando los últimos 10 mL de extracto en la cámara de medición. Retirar el dispositivo de filtración, deslice el lente de visión a su posición, gire el control de lectura del potenciómetro en sentido de las agujas del reloj hasta que se levante el hidrómetro y registre la lectura. Establecer que el extracto cambia la temperatura mediante la repetición de la lectura de 3-4 veces. Sacar el promedio de lecturas.

### **Prueba 7: Grasa (Cruda) en Carne y Aves <sup>(i)</sup>**

#### **A. Fundamento**

La grasa se extrae con diclorometano de una muestra pesada, por el sistema de extracción automática de microondas-muestra seca. El extracto se filtra y el residuo se vuelve a secar para eliminar cualquier resto del solvente y humedad.

El residuo resecado se pesa, la pérdida de peso debido a la extracción se convierte al porcentaje de grasa por un microprocesador con lectura digital.

#### B. Materiales y Equipos

- Extractor de solvente automático: Cerrado, autónomo, la extracción de grasa controlada termostáticamente y el sistema de recuperación de solventes con una sensibilidad de grasa de 0.5 mg y rango de medida de grasa de 0-100% (CEM Corp., PO Box 200, Matthews, NC 28106), o equivalente.
- Almohadillas de fibra de vidrio: rectangulares de 9.8×10.2 cm y redondas 11 cm (CEM Corp.) o equivalente.
- Microondas analizador de humedad: sensibilidad de 0.2 mg, rango de humedad/sólidos de 0.1-99.9%, resolución de 0.01%. Incluye tara automática en balanza electrónica, sistema de secado por microondas y un control microprocesador computarizado digital. El platillo de la balanza electrónica está situado en el interior de la cámara de secado. (Sensibilidad de la balanza: capacidad de 0.2 mg a 15 g o capacidad de 1.0 mg a 40 g [CEM Corp., o equivalente].)
- Balanza analítica

#### C. Reactivos

- Cloruro de metileno: Grado reactivo.

#### D. Determinación

Para preparar las muestras ver "Preparación de Muestras de Carne". Colocar las almohadillas de fibra de vidrio, 2 rectangulares y una redonda sobre el platillo de la balanza en el interior del microondas analizador de humedad y tarar. Retire las placas rectangulares y en forma pareja difundir 4.0 g de muestra bien mezclada en la parte áspera de una almohadilla, cubrir con la

segunda almohadilla y colocar junto con la almohadilla redonda en platillo en la balanza. Secar la muestra en las almohadillas de 3-5 min a 80-100% de potencia, dependiendo del tipo de producto. Al final del ciclo de secado, retirar la muestra seca y las almohadillas de platillo de la balanza. Doblar las pastillas rectangulares, con muestra seca, en la mitad y colocar en una cámara extractora de solvente automática. Colocar la almohadilla en un lugar empotrado en la parte superior de la cámara extractora y cerrar. Comenzar el ciclo de extracción (la muestra y las almohadillas rectangulares se mezclan en este momento con suficiente diclorometano para extraer la grasa). Después de la terminación del ciclo de extracción, remover la almohadilla redonda con los residuos y colocar en el platillo de la balanza en el microondas analizador de humedad. Resecar la almohadilla y el residuo hasta peso constante (30seg en el 80-100% de energía) para eliminar el solvente residual o humedad. La pérdida de peso debido al solvente de extracción se convierte en porcentaje de grasa por microprocesador y se muestran en el panel de lectura digital.

Ciertas clases de productos requieren la adición de factores de ajuste a la lectura para obtener resultados precisos, de la siguiente manera: las carnes frescas, pre-mezclas, emulsiones, carnes curadas/cocidas factor = 0.40, salchichas cocidas factor = 0.80.

### **Prueba 8: Sal (Cloro como Cloruro de Sodio) en Carne <sup>(1)</sup>**

#### **A. Fundamento**

Los cloruros presentes en la muestra se valoran con solución de nitrato de plata en presencia de permanganato de potasio como indicador. El punto final de la valoración está dado por la aparición de un precipitado de cromato de plata de color marrón.

## B. Materiales y Equipos

- Hot plate
- Soporte
- Pinza para bureta

## C. Reactivos

- Tiocianato de amonio 0.1N
- Éter etílico GR
- Ácido nítrico concentrado
- Permanganato de potasio acuoso concentrado
- Nitrato de plata 0.05N

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo N° 1

## D. Cristalería

- Probeta de 25 mL
- Beaker de 30 mL
- Bureta de 50.0 mL
- Erlenmeyer de 300 mL

## E. Procedimiento

Pesar en balanza analítica 2.5-3.0 g de muestra y humedecer en un erlenmeyer de 300 mL con 5.0 mL de solución de  $\text{AgNO}_3$  0.5N. Añadir 15 mL de ácido nítrico y se hervir en hot plate hasta que la carne se disuelva (10 min suelen ser suficientes). Añadir la solución acuosa concentrada de permanganato de potasio en pequeñas porciones, hirviendo después de cada adición hasta que el color del permanganato de potasio desaparezca y la solución se torne incolora o casi incolora. Añadir 25 mL de agua destilada y hervir 5 min en hot plate. Enfriar, diluir hasta aproximadamente 150 mL, añadir 25 mL de éter etílico y agitar. Valorar con una solución de tiocianato de amonio

0.1N hasta que la solución se vuelva color marrón claro permanente. Restar los mL usados de tiocianato de amonio 0.1N de los mL agregados de nitrato de plata 0.1N y calcular la diferencia como cloruro de sodio. Con 10 g de muestra cada mL de nitrato de plata 0.1N = 0.058% de cloruro de sodio.

Cálculo:

$$\% \text{ NaCl} = (V_1 - V_2) \times \text{meq cloruro de sodio} \times \text{FD} / \text{g mx}$$

Dónde:  $V_1$  = volumen en mL de tiocianato de amonio,  $V_2$  = volumen en mL de cloruro de sodio y FD = factor de dilución.

### **Prueba 9: Fosforo Total en Carne <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

El fósforo está presente en forma de fosfatos en los alimentos, reacciona con el reactivo molibdato el cual origina un compuesto de color amarillo. La cantidad de compuesto formada es directamente proporcional a la cantidad de fósforo presente en la muestra.

#### B. Materiales y Equipos

- Estufa
- Digestor Kjeldahl
- Hot plate
- Papel tornasol

#### C. Reactivos

- Fenolftaleína
- Nitrato de magnesio
- Ácido nítrico concentrado

- Acido perclórico concentrado
- Hidróxido de amonio concentrado
- Molibdato de sodio
- Acetona concentrado
- Ácido cítrico concentrado
- Quinolona

#### D. Cristalería

- Balón volumétrico 250.0 mL y 1000.0 mL
- Probetas 10 mL, 25 mL y 50 mL
- Matraz Kjeldahl 500 mL u 800 mL
- Pipetas volumétricas 5.0 mL
- Termómetro
- Vidrio reloj
- Crisol
- Filtro Gooch

#### E. Método I

Destruir la materia orgánica evaporando con 5 mL de solución de nitrato de magnesio, incinerar. Pesar en balanza analítica 2.5 g de muestra en un matraz Kjeldahl de 500-800 mL, añadir 20-30 mL de ácido nítrico y hervir suavemente 30-45 min para oxidar fácilmente toda materia oxidable. Enfriar la solución un poco y agregar 10 mL de ácido perclórico al 70-72%. Hervir suavemente, ajustar el calentamiento hasta que la solución sea casi incolora o hasta que aparezca humo blanco denso. Tener el cuidado de no hervir a sequedad en cualquier momento. Dejar enfriar un poco, añadir 50 mL de agua destilada y hervir para expulsar cualquier resto de humo de dióxido de nitrógeno. Enfriar, diluir, filtrar en un balón volumétrico de 250.0 mL, diluir a volumen y agitar fuertemente. Pipetear en un beaker una alícuota correspondiente a 0.4 g de

muestra por contenido de  $P_2O_5$  de muestra <5%, 0.2 g de 5-20%, 0.1 g por >20%. Añadir 5-10 mL de ácido nítrico, dependiendo del método de solución, agregar hidróxido de amonio hasta que se forme un precipitado que se disuelve lentamente sólo con agitación vigorosa, diluir a 75-100 mL y ajustar a 25-30°C. Si la muestra no da precipitado con hidróxido de amonio como prueba de neutralización, hacer una solución ligeramente alcalina al papel de tornasol con hidróxido de amonio y luego ligeramente ácida con ácido nítrico (1+3). Añadir 20-25 mL de solución acidificada de molibdato para el contenido en  $P_2O_5$  <5%, 30-35 mL por 5-20%, y suficiente solución acidificada de molibdato para asegurar una completa precipitación de >20%. Agitar mecánicamente 30min a temperatura ambiente, decantar a través de un filtro y lavar dos veces el precipitado por decantación con porciones de 25-30 mL de agua destilada, agitando fuertemente y permitiendo que se asiente. Transferir el precipitado al filtro y lavar con agua fría 2 veces el filtrado o hasta que el rendimiento del relleno del filtro cambie a color rosa con la adición de fenolftaleína y 1 gota de estándar alcalino. Trasladar el precipitado y el filtro al beaker, disolver el precipitado con un pequeño exceso del estándar alcalino, añadir algunas gotas de fenolftaleína y titular con estándar ácido. Reportar como % Fosforo.

#### F. Método II

Pesar en balanza analítica  $2.5 \pm 0.1$  g de muestra preparada como en "Preparación de Muestras de Carnes", en el plato de incineración (platino, Vycor, u otro material adecuado) secar por 30 min a 125°C en horno de tiro forzado. Incinerar en el horno a 550°C a blanco o blancura cercana. Enfriar, agregar 25 mL de ácido nítrico (1+4) y calentar en un baño de vapor por 30min. Filtrar cuantitativamente en un beaker de 400 mL, utilizando agua destilada para transferir. Ajustar el volumen hasta aproximadamente 100 mL y proceder de la siguiente manera:

Añadir 50 mL de reactivo quimociac (Disolver 70 g de molibdato de sodio.2H<sub>2</sub>O en 150 mL de agua destilada. Disolver 60 g de ácido cítrico en mezcla de 85 mL de ácido nítrico y 150 mL de agua destilada y enfriar. Añadir poco a poco solución de molibdato a una mezcla de ácido cítrico- ácido nítrico con agitación. Disolver 5 mL de quinolina sintética en una mezcla de 35 mL de ácido nítrico y 100 mL de agua destilada. Añadir poco a poco esta solución a la solución de molibdato-ácido cítrico- ácido nítrico, mezclar y dejar reposar 24h. Filtrar, agregar 280 mL de acetona, diluir hasta 1L con agua destilada y mezclar), cubrir con vidrio de reloj, colocar sobre un hot plate en una campana bien ventilada y hervir 1 min. Después del tratamiento se enfría a temperatura ambiente, agitar cuidadosamente 3-4 veces durante el enfriamiento, filtrar en Gooch con papel de filtro de fibra de vidrio previamente secado a 250°C y pesado, y lavar con 5 porciones de 25 mL de agua destilada. Secar en estufa el crisol y el contenido por 30 min a 250°C, enfriar en desecador a temperatura ambiente y pesar como (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>N)<sub>3</sub>H<sub>3</sub>[PO<sub>4</sub>.12MoO<sub>3</sub>]. Reste el peso del blanco reactivo. Multiplicar por 0.03207 para obtener el peso de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (ó 0.01400 para fósforo). Reportar como %P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (o %Fósforo).

#### **Prueba 10: Fósforo en Carne y Productos Cárnicos <sup>(1)</sup>**

(Aplicable a jamón ahumado, jamón con agua añadida, jamón enlatado, carne de cerdo, salchicha, salchicha cocida, y hamburguesas.)

- Método de rendimiento:

Jamón ahumado, 0.22-0.30% P

$s_r = 0.005-0.010$ ;  $s_R = 0.009-0.010$ ;  $RSD_r = 1.70-4.66\%$ ;

Jamón con agua añadida, 0.23-0.26% P

$s_r = 0.007-0.012$ ;  $s_R = 0.012-0.013$ ;  $RSD_r = 2.87-4.48\%$ ;  $RSD_R = 4.75-5.51\%$

Salchicha de cerdo, 0.10–0.13% P

$s_r = 0.004\text{--}0.005$ ;  $s_R = 0.009\text{--}0.011$ ;  $RSD_r = 3.75\text{--}3.98\%$ ;  $RSD_R = 6.88\text{--}9.87\%$

Salchicha cocida, 0.12–0.13% P

$s_r = 0.004\text{--}0.008$ ;  $s_R = 0.007\text{--}0.011$ ;  $RSD_r = 3.72\text{--}6.16\%$ ;  $RSD_R = 5.64\text{--}8.65\%$

Jamón enlatado, 0.23–0.24% P

$s_r = 0.004\text{--}0.009$ ;  $s_R = 0.012\text{--}0.013$ ;  $RSD_r = 1.82\text{--}4.06\%$ ;  $RSD_R = 5.20\text{--}5.59\%$

Hamburguesas (70–90%), 0.14–0.18% P

$s_r = 0.003\text{--}0.010$ ;  $s_R = 0.010\text{--}0.014$ ;  $RSD_r = 2.22\text{--}7.28\%$ ;  $RSD_R = 7.27\text{--}8.05\%$

#### A. Fundamento

La muestra se dispersa en agua destilada y se digiere con ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno. La digestión es completa en aproximadamente 10min. El fósforo es determinado en alícuotas diluidas de digestión en dos pasos usando 2 soluciones. En el primer paso el ortofosfato reacciona con molibdato en solución ácida para formar el complejo de fosfomolibdato amarillo. Entonces, el complejo amarillo se reduce mediante ácido ascórbico para formar especies características de azul de molibdeno, que pueden ser medidas espectrofotométricamente comparada con soluciones estándar.

#### B. Material y Equipos

- Espectrofotómetro: para operar en  $890\pm 1$  nm. Longitud de onda con repetibilidad de 0.2nm. Con vertido a través de celdas, aproximadamente 1 pulgada de longitud de trayectoria (modelo Hach DR 3000 Espectrofotómetro con Pour cell Thru [Hach Co., PO Box 389, Loveland, CO 80539] cumple con estos requisitos)
- Equipo de Digestión: Para el operar a  $470^\circ\text{C}$ . Control de temperatura dentro de  $\pm 15^\circ$  de ajuste. Calibrar el ajuste de temperatura de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Capacidad de entrega de peróxido de hidrogeno a una velocidad controlada de aproximadamente

3.5mL/min. Digestión de humos por aspiración mecánica o agua. (Hach Modelo 23130 Digesdahl, este aparato cumple estos requisitos.)

- Balanza analítica
- Agitador magnético

#### C. Reactivos

- Soluciones estándar de fósforo: Use fosfato monobásico de potasio grado ACS para preparar 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, y 25.0 mg/L de fosfato de fósforo ( $\text{PO}_4\text{-P}$ ) en una solución al 3% de ácido sulfúrico.
- Peróxido de Hidrogeno: 50% (p/p). Grado alimentario.
- Solución 1 de fósforo: contiene ácido sulfúrico, ácido ciclohexano diaminatetracético, molibdato tetrahidrato de amonio y tartrato antimoril de potasio (Hach cat. N° 22605-11)
- Solución 2 de fósforo: Contiene ácido ascórbico y dimetilsulfóxido (Cat Hach. N° 22.606-11).
- Ácido sulfúrico concentrado

#### D. Cristalería

- Vidrio reloj
- Beaker 200 mL
- Probeta 50 mL

#### E. Preparación de la muestra y la digestión

Colocar 1 pulgada de barra de teflón para agitar en un beaker Berzelius de 200mL y registrar el peso combinado como (A). Tarar la balanza. Pesar y agregar 10.0 g de muestra preparada como en “Preparación de Muestras de Carne” al beaker y registrar el peso exacto como (B). Añadir 50 mL de agua destilada a la muestra y dispersar con un agitador magnético. Con agitación, añadir 50 mL de ácido sulfúrico y cubrir el beaker con un vidrio de reloj de

65mm. Continuar revolviendo hasta la disolución de la muestra (1 min). Retirar el vidrio reloj y registrar el peso del beaker y el contenido como (C). Tarar un matraz de digestión. Dejar cualquier aumento de grasa fundida en la superficie, entonces, evitar la capa de grasa, retirar 5 mL de muestra y transferir a un matraz tarado. Registrar el peso exacto de 5 mL de muestra como (D). Añadir una perla de ebullición al matraz. Colocar un frasco de digestión precalentado a 470°C. Colocar la cabeza del frasco de fraccionamiento, encender el aspirador de agua para la eliminación de humos y calentar por 4 min. Añadir 10 mL de peróxido de hidrogeno al 50% usando un embudo. Calentar la muestra durante 1 min después que el flujo de peróxido de hidrogeno ha terminado. Retirar del calentamiento el frasco y desconectar la cabeza de fraccionamiento. Enfriar la muestra digerida y diluir a 100.0 mL con agua destilada y mezclar.

#### F. Preparación de la curva estándar

Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 890 nm. Llevar a zero el espectrofotómetro con agua desionizada (100% T). Construir la mejor línea de calibración utilizando soluciones estándar de fósforo. Pipetear 0.5 mL de cada solución estándar de fósforo por separado dentro de probetas graduadas de 25mL. Diluir cada solución a 23 mL con agua desionizada. Añadir 1.0 mL de solución 1 de fósforo y agregar 1.0 mL solución 2 de fósforo a cada estándar. Invertir los cilindros varias veces para homogenizar la mezcla (Diluidor/dispensador modelo Hach 42800-03 puede ser usado para la dilución de la muestra y las adiciones de reactivos). Reposar las soluciones por 3 min, pero 10 min antes de la medición. Basado sobre 10 g de muestra esta serie de estándares representan 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0% de Fósforo, respectivamente. Registrar las lecturas %T para los estándares y construir la curva de calibración de %T vs %P en 1 ciclo, en papel semilogarítmico con división 70 (si se utiliza el espectrofotómetro DR/3000 HACH ingresar las líneas de calibración directamente en el instrumento de acuerdo a instrucciones

del fabricante). La curva es lineal en todo el rango de los estándares especificados. Calibrar con cada nuevo lote de reactivos.

#### G. Determinación

Desarrollar el color en la muestra digerida como compendio de las normas. Lea %T de las muestras y comparar con la curva de los estándares. (Para cada espectrofotómetro lea % Fósforo aparente directamente desde la pantalla del instrumento). Realizar el cálculo de la siguiente manera:

$$\% \text{ Fósforo real} = [0.25 \times \% \text{ Fósforo aparente} \times (C - A)] / (B \times D)$$

### **Prueba 11: Nitrógeno en Carne** <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

La muestra se digiere en ácido sulfúrico, usando un catalizador, convirtiendo el nitrógeno en amoníaco el cual es destilado y titulado.

#### B. Aparatos y Equipos

- Balanza analítica
- Hot plate
- Digestor Kjeldahl
- Destilador Kjeldahl
- Soporte metálico
- Pinza para bureta

#### C. Reactivos.

- Catalizador Kjeldahl: 15 g de sulfato de potasio + 0.7 g de óxido mercurio (catalizadores comerciales preparados están disponibles que contienen piedra pómez, si se desea).

- Ácido sulfúrico: ACS.
- Solución de hidróxido de sodio: Preparar 1200 mL de hidróxido de sodio (1+1). Deje reposar hasta que se aclare (10 días).
- Zinc metálico: Polvo, ACS, que se utilizará si el catalizador no contiene piedra pómez.
- Solución indicadora: Fleisher-Metil Purple, o equivalente.
- Ftalato ácido de potasio: NIST.
- Solución estándar de hidróxido de sodio:  $0.2000 \pm 0.0004$  N. Añadir 108 mL hidróxido de sodio (1+1) a agua libre de dióxido de carbono y diluir hasta 10L. Estandarizar contra ácido ftalato de potasio, utilizando fenolftaleína como indicador.
- Solución ácida estándar:  $0.2000 \pm 0.0004$  N. Preparar solución de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.
- Ácido clorhídrico: Diluir 178 mL de ácido clorhídrico 35-37% a 10L. Estandarizar contra solución estándar de hidróxido de sodio y ajustar.
- Ácido sulfúrico: Diluir 55 mL de ácido sulfúrico 98% a 10L. Estandarizar frente a una solución estándar de hidróxido de sodio y ajustar.
- Hidróxido de sodio-Solución de tiosulfato de sodio: Disolver 460 g de tiosulfato de sodio en agua destilada, diluir a 1L con agua y añadir esta solución a 15.250 g de hidróxido de sodio disuelto en 14.25 mL de agua destilada. Esto dará 20L de solución de hidróxido de sodio al 50% (peso/volumen). Si otros volúmenes se desean, ajustar los pesos de hidróxido de sodio y tiosulfato de sodio respectivamente. La gravedad específica de la solución final debe ser 1.45. 40 g de sulfato de potasio o sulfato de sodio por litro de solución final que puede ser utilizado en lugar de tiosulfato de sodio. *Nota:* preparar un exceso para precipitar mercurio residual.

Estandarizar cada solución estándar con el patrón primario (ver anexo 1 y certificado del proveedor) y comprobar el uno contra el otro. Analizar todos los reactivos antes de usar por determinación con blanco con 2 g de azúcar, lo que garantiza una reducción parcial de cualquier nitrato presente y proporciona materia orgánica para asegurar los requisitos ácidos y características de digestión similares a los encontrados en los estándares de carnes.

#### D. Cristalería

- Balón de digestión
- Probeta 10 mL y 50 mL
- Bureta 50.0 mL
- Erlenmeyer 250 mL

#### E. Determinación

Pesar en balanza analítica 2.0-2.2 g de muestra en un matraz de digestión. Añadir 0.7 g de óxido de mercurio ó 0.65 g de mercurio metálico, 15g de polvo sulfato de potasio o sulfato de sodio anhidro y 40mL de ácido sulfúrico. Si se utiliza la muestra >2.2 g aumentar 10 mL de ácido sulfúrico por cada gramo de muestra. Colocar el frasco en posición inclinada y calentar en hot plate suavemente hasta que cese la formación de espuma (si es necesario agregue una pequeña cantidad de parafina para reducir la formación de espuma), hervir vigorosamente hasta que la solución sea clara y a continuación 30 min más (2h para muestras que contienen material orgánico). Enfriar, agregar aproximadamente 200mL de agua destilada, enfriar a <25°C, añadir 25mL de solución de sulfuro de tiosulfato y mezclar hasta precipitar el mercurio. Añadir algunos gránulos de zinc para regular la ebullición, inclinar el frasco y añadir capas de hidróxido de sodio sin agitación (por cada 10 mL de ácido sulfúrico usado, o su equivalente en ácido sulfúrico diluido, agregar 15 g de hidróxido de sodio sólido o una solución suficiente para hacer el contenido

fuertemente alcalino) (la solución de tiosulfato o sulfuro puede ser mezclado con la solución de hidróxido de sodio antes de la adición al matraz). Inmediatamente conectar el matraz al bulbo de destilación en el condensador y, con la punta del condensador inmersa en ácido estándar y 5-7 gotas de indicador receptor, gire el matraz para mezclar el contenido fuertemente y luego calentar hasta que todo el amoníaco haya destilado (150 mL de destilado). Quite el receptor, lave la punta del condensador, y valorar el exceso del estándar ácido en el destilado con la solución estándar de hidróxido de sodio. Corregir la determinación de blancos. Cálculos:

$$\% N = [(\text{ácido estándar mL} \times N_a) - (\text{hidróxido de sodio mL} \times N_n)] \times 1.4007/\text{g mx}$$

Dónde:  $N_a$  = normalidad del ácido y  $N_n$  = normalidad del hidróxido de sodio

### **Alternativa II (catalizador a base de cobre)**

- Eficacia del método:

Carne molida (valor medio de proteínas = 17%)

$s_r = 0.22$ ;  $s_R = 0.26$ ;  $RSD_r = 1.30\%$ ;  $RSD_R = 1.51\%$

Jamón enlatado (valor medio de proteínas = 18%)

$s_r = 0.23$ ;  $s_R = 0.27$ ;  $RSD_r = 1.27\%$ ;  $RSD_R = 1.48\%$

Jamón ahumado (valor medio de proteínas = 15%)

$S_r = 0.20$ ;  $s_R = 0.24$ ;  $RSD_r = 1.36\%$ ;  $RSD_R = 1.58\%$

Salchicha de cerdo (valor medio de proteína = 10,5%)

$s_r = 0.16$ ;  $s_R = 0.19$ ;  $RSD_r = 1.54\%$ ;  $RSD_R = 1.80\%$

Embutidos cocidos (valor medio de proteínas = 12%)

$s_r = 0.18$ ;  $s_R = 0.21$ ;  $RSD_r = 1.47\%$ ;  $RSD_R = 1.72\%$

Jamón curado seco (valor medio de proteínas = 23%)

$s_r = 0.28$ ;  $s_R = 0.31$ ;  $RSD_r = 1.16\%$ ;  $RSD_R = 1.36\%$

(*Precaución:* al contacto con ácido sulfúrico concentrado hirviendo que se utiliza durante la digestión o hidróxido de sodio concentrado hirviendo que se utiliza durante destilación, puede resultar en un daño permanente, usar guantes, gafas de seguridad y bata de laboratorio. Además, el ácido sulfúrico se transforma en vapores de óxido de azufre que son tóxicos y típicamente causan irritación respiratoria severa. Llevar a cabo la digestión en el aparato Kjeldahl diseñado para contener y eliminar los humos. Después de la digestión, y dejar que los matraces Kjeldahl se enfríen a temperatura ambiente antes de la extracción)

#### F. Fundamento

La muestra se digiere en ácido sulfúrico, usando sulfato de cobre como catalizador, convirtiendo el nitrógeno en amoníaco el cual es destilado y titulado.

#### G. Material y reactivos

Ver **B**, excepto un catalizador cúprico se utiliza en lugar de catalizador de mercurio.

Catalizador de cobre: Preparar usando 15.0 g de sulfato de potasio y 0.45 g de sulfato de cobre. Como ayuda en la ebullición, se puede añadir 0.1g de piedra pómez.

#### H. Preparación de muestras

Ver "Preparación de Muestras de Carne"

#### I. Determinación

Ver **E**, excepto en el apartado 1, después de la solución limpia, hervir 45 min más (2h para muestras que contienen material orgánico).

## J. Cálculos

Alternativa II produce resultados que son, en promedio, 99.0% de los resultados de alternativa I.

### **Prueba 12: Proteína Cruda en Carne y Productos Cárnicos** <sup>(i)</sup>

(Solo se aplica a la carne y los productos cárnicos [incluidos los alimentos para mascotas] con 10-20% de proteína cruda)

- Eficacia del método:

$s_r = 0.12-0.41$ ;  $s_R = 0.18-0.46$ ;  $RSD_r = 0.60-2.23\%$ ;  $RSD_R = 1.32-3.35\%$

#### A. Fundamento

El método de combustión determina el nitrógeno liberado a alta temperatura en oxígeno puro y medido por conductividad térmica. El nitrógeno se convierte en equivalente de proteína mediante el uso apropiado del factor 6.25 para los productos cárnicos y carne, incluyendo los alimentos para mascotas.

#### B. Materiales y Equipos

*Nota:* Las recomendaciones del fabricante deben seguirse para asegurar el funcionamiento preciso de los instrumentos. Para las precauciones adecuadas en el manejo de gases comprimidos con los instrumentos de laboratorio ver los libros de seguridad en el laboratorio.

- Instrumentos de combustión: Apropriado para la detección de 1-5% de Nitrógeno (proteína 5-30%) en productos de carne y productos cárnicos, con una precisión de  $\pm 0.15\%$  del contenido teórico de nitrógeno en el estándar y es repetible con desviación estándar de  $\leq 0.15$  para 10 determinaciones sucesivas sobre el mismo estándar. El instrumento es

capaz de analizar una sola muestra de al menos 200 mg (para reducir el impacto de la no homogeneidad de la carne y los productos cárnicos). El instrumento está compuesto de un horno capaz de funcionar a  $\geq 85^{\circ}\text{C}$  en oxígeno puro (para la liberación completa de nitrógeno a partir de las muestras), para aislar el nitrógeno de los otros productos de la combustión (es decir dióxido de carbono y agua) para la cuantificación siguiente y capaz de medir la conductividad térmica de nitrógeno (Leco # FP 428, Leco Corp., 3000 Lakeview Ave, San Joseph, MI, o Macro-N Analyzer, Foss Hereaus Analysensysteme GmbH, Hanau 1, Alemania PE2410, o Perkin-Elmer Corp., Norwalk, TC es adecuada). Las calibraciones, requeridas por la mayoría de los instrumentos, debe llevarse a cabo mediante el uso de un porcentaje teórico de nitrógeno puro de un estándar primario de compuestos orgánicos, tales como EDTA.

- Triturador de Alimentos: Con un plato de 1/8"(o menos), capaz de moler muestras de carne.

### C. Reactivos

Los siguientes reactivos son comunes, pero pueden variar dependiendo el instrumento. Consulte las instrucciones del fabricante para las especificaciones del instrumento.

- Gas de oxígeno: 99.99%.
- Gas helio comprimido: 99.99%.
- Dióxido de carbono comprimido: 99.99%.
- Gas inerte comprimido: Nitrógeno, o equivalente, libre de aceite y agua.
- Estándar de nitrógeno: ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 9.59% de nitrógeno, u otro material orgánico adecuado de alto pureza y contenido de nitrógeno conocido (por ejemplo: ácido nicotínico, lisina clorhidrato).

- Lana de cuarzo.
- Lana de vidrio.
- Pellets de óxido de aluminio.
- Perclorato de magnesio anhidro ( $\text{MgClO}_4$ ).
- Hidróxido de sodio en soporte de silicato.
- Tungstato de plata sobre dióxido de magnesio.
- Tiras de cobre.
- Virutas de metal de cobre.
- Hojas de aluminio para los vasos de combustión
- Vanadato de plata.
- Óxido de cobre.
- Tazas o cápsulas de combustión de estaño.

#### D. Preparación de la Muestra

Pasar la muestras a través de un molino 2x en sucesión para productos emulsificados de carne, mezclando bien después de cada trituración, 3x en la sucesión para productos no emulsificados (músculo grueso o conjunto).

#### E. Determinación

Establezca los parámetros de funcionamiento del instrumento (temperatura del horno, fluidez del oxígeno, los valores de calibración, etc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Permitir al horno y al instrumento alcanzar la temperatura de funcionamiento y de estabilización. El tiempo de calentamiento puede ser de 6h desde el arranque en frío. Establecer el sistema de blancos para el análisis y calibrar los blancos si es necesario. Se recomiendan al menos 5 análisis de blanco. Calibrar el instrumento mediante el uso de 3-5 análisis de estándar de nitrógeno como siguiente:

Pesar exactamente 50.0-150.0 mg de EDTA o una cantidad equivalente de nitrógeno si se utiliza otro estándar de nitrógeno, en el vaso de combustión tarado o papel de aluminio y la copa/lámina de transferencia para abrir carga puerto en el instrumento. Entrar o registrar el factor de conversión de proteínas requerida, en su caso para el instrumento utilizado. Cerca del puerto, mover la muestra en el horno, y comenzar el análisis. Cuando el análisis haya finalizado (3-5 min), la secuencia de repetición para la siguiente muestra. Ajustar el instrumento con las bases necesarias para los resultados del estándar de nitrógeno. Analizar las muestras y leer los resultados de nitrógeno directamente del instrumento.

F. Cálculo:

$$\% \text{ Proteína bruta} = \% \text{ de nitrógeno} \times 6.25$$

### **Prueba 13: Proteína Cruda en Carne <sup>(i)</sup>**

A. Fundamento

El tratamiento con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador y su posterior ebullición, convierte el nitrógeno orgánico en ión amonio que luego es titulado con una solución ácida.

B. Material y Equipos

- Bloque de Digestión y cristalería asociada: Tecator DS-6 o DS-20 (Tecator), o equivalente.
- Unidad de Destilación y cristalería asociada: Kjeltex 1003 (Tecator), o su equivalente.
- Balanza analítica
- Papel whatman N°541

### C. Reactivos

- Pastillas catalizadoras: Con un contenido 3.5 g de sulfato de potasio y 0.175 g de óxido de mercurio (Kjeltabs "MT" de Tecator disponible, Inc., 2875C Towerview Rd, Herndon, VA 22071, o equivalente).
- Solución de ácido bórico: 4%. Disolver 4 g de ácido bórico en agua destilada conteniendo 0.7 mL de solución alcohólica al 0.1% de rojo de metilo y 1.0 mL de 0.1% solución alcohólica de verde bromocresol, y diluir hasta 100 mL con agua destilada.
- Solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio: Disolver 2.0 g de hidróxido de sodio y 125 g de tiosulfato de sodio en agua destilada y diluido a 5L (50 mL se utiliza según el análisis).
- Solución estándar de ácido clorhídrico: 0.2N
- Peróxido de hidrógeno: 30-35%.
- Ácido sulfúrico: Concentrado.

### D. Cristalería

- Tubos de digestión 250 mL
- Probeta 25 mL y 100 mL
- Bureta 50.0 mL
- Erlenmeyer 250 mL

### E. Determinación

Pesar en balanza analítica 2.0 g de muestra bien molida y mezclada en 7 cm de papel filtro sin nitrógeno (por ejemplo, Whatman N°541), doblar y transferir a un tubo de digestión de 250 mL. Coloque los tubos en una campana de extracción y añadir 2 o 3 perlas de ebullición, 2 tabletas de catalizador, 15 mL de ácido sulfúrico y lentamente 3 mL de peróxido de hidrógeno 30-35%. Dejar que la reacción disminuya y colocar los tubos en el bloque digestor precalentado a 410°C. (El digestor debe ser colocado en un receptor de humos

de ácido perclórico o ser equipado con un sistema de escape. El ácido concentrado en ebullición es muy corrosivo y también emite vapores corrosivos. La adición rápida de peróxido de hidrógeno 30-35% puede causar que la reacción se vuelva violenta). Digerir a 410°C hasta que la mezcla es clara, cerca de 45 min. Retirar los tubos y dejar enfriar por 10 min. No permita la formación de precipitado, si se forma un precipitado, recaliente. Añadir con cuidado 50 a 75 mL de agua destilada.

Coloque la solución de hidróxido de sodio-tiosulfato de sodio en el tanque de álcali del equipo de destilación de vapor. Asegúrese de que 50-75 mL se dispensen desde la unidad antes de conducir la destilación. Fije el tubo de digestión que contiene la digestión diluida a la unidad de destilación. Coloque el tubo de recepción de 250 mL que contiene 25 mL de solución de ácido bórico con una mezcla de indicadores sobre la plataforma de recepción, con un tubo desde el condensador extendido hasta la superficie de absorción. Colectar el vapor destilado hasta 100-125 mL (la solución absorbente se convierte en verde cuando el amoníaco es liberado). Retire el tubo de digestión y el frasco receptor de la unidad.

Valorar la solución absorbente con ácido clorhídrico 0.2N hasta el punto final gris neutro y recoger el volumen de ácido requerido para 0.01 mL. Valorar un blanco de reactivo de manera similar.

#### F. Cálculos

$$\% N = (V_A - V_B) \times 1.4007 \times N/g \text{ de muestra}$$

$$\% \text{ Proteína} = (V_A - V_B) \times 1.4007 \times N \times 6.25/g \text{ de muestra}$$

Dónde:  $V_A$  y  $V_B$  = volumen de estándar ácido requerido para la muestra y el blanco, respectivamente; 1.4007 = peso en miliequivalentes  $N \times 100$  (%),  $N$  = Normalidad del ácido estándar y 6.25 = factor de la proteína de productos cárnicos (16% N)

#### **Prueba 14: Nitratos y Nitritos en Carne** <sup>(i)</sup>

##### A. Fundamento

Este método de análisis se basa en la reacción del analito en medio ácido para formar una sal que acoplada a aminas aromáticas produce un colorante azo. Esta reacción de color es monitoreada por espectrofotometría ultravioleta.

##### B. Materiales y Equipos

- Aparato de destilación simple, incluyendo un bulbo de destilación. Tipo de condensador de vidrio delgado, en el que fluye rápidamente el agua. Se recomienda el medio de refrigeración (tipo West).
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro UV

##### C. Reactivos

- m-Xilenol: 2,4-Dimetilfenol. Eastman Kodak Co. N° 1150, o equivalente.
- Solución de plata-hidróxido de amonio: Se disuelven 5g de nitrato libre de sulfato de plata en 60mL hidróxido de amonio. Calentar a ebullición, se concentra hasta aproximadamente 30 mL, enfriar y diluir a 100 mL con agua destilada.
- Indicador verde de bromocresol: Se disuelven 0.1 g de verde de bromocresol en 1.5 mL de hidróxido de sodio 0.1N, y diluir hasta 100 mL con agua destilada.

- Solución estándar de nitrato: Disolver 0.1805 g de nitrato de potasio recristalizado en agua destilada y diluir a 1L, o diluir 17.85 mL de ácido nítrico 0.1N a 1L, 10mL contienen 0.25 mg de nitrato N.

#### D. Cristalería

- Mortero y Pistilo
- Balón volumétrico 100.0 mL y 50.0 mL
- Bureta 50.0 mL
- Pipetas volumétricas 1.0 mL y 10.0 mL
- Erlenmeyer 500 mL
- Probeta 100 mL

#### E. Determinación

Pesar en balanza analítica 5.0-10.0 g de muestra finamente triturada y completamente mezclada con 80 mL de agua destilada caliente. Romper todos los grumos y calentar en el baño de vapor por 1h, mezclando ocasionalmente. Transferir a un balón volumétrico de 100.0 mL, enfriar, diluir a volumen y mezclar. Filtrar, dejar reposar y pipetear 40 mL de filtrado o líquido sobrenadante en un balón volumétrico de 50.0 mL (no es necesario corregir el volumen ocupado por la carne). Añadir 3 gotas de indicador verde de bromocresol. Añadir ácido sulfúrico (1+10) gota a gota hasta que el color cambie a amarillo. Oxidar nitritos a nitratos mediante la adición de solución permanganato de potasio 0.2N con agitación constante hasta la aparición de un color rosado pálido que dure aproximadamente 1 min. Añadir 1 mL de ácido sulfúrico (1+10) y 1 mL de solución de ácido fosfotungsténico (20 g/100 mL). Diluir a volumen, mezclar y filtrar. En un erlenmeyer de 500 mL medir una alícuota de 20.0 mL que contenga 0.025-0.25 mg de nitrato N (si se necesitan >20 mL hacer la solución ligeramente alcalina y concentrar por evaporación). Agregar suficiente solución de plata-hidróxido de amonio para precipitar todos

los cloruros y la mayoría del exceso de ácido fosfotungsténico (un ligero exceso de reactivo plata no es perjudicial, 1 ó 2 mL suelen ser suficientes). Sin decantación o filtrado, añadir un volumen de ácido sulfúrico (3+1) aproximadamente 3 veces el volumen de líquido en el erlenmeyer. Tapar el matraz, mezclar, enfriar a 35°C, añadir 0.05 mL (1-2 gotas) de la m-xilenol, tapar, agitar y mantener 30 min a 30-40°C (cuando aparece un color amarillo a café amarillo es indicativo de nitratos. Un precipitado de color rojo brillante es debido a la eliminación incompleta de ácido fosfotungsténico que también puede aparecer. Un leve exceso de ácido fosfotungsténico no causa interferencias, pero un exceso si puede).

Después de que la nitración es completa, agregar 150 mL de agua destilada, teniendo cuidado de lavar el tapón y destilar 40-50 mL dentro del recipiente que contiene 5 mL de hidróxido de sodio (10 g/L). Quite rápidamente cualquier nitroxilenol solidificado en el condensador, deteniendo el flujo de agua destilada y dejar que el condensador se caliente. Transferir el destilado a un matraz volumétrico de 100.0 mL, diluir a volumen con agua destilada, y determinar el nitrato N mediante la comparación de la lectura del color de la alícuota adecuada con la curva estándar preparada a aproximadamente 450nm. Preparar una solución estándar de color a partir de 10 mL de solución estándar de nitrato, utilizando 0.05 mL de m-xilenol y 30mL de ácido sulfúrico (3+1) y diluir el destilado a 500.0 mL. Leer en un espectrofotómetro UV.

#### **Prueba 15: N-nitrosaminas (Volátiles) de Tocino Frito <sup>(1)</sup>**

*(Precaución: Se debe tener mucho cuidado al manejar nitrosaminas o soluciones de nitrosaminas. Estos compuestos se reportan por su alto potencial carcinógeno)*

## A. Fundamento

La determinación de nitrosaminas se caracteriza por procesos de extracción y concentración más complejos y caracterización final por técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En estas determinaciones se evalúan niveles mucho más bajos que los descritos para los nitratos y nitritos, siendo normales valores del orden de  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento o inferiores.

## B. Material y Equipos

Limpiar a fondo toda la cristalería y enjuague con diclorometano antes de su uso.

- Adaptador: Kontes Glass Co. N° 183000 con cono estándar 24/40 de interior unido en la parte inferior de un anillo cónico estándar "O" de 18/9 (Kontes Glass Co. N° 671.300, o su equivalente).
- Bomba de vacío: desplazamiento de aire libre de 25L/min, Welch Duo Seal 1400 B (Fisher Scientific Co. N° 1-096), o su equivalente.
- Tubo de vacío: 5/16 Pulgadas (Fisher Scientific Co. N° 74-175D).
- Controlador de vacío: tipo cartesiano (ColeParmerInstrument Co., 7425 N. Oak Park, PO Box 48898, Niles, IL 60714, N° C-909-00), o su equivalente.
- Manta de calefacción
- Trampas de vapor: Thomas Scientific N° 9466-R75, o equivalente, equipado con rotulas de anillo "O" talla 18/9 (Kontes Glass Co. N° 671 500, o equivalente).
- Indicador de McLeod: Blindado (Cole Parmer Instrument Co. N° C-903-00), o su equivalente.
- Funda calefactora: 500 mL (Kontes Glass Co. N° 726000, o equivalente).
- Cinta de calefacción: Doble elemento, tipo 12, ½ pulg de ancho x 2 pies de largo (Kontes Glass Co. N° 729500, o equivalente).

- Frasco de Dewar: 350 mm de profundidad x 110 mm de diámetro (Kontes Glass Co. N° 611 785, o equivalente).
- Toma de laboratorio: LabLift (FisherScientific Co.N° 14-673-10), o equivalente.
- Autotransformador: encendido tipo 3PN117B (Thomas Scientific, N°9461-F-15), o su equivalente.
- Embudo: Büchner de 60 mL, disco sinterizado de porosidad gruesa (Kontes Glass Co. N° 955 000, o equivalente).
- Concentrador de evaporación: Kuderna-Danés (KD), 250 mL articulación cónica superior estándar 24/40, articulación cónica inferior estándar 19/22 (Kontes Glass Co. N° 850 500, o equivalente).
- Tubo concentrador: tamaño 425, articulación cónica superior estándar 19/22, 4 mL (Kontes Glass Co. Cat. N° 570050), articulación cónica inferior estándar 19/22 (850,500).
- Columna de Destilación: Snyder, con articulación cónica superior estándar de 24/40, 3 secciones, tamaño 121 (Kontes Glass Co. N° 503000, o equivalente).
- Equipo de Concentración: N-EVAP con baño de agua N° A11151, agujas cubiertas de teflón N° 10603, y termómetro N° 1111 (Organomation Associates, Inc., 266 River Road West, Berlín, MA 01530-1600) o su equivalente.
- Cromatógrafo de gases: Con enfriamiento automático, programador de temperatura, programador de temperatura del puerto de inyección, apertura de puerta automática, revestimiento de vidrio en línea de transferencia calentada de cromatógrafo de gases hacia TEA, el sistema de doble columna, con la diferencia de caudales de controladores, manómetros y rotómetros; grabadora R 11M, sola pluma, 1mV escala completa, o equivalente (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., 7012 Riverwood Rd, Columbia, MD 21046).

- Columna de vidrio de 2.5mm×3.0 mm de diámetro (5.0 mm od) rellena con una malla 100-120 Analab AB (Analabs, Inc.), recubierta con 10% de Carbowax 20M y 5% de hidróxido de potasio. Para preparar embalaje, disolver 5.0 g de Carbowax 20M y 2.5 g de hidróxido de potasio en 100 mL de metanol contenido en un matraz de fondo redondo de 500 mL, cuello estándar cónico de 24/40. Agregue lentamente 42.5 g de Anakrom AB, 100-120 de malla, agite el frasco suavemente. Coloque el frasco sobre el evaporador rotatorio por 5 min. Aplicar vacío lentamente primero y luego aumentar hasta aproximadamente 26 mm de mercurio con la formación de espuma o burbujas.

Permitir que el soporte gire hasta que todo el alcohol metílico se haya extraído como indica el volteo de apoyo. Suelte lentamente el vacío y mover el matraz del sistema. Coloque el matraz del soporte en un horno de convección por gravedad a 100°C para eliminar las trazas de metanol. Transferir el soporte recubierto con tapa de rosca hasta su uso. La columna se empaca con la adición incremental al vacío la luz mientras golpea suavemente con una varilla. Cuando está lleno, inserte los tapones de lana de vidrio en los extremos. Las condiciones de empacado de la columna, no desconectar la línea de transferencia de calor por 24h a 225°C con un portador de 40 mL de gas N<sub>2</sub>/min. Condiciones: inyector 185°C, columna isotérmica 165°C, línea de interface del cromatógrafo de gases hacia TEA con 230°, portador de gas nitrógeno a 40 mL/min.

Parámetros de operación: registrador de respuesta debe ser >10% para 1.5ng de N-nitrosopirrolidina. Resolución (*R*) entre N-nitrosopiperidina y N-nitrosopirrolidina no debe ser <0.8 cuando se calcula como sigue:

$$R = (T_2 - T_1) / \frac{1}{2} (W_1 + W_2)$$

Donde  $T_1$  y  $T_2$  = Tiempos de retención (mm) de N-nitrosopiperidina y N-nitrosopirrolidina,  $W_1$  y  $W_2$  = Anchura del pico a la base (mm) de N-nitrosopiperidina y N-nitrosopirrolidina.

- Analizador de energía térmica (TEA): Modelo 502 (Thermo Electron Corp., 115 Second Ave, Waltham, MA02154). Operar conforme a las instrucciones del fabricante, salvo el uso de nitrógeno como trampa refrigerante.

#### C. Reactivos.

- Aceite de parafina: pesada, viscosidad Saybolt 335/350, grado de laboratorio (Fisher Scientific Co. N° 0-120, o equivalente).
- Diclorometano: Destilado en vidrio (Burdick & Jackson Laboratorios, Inc., o su equivalente). Concentrar 100 mL de cada lote a 1.0mL y comprobar interferencias correspondientes al sistema de GC/TEA.
- Sulfato de sodio: Anhidro (Mallinckrodt especiales Chemical Company, o equivalente).
- Carborundo: gránulos N° 12 (Thomas Científica N° 1590-D33, o equivalente).
- Mezcla de estándar de referencia N-nitrosamina: solución estándar de 5µg por cada mL de isooctano: N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodipropilamina (NDPA), N-nitrosodibutilamina (NDBA), N-nitrosopiperidina (NPIP), N-nitrosopirrolidina (NPYR) y N-nitrosomorfolina (NMOR) (Repositorio químico Midwest Research Institute, 425 Volker Blvd, Kansas City, MO 64110).

- Mezcla de solución estándar de trabajo: 0.25µg de cada nitrosamina/mL. Diluir la solución madre 1:20 con diclorometano.
- Solución estándar interno N-Nitrosodipropilamina (NDPA): Stock solución: 5 mg/mL de isooctane (Midwest Research Institute, 425 Volker Blvd, Kansas City, MO 64110). Solución estándar de trabajo: 0.5µg/mL. Diluir la solución madre 1:10 con diclorometano. Usar la solución como estándar interno.
- Metanol GR
- Hidróxido de sodio 0.2N
- Aceite mineral GR

#### D. Cristalería

- Matraz de ebullición: 500 mL con termómetro y cuello cónico estándar de 24/40.
- Termómetro: 75 mm de inmersión, -20°C hasta 150°±1°C de subdivisiones (Fisher Scientific Co. N°14-585-5C, o equivalente).
- Pipetas volumétricas 2 mL, 10 mL y 25 mL

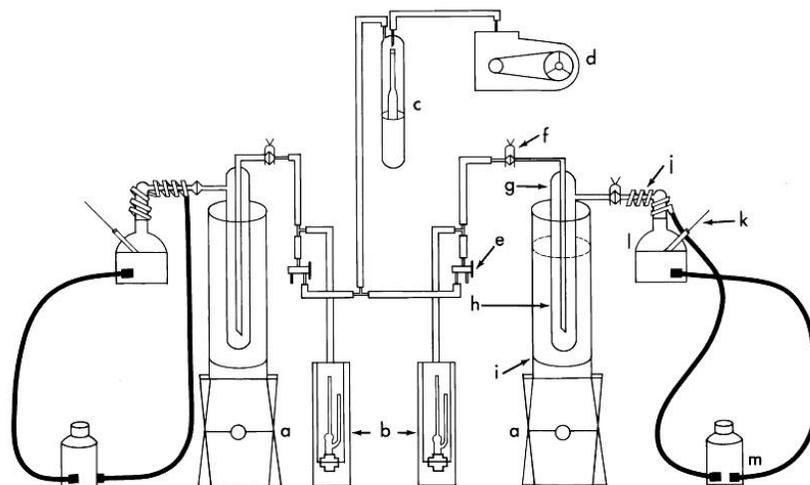
#### E. Preparación de la muestra

Refrigere el tocino frito en un congelador a -18°C durante la noche o en hielo seco. Moler la muestra congelada a través de un plato de 3/8 pulg, mezclar bien, añadir la muestra a través de una molidora por segunda vez y repetir la mezcla. Almacene la muestra en un congelador a -18°C hasta su análisis.

#### F. Destilación

Montar el aparato como en la **figura N° V**. Pesar en balanza analítica 250.0 g de muestra en un frasco de fondo redondo con termómetro incluido de 500mL, añadir 2.0 mL de hidróxido de sodio 0.2N, 0.5 mL de solución estándar interno (NDPA) y 25.0 mL de aceite mineral. Colocar al frasco una manta de

calefacción. Use el adaptador para conectar el matraz de ebullición a la malla pre-humedecida (2 mL de agua destilada) equilibrar con nitrógeno líquido. Conectar el vacío y comprobar si hay fugas en el sistema de acuerdo a la presión de funcionamiento (<2 Torr). Mantener al vacío 10min antes de la aplicación de calor. Envuelva el adaptador con cinta de calentamiento. Aumentar la temperatura del matraz de ebullición, según como indica el termómetro de aceite incluido, desde la temperatura ambiente hasta 120°C en 55 a 60 min. La temperatura interna del adaptador es de 170-175°C. Al final del periodo de calentamiento, bajar el manto de calentamiento lejos del frasco. Deje que el adaptador de enfriamiento del frasco siga siendo calentado por 15 min (170-175°C) con un vacío mantenido. Libere cuidadosamente el vacío y separe el frasco Dewar de la trampa. Desconecte el matraz. Invertir el adaptador. Coloque la trampa con el adaptador conectado en la campana hasta que el contenido sea líquido.



**Figura N° V:** Ensamblaje de bombeo y destilación. (Sistema dual. Sistema de destilación simple puede ser usado). a-soporte de laboratorio, b-medidor McLeod, c-controlador de vacío, d-bomba de vacío, e-llave de 3 vías, f-pinza de presión, g-trampa de vapor, h-nitrógeno líquido, i-frasco Dewar, j-cinta de calefacción, k-termómetro (-20°C a 150°C), l- matraz de 500mL con termómetro, m, encendido.

#### G. Transferencia, extracción y secado

Enjuague el adaptador con 10 mL de diclorometano, colectar el lavado en la trampa. Retire el adaptador. Transferir el destilado y lavar el separador con 125mL de diclorometano. Lavar la trampa con 15 mL de diclorometano, 5 mL a través del vástago y 10 mL a través del cuerpo. Enjuague agitando 1min. Transferir el lavado diclorometano al separador y extraer por agitación de 1min. Dejar reposar hasta que las fases se separen. Drenar la capa de diclorometano al segundo separador. Repita el lavado y la extracción dos veces. Drenar la mezcla de diclorometano a través de 30 g de sulfato de sodio anhidro (mantener en un embudo de vidrio sinterizado grueso de 60mL pre-humedecido con 25 mL de diclorometano) dentro de un matraz KD de 250 mL con un tubo concentrador de 4 mL adjunto. Enjuague el segundo separador con 25 mL de diclorometano y drenar el enjuague dentro del frasco KD.

#### H. Concentración

Colocar un grano de carburo de silicio en el tubo concentrador, conecte 3 bolas de la columna Snyder a un matraz KD y concentrar cuidadosamente el solvente hasta obtener 4 mL en un baño de agua a 60°C en 1.5h. Retirar el concentrado, secar, enfriar a temperatura ambiente. Dejar el remanente en la columna Snyder y drenar dentro de un tubo concentrador. Trasferir el tubo concentrador al sistema de evaporación de nitrógeno. Reducir el volumen a 1.0mL en 30 min bajo una corriente suave de nitrógeno.

#### I. Determinación

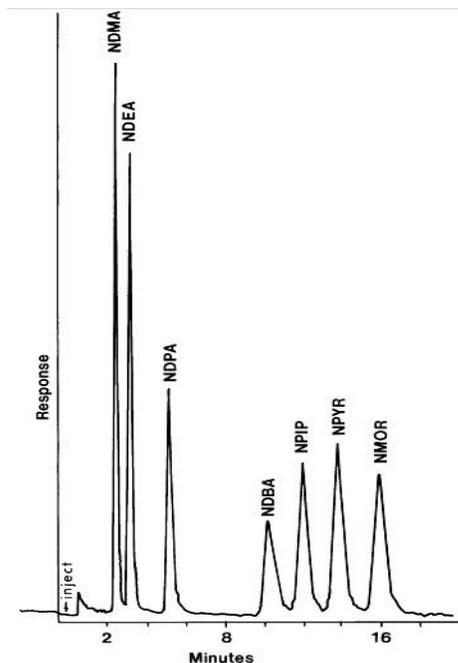
Inyectar 6.0  $\mu\text{L}$  de la mezcla de solución estándar de trabajo que contenga 0.25  $\mu\text{g}$  de N-nitrosamina/mL, al cromatógrafo de gases acoplado a TEA. Obtener el tiempo de retención y la respuesta en ng/mm para cada compuesto (véase **figura N° VI**)

Inyectar 6.0 µL del extracto de la muestra concentrada. Obtener el tiempo de retención y la respuesta de cada compuesto presente. (*Nota:* las soluciones estándar individuales deben ser utilizadas para establecer los patrones de retención relativos) Si la recuperación de estándar internos NDPA es <70 ó >110%, repetir el análisis de la muestra.

Calcular la cantidad de cada nitrosamina en el extracto de la muestra y determinar la cantidad en la muestra original, de la siguiente manera:

$$\text{Para cada nitrosamina, ng/g de la muestra} = (\text{PH}/\text{PH}') \times 10$$

Donde PH y PH' = altura del pico de la muestra y estándar respectivamente



**Figura N° VI:** Cromatografía Líquida de una solución estándar de mezclas de N-nitrosaminas: 1.50ng de NDMA, 1.58ng de NDEA, 1.46ng de NDPA, 1.59ng de NDBA, 1.64ng de NPYP, 1.67ng de NPYP, 1.80ng de NMOR.

## Prueba 16: N-nitrosopirrolidina en Tocino Frito <sup>(i)</sup>

### A. Fundamento

La muestra de suelo se mezcla con sulfato de sodio y Celite y se añade como estándar de referencia interno N-nitrosoazetidina (NAZET). Después transferir a la columna acida de Celite y lavar, la N-nitrosopirrolidina (NPYR) es eluida con diclorometano y determinada por GC con un analizador de energía térmica.

### B. Material y Equipo

- Mortero y pistilo: de vidrio, 473 mL (16 oz)
- Balanza analítica
- Columna cromatográfica: Vidrio de 350x32 mm de diámetro interno con 60x6 mm de diámetro interno en punta de goteo.
- Concentrador de evaporación: Kuderna-Danés (KD), 250 mL, tubo concentrador, 4 mL, graduada; Snyder (3 secciones) y micro-columnas Snyder de destilación (Kontes Glass Co.).
- Barra compactadora: vidrio, 450 mm de largo con disco de 12 mm de diámetro preparado con soplador de vidrio.
- Analizador de cromatógrafo de gases-energía térmica: Cromatógrafo para varios gases, modelo 2700, o equivalente, en interfaz con analizador de energía térmica Modelo 502. Condiciones de uso: 2.7m x 3.2 mm columna de acero inoxidable lleno de 15% Carbowax 20M-TPA sobre malla 60-80 de Gas-ChromP; gas portador de He 35mL/min; columna 180° isotérmica, inyector 200°, horno TEA 450°C, vacío TEA 1.5 mm; trampa enfriadora de líquido N<sub>2</sub> y alcohol.

### C. Reactivos

- Celite 545: No es lavado con ácido (Fisher Scientific Co.). Ejecutar un blanco de reactivo antes de comenzar el análisis de la muestra, sobre

todo si es nuevo el frasco de Celite. Si productos cromatográficos interferentes son notados, prelavado el Celite dos veces con diclorometano y luego séquela por 4h en un horno de vacío a 120°C antes de su uso.

- Diclorometano, iso-octano, y n-pentano: Destilada en vidrio (Burdick & Jackson Laboratories, Inc.).
- Sulfato de sodio: Anhidro, granular (Mallinckrodt N° 8024).
- Ácido fosfórico: 6N. Extraer una vez con un volumen igual de diclorometano para eliminar las impurezas.
- Solución de estándar interno de N-Nitrosoazetidina (NAZET): Preparar la solución madre 1.0 µg/mL en isooctano. Diluir hasta 0.10 µg/mL en diclorometano antes del análisis.
- Solución estándar de N-nitrosopirrolidina (NPYR): Preparar una solución madre individuales en isooctano que contiene 1.0 µg/mL de cada uno de los NAZET y NPYR. Diluir a 0.10 µg/mL en diclorometano antes del análisis.

#### D. Cristalería

- Beaker 250 mL
- Pipetas volumétricas 1.0 mL y 10.0 mL
- Agitador de vidrio
- Embudo de vidrio
- Matraz KD 250 mL
- Perlas de ebullición

#### E. Determinación

Pesar en balanza analítica 10.0 g de Celite en un beaker de 250 mL. Añadir 10mL de ácido fosfórico 6N y agitar el Celite con un agitador de vidrio hasta que la mezcla es esponjosa y con textura uniforme. Usando un embudo vertir el

Celite ácido en la columna cromatográfica que contiene un tapón de lana de vidrio en la parte inferior. Inserte la varilla de apisonamiento a través del Celite y toque de abajo hacia arriba a la altura de aproximadamente 25 mm. Pesar en balanza analítica  $10.0 \pm 0.1$  g de tocino frito doblemente molido y transferir cuantitativamente al mortero. Añadir 1.0 mL de solución estándar interno (equivalente a 10 ppb) a la muestra de tocino, con una pipeta volumétrica de 1.0 mL. A continuación, añadir 25 g de sulfato de sodio y mezclar con el pistilo por 30 seg. Añadir 20 g de Celite al mortero y triturar de 15-20 seg hasta que el Celite es mezclado completamente con el sulfato de sodio y el tocino. Luego moler con presión moderada durante 2 min. Transferir cuantitativamente la mezcla seca con flujo libre a la columna cromatográfica y presionar con la varilla de vidrio a una altura total de 100 mm. Añadir 30 g de sulfato de sodio al inicio de la columna. Enjuagar el mortero y pistilo con 10 mL de pentano-diclorometano (95+5) y añadir el enjuague a la columna, seguido inmediatamente por 90 mL del mismo disolvente. Recoger en un frasco graduado de 100 mL. Cuando el nivel del solvente en la columna baje de manera que apenas toque la parte superior de sulfato de sodio, añadir 125 mL de diclorometano de una vez. Después que 85 mL del eluyente lavado sea colectado, descartar y cambiar los receptores. Recoger el eluyente restante en un matraz KD de 250 mL equipado con un tubo de concentración de 4 mL (algunas muestras dan como rendimiento eluyentes turbios, esto es normal).

Cuando la columna deje de gotear, retire el frasco KD, añadir 2 pequeños trozos de porcelana en el matraz, adjunte 3 secciones de la columna Snyder, y concentrar el eluyente a 4 mL en un baño de vapor. Continuar la concentración (añadir una nueva perla de ebullición) a 1.0 mL con una columna micro-Snyder en un baño de agua a 70°C. Nota: La temperatura ambiente debe ser <24°C durante el análisis de la muestra. Inyectar 9.0 µL de solución estándar NPYR en menor atenuación que produce la señal de al menos 1/3 de respuesta TEA

en escala completa, y medir la altura del pico. Repita el proceso para asegurar una buena reproducibilidad del tiempo de retención y de respuesta. Inyectar 9.0 µL de la solución muestra y medir la altura de los picos.

Para cada inyección calcular R, que es la relación de la altura del pico NPYR a la altura del pico NAZET.

$$\text{NPYR, } \mu\text{g/kg (ppb)} = (R / R') \times (C / W) \times 1000$$

Dónde: R y R' = es la relación entre la altura del pico NPYR y la altura del pico NAZET para la muestra y el estándar, respectivamente, C = es la concentración de NPYR en el estándar de trabajo o µg/mL, W = altura de la muestra en g.

**Tabla N° XII:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.02.13:98 Carne y productos Cárnicos y Embutidos Crudos y Cocidos

Constituyente	Mínimo	Máximo
Humedad en porcentaje en masa (m/m)		
a) Para embutido frescos	30	65
b) Para embutidos secos	-	35
Proteína total (% masa/masa)	12	-
Grasa total, base seca (% masa/masa)	-	30
Aglutinantes <sup>(1)</sup> carbohidratos y proteínicos, tales como productos lácteos, almidón de maíz y harinas de origen vegetal; 1 solo de estos o mezcla de 2 o más, en porcentaje en masa (m/m)		7 <sup>(2)</sup>
Sustancias coadyuvantes, en porcentaje en masa (m/m)		
a) Sal común		3
b) Jarabe de maíz o solidos de jarabe de maíz		2
c) Azúcar blanca o refinada		
	Cantidad limitada por las prácticas correctas de fabricación	

**Tabla N° XII: Continuación**

<b>Otros aditivos alimentarios, en miligramos por kilogramo de producto</b>	<b>Función</b>	<b>Máximo</b>
a) Ácido ascórbico, isoascórbico y sus sales sódicas, solos o mezclados, expresados como ácido ascórbico	Antioxidante	500
b) Nitrito y nitrato de potasio y/o de sodio, expresados como nitrito de sodio	Conservador	125
c) Fosfatos añadidos (mono-di y polifosfatos de sodio y potasio), solos o mezclados, expresados como P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Regulador del pH	3000
d) Glutamato monosódico, expresado como ácido glutámico	Acentuador del sabor	1000
e) Ácido ascórbico y sus sales de sodio, potasio y calcio, expresados como ácido ascórbico	Conservador	100

(1) Se permitirá el uso de aglutinantes solamente en los embutidos cocidos.

(2) Del 7% autorizado, el 2% podrá adicionarse como caseinato de sodio y el 3% como almidón de maíz, papa o yuca.

**METODOS DE ANALISIS PARA  
MANTEQUILLA**

## MANTEQUILLA

**Norma Consultada:** NSO 67.01.12:07 Productos Lácteos: Mantequilla

### **Alcance:**

Aplica a la mantequilla para consumo directo ya sea mantequilla con o sin sal.

### **Pruebas Organolépticas:**

La mantequilla debe presentar una consistencia firme y uniforme a una temperatura de 10 a 12°C. El sabor y olor serán propios del producto fresco o madurado, sin indicios de rancidez, enmohecimiento, sabor amargo o cualquier otro sabor u olor extraño u objetable. El color será el característico y la distribución será uniforme.

### **Pruebas Fisicoquímicos:**

**Tabla N° XIII:** Resumen de metodologías de análisis para cada prueba de Mantequilla

<b>Prueba</b>	<b>Método</b>
Humedad	Pérdida por Secado
Índice de Refracción	Refractometría
Sal	Volumétrico
Índice de Yodo	Wijs (Titulación)
Ácidos Volátiles (Valores Reichert-Meissl y Polenske)	Volumétrico
Índice de Saponificación (Koettstorfer)	Volumétrico
Acido Butírico	CG

**Tabla N° XIV:** Resumen de análisis de métodos según AOAC para Mantequilla

<b>Prueba</b>	<b>Método AOAC</b>	
Preparación de Muestra	938.05	33.6.02
Humedad en Mantequilla	920.116	33.6.03
Índice de Refracción de Mantequilla	969.18	33.6.09
Sal en la Mantequilla	960.29	33.6.06
Índice de yodo de las grasas y aceites	993.20	41.1.15
Ácidos (Volátiles) en Aceites y Grasas	925.41	41.1.23
Índice de Saponificación de Aceites y Grasas	920.160	41.1.18
Ácido Butírico	990.27	41.1.38

- **Preparación de Muestra de Mantequilla (i)**

Suavizar totalmente la muestra en el recipiente de la muestra por medio de mezclado (use tarros de boca ancha, limpios y secos, cilíndricos a prueba de agua e impermeables a las grasas, de vidrio, metal inoxidable o de plástico adecuado. Llenar el frasco  $\geq 1/2$  lleno y sellar herméticamente. Inmediatamente después de cerrar, envolver el tarro en papel o almacenar en la oscuridad, si la determinación lo requiere. No deje que la mantequilla esté en contacto con el papel o cualquier cantidad de agua destilada o grasa absorbente) y calentar en baño de agua manteniendo la temperatura más baja como sea posible,  $\leq 39^{\circ}\text{C}$ . Evitar el sobrecalentamiento. Agitar con frecuencia durante el proceso de ablandamiento para reincorporar cualquier separación de grasa y observar la fluidez de la muestra. La consistencia óptima se alcanza cuando la emulsión es todavía intacta pero lo suficientemente fluida para revelar el nivel de la muestra casi de inmediato. Quitar la muestra del calentamiento y agitar con frecuencia vigorosamente o colocar el recipiente de la muestra en un agitador mecánico que simula la agitación manual, con un brazo de 23 cm (9") de largo, ajustado a oscilar a  $425 \pm 25$  veces/min a través de un arco de 4.5cm (1.75").

Continuar agitando hasta que la muestra se enfría a consistencia espesa y cremosa y el nivel de la muestra ya no se pueda ver fácilmente. Inmediatamente pesar la porción para el análisis.

### **Prueba 1: Humedad <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

La muestra se somete a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra.

#### B. Material y Equipos

- Balanza analítica
- Estufa
- Desecador
- Platos de aluminio fondo plano

#### C. Procedimiento

Pesar en balanza analítica 1.5-2.5 g de muestra preparada de mantequilla salada o 2-6 g de mantequilla sin sal (Ver Preparación de muestra de Mantequilla) en un plato pesado de fondo plano de 5cm de diámetro y secar hasta peso constante en un horno.

#### D. Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = ([\text{g de muestra húmeda} - \text{g de muestra seca}] / \text{g muestra}) \times 100$$

## Prueba 2: Índice de Refracción (i)

### A. Fundamento

El fenómeno de la refracción consiste en la desviación de trayectoria que sufre un haz de radiación monocromática al pasar desde el vacío a otro medio material de distinta densidad.

### B. Material y Equipos

- Estufa
- Hot plate
- Refractómetro
- Papel filtro

### C. Cristalería

- Beaker 250 mL
- Embudo de vidrio

### D. Procedimiento

Derretir la mantequilla y mantener 2-3h en un lugar seco a aproximadamente 60°C, o hasta que el agua y la floculo se separaren por completo. Filtrar la grasa clara sobrenadante a través de un papel seco con agua destilada caliente en embudo o en el horno a aproximadamente 60°C. Si la grasa líquida filtrada no es perfectamente clara, filtrar de nuevo.

Determinar el índice de refracción ( $n$ ) con cualquier instrumento estándar, las lecturas de aceites a 20 o 25°C y grasas a 40°C. Coloque el aparato de manera que la luz difusa o algún tipo de luz artificial como lámpara de vapor de sodio puede utilizarse para la iluminación. Haga circular vapor de agua destilada a temperatura constante ( $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) a través de los prismas. Las correcciones de

temperatura aproximadas de las lecturas del butirorefractómetro pueden ser hechas por la siguiente fórmula:

$$R = R' + K (T' - T)$$

Donde  $R$  = lectura reducida a temperatura estándar,  $R'$  = lectura obtenida a la temperatura  $T'$ ,  $T$  = temperatura estándar, y  $K = 0.55$  para grasas y  $0.58$  para los aceites.

Las lecturas de los instrumentos que dan directamente a  $n$  se pueden reducir a temperatura estándar mediante la sustitución de factor de  $0.000365$  para  $0.55$  y  $0.000385$  para  $0.58$  en la fórmula. A medida que aumenta la temperatura,  $n$  disminuye. El instrumento utilizado puede ser estandarizado con agua destilada a los  $20^{\circ}\text{C}$ , teóricamente  $n$  en agua destilada a esa temperatura viene siendo  $1.3330$ . Toda corrección encontrada debe hacerse en todas las lecturas. El índice de refracción varía con la densidad y en la misma dirección. Corregir el índice de refracción observado sumándole  $0.000045$  por cada unidad de índice de acidez, si este es de  $2$  como se determina en “Valor de acidez de la Mantequilla” redondeando al cuarto decimal. La diferencia entre determinaciones por duplicado debe ser de  $0.0002$ .

### **Prueba 3: Sal en Mantequilla (i)**

#### **A. Fundamento**

Los cloruros presentes en la muestra se valoran con solución de nitrato de plata en presencia de cromato de potasio como indicador. El punto final de la valoración está dado por la aparición de un precipitado de cromato de plata de color rojo.

#### B. Material y Equipo

- Balanza analítica
- Soporte metálico
- Estufa
- Pinza para bureta

#### C. Reactivos

- Nitrato de plata 0.1N
- Dicromato de potasio (Indicador)

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo N° 1

#### D. Cristalería

- Pipeta volumétrica 2.0 mL
- Bureta 50.0 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Agitador magnético
- Probeta 100 mL

#### E. Procedimiento

Pesar en balanza analítica 5.0 g ( $\pm 10$  mg) de muestra en un erlenmeyer de 250mL y medir en probeta 100mL de agua destilada en ebullición y agregar a la muestra. Deje reposar, agitando ocasionalmente por 5-10 min mientras se enfría a 50-55°C. Añadir 2 mL de indicador dicromato de potasio y titular con nitrato de plata 0.1N. Estandarizar hasta que el color naranja-marrón persista por 30 seg. Del volumen de titulación restar los mL de la solución de nitrato de plata requerida para producir el color del punto final en 75 mL de agua destilada que contiene 1 mL de solución dicromato de potasio.

## F. Cálculos

% de Cloruro de sodio = mL nitrato de plata 0.1N  $\times$  0.585 / g de muestra

## Prueba 4: Índice de Yodo <sup>(i)</sup>

### A. Fundamento

La grasa se mezcla con una solución de monoclóruo de yodo a enlaces halogenados dobles en grasa. El exceso de monoclóruo de yodo se reduce a yodo libre en presencia de yoduro de potasio y el yodo libre se mide por valoración con tiosulfato de sodio usando almidón como indicador. El índice de yodo (IV), calculado como  $\mu\text{g}$  de iodo absorbido por g de muestra (% de yodo absorbido) es una medida de la insaturación de grasas y aceites. (Aplicable a la determinación del índice de yodo de las grasas y aceites que no contienen dobles enlaces conjugados)

### B. Material y Equipo

- Frascos para el índice de yodo con tapón de vidrio: 500 mL.
- Frascos volumétricos tapón de vidrio: 1.0L, para preparar soluciones estándar.
- Hot plate
- Dispensadores volumétricos: (1) 25 mL, para Wijs y soluciones de ioduro de potasio (KI) 15%. (2) de 2 mL para la solución de almidón. (3) de 50mL para agua destilada.
- Pipeta repetidora: 20 mL, con frasco refilado, para ciclohexano.
- Balanza analítica: con una precisión de  $\pm 0.0001\text{g}$ .
- Papel filtro: Sin cenizas, grado grueso (Whatman N° 541 es adecuado).
- Horno de aire caliente: Capaz de mantener  $100^\circ$  dentro de  $\pm 1.5^\circ\text{C}$ .
-

Eficacia del método: ver **tabla N° XV** para los datos de rendimiento del método.

**Tabla N° XV:** Eficacia del método para la determinación del índice de yodo por el método Wijs usando solvente tetracloruro de carbono o solvente ciclohexano- ácido acético (1+1)

Muestra	Valor Medio		s <sub>r</sub>		s <sub>R</sub>		RSD <sub>r</sub> %		RSD <sub>R</sub> %	
	CTC <sup>a</sup>	CHX <sup>b</sup>	CTC	CHX	CTC	CHX	CTC	CHX	CTC	CHX
Girasol	133.6	132.9	1.4	1.7	3.4	2.3	1.1	1.3	2.6	1.7
Palma Refinado	53.1	53.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.5	0.7
Pescado Crudo	109.1	108.5	0.7	0.5	1.7	1.1	0.6	0.5	1.6	1.0
Tung	164.5	163.1	2.0	1.4	3.1	2.5	1.2	0.9	1.9	1.5
Sebo (Carne de vaca)	47.2	46.9	0.2	0.2	0.5	0.4	0.5	0.5	1.0	0.8
Palma Crudo	52.5	52.6	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.8	0.8	1.0
Freír usado	37.7	37.7	0.1	0.2	0.2	0.3	0.4	0.5	0.4	0.9
Palmiste	18.2	18.3	0.01	0.01	0.03	0.04	0.1	0.1	0.2	0.2
Oliva	82.3	82.2	0.2	0.5	0.6	0.8	0.3	0.6	0.7	0.9
HSBO <sup>c</sup> -1	102.6	102.3	0.5	0.8	1.8	1.9	0.5	0.8	1.7	1.8
HSBO-2	74.7	74.8	0.5	0.4	1.0	0.6	0.6	0.5	1.3	1.8
HFO <sup>d</sup>	73.0	72.8	0.4	0.4	0.7	0.6	0.6	0.6	0.9	0.8

<sup>a</sup>-Tetracloruro de carbono, <sup>b</sup>-Ciclohexano-Ac. Acetico (1+1)

<sup>c</sup>-Aceite de Soya Hidrogenado, <sup>d</sup>-Aceite de Pescado Hidrogenado

### C. Reactivos.

- Solución de yoduro de potasio (KI): 15%. Disolver 15 g de KI en 100 mL de agua destilada.
- Solución de yodo Wijs: (1) Disolver 13 g de yodo resublimado en 1L de ácido acético y pasar cloro en seco (a través de ácido sulfúrico) hasta que la titulación de la solución original de tiosulfato de sodio no se duplique. (las características del cambio de color en el punto final indica la cantidad adecuada de cloro. El método conveniente consiste en

reservar algo de solución original de yodo, añadir un ligero exceso de cloro al volumen de la solución, y llevar a la titulación deseada por adiciones de porciones guardadas). O, (2) Disolver 16.5 g de cloruro de yodo en 1L de ácido acético.

Determinar la relación yodo/cloro de la siguiente manera:

Contenido de yodo: Pipetear 5.0 mL de la solución Wijs en el erlenmeyer de 500 mL que contiene 150mL de cloro-agua destilada saturada y algunas perlas de vidrio. Agitar, llevar a ebullición y hervir enérgicamente por 10 min en hot plate. Enfriar, añadir 30 mL de solución ácido sulfúrico (1+49) y 15 mL de solución de yoduro de potasio 15% y valorar inmediatamente con tiosulfato de sodio 0.1N.

Contenido total de halógenos: Pipetear 20 mL de solución de Wijs en un erlenmeyer de 500 mL conteniendo 150 mL del agua destilada recientemente hervida y enfriada y 15 mL de solución yoduro de potasio al 15%. Valorar inmediatamente con tiosulfato de sodio 0.1N.

$$I / Cl = 2X / (3B - 2X)$$

Donde  $X$  = mL de tiosulfato de sodio 0.1N necesario para que el contenido de yodo y  $B$  = mL requeridos para el contenido total de halógenos. Si la proporción yodo/cloro no es  $1.10 \pm 0.1$ , añadir yodo o cloro para corregirla.

La solución de estandarización Wijs puede obtenerse a partir de proveedores comerciales (sin especificar el tetracloruro de carbono). Almacenar en frascos de color ámbar sellados con parafina hasta que esté listo para su uso. Las

soluciones Wijs son sensibles a la temperatura, la humedad y la luz. Almacenar en un lugar oscuro a  $<30^{\circ}\text{C}$ .

- Solución de almidón soluble: Mezclar la pasta de 1 g de almidón con una cantidad pequeña de agua destilada fría. Mientras se agita, añadir 200mL de agua destilada hirviendo. Prueba para sensibilidad: colocar 5mL de la solución de almidón en 100mL de agua destilada y añadir 0.05 mL de solución de yodo 0.1N, el color azul profundo producido debe ser descartado por 0.05mL de solución de tiosulfato de sodio 0.1N.
- Dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ): triturar finamente y secar hasta peso constante (alrededor de  $110^{\circ}$ ) antes de utilizar en **D**.
- Tiosulfato de sodio 0.1N ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ): Estandarizar como en **D**.
- Ácidos: (1) ácido clorhídrico: concentrado, sp gr 1.19. (2) ácido acético glacial. (3) ácido sulfúrico concentrado.
- Ciclohexano: *Nota:* Resultados erráticos puede resultar si el ciclohexano es viejo, es decir, contiene materia oxidable.
- Solvente Ciclohexano- Ácido acético: Mezclar el ciclohexano y ácido acético, 1+1 (v/v). Verifique que no hay materia oxidable en el solvente mediante agitación de 10 mL de solvente con 1 mL de solución acuosa saturada de dicromato de potasio y 1 mL de solución de ácido sulfúrico. No debe aparecer de color verde.

#### D. Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio

Pesar en balanza analítica 0.16-0.22 g de dicromato de potasio seco, finamente molido lo más cercano a 0.0001 g en un matraz de 500 mL, disolver en 25 mL de agua destilada, añadir 5 mL de ácido clorhídrico y 20 mL de solución de yoduro de potasio y rotar para mezclar. Dejar reposar 5 min. Añadir 100 mL de agua destilada. Valorar con solución de tiosulfato de sodio agitando continuamente hasta que el color amarillo casi ha desaparecido. Añadir 1-2 mL

de solución indicadora de almidón y continuar añadiendo solución de tiosulfato lentamente hasta que el color azul desaparezca.

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  solución normal,  $N = [20.394 \times \text{peso } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7] / \text{mL tiosulfato de sodio}$

E. Cristalería

- Probeta 25 mL
- Pipeta volumétrica 5.0 mL
- Erlenmeyer 500 mL
- Beaker 250 mL
- Bureta 50.0 mL
- Agitador de vidrio

F. Determinación.

Derretir la muestra de prueba, si no es líquida (no exceda el punto de fusión de la muestra  $>10^\circ\text{C}$ ). Pasar la muestra a través de una capa doble de papel filtro para eliminar las impurezas sólidas y trazas de agua (la filtración se puede realizar en horno de aire, a  $100^\circ\text{C}$ , pero debe ser completado dentro de  $5\text{min} \pm 30\text{seg}$ ). La muestra debe estar completamente seca. (Nota: Todo el material de vidrio debe estar absolutamente limpio y completamente seco).

Dejar que la muestra filtrada se enfríe a  $68\text{-}71^\circ\text{C}$ . Pesar inmediatamente la cantidad de muestra indicada en la **tabla N° XVI** en un frasco limpio y seco de 500 mL.

Preparar al menos 2 determinaciones de blanco para ejecutarse con cada grupo de muestras.

**Tabla N° XVI: Pesos de Muestra**

Valor de I	Muestra, g	Exactitud, mg
3	10.58–8.46	0.5
10	3.17–2.54	0.2
20	1.59–1.27	0.2
40	0.79–0.63	0.2
80	0.40–0.32	0.2
120	0.26–0.21	0.2
160	0.20–0.16	0.2
200	0.16–0.13	0.2

Añadir 15 mL de solvente ciclohexano- ácido acético para cada prueba de la muestra y agitar para asegurarse que la muestra esté completamente disuelta. Vertir 25 mL de solución de Wijs en un matraz que contiene la muestra de prueba, tapar el frasco y agitar para mezclar. Establecer inmediatamente temporizador para 1.0 o 2.0h, dependiendo del valor de yodo de muestra ( $IV < 150$ , 1.0h;  $IV \geq 150$ , 2.0h) y los frascos almacenarlos en oscuridad a  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  de la duración para la reacción. Remover los frascos de la oscuridad, añadir 20 mL de solución de yoduro de potasio y mezclar. Añadir 150 mL de agua destilada y gradualmente valorar con solución estándar de tiosulfato de sodio 0.1N, agitar constante y vigorosamente o con agitación mecánica. Continuar titulando hasta que el color amarillo casi ha desaparecido. Añadir 1-2mL de solución de indicador de almidón al matraz y proseguir la valoración hasta que el color azul desaparezca. (Nota: Si la reacción no se termina por la adición de yoduro de potasio y agua destilada en menos de que 3 min después de 1.0 o 2.0h de tiempo de reacción, la muestra debe ser desechado. La muestra debe ser titulada a los 30 min de la terminación de la reacción, sino, el análisis es no valido).

### G. Cálculo

$$\text{Índice de yodo (IV)} = [(B - S) \times N \times 12.69] / \text{peso de la muestra}$$

Donde B = valoración del blanco (mL), S = titulación de la muestra (mL), N = normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

## Prueba 5: Ácidos Volátiles <sup>(i)</sup>

### A. Fundamento

Métodos de Polenske y Reichert-Meissl, estos métodos se basan en la reacción química de los ácidos grasos con un álcali, formándose la sal del ácido (Saponificación). El método de Reichert-Meissl se basa en la neutralización de los ácidos grasos volátiles, solubles en agua; el de Polenske en la neutralización de los ácidos grasos volátiles insolubles en agua. Los ácidos grasos de los métodos antes mencionados deben estar previamente saponificados.

### B. Materiales y Equipos

- Aparato de Reichert-Meissl y Polenske
- Hot plate
- Balanza analítica

### C. Reactivos

- Solución de hidróxido de sodio (1+1): A una parte de hidróxido de sodio (calidad reactivo conteniendo un porcentaje de bicarbonato de sodio) en un frasco agregar 1 parte de agua destilada y agitar hasta que la disolución se complete. Tapar con un tapón de goma. Dejar a un lado hasta que el bicarbonato de sodio se haya asentado. Dejando perfectamente un líquido claro (cerca de 10 días).

- Solución de glicerol-soda: Añadir 20 mL de solución de hidróxido de sodio 1+1 a 180 mL de glicerol puro.
- Fenolftaleína (Indicador)
- Carburo de silicón: de polvo N° 6, Carborundum Co.
- Solución de ácido sulfúrico (1+4): medir 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y agregar 4 mL de agua destilada, agitar.
- Solución de hidróxido de sodio 0.1N

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo N° 1

#### D. Cristalería

- Balón fondo redondo 300 mL
- Beaker 100 mL y 250 mL
- Erlenmeyer 125 mL
- Probeta 25 mL y 50 mL
- Balón volumétrico 100.0 mL
- Embudo de separación de vidrio
- Bureta 50.0 mL

#### E. Determinación

Se pesan en balanza analítica  $5 \pm 0.1$  g de muestra en un frasco de fondo redondo limpio, seco de 300 mL. Tomar <5 g de muestra con ciertas grasas o derivados. Añadir el aceite diluyente con valor Reichert-Meissl <0.2, por ejemplo: aceite de semilla de algodón, al frasco de la muestra para proporcionar un total de 5 g de muestra más el aceite diluyente. Añadir 20 mL de solución de glicerol-soda y calentar con agitación con llama o un hot plate cubierto con material a prueba de fuego hasta que se complete la saponificación, lo que se muestra por cuando la mezcla es perfectamente clara. El aceite no debe permanecer en la superficie, las paredes del matraz deben estar mojadas por la solución. Dejar el matraz enfriar a 100°C (5 min)

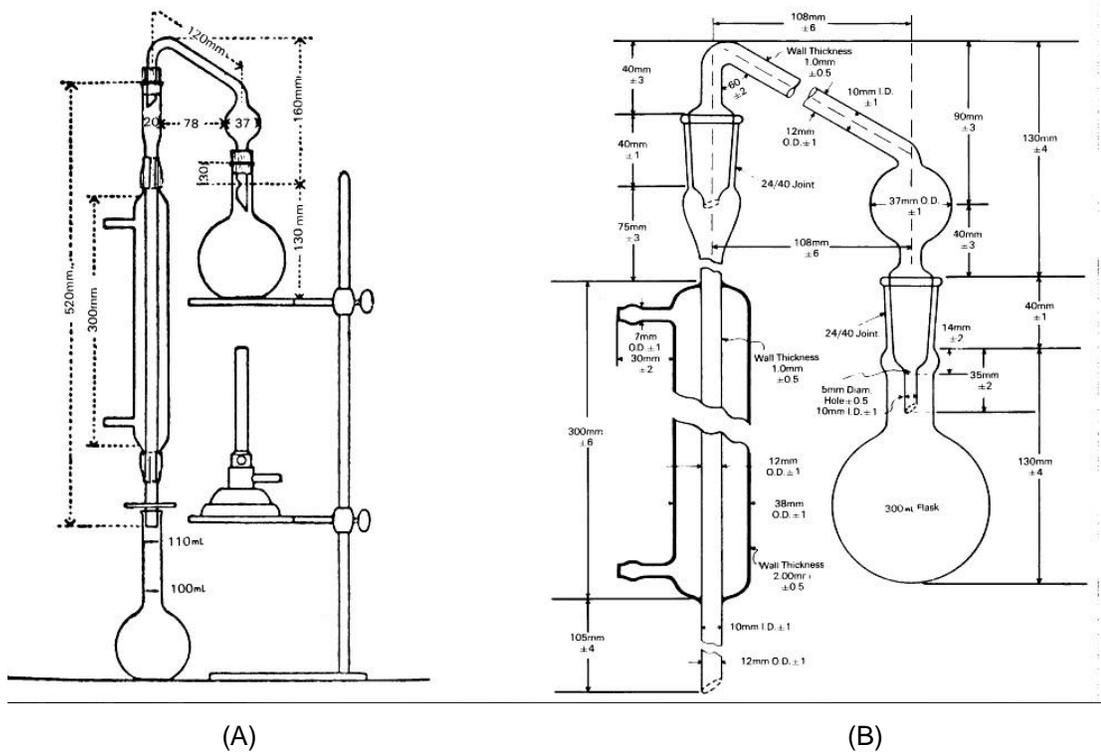
y disolver su contenido en  $135 \pm 1$  mL de agua destilada hervida recientemente con una pérdida mínima de vapor de agua (135 mL de agua destilada se miden en un erlenmeyer de 125 mL previamente calibrado para entregar  $134.6 \pm 1.0$  g de agua destilada a  $25^\circ\text{C}$ ). Añadir 6 mL de ácido sulfúrico (1+4) y 15 piezas de carburo de silicio. Destilar, utilizando un aparato con dimensiones indicadas en la **figura N° VII**. (Un adaptador puede ser utilizado para destilar en un frasco volumétrico de 110 mL). El frasco de descanso sobre la pieza del soporte a prueba de fuego con un agujero en el centro de 5 cm de diámetro y regular el calentamiento hasta recoger 110 mL de destilado en  $30 \pm 2$  min (tiempo de medida desde el paso de la primera gota de destilado del condensador al matraz receptor), dejando un goteo de destilado en el matraz receptor a una temperatura de aproximadamente  $20^\circ\text{C}$ . Cuando 110 mL hayan sido destilados, sustituir por un frasco receptor volumétrico de 25 mL, retire el calor y desconecte la cabeza del destilador del condensador. Mezcle sin agitación violenta, sumergir el frasco que contiene el destilado casi completamente en un baño de agua a  $15^\circ\text{C}$  por 15 min, filtrar a través de papel de moderada retención seco de 9 cm (S&S 589 White Ribbon puede utilizarse) y valorar 100mL de filtrado con hidróxido de sodio 0.1N, utilizando fenolftaleína. La solución debe permanecer rosa por 2- 3 min.

$$\text{Valor Reichert-Meissl} = 1.1 \times (\text{titulación A} - \text{titulación B}) \times 5 / \text{g mx}$$

Retire los restos de ácidos solubles de los ácidos insolubles en el filtro lavando con tres porciones de 15 mL de agua destilada a  $15^\circ\text{C}$ , cada uno previamente pasado a través del condensador, frascos graduados de 25 mL y 110mL. Disolver los ácidos insolubles mediante el paso de tres porciones de 15mL de alcohol neutro a través del papel filtro, cada porción que previamente ha sido pasada por el condensador, frascos graduados de 25 mL y 110mL. Valorar los lavados alcohólicos combinados con hidróxido de sodio 0.1N, utilizando fenolftaleína como indicador.

$$\text{Valor Polenske} = (\text{titulación A} - \text{titulación B}) \times 5 / \text{g mx}$$

Dónde: A = muestra y B = blanco en ambos métodos. *Nota:* si no se siguen estas instrucciones en cada detalle, la reproducción de resultados no es posible de obtener.



**Figura N° VII:** Aparato para la determinación de los valores de Polenske-Reichert Meissl, (A) con tapones de goma, (B) con juntas de vidrio

### Prueba 6: Índice de Saponificación - Número Koettstorfer (i)

#### A. Fundamento

Este método se basa en la reacción química de los ácidos grasos con un álcali, formándose la sal del ácido que se cuantifica con una titulación.

## B. Material y Equipos

- Equipo de condensación
- Soporte metálico
- Pinza para bureta
- Balanza analítica

## C. Reactivos

- Solución alcohólica de hidróxido potásico: (1) Reflujar 1.2L de alcohol por 30 min en un matraz de destilación con 10 g de hidróxido de potasio y 6 g de aluminio granulado (o lámina de aluminio). Destilar y recoger 1L después de descartar los primeros 50 mL. Disolver 40 g de hidróxido de potasio en 1L de alcohol, manteniendo la temperatura  $<15^{\circ}\text{C}$ , mientras que se disuelve el álcali. Guarde la solución en un frasco con tapón de vidrio. O, (2) triturar 40 g de hidróxido de potasio en un mortero. Añadir 45 g de óxido de calcio granulado y moler la mezcla a polvo. De 1L de alcohol añadir 100 mL al mortero y transferir a un frasco, enjuagar el mortero con varias porciones más. Añadir el resto de alcohol en el frasco, agitar la mezcla  $\geq 5$  min e invertir un beaker sobre el cuello del matraz. Repetir agitando varias veces durante el día. Filtrar la solución en una frasco con tapón de vidrio, limpio y seco.
- Ácido clorhídrico 0.05N
- Fenolftaleína (Indicador)

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo N° 1

## D. Cristalería

- Erlenmeyer 250 mL
- Pipeta volumétrica 50.0 mL
- Bureta 50.0 mL
- Mortero y pistilo

### E. Determinación

Pesar aproximadamente 5.0 g de la muestra filtrada en un erlenmeyer de 250mL. Pipetear 50.0 mL de la solución alcohólica de hidróxido de potasio dentro de un frasco, dejando drenar la pipeta un tiempo definido. Conecte el frasco con el condensador de aire y dejar hervir hasta que la grasa es completamente saponificado (30 min). Enfriar y titular con ácido clorhídrico 0.5N, utilizando fenolftaleína como indicador. Realizar una determinación de blanco junto con la muestra, utilizando la misma pipeta para medir la solución de hidróxido de potasio y drenar el mismo tiempo. Calcular el índice de saponificación:

$$\text{mg de KOH necesaria para saponificar 1g de grasa} = 28.05 (B - S) / g \text{ mx}$$

Donde  $B$  = mL de ácido clorhídrico 0.5N requeridos por el blanco y  $S$  = mL de ácido clorhídrico 0.5N requeridos por la muestra.

### Prueba 7: Ácido Butírico (i)

- Eficacia del método:

100% grasa de mantequilla

$$s_r = 0.104, s_R = 0.242, RSD_r = 3.0\%, RSD_R = 7.0\%$$

Mezcla de aceite-crema vegetal que contiene aproximadamente 50% de grasa de leche

$$s_r = 0.043, s_R = 0.161, RSD_r = 2.4\%, RSD_R = 9.0\%$$

Sebo refinado contiene 5% de grasa de mantequilla

$$s_r = 0.008, s_R = 0.024, RSD_r = 4.5\%, RSD_R = 13.1\%$$

### A. Fundamento

La grasa se saponifica con una solución de hidróxido de potasio y después se acidifica con ácido fosfórico para liberar los ácidos grasos. Los ácidos grasos solubles e insolubles en agua se separan por filtración. El ácido butírico se determina como ácido libre mediante cromatografía de gases utilizando un patrón interno. (Aplicable a la determinación del contenido de ácido butírico de la materia grasa o grasa de mantequilla o mezclas de grasas que contienen grasas de la leche o grasa de mantequilla).

### B. Material y Equipo

- Cromatógrafo de gases: con detector de ionización de llama, en columna o todos los sistemas de inyección de vidrio, y la grabadora.
- Baño maría
- Columna: Vidrio, 2m x 3 mm de diámetro interior, lleno de un 10-15% de fase estacionaria adecuada para el análisis de ácidos grasos libres en una malla de 80-100 con soporte silanizado lavado con ácido. (1220 FFAP o SP es una fase estacionaria adecuada, la adición de ácido fosfórico 1% puede mejorar la resolución del ácido butírico y los picos de disolvente. Chromosorb W es el soporte adecuado) Condicionar y estabilizar la columna para su uso a aproximadamente 130-135°C.

*Nota:* Condicionar la columna  $\geq 48$ h a 180°C. Si la pre-columna no se utiliza para la inyección, poner un puerto de inyección a  $\geq 175$ °C. Si los picos del ácido butírico y valérico no se separan en la línea base, la resolución de las columnas que contienen como fase estacionaria ácido fosfórico puede ser utilizada mediante la inyección de cantidades de 1  $\mu$ L de solución ácido fosfórico 2.5% peso/volumen en la columna, mientras que la columna se calienta a temperatura analítica (130-135°C). Ajuste el flujo del soporte de vidrio de manera que el tiempo de retención para el ácido butírico sea de

aproximadamente 5 min. Las colas de los picos, incluso después de que se acondiciona la columna, a veces pueden ser reducidas o eliminadas por inyección de 2  $\mu$ L de trimetilclorosilano (TMCS) en la columna.

#### C. Reactivos

- Solución de hidróxido de potasio 0.5N en etanol: Disolver 4.5 g de hidróxido de potasio en 100 mL de etanol.
- Ácido o-fosfórico 5%: Pesar 5.0 g de ácido fosfórico y diluir a 100 mL con agua destilada.
- Solución estándar de ácido n-butírico: 0.4 mg/mL agua destilada. Disolver 400 mg de estándar de referencia de ácido n-butírico en 100mL de agua destilada y diluir 10 mL de esta solución a 100 mL con agua destilada. La solución debe ser recientemente preparada.
- Solución de estándar interno: 0.25 mg de ácido n-valérico/mL de agua destilada. Disolver 250 mg de ácido n-valérico en 100 mL de agua destilada y diluir 10 mL de esta solución a 100 mL con agua destilada.

#### D. Cristalería

- Beaker 50 mL
- Pipetas volumétricas 2.0 mL, 3.0 mL y 5.0 mL
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Microjeringa: 1  $\mu$ L

#### E. Preparación de la curva estándar

Utilice pipetas graduadas o bureta de 10.0 mL para transferir a tubos de ensayo individuales 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.5 y 5.0 mL cada vez de una solución estándar de ácido butírico. Para cada tubo de ensayo, agregar mediante una pipeta volumétrica 2.0 mL de solución estándar interno de ácido valérico y

respectivamente 4.8, 4.5, 4.0, 3.0, 1.5, y 0 mL de agua destilada. Tapar los tubos de ensayo y agitar suavemente cada solución. Las soluciones en los tubos de ensayo contienen respectivamente 0.08, 0.2, 0.4, 0.8, 1.4, y 2.0 mg de ácido butírico y 0.5 mg de ácido valérico. Estabilizar la columna  $\geq 30$  min a temperatura analítica (130-135°C). Utilice una microjeringa para inyectar alícuotas de 1  $\mu$ L de las soluciones estándar preparadas a su vez. Medir la altura de los picos de ácido butírico y valérico con precisión de 0.5mm. Interpolar la relación (ácido butírico/ácido valérico) contra los pesos correspondientes del ácido butírico. *Nota:* Ajuste del amplificador la atenuación de modo que la altura del pico del ácido butírico para la más grande altura del ácido butírico estándar es de aproximadamente 80% de la escala completa.

#### F. Determinación

Pesar en balanza analítica 100.0 mg de muestra en un beaker de 50mL. Pipetear con pipeta volumétrica 3.0 mL de solución de hidróxido de potasio etanólica en el beaker y añadir algunas perlas de vidrio. Cubrir el beaker con un vidrio reloj, coloque en baño de agua hirviendo y calentar 10 min o hasta que los glóbulos de grasa ya no sean visibles en la superficie. Remover el vidrio de reloj y continuar calentando hasta que el etanol se evapore por completo. Dejar enfriar el beaker. Pipetear 5.0 mL de agua destilada en el beaker, cubrir con vidrio reloj y suavemente agitar para disolver completamente el jabón. Si es necesario, calentar la mezcla suavemente para completar la disolución. Pipetear 5.0 mL de solución de ácido fosfórico en el beaker y agitar suavemente para coagular los ácidos grasos precipitados. Filtrar la solución a través de papel filtro. Pipetear 5.0 mL del filtrado dentro de un tubo de ensayo y añadir con pipeta volumétrica 2.0 mL de solución de estándar interno de ácido valérico. Tapar el tubo de ensayo y mezclar el contenido. Estabilizar la columna por 30 min a temperatura analítica (130-135°C). Usar microjeringa para inyectar 1  $\mu$ L de la solución final en la columna. Medir las alturas de los picos

del ácido butírico y valérico con precisión de 0.5 mm. Efectuar 2 determinaciones.

*Notas:* (1) Enjuague la jeringa con agua destilada entre cada 2 análisis y al completar el análisis con solución jabonosa diluida para minimizar la corrosión debido al ácido fosfórico. (2) Después de la serie de inyecciones de la muestra, inyectar una o más soluciones estándar de ácido butírico y de ácido valérico y chequear la curva de calibración vs la relación de las alturas de los picos correspondientes obtenidos de las soluciones estándar. (3) Los ácidos caproíco y caprílico pueden ser eluidos después del ácido valérico y causar picos de interferencias en análisis posteriores. Asegúrese de que estos ácidos se eluyen antes de que otra solución muestra sea inyectada.

#### G. Cálculos

Encuentre la relación entre la altura del pico del ácido butírico/ácido valérico y la lectura de la curva de calibración del peso del ácido butírico equivalente a la relación de la altura del pico. Calcular el ácido butírico, % peso/peso, en la muestra de la siguiente manera:

$$\% \text{ ácido butírico} = (W_b \times 200) / W_s$$

Donde  $W_b$  = peso (mg) de la lectura de la curva de calibración del ácido butírico,  $W_s$  = peso (mg) de la porción de la muestra.

Si el valor de repetibilidad (r) es satisfactorio, el resultado final es la media de 2 determinaciones.

#### H. Repetibilidad y Reproducibilidad

Repetibilidad: Cuando la media de determinaciones por duplicado se encuentra entre los 2 valores medios de la **tabla N° XVII**, la diferencia entre los resultados de 2 determinaciones llevadas a cabo en rápida sucesión por el mismo analista, utilizando el mismo aparato, para el análisis de una muestra de material idéntico no debe ser mayor que el valor de  $r$  que corresponde al mayor de los 2 valores medios.

Reproducibilidad: Cuando los medios de las determinaciones por duplicado, obtenidos en 2 laboratorios diferentes para el análisis de un material de muestra idéntica, se encuentran entre los 2 valores medios en la **tabla N° XVII**, la diferencia entre los resultados medios obtenidos por los laboratorios no deben ser mayores que el valor de  $R$  que corresponde al más alto de los 2 valores medios.

**Tabla N° XVII:** Valores de Repetibilidad ( $r$ ) y Reproducibilidad ( $R$ ) ( $P=0.95$ ) para la determinación del ácido butírico en Grasas

Estadística <sup>b</sup>	Muestra <sup>a</sup>		
	1	2	3
Número de laboratorio	11	10	11
Valor medio, % peso/peso	3.46	1.79	0.18
Valor $r$ ( $2,8 \times s_r$ )	0.29	0.12	0.02
Valor $R$ ( $2,8 \times s_R$ )	0.68	0.45	0.07

<sup>a</sup> Muestra 1: 100% materia grasa butírica, muestra 2: mezcla de aceite de crema y aceites vegetales que contienen acerca del 50% de grasa de leche, muestra 3: sebo refinado que contiene 5% de la muestra 1.

<sup>b</sup>  $s_r = 0.104, 0.043$  y  $0.008$  y  $s_R = 0.242, 0.161$  y  $0.024$  para las muestras 1, 2, y 3 respectivamente.

**Tabla N° XVIII:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.01.12:07 para Mantequilla

<b>Características</b>	<b>Mínimos (%)</b>	<b>Máximos (%)</b>
Grasa Butírica	80.0 <sup>(1)</sup>	84.0
Humedad	14.0	16.0 <sup>(1)</sup>
Índice de Refracción a 40°C	1.4528	1.4558
Índice de Yodo	26.0	38.0
Índice de Reichert-Meisser	20.0	32.0
Índice de Polenske	1.3	3.6
Índice de Saponificación	219.0	234.0

<sup>(1)</sup>Reglamento de la Ley de Fomento de Producción Higiénica de la Leche y Productos Lácteos

*Nota:* la sal y sólidos no grasos aumentan o disminuyen el porcentaje de humedad.

**METODOS DE ANALISIS PARA  
HELADOS Y MEZCLAS DE HELADOS**

## HELADOS Y MEZCLAS DE HELADOS

**Norma Consultada:** NSO 67.01.11:04 Helados y mezclas de Helados.

**Alcance:**

Aplica a los helados para el consumo y a las mezclas de helados en forma líquida o pulverizada que se comercializan en todo el territorio nacional. Entiéndase como helados a los siguientes: Helado de Leche, Helado de crema, Helado de Grasa Vegetal, Helado de Crema Vegetal, Helados de Agua, Mezcla en Polvo para Helados, Mezclas Líquidas pasteurizadas para Helados y Nieves.

**Pruebas Organolépticas:**

- **Textura:** los helados deben tener una textura suave característica uniforme libre de hielo, en el caso de los helados de agua y las nieves en los cuales la presencia de hielo no constituirá defecto si los mismos no son mayores de 5mm.
- **Color:** los helados deben tener el color propio del tipo y sabor que corresponda.
- **Olor y Sabor:** los helados deben tener olor y sabor agradable y característico, sin la presencia de olores o sabores extraños o anormales.
- **Apariencia:** los helados deben tener una apariencia atractiva y uniforme, exceptuando los helados preparados con fruta, nueces, con trozos de chocolate, u otros similares, en los cuales los trozos de dichos ingredientes deben estar uniformemente distribuidos en la masa del helado. Los helados que se designen como “de...(nombre específico de frutas)...” deben tener las frutas o productos de frutas en cantidad suficiente para caracterizar el producto.

## Pruebas Fisicoquímicas:

**Tabla N° XIX:** Resumen de métodos analíticos para cada prueba de Helados

Prueba	Método
Peso por Unidad de Volumen	Diferencia de Pesos
Fosfatasa Residual en Leche	Colorimétrico
Fosfatasa Residual en Helados	Colorimétrico
Grasa en Helados	Extracción y Diferencia de Pesos
Proteínas	Kjeldahl

**Tabla N° XX:** Resumen de métodos de análisis según AOAC para Helados

Prueba	Método AOAC	
Preparación de muestra	969.20	33.8.02
Peso por unidad de volumen de Helados envasados	968.14	33.8.01
Fosfatasa Residual en Leche	946.01	33.2.47
Fosfatasa Residual en Helados y Postres Congelados	946.04	33.8.12
Grasa en Helados y Postres Congelados	952.06	33.8.05
Proteínas en Sorbetes y Postres Congelados	930.33	33.8.04

- **Preparación de la Muestra de Helado** (i)

Cortar bloques congelados de producto en piezas de la ½ de pinta. Seleccione 2 o 3 piezas al azar, colocar en una copa de mezclador de alta velocidad, y cerrar herméticamente. Mantener a temperatura ambiente y mezclar (2min para productos llenos y ≤7 min para los que contienen frutos secos o las chips de caramelo duro). No permita que la temperatura supere los 12°C en cualquier momento durante el ablandamiento y las etapas de mezcla. Si se produce la

separación de grasa o "batido", desechar la muestra y repetir, con menor tiempo de mezclado. Inmediatamente vierta la mezcla en un frasco de boca ancha y tapar. Si se deja en reposo, agitar vigorosamente antes de extraer las muestras.

### **Prueba 1: Peso por Unidad de Volumen de Helados Envasados** (i)

#### Método I

##### A. Fundamento

La densidad absoluta de un cuerpo es la relación entre la masa y el volumen que ocupa.

##### B. Materiales y Equipos

- Equipo Overflow can: **figura N° VIII**. N°10, o con capacidad de 1gal, con un dispensador de líquido de 1/8-3/16" de diámetro interno, tubo de metal soldado con apertura en la parte inferior del costado de la lata de 1" desde la parte inferior que se inclina hacia arriba y se extiende paralela a lados. El tubo debe ser doblado encima en extremo superior para formar pico 1½" debajo del tope de la lata. El borde superior de la abertura de la boquilla debe ser superior y el borde inferior por debajo del punto más alto de la superficie interior de la parte superior curva, *B*. La barra de hierro, ligeramente más larga que el diámetro de la lata, equipado con un "puente" de la lata de metal, se puede utilizar para sumergir la muestra en queroseno de densidad conocida a 20/4° y enfriada a 5-10°C (temperatura del refrigerador) antes de su uso. "El Puente" se puede extender ½" por debajo del nivel de *B*.
- Balanza: Capacidad de 1 kg y sensibilidad de 1 g.

C. Cristalería

- Beakers 500 mL y 1L graduados
- Probeta 250 mL

D. Reactivos

- Keroseno

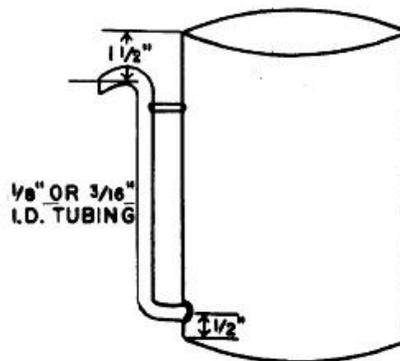


Figura N° VIII: Overflow can

E. Determinación

Obtener muestras envasadas (pintas preferible) del compartimiento de congelación o cuarto frío e inmediatamente colóquelo en un recipiente aislado con CO<sub>2</sub> sólido para el transporte al laboratorio. Rodee el paquete con losas o piezas de CO<sub>2</sub> sólido para que se mantengan congelados.

Colocar el equipo en una tabla de niveles para que las descargas de desbordamiento sean en un fregadero. Rellene si se puede con kerosene refrigerado hasta que se desborda por el surtidor. Cuando el desbordamiento cesa, colocar un beaker pesado de 500mL bajo el surtidor.

Retire las piezas congeladas de CO<sub>2</sub> sólido, quite rápidamente el cartón, y pesar con precisión de 1.0 a 2.0 g. Designar a este peso *W*. Despacio sumerja el ladrillo en el keroseno, finalmente, sumergiéndolo completamente manteniéndolo bajo la superficie con una espátula hasta que cese el desbordamiento. Pesar el keroseno desplazado con una precisión de 1.0-2.0 g, y restar el peso de la tara del beaker para determinar el peso neto del keroseno desplazado. Dividir el peso neto del keroseno por su gravedad específica y designar al volumen resultante *V*.

$$\text{Peso/volumen de la unidad (como lb / gal)} = W \times 8.345 / V$$

Si los productos son envasados de manera que son difíciles de retirar del cartón, determinar el peso bruto del cartón y del contenido, luego abrir los extremos o lados del cartón lo suficiente para evitar la formación de burbujas de aire atrapadas y sumergir el cartón entero en keroseno directamente. Después que el desbordamiento cesa y el keroseno desplazado ha sido pesado, remover el contenido del cartón, secar el cartón vacío y pesar.

Trasladar el keroseno a una probeta de a 100 o 200 mL, llenando hasta la mitad de la marca y marque el volumen. Enrolle la caja seca para que se deslice dentro del cilindro, evitando que quede aire atrapado. Presione el cartón en el cilindro hasta que esté completamente sumergida en el keroseno. El aumento del volumen es el volumen ocupado por el cartón. Corrija para el peso y el volumen de cartón en la fórmula dada arriba y calcular el peso unitario en lb/gal. Una probeta puede utilizarse en lugar de un beaker para atrapar el exceso de flujo. La lectura de volumen puede ser utilizado para chequear el volumen calculado de keroseno. El volumen que se calcula a partir del peso es más casi exacto.

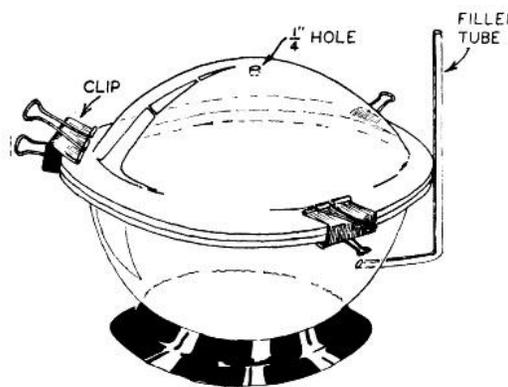
## Método II

### A. Aparatos y Materiales

- Contenedores: Ver **figura N° IX**. Desecador de plástico, capacidad para 1-1.5L (1-1.5 qt) (Ace Glass Co., N° 1810, o equivalente) modificado para incluir un agujero de 6 mm (1/4") en el centro de la cubierta para el escape de aire y un tubo de brazo lateral libre de fugas. Limpie con detergente antes de su uso y engrase los bordes ligeramente con grasa.
- Abrazaderas: Para asegurar la tapa desecador (Hoge N° 25 clips de la carpeta [Disponible en tiendas de papelería], o equivalentes), ver **figura N° IX**.
- Balanza: capacidad aproximadamente 4.5 kg (10 lb) y 0.3 g (0.01 oz) de sensibilidad.
- Hielera: capacidad para aproximadamente 15 a 20L, empacada de CO<sub>2</sub> sólido.

### B. Reactivo

- Fluido de inmersión: Aproximadamente 0.001% de solución de polisorbato acuoso 80 (Tween 80). Prepare 4L para cada determinación y enfriar a  $4\pm 4^{\circ}\text{C}$ .



**Figura N° IX:** Desecador plástico modificado

### C. Determinación

Empacar y guardar las muestras durante la noche en CO<sub>2</sub> sólido. Separar con fuerza la muestra congelada. Si la muestra es de 0.5 gal o una unidad más grande, romper marcando con un cincel u otro instrumento afilado y conducir el cuchillo o cuña en el bloque a lo largo de la marca. Determinar rápidamente el peso en el aire ( $W_a$ , oz) de la pieza seleccionada para la determinación del peso/volumen y devolver a la hielera. Colocar el recipiente en una superficie plana y con tapa segura en un lugar con 4 abrazaderas. Llenar completamente el recipiente a través del tubo de entrada de fluido de inmersión fría dispensado desde el separador con el tubo de goma conectado. Limpiar la superficie exterior seca y determinar el peso ( $W_p$ , oz). Colocar el recipiente en el fregadero o en el escurridor y retire la tapa. Coloque la pieza de muestra previamente pesada en el recipiente y la tapa con seguro de 4 abrazaderas. Llenar el recipiente completamente con el líquido de inmersión, dejando que todas las burbujas de aire se escapen por el orificio en la tapa. Limpiar la superficie externa y determinar el peso ( $W_i$ , oz).

$$\text{Peso por unidad de volumen (lb/gal)} = (W_a \times 8.338) / [W_a + (W_p - W_i)]$$

Dónde: 8.338 = densidad del agua destilada a 0–8°C (lb/gal)

## **Prueba 2: Fosfatasa Residual en Leche** <sup>(i)</sup>

### Método II

#### A. Fundamento

La muestra de la leche se incuba en una solución reguladora. Si la fosfatasa activa está presente, el fenilfosfato se hidroliza y se forma fenol. En la leche que ha sido pasteurizada eficientemente, la fosfatasa se destruye y no hay

hidrólisis. El fenol formado se determina colorimétricamente haciéndolo reaccionar con 2,6-Dibromoquinonaclorimida (BQC) obteniéndose un color azul, cuya intensidad se mide al espectrofotómetro.

#### B. Aparatos y Equipos:

- Hot plate
- Baño maría
- Balanza analítica
- Papel Wathman N° 42
- Fotómetro
- Centrifuga Babcock
- pHmetro
- Papel litmus

#### C. Reactivos

##### Buffers:

- Buffer borato de bario-hidróxido: pH  $10.6 \pm 0.15$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Disolver 25.0 g de hidróxido de bario en agua destilada y diluir hasta 500mL. Por separado disolver 11.0 g de ácido bórico y diluir a 500 mL. Calentar cada solución a  $50^{\circ}\text{C}$ , mezclar las soluciones, agitar, enfriar a  $20^{\circ}\text{C}$ , filtrar y guardar filtrado en un envase bien cerrado.
- Buffer de desarrollo de color: pH  $9.8 \pm 0.15$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Disolver 6.0 g de metaborato de sodio y 20 g de cloruro de sodio en agua destilada y diluir a 1L con agua destilada.
- Buffer de dilución de color: Diluir 100 mL de buffer de desarrollo del color a 1L con agua destilada.
- Buffer estándar de bórax para el control de pHmetro: 0.00996M, pH 9.183 a  $25^{\circ}\text{C}$ .

#### Buffer Sustratos:

- Para la evaluación de la pasteurización: Se disuelven 0.10 g de fenilfosfato disódico cristalino libre en 100 mL de buffer borato de bario-hidróxido, diluir (1+1). Si el fenilfosfato disódico no está exento de fenol, purificarlo de la siguiente manera: Disolver 0.5 g en 4.5 mL de agua destilada, añadir 0.5 mL de buffer borato de bario-hidróxido y 2 gotas de reactivo BQC y dejar reposar 30 min. Extraer el color con 2.5 mL de butanol y dejar reposar hasta que se separa el alcohol. Eliminar el alcohol con gotero y descartar. Diluir 1.0 mL de la solución acuosa a 100 mL con buffer de borato de bario-hidróxido diluido para la preparación del buffer sustrato. Calentar la solución a 85°C durante 2 min, detener el calentamiento e inmediatamente guardar en el refrigerador. La solución es estable 1 año si las porciones se retiran con la mínima exposición a la atmósfera. Desarrollar el color, y re-extraer antes de su uso, si es necesario.
- Precipitante de proteínas de zinc y cobre: Se disuelven 3.0 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0.6 g de sulfato de cobre pentahidratado en fenilfosfato disódico y diluir hasta 100mL con fenilfosfato disódico.
- Solución BQC (2,6-dibromoquinonecloroimida) (Reactivo Gibbs). Se disuelven 40 mg de polvo BQC en 10 mL de alcohol absoluto o metanol y trasladar a un frasco gotero de color oscuro. (El reactivo permanece estable 1 mes si se mantiene en la bandeja de hielo de la nevera, no utilice después de que comience a tomar color café. Almacene el polvo BQC en el congelador, compartimento del refrigerador o en el desecador. [Nota: Las explosiones del reactivo BQC almacenado en botellas o en el estante de reactivos deben ser reportados.] Verifique los nuevos lotes de reactivo BQC antes de su uso mediante la preparación de la curva estándar de fenol y comparando con la curva obtenida con

un lote conocido de BQC que pueda ser confiable. Repita la prueba por lo menos dos veces al año.)

- Solución de sulfato de cobre para estándares 0.05%: Disolver 0.05 g de sulfato de cobre pentahidratado en fenilfosfato disódico y diluir hasta 100mL.
- Alcohol butílico: Usar n-butanol, para ajustar el pH mezclar 1L con 50mL de buffer de desarrollo de color. Almacenar en un recipiente de vidrio con tapón.
- Soluciones patrón de fenol: *Solución madre*: Pesar 1.0 g de fenol puro, transferir a un frasco volumétrico de 1L, diluir a volumen con agua destilada y mezclar (1 mL = 1 mg de fenol). (La solución es estable varios meses en el refrigerador). *Estándar de trabajo*: Diluir 10.0 mL de solución madre a 1L con agua destilada y mezclar (1 mL = 10 µg, 0.00001 g, o 10 unidades de fenol). Utilice esta solución estándar para preparar más soluciones estándar diluidas: por ejemplo, diluir 5, 10, 30, y 50 mL a 100 mL con agua destilada para preparar soluciones estándar que contienen 0.5, 1.0, 3.0 y 5.0 µg o unidades de fenol/mL, respectivamente. Guarde estas soluciones estándar de refrigeración. En forma similar preparar a partir de las soluciones estándar, soluciones que contengan 20, 30, y 40 unidades/mL.

Medir volúmenes apropiados de soluciones estándar de trabajo en una serie de tubos (de preferencia graduado en 5.0 y 10.0 mL) para proporcionar una serie de rango de estándares, según sea necesario, conteniendo 0 (control o blanco) 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0 y 40.0 unidades. Para aumentar el brillo de las soluciones azules y mejorar la estabilidad del estándar, añadir 1.0 mL de solución sulfato de cobre a cada tubo. A continuación, añadir 5.0 mL buffer de dilución de color y diluir a volumen de 10.0 mL con agua destilada. Añadir 4 gotas (0.08 mL) de solución BQC mezclar y dejar desarrollar el color azul por

30 min a temperatura ambiente. Si se utiliza el método de extracción con butanol, extraer las normas como en paso 10. Leer las intensidades de color en un fotómetro de 610 nm con filtro, restar el valor del blanco del valor de cada estándar de fenol, y preparar una curva estándar (debe ser en línea recta). Si los estándares se utilizan para la comparación visual, mantener en refrigeración. Preparar un nuevo set cada semana.

#### D. Cristalería

- Pipeta volumétrica 1.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL
- Tubos de ensayo
- Beaker 500 mL
- Termómetro
- Probeta 10 mL
- Balón volumétrico 10.0 mL y 500.0 mL
- Agitador de vidrio
- Embudo de vidrio
- Tubos Babcock

#### E. Muestreo

Mezclar bien el producto, verter algunos mililitros en un pequeño tubo, tapar y mantener en el refrigerador. Si el uso de conservante es necesario, añadir 1-3% de cloroformo y rotular "Tóxico, preservativos agregados"

#### F. Determinación

Los principios químicos que participan en la detección y medición de la actividad de la fosfatasa de la leche son los mismos para todos los productos lácteos, pero diferentes para los productos lácteos que requieren modificaciones de los métodos a causa de sus diferentes propiedades físicas, composiciones y especialmente la capacidad amortiguadora.

Para la leche y otros productos líquidos proceder de la siguiente manera:

Paso 1: Pipetear una porción de 1.0 mL de la muestra en 2 o 3 tubos de ensayo (1 tubo se necesita para el control o en blanco y es preferible tener 2 tubos más para hacer determinaciones por duplicado).

Paso 2: Calentar el blanco por 1min en un beaker con agua destilada en ebullición, cubierto (Temperatura del tubo entero debe ser 85-90°C) y enfriar a temperatura ambiente. A partir de ahora, tratar el blanco y la solución prueba de forma idéntica.

Paso 3: Añadir 10.0 mL de buffer sustrato de bario en un tubo tapado y mezclar (pH 10.0 ± 0.15).

Este sustrato es ideal para la leche fresca, dulce de mantequilla, o suero de queso. Para suero de leche viejo o ligeramente amargo use el buffer preparado sin diluir para bebidas de chocolate prepare el sustrato de tampón diluido con ¼ volumen de agua destilada, para suero de leche muy ácido (pH<4.5) prepare el buffer sustrato 26-11 (Disolver 26.0 g de hidróxido de bario octahidratado [fresco, no deteriorado] en agua destilada y diluir hasta 500 mL. Por separado se disuelven 11.0 g de ácido bórico y diluir hasta 500 mL. Calentar cada solución a 50°C, mezclar las soluciones, agitar, enfriar hasta aproximadamente 20°C, filtrar y guardar el filtrado en un recipiente bien tapado) y para la leche de cabra, prepare el buffer sustrato 27-11(preparar como el buffer 26-11 solo que en pesando 27.0 g). Para obtener resultados cuantitativos de muestras desconocidas, ajustar el pH a 10.0-10.05.

Paso 4: Inmediatamente después de agregar el sustrato, incubar en un baño de agua por 1h a 37-38°C, mezclando o agitando el contenido ocasionalmente.

Paso 5: Calentar en un beaker con agua destilada en ebullición casi por 1min. (La temperatura del contenido de los tubos debe llegar a 85-90°C, que se

determina por termómetro en otro tubo de mismo tamaño y forma que contiene el mismo volumen de líquido). Enfriar a temperatura ambiente en un recipiente con agua destilada fría.

Paso 6: Pipetear 1.0 mL de proteína precipitante de zinc-cobre para leche fresca, suero de leche dulce, o suero de queso. (Para suero de leche viejo o ligeramente agria o ácido, sustituir 1.0 mL de solución sulfato de zinc heptahidratado al 6.0%, para las bebidas de chocolate, utilice 1.0 mL de solución que contiene 4.5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0.1 g de sulfato de cobre pentahidratado/100 mL, y para la leche de cabra utilizar 1.0 mL de solución que contiene 7.5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0.1 g de sulfato de cobre pentahidratado/100 mL.) Mezclar fuertemente (el pH de la mezcla debe estar 9.0-9.1).

Paso 7: Filtrar (en un embudo de 5 cm, 9 cm de papel Whatman N° 42 o N° 2, o equivalente) y recoger 5.0 mL de filtrado en el tubo, preferiblemente graduado de 5.0 y 10.0 mL.

Paso 8: Añadir 5.0 mL de buffer de desarrollo de color (pH de la mezcla debe ser 9.3 a 9.4).

Paso 9: Añadir 4 gotas de solución BQC mezclar y dejar que el color se desarrolle por 30 min a temperatura ambiente. (Para únicamente detectar la pasteurización, agregar sólo 2 gotas de la solución BQC.)

Paso 10: Determinar la intensidad del color azul por uno de los siguientes métodos:

Con fotómetro: Leer las intensidades de color de la solución blanco y prueba (utilizando un filtro con la máxima  $T$  610 nm), restar la lectura del resultado del

blanco al de la muestra, y convertir a equivalentes de fenol por referencia a la curva estándar. [Por lo general la extracción butanol es innecesaria cuando se usa fotómetro, si la extracción de butanol se hace como anteriormente, centrifugar la muestra por 5 min para romper la emulsión y eliminar el agua suspendida en la capa de alcohol. (La centrífuga Babcock puede ser adaptado para este propósito al hacer soportes de tubos especiales de la siguiente manera: Sección Slice de 6mm de espesor con tapón de goma del diámetro apropiado para encajar en la parte inferior de la taza de centrífuga. Pegar 2 tapones de diámetro adecuado, que lleve en el centro de un agujero del tamaño adecuado para el tubo de retención perfectamente, e inserte la sección del doble corcho en la taza). Después de la centrifugación, eliminar casi todo el butanol mediante una pipeta con perilla de goma en el extremo superior. Filtrar en celdas de fotómetro y leer con filtro con un máximo de  $T 650 \text{ nm}$ .].

Con estándares visuales: Con las muestras que producen  $>5$  unidades, comparar los colores en tubos con los de los estándares acuosas de fenol. Para obtener resultados cuantitativos en casos dudosos, (por ejemplo: pruebas produciendo 0.5-5 unidades de color), se extrae con butanol. Añadir 5.0 mL de butanol e invertir tubo lentamente varias veces, centrifugar si es necesario para aumentar la claridad de la capa de alcohol, y comparar el color azul con los colores de los estándares de fenol con tratamiento similar.

Paso11: En las pruebas se observó un fuerte y positivo desarrollo de color (por ejemplo  $\geq 20$  unidades) en los cuales 4 gotas de solución BQC puede ser insuficiente para combinarse con todo el fenol, pipetear una proporción apropiada de contenido en otro tubo, diluir a 10.0 mL con el color buffer de dilución y añadir 2 gotas adicionales de solución BQC. En cada ensayo, diluir y tratar el blanco de manera similar. Si la prueba o la muestra diluida es todavía

muy fuertemente positiva, diluir de nuevo de la misma manera hasta que el color final este dentro del alcance de las normas visuales o la curva estándar del fotómetro. Reposar por 30 min para el desarrollo del color después de la última adición de solución BQC antes de hacer la lectura final. Para corregir la lectura para la dilución, multiplicar por 2 para una dilución 5+5, por 10 para una dilución 1+9 y por 50 para una dilución 1+9 seguido de una dilución 2+8, etcétera.

Paso 12: Cuando se utiliza 1.0 mL de muestra y se adiciona 11.0 mL de reactivos (líquido total 12.0 mL, 5.0 mL de filtrado se utilizan), se multiplica el valor de la lectura por 1.2 para convertir al fenol equivalente/0.5 mL de muestra. (Si se desea, los resultados pueden ser convertidos a equivalentes de fenol/1 mL multiplicando por 2.4) los equivalentes de fenol  $>2/0.5$  mL indican la pasteurización baja de la leche, bebidas de chocolate, mantequilla y suero de queso, los equivalentes de fenol  $>1/1.5$  mL indican baja pasteurización de la leche de cabra.

*Nota:* Para las pruebas con productos lácteos concentrados, reconstituir el producto con agua destilada para llegar a la concentración inicial de sólidos de leche y probar de manera específica para productos originales.

### **Prueba 3: Fosfatasa Residual en Helados y Postres Congelados <sup>(i)</sup>**

Derretir parte de la muestra y se deja permanecer derretida  $\geq 1$ h antes de la prueba. Luego proceder como en la prueba “Fosfatasa (Residual) en Leche” literal **F**, excepto en lo siguiente:

En el paso 3, proceder como para leche en el caso de los sorbetes, para los helados sustituir el buffer sustrato hecho disolviendo fenilfosfato disódico por la

mezcla de 4 partes de buffer de bario, ver “Fosfatasa (Residual) en Leche” y 1 parte de agua destilada.

En el paso 6, proceder como para leche en el caso de los sorbetes, para los helados precipitar con un 10 mL de solución que contiene 4.5 g de sulfato de zinc heptahidratado y 0.1 g de sulfato de cobre pentahidratado/100mL.

Los controles son esenciales ya que los fenoles pueden estar presentes desde los sabores o los recipientes de plástico.

#### **Prueba 4. Grasa en Helados y Postres Congelados (i)**

##### A. Fundamento

En el método para la extracción de lípidos libres se extrae la grasa presente, se utiliza el medio alcohólico para disolver las proteínas y así permitir la separación de la grasa.

##### B. Material y Equipo

- Balanza analítica
- Baño maría
- Centrifuga
- Hot plate
- Estufa

##### C. Reactivos

- Hidróxido de amonio
- Etanol GR
- Éter etílico
- Éter de petróleo

#### D. Cristalería

- Balón volumétrico 10.0 mL
- Pipeta volumétrica 2.0 mL, 5.0 mL, 10.0 mL y 25.0 mL
- Probeta 10 mL y 25 mL

#### E. Procedimiento

Pesar en una balanza analítica 4.0-5.0g de muestra mezclada directamente en el frasco o tubo de extracción de materia grasa, utilizando una pipeta de flujo libre, diluir con agua destilada a 10 mL, trabajar la muestra dentro de una cámara y mezclar por agitación. Añadir 2 mL de hidróxido de amonio, mezclar bien y calentar en un baño de agua por 20 min a 60°C con agitación ocasional. Enfriar y proceder de la siguiente manera: Añadir 10 mL de alcohol etílico, tapar con un tapón empapado de agua destilada y agitar el matraz por 15 seg. Para la primera extracción, añadir 25 mL de éter etílico, tapar y agitar el frasco vigorosamente por 1 min, liberando la presión acumulada aflojando el tapón si es necesario. Añadir 25 mL de éter de petróleo, tapar, y repetir la agitación vigorosa durante 1 min. Centrifugar el frasco aproximadamente durante  $\geq 30$  seg a 600 rpm para obtener una separación limpia de la fase acuosa (rosa claro) y éter. Decantar la solución de éter en el plato de pesaje adecuado preparado (limpio, libres de partículas y a peso constante). Cuando la solución de éter se decante en los platos, tenga cuidado de no verter cualquier sólido suspendido o fase acuosa en plato de pesaje. El éter puede ser evaporado a  $\leq 100^\circ\text{C}$  desde los platos mientras se realiza una segunda extracción.

Para la segunda extracción, añadir 5 mL de alcohol etílico, con tapón de corcho, y agitar vigorosamente por 15 seg. A continuación, añadir 15 mL de éter etílico, reemplace el corcho y agitar el frasco vigorosamente por 1min. Añadir 15 mL de éter de petróleo, tapar y repetir agitación la vigorosa

durante 1 min. Centrifugar los frascos a 600 rpm durante  $\geq 30$  seg para obtener una separación limpia entre la fase acuosa (rosa claro) y la fase de éter. Si la interfaz está por debajo del cuello del matraz, añadir agua destilada hasta que el nivel este aproximadamente a la mitad del cuello. Añadir agua destilada lentamente dentro de la superficie interior del frasco para que no haya alteración mínima de la separación. Decantar la solución de éter de la segunda extracción en el mismo plato de pesaje utilizado para la primera extracción.

Para la tercera extracción, omita la adición de alcohol etílico y repetir el procedimiento utilizado para la segunda extracción. Evaporar completamente el solvente en la cámara sobre un hot plate a  $\leq 100^{\circ}\text{C}$  (evitar salpicaduras). Secar la grasa extraída más el plato hasta peso constante en un horno de aire forzado a  $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $\geq 30$  min) o en estufa de vacío a  $70-75^{\circ}\text{C}$  en  $> 50.8$  cm (20 pulgadas) de vacío durante  $\geq 7$  min. Retire los platos pesados del horno y coloque en el desecador para enfriar a temperatura ambiente. Apuntar el peso de cada plato pesado más la grasa.

Llevar a la par blancos de reactivo cada día que se llevan a cabo las pruebas. Para ejecutar el blanco de reactivo, reemplace la muestra de leche con 10 mL de agua destilada y llevar a cabo el procedimiento normal. Apunte el peso de cualquier residuo seco recogido y usar el valor en el cálculo. El blanco de reactivo debe ser  $< 0.0020$  g de residuos. Si el blanco de reactivo para el set de muestras es negativo utilice un número negativo en el cálculo. (*Nota:* Para restar números negativos [peso promedio de residuos de blancos] en la siguiente ecuación, añadir a [(peso plato + grasa) - peso del plato].). Un blanco negativo por lo general indica que los platos no estaban completamente secos al comienzo de la determinación o que la calibración de la balanza cambio entre el peso de los platos vacíos y platos más grasa. La causa de los blancos negativos debe ser identificada y corregida.

Cálculo:

$$\% \text{ de Grasa} = 100 \times \{[(A + \text{grasa}) - A] - B\} / C$$

Dónde: A = peso del plato, B = peso promedio de residuo del blanco y C = peso de la leche. La diferencia máxima recomendada entre los dos análisis es <0.03% de grasa.

A 3.6% de grasa:

$s_r = 0.015\%$	$RSD_R = 0.512\%$
$s_R = 0.020\%$	valor $r = 0.044\%$
$RSD_r = 0.396\%$	valor $R = 0.056\%$

### **Prueba 7: Proteínas en Sorbetes y Postres Congelados (i)**

#### I. Método Kjeldahl

- Eficacia del método:

Expresado en forma de proteínas (N × 6.38)

$$s_r = 0.014; s_R = 0.017; RSD_r = 0.385\%; RSD_R = 0.504\%$$

#### A. Fundamento

La leche se digiere con ácido sulfúrico, se usa sulfato de cobre heptahidratado como catalizador con sulfato de potasio como elevador del punto de ebullición, para liberar el nitrógeno de las proteínas y retener el nitrógeno como sal de amonio. El hidróxido de sodio concentrado se añade para liberar el amoníaco, el cual se destila y se recoge en una solución de ácido bórico y se valora.

## B. Aparatos

- Sistema de digestión/aparato de destilación: Tradicional
- Hot plate
- Soporte metálico
- Pinza para bureta
- Balanza analítica

## C. Reactivos

- Ácido sulfúrico: 95-98%, libre de nitrógeno.
- Solución catalizadora de cobre: sulfato de cobre heptahidratado. Libre de nitrógeno. Preparar una solución de 0.05g/mL de agua destilada.
- Sulfato de potasio: libre de nitrógeno.
- Solución de hidróxido de sodio 50%.
- Perlas de ebullición: tamaño Mesh 10 sugerido.
- Solución indicadora de rojo de metilo/verde de bromocresol: Disolver 0.2g de rojo de metilo y diluir hasta 100 mL en etanol al 95%. Disolver 1.0 g de verde de bromocresol y diluir hasta 500 mL en etanol al 95%. Mezcla 1 parte de solución de rojo de metilo con 5 partes de solución de verde de bromocresol (Combinar ambas soluciones).
- Solución de ácido bórico: 4%, con indicador. Disolver 40 g de ácido bórico y diluir a 1L con agua y añadir 3 mL de solución indicadora de rojo de metilo/verde de bromocresol. La solución será de color naranja claro.
- Solución de ácido clorhídrico: 0.1000N. También se puede utilizar una solución prefabricada certificada con un rango de especificación de 0.0995 a 0.1005N y uso de 0.1000N para cálculos.
- Sulfato de amonio: 99.9%
- Triptófano o Lisina clorhidrato: 99%
- Sucrosa: libre de nitrógeno

#### D. Cristalería

- Frascos de digestión: Kjeldahl. Duros, moderadamente gruesos, de vidrio resistente. Capacidad total 500 o 800 mL.
- Frascos de destilación: mismos frascos Kjeldahl equipados con un tapón de goma a través del cual pasa desde el extremo inferior una eficiente bombilla o trampa para evitar el arrastre mecánico de hidróxido de sodio durante la destilación. Conecte el extremo superior de goma a los tubos del condensador por el tubo de goma. Usar un erlenmeyer de titulación graduado de 500 mL para recoger el destilado. Asegurar la salida del condensador de manera para garantizar una completa absorción del amoníaco destilado en una solución de ácido bórico.
- Bureta de titulación: 50 mL. Clase A o equivalente.
- Pipeta volumétrica 1.0 mL
- Probeta 25 mL y 50 mL
- Erlenmeyer 500 mL

#### E. Preparación de la muestra

Pesar en balanza analítica 15.0 g de sulfato de potasio, medir con pipeta volumétrica 1.0 mL de solución catalizador de sulfato de cobre pentahidratado y 8-10 perlas de ebullición, y agregarlos a un matraz de digestión. Calentar en hot plate la muestra a  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mezclar la muestra mediante el vertido en recipientes limpios de forma repetida. Pesar en balanza analítica 4.0 g de muestra caliente y colocarla inmediatamente en el matraz de digestión. Medir con probeta y añadir 25 mL de ácido sulfúrico, enjuagar cualquier residuo de la muestra desde el cuello del matraz hacia abajo del bulbo. El frasco puede taparse y mantenerse para llevar a cabo luego la digestión. Digerir y destilar un blanco cada día.

## F. Determinación

Ajuste del calentador de digestión: la conducta de la digestión sobre el dispositivo de calentamiento se puede ajustar poniendo 250 mL de agua destilada a 25°C para comenzar la ebullición en 5-6 min. Para determinar el calentamiento máximo a ser usado durante la digestión, precalentar en el quemador durante 10 min (gas) o 30 min (eléctrico) y evaluar. Añadir 3 o 4 perlas de ebullición a 250 mL de agua destilada a 25°C y colocar el frasco en un quemador precalentado. Determinar la temperatura del calentador que lleva el agua desde 25°C a ebullición en 5-6 min en cada quemador. Este es el valor máximo del quemador para ser utilizado durante la digestión.

Frasco de digestión: Colocar en posición inclinada con el sistema de eyección de humo. Iniciar el calentamiento lo suficientemente lento como para que la muestra no forme espuma hasta el cuello del frasco Kjeldahl. Se digiere al menos 20 min o hasta que humos blancos aparezcan en el frasco. A continuación, aumentar el ajuste del quemador a medio camino de ajuste de lo máximo determinado anteriormente y calentar durante 15 min. Luego, aumentar el calor al ajuste máximo establecido. Cuando lo digerido este claro (claro con color azul-verde claro), continúe hirviendo por 1-1.5h al ajuste máximo (tiempo total 1.8-2.25h).

Para determinar el tiempo de ebullición específico necesario para las condiciones de análisis en su laboratorio, seleccione una proteína alta, muestra de leche alta en grasa y determinar el contenido de proteína utilizando diferentes tiempos de ebullición (1-1.5h) después de que este claro. La prueba de proteína aumenta con el aumento de tiempo de ebullición promedio (0-1.5h), se vuelve constante, y luego disminuye cuando el tiempo de ebullición es demasiado de largo. Seleccione el tiempo de ebullición máximo que produce la proteína en la prueba.

Al final de la digestión, la solución debe ser clara y libre de materiales no digeridos. Enfriar el ácido digerido a temperatura ambiente (alrededor de 25min). La digestión fría debe ser líquido o líquido con algunos pequeños cristales (gran cantidad de cristalización antes de la adición de agua indica un pequeño residuo de ácido sulfúrico al final de la digestión y puede dar lugar a valores bajos de la prueba). Después de que la digestión se enfría a temperatura ambiente, añadir 300 mL de agua destilada al matraz y agitar para mezclar (para frascos de 800 mL añadir 400 mL de agua destilada). Cuando el agua a temperatura ambiente es agregada algunos cristales pueden formarse dentro de la solución, lo que es normal. Deje enfriar la mezcla a temperatura ambiente antes de la destilación. Los frascos con cierre hermético para la destilación en el momento más tarde.

Destilación: Encienda el condensador de agua. Añadir 50 mL de solución de ácido bórico con indicador a un frasco erlenmeyer de titulación graduado de 500 mL y colocar el frasco sobre la punta del condensador de manera que la punta este muy por debajo la superficie de la solución de ácido bórico. A temperatura ambiente, diluir la digestión, añadiendo cuidadosamente 75 mL de hidróxido de sodio al 50% por la pared lateral del matraz de Kjeldahl sin agitación alguna. El hidróxido de sodio forma una capa clara por debajo de la digestión diluida. Conectar inmediatamente el matraz al bulbo de destilación sobre el condensador. Vigorosamente agitar el frasco para mezclar el contenido fuertemente, calentar hasta que todo el amoníaco ha sido destilado ( $\geq 150$  mL de destilado,  $\geq 200$  mL en volumen total). No descuide la destilación. El frasco (500 mL) podrá ser tapado en este punto (150 mL de destilado, 200 mL de volumen total).

Baje el matraz receptor y deje drenar el líquido de la punta del condensador. Apague el calor de destilación. Valorar la solución de ácido bórico recibida con solución de ácido clorhídrico estándar 0.1N hasta la primera

traza de color rosa. Una placa de agitación con luz puede ayudar a la visualización de punto final. Registrar los mL de ácido clorhídrico hasta por lo menos 0.05mL más cercanos.

#### G. Verificación de recuperación de nitrógeno.

Ejecutar la recuperación de nitrógeno para comprobar la exactitud de los procedimientos y equipos.

Pérdida de nitrógeno: Usar 0.12 g de sulfato de amonio y 0.85 g de sucrosa por frasco. Añadir el resto de los reactivos como se indica en la Preparación de la Muestra, **E**. Digerir y destilar bajo las mismas condiciones como para la muestra de la leche. La recuperación será de al menos 99%.

Eficiencia de digestión: Usar 0.16 g de clorhidrato de lisina o 0.18 g de triptófano, con 0.67 g de sacarosa por matraz. Añadir el resto de reactivos como se indica en la preparación de muestras, **E**. Recopilar y destilar bajo las mismas condiciones que para una muestra de leche. La recuperación será de al menos 98%.

#### H. Cálculos

Calcular los resultados de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Nitrógeno} = [1.4007 \times (V_s - V_b) \times N] / W$$

Dónde  $V_s$  y  $V_b$  = mL de HCl reactivo utilizado para la muestra y el blanco respectivamente,  $N$  = normalidad de la solución de HCl y  $W$  = peso de muestra en g. *Nota:* Multiplicar el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.38 para calcular el porcentaje "Proteína". Esto es "proteína" sobre un total de nitrógeno base.

La diferencia máxima recomendada entre los dos análisis es de 0.03% de "Proteína."

## I. Valores de Repetibilidad y Reproducibilidad

Para los parámetros de rendimiento del método obtenidos en colaboración en el estudio de este método, el valor de  $r = 0.038$  y valor  $R = 0.049$  (expresado en base a la proteína [ $N \times 6.38$ ]).

## J. Aparatos

- Bloque de digestión: bloque de aleación de aluminio o aparato equivalente, con control de temperatura ajustable y un dispositivo para medir un bloque de temperatura.
- Tubos de digestión: Capacidad 250 mL.
- Unidad de Destilación: Por destilación al vapor. Para aceptar tubos de digestión de 250 mL y frascos de titulación de 500 mL.
- Frascos de titulación destilación: frasco erlenmeyer de titulación graduados de 500 mL.
- Bureta de titulación: 50.0 mL. Clase A o equivalente.

## K. Reactivos.

Ver **C**.

Nota: peso al 40%/peso de hidróxido de sodio puede ser utilizado en lugar de peso al 50%/peso. Perlas de ebullición no deben utilizarse si el equipo de manufactura no recomiendan su uso.

## L. Cristalería

Ver **D**.

## M. Preparación de la muestra

Añadir 12.0 g de sulfato de potasio y 1 mL de solución catalizadora de sulfato de cobre pentahidratado al tubo de digestión. Calentar la leche a

38±1°C. Mezclar la leche mediante el vertido de la leche en recipientes limpios de forma repetida. Pesar la muestra caliente (5±0.1 mL) y se coloca inmediatamente en el tubo de digestión. (Nota: Los pesos deben registrarse a más cercana 0.0001 g.) Agregar 20 mL de ácido sulfúrico. El frasco puede taparse y mantenerse para llevar a cabo luego la digestión. Digerir y destilar un blanco (todos los reactivos y sin muestra) cada día.

#### N. Determinación.

Bloque de digestión: establecer la temperatura inicial baja para controlar la espuma (180-230°C). Colocar los tubos con aspirador conectados en el bloque digestor, la succión debe ser suficiente para eliminar los humos. Digerir por 30min o hasta que se desarrollen humos blancos. Aumente la temperatura a 410-430°C y digerir hasta que se aclare. Puede ser necesario aumentar la temperatura gradualmente durante 20 min para controlar la formación de espuma. No deje que la espuma dentro del tubo sea superior a 4-5 cm debajo del dispositivo de colectores de humo en la parte superior del tubo. Después de digerir a color claro (claro de color azul-verde claro), continúe hasta ebullición (el ácido sulfúrico debe ebullición) durante al menos 1h, tiempo total de digestión 1.75-2.5h. Para determinar la duración de tiempo de ebullición necesario para las condiciones del análisis en su laboratorio, seleccione proteínas altas, muestras de leche con alto contenido de grasas y determinar el contenido de proteína utilizando diferentes tiempos de ebullición (1-1.5h) después del aclarado. La prueba de la proteína media aumenta con el aumento del tiempo de ebullición (0-1.5h), se vuelve constante, y disminuye cuando el tiempo de ebullición es demasiado largo. Seleccione el tiempo de ebullición que produce la proteína de prueba máxima. (Nota: Antes de retirar los tubos calientes del bloque, asegúrese de que no hay alguna capa de condensado en el colector aspirador. Si hay una capa de líquido, aumentar la aspiración para eliminar el líquido). Al final de la digestión, la digestión debe ser clara y libre de material

sin digerir. Enfriar la digestión a temperatura ambiente (aproximadamente 25min.) La digestión fría debe ser un líquido o líquido con algunos pequeños cristales en el fondo del tubo. (Una cristalización excesiva indica muy poco ácido sulfúrico residual al final de la digestión y puede causar resultados bajos. Para reducir la pérdida de ácido durante la digestión, reducir la velocidad de aspiración de humos). Después que la digestión se ha enfriado a temperatura ambiente, añadir 85 mL de agua destilada (el blanco puede requerir 100 mL) a cada tubo, agitar para mezclar, y dejar enfriar a temperatura ambiente. Cuando se añade agua a temperatura ambiente algunos cristales se pueden formar y luego pueden ir dentro de la solución, lo que es normal. Los tubos pueden ser tapados para destilar tiempo más tarde.

Destilación: colocar 50% (o 40%) de hidróxido de sodio en el tanque de álcali de la unidad de destilación. Ajustar el volumen dispensado a 55 mL (65 mL para 40% NaOH). Fije el tubo de digestión que contiene la digestión diluida a la unidad de destilación. Colocar el frasco erlenmeyer de titulación graduado de 500 mL que contiene 50 mL de solución ácido bórico con indicador sobre la plataforma de recepción, con el tubo del condensador que se extiende debajo de la superficie de la solución de ácido bórico. Destilar el vapor hasta que se recoge  $\geq 150$  mL de destilado ( $\geq 200$  mL en volumen total). Retire matraz receptor. Valorar la solución recolectada de ácido bórico con estándar ácido clorhídrico 0.1000N hasta le primer rastro de color rosa. Una placa de agitación con luz puede ayudar a la visualización de punto final. Registre los mL de ácido clorhídrico más cercana a 0.05 mL.

#### O. Verificación de Recuperación de Nitrógeno.

Ejecutar la recuperación de nitrógeno para comprobar la exactitud de los procedimientos y el equipo.

Pérdida de nitrógeno: Usar 0.12 g de sulfato de amonio y 0.85 g de sucrosa por frasco. Añadir el resto de los reactivos como se indica en preparación de la muestra, **M**. Digerir y destilar bajo las mismas condiciones que para una muestra de leche. La recuperación será de al menos 99%.

Eficiencia de digestión: Usar 0.16 g de clorhidrato de lisina o 0.18 g de triptófano, con 0.67 g de sucrosa por matraz. Añadir el resto de los reactivos como se indica en preparación de la muestra, **M**. Digerir y destilar bajo las mismas condiciones que para una muestra de leche. La recuperación será de al menos 98%.

#### P. Cálculos

Ver **H**.

#### Q. Valores de Repetibilidad y Reproducibilidad.

Para los parámetros de rendimiento del método obtenidos en colaboración del estudio de este método, el valor de  $r = 0.038$  y  $R =$  valor de 0.049.

## II. Método de Fijación del Colorante

### A. Aparatos y Equipos:

- Espectrofotómetro: colorímetro fotoeléctrico o espectrofotómetro ajustado a 480nm. Usar diluciones de buffer de solución de reactivo colorante que representa 0.350, 0.600, 0.750 y 0.850 g/L para calibrar el espectrofotómetro. Trazar  $A$  contra la concentración para usar como gráfico de calibración.
- Celdas de corto recorrido: celdas con longitud de recorrido de 0.3nm. Medir arsénico a 370 nm de cromato de potasio 0.0400 g/L en 0.05N de hidróxido de potasio. Calcular la longitud del trayecto en

mm, del  $b = A_s/0.09914$ . Disponga el tubo de drenaje y el tubo de alimentación en su caso, de acuerdo con las instrucciones del fabricante para asegurar un flujo adecuado y los niveles de líquidos. El colorímetro adecuado con el recorrido corto, la celda de flujo y la curva de calibración están disponibles en Udy Corporation.

- Pipeta automática: Ajustar para entregar 40.44 g de solución colorante reactivo a 20°C (equivalente a 39.887 g de agua destilada, 40 mL). Ajuste de manera que 10 entregas sucesivas se encuentran a  $40.44 \pm 0.02$  g.
- Jeringa: Estandarizar la jeringa de muestreo para proporcionar 2.24 mL a 20°C (equivalente a 2.2337 g de agua destilada)
- Balanza analítica
- Hot plate

#### B. Cristalería

- Bureta 10.0 mL
- Probeta 100 mL
- Beaker 250 mL

#### C. Reactivos

- Ácido anaranjado 12 purificado: Disolver 100 g de colorante en 400 mL de agua en ebullición y agitar en 400 mL de alcohol desnaturalizado hirviendo. Deje que se enfríe a 0-5°C por 15h. Filtrar a través de Büchner, lavar una vez con alcohol frío y continuar el vacío hasta que se elimine el alcohol. Secar a 125°C. Repetir la re-cristalización y secar en estufa de vacío a 100°C.
- Solución de colorante reactivo: (1) Formulación I: Disolver 1.30 g de ácido anaranjado 12 dos veces recristalizado en 1L de buffer fosfato 0.05M. (2) Formulación I<sup>1</sup>: Disolver 1.32 g de ácido anaranjado 12

recristalizado dos veces (corregido para el ensayo) en 1L de solución que contiene 60 mL de ácido acético y 10 g de ácido oxálico (<sup>1</sup>-Primera acción oficial como una alternativa para, pero no es intercambiable con, Formulación I). Hacer correcciones al ensayo calculando la concentración de colorante en la solución de A, utilizando la ecuación  $C = A / (5.90 \times b)$ , donde *b* es la longitud del recorrido de la celda en mm. Comprobar una solución adicional en contra de cualquier leche con contenido de proteína conocida o una solución de colorante previamente validada. (La misma formulación de colorante debe ser utilizada para el ensayo y la calibración).

- Solución colorante de referencia: Disolver 0.600 g de ácido anaranjado 12 dos veces recristalizado y 1mL de ácido propiónico en 900mL de agua destilada. Diluir a 1L con agua destilada. Corregir para la prueba.
- Buffer fosfato 0.05M: pH 1.8-1.9. Disolver 3.4 g de fosfato de potasio monobásico, 3.4 mL de ácido fosfórico (1[85%]+1) 60 mL de ácido acético, 1 mL ácido propiónico y 2 g de ácido oxálico en 800 mL de agua destilada. Diluir a 1L con agua destilada.

#### D. Preparación de las muestras

- Leche líquida, mezcla de helado: Usar según lo recibido.
- Leche de mantequilla, mitad y mitad, bebida de chocolate: Se calienta a 35-38°C y agitar fuertemente.
- Leche descremada en polvo (LDP): Utilizar en forma de polvo o de reconstituir como sigue: Pesar la bolsa de plástico. Añadir 1 cucharada rasa NFDM (aproximadamente 7.5 g) y pesar de nuevo. Añadir 75 mL de agua destilada (aproximadamente 60°C). Sellar la bolsa y agitar vigorosamente por 3 min. Deje que se enfríe a temperatura ambiente. No utilice baño de agua. Pesar de nuevo. Refrigerere durante la

noche. Reconstituir una nueva porción de muestra NFDM para cada réplica.

#### E. Determinación.

Llevar a cero el espectrofotómetro. Ajustar la sensibilidad de la solución de referencia del colorante, leer 42% de  $T$  a 480 nm. Colocar 2.24 mL de leche, suero de leche, o mitad y mitad, 2.5 a 2.8 mL de bebida de chocolate o NFDM reconstituido, desde la jeringa, o 2.0 a 2.3 g de la mezcla de helado o 0.22 a 0.24 g de polvo NFDM en una botella dispensadora de polietileno de 2 oz equipada con papel hilado de vidrio dentro de la tapa. Determinar el peso de la muestra a 0.5 mg. Añadir 40.44 g de solución colorante reactivo a la botella con la pipeta automática. Agitar vigorosamente 30 seg, excepto agitar la botella que contiene el polvo NFDM por 3 min. Restablecer la lectura de referencia de la solución colorante al 42% de  $T$ , si es necesario. Gotear el filtrado desde el dispensador de la botella en el embudo de la celda y extraer dentro de la celda. Cuando la lectura es constante, registrar lo más cercano al 0.1%, evitando un paralaje. Revise el alcance del espectrofotómetro. Si la lectura no es de 42% con solución de colorante de referencia, ajuste los instrumentos y volver a leer la muestra. Todas las soluciones deben estar a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  cuando se coloca en la celda. Medir la temperatura antes de la lectura, la solución se calienta mientras esta en el instrumento.

#### F. Cálculos

Para formulación I: usar el diagrama de calibración preparado para el instrumento, determinar la concentración del colorante (mg/mL) en el filtrado de la muestra desde la lectura observada. Volumen =  $(1/1.012) \times (\text{g de muestra} + 40.44)$ , mg de colorante no fijado = volumen  $\times$  concentración de colorante, los mg de colorante fijado = 52 mg de colorante disponible - mg de colorante no fijado. Proteína en mg = mg de colorante fijado/0.312.

$$\% \text{ Proteína} = \text{mg de proteína} / (\text{g de muestra} \times 10)$$

$$\% \text{ Proteína en NFDM} = A \times B / \text{g de muestra utilizada NFDM}$$

Dónde: A = porcentaje de proteína en NFDM reconstituida y B = gramos de NFDM reconstituida preparada.

Para formulación II: Utilizar la curva de calibración preparada para el instrumento, determinar la concentración de colorante (mg/mL) en la muestra filtrada de la lectura observada.

$$\% \text{ Proteína} = (1.250 - \text{concentración de colorante de la muestra}) / 0.1824$$

**Tabla N° XXI:** Especificaciones para los parámetros requeridos por las NSO 67.01.11:04 para Helados.

Características	Tipos de Helados					
	Helado de Leche	Helado de Crema	Helado con grasa vegetal	Helado de crema vegetal	Helado de Agua	Nieve
Sólidos totales, en porcentaje en masa, mínimo	30	35	30	35	15	20
Grasa de leche, en porcentaje en masa	Menor o igual a 7%	Mayor o igual a 8%	0	0	0	0
Grasa no láctea, en porcentaje en masa, mínimo	0	0	Menor o igual a 7%	Mayor o igual a 8%	0	0
Proteínas en porcentaje en masa, mínimo	1.5	2	1.5	2	0	0
Masa por volumen en g/L, mínimo	475	475	475	475	710	710

**METODOS DE ANALISIS PARA  
JALEA REAL**

## JALEA REAL

**Norma Consultada:** NSO 67.38.03:05 Jalea Real

### **Alcance:**

Esta norma aplica a la jalea real de tipo fresco y liofilizado producida y comercializada en el país como la importada, dentro de las que se encuentran la jalea real fresca y liofilizada.

### **Pruebas Organolépticas:**

- **Apariencia:** sustancia cremosa
- **Color:** varia de blanco a marfil
- **Olor:** fenólico característico
- **Sabor:** ácido y picante

### **Pruebas Fisicoquímicas:**

**Tabla N° XXII:** Resumen de métodos de análisis para cada prueba de Jalea Real

<b>Prueba</b>	<b>Método</b>
Cenizas	Pérdida por Secado
Acidez Libre, Lactona y Acidez Total	Volumétrico
Humedad	Pérdida por Secado
pH	Potenciométrico
Proteínas	Kjeldahl
Glucosa	Cromatografía Cualitativa
Polarización Directa (Sacarosa)	Polarimetría

**Tabla N° XXII:** Continuación

Prueba	Método
Fructosa	Cromatografía de Capa Fina
Lípidos y Fosforo Lipídico	Método de Cenizas Húmedas
Fósforo Total	Titulación

**Tabla N° XXIII:** Resumen de métodos de análisis según AOAC para Jalea Real

Prueba	Método AOAC	
Cenizas	920.181	44.4.05
Acidez Libre, Láctona y Total	962.19	44.4.20
Humedad	969.38	44.4.04
pH	945.27	27.6.07
Proteínas	945.23	27.6.03
Glucosa	959.12	44.4.14
Polarización Directa	920.182	44.4.08
Fructosa	979.22	4.4.16
Lípidos y Fósforo Lipídico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	923.07	34.1.08
Fósforo Total (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	931.06	34.1.10

**Prueba 1: Humedad** <sup>(i)</sup>

## A. Fundamento

La muestra se somete a un proceso de secado mediante calentamiento a una temperatura suficiente como para que pierda el agua por evaporación hasta peso constante. La diferencia de pesos antes y después del secado permite la estimación del contenido de agua en la muestra.

## B. Material y Equipos

- Tamiz N° 40
- Estufa
- Desecador
- Balanza analítica
- Refractómetro

## C. Secado directo

Digerir la arena y pasar por un tamiz N° 40, lavar, secar y quemar. Conservar en un recipiente cerrado. Colocar 25-30 g de arena preparada y con una varilla corta distribuirla en un plato de 55 mm de diámetro y 40 mm de profundidad, provistos de tapa. Secar bien, cubrir el recipiente, enfriar en desecador y pesar inmediatamente con un peso de muestra suficiente para producir 1g de sólido. Agregar, de ser necesario, pocos mL de agua destilada para incorporar la muestra fuertemente con la arena. Secar a 60°C bajo presión  $\leq 50$ mmHg (6.7kPa). Purgando el horno con corriente de aire seco (secado al pasar por sulfato de calcio anhidro, pentóxido de fósforo u otro desecante eficiente) durante el secado para eliminar el vapor de agua. Haga pesadas de prueba en intervalos de 2h hasta el periodo de secado final (18h) hasta que el cambio de peso sea  $\leq 2$ mg. Para materiales que no contienen fructosa u otra sustancia de fácil descomposición, secar 8-10h a presión atmosférica en el horno a 100°C, enfriar en el desecador y pesar, repitiendo el calentamiento y pesando la pérdida en 1h de calentamiento es  $\leq 2$ mg. Reportar la pérdida de peso como agua.

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{\text{[g de muestra} - \text{g de muestra seca]}}{\text{g muestra}} \right) \times 100$$

*Nota:* Como la arena seca, así como la muestra seca, absorben humedad apreciablemente cuando se coloca junto a la mayoría de agentes desecantes,

hacer todas las pesadas rápidamente como sea posible después de enfriar en el desecador.

#### D. Por medio del Refractómetro

Determine la lectura del refractómetro de la jalea real a 20°C y obtener el correspondiente porcentaje de humedad de la **tabla N° XXIV**. Si la determinación se ha hecho a temperatura distinta de 20°C, corregir la lectura a la temperatura estándar de 20°C de acuerdo a la nota.

**Tabla N° XXIV:** Relación entre el Índice de Refracción y Contenido de Agua en Miel<sup>a</sup>

Water Content, %	Refractive Index			Water Content, %	Refractive Index		
	20° C <sup>b</sup>	60° F <sup>c</sup>	40° C		20° C <sup>b</sup>	60° F <sup>c</sup>	40° C
13.0	1.5044	1.5053	1.4998	19.0	1.4890	1.4900	1.4845
13.2	1.5038	1.5048	1.4993	19.2	1.4885	1.4895	1.4840
13.4	1.5033	1.5043	1.4988	19.4	1.4880	1.4890	1.4835
13.6	1.5028	1.5038	1.4983	19.6	1.4875	1.4885	1.4829
13.8	1.5023	1.5033	1.4978	19.8	1.4870	1.4880	1.4824
14.0	1.5018	1.5027	1.4973	20.0	1.4865	1.4875	1.4819
14.2	1.5012	1.5022	1.4968	20.2	1.4860	1.4870	1.4814
14.4	1.5007	1.5017	1.4962	20.4	1.4855	1.4865	1.4809
14.6	1.5002	1.5012	1.4957	20.6	1.4850	1.4860	1.4804
14.8	1.4997	1.5007	1.4952	20.8	1.4845	1.4855	1.4799
15.0	1.4992	1.5002	1.4947	21.0	1.4840	1.4850	1.4794
15.2	1.4987	1.4997	1.4942	21.2	1.4835	1.4845	1.4788
15.4	1.4982	1.4992	1.4937	21.4	1.4830	1.4840	1.4783
15.6	1.4976	1.4986	1.4932	21.6	1.4825	1.4835	1.4778
15.8	1.4971	1.4981	1.4927	21.8	1.4820	1.4830	1.4773
16.0	1.4966	1.4976	1.4922	22.0	1.4815	1.4825	1.4768
16.2	1.4961	1.4971	1.4916	22.2	1.4810		
16.4	1.4956	1.4966	1.4911	22.4	1.4805		
16.6	1.4951	1.4961	1.4906	22.6	1.4800		
16.8	1.4946	1.4956	1.4901	22.8	1.4795		
17.0	1.4940	1.4951	1.4896	23.0	1.4790		
17.2	1.4935	1.4946	1.4891	23.2	1.4785		
17.4	1.4930	1.4940	1.4886	23.4	1.4780		
17.6	1.4925	1.4935	1.4881	23.6	1.4775		
17.8	1.4920	1.4930	1.4876	23.8	1.4770		
18.0	1.4915	1.4925	1.4870	24.0	1.4765		
18.2	1.4910	1.4920	1.4865	24.2	1.4760		
18.4	1.4905	1.4915	1.4860	24.4	1.4755		
18.6	1.4900	1.4910	1.4855	24.6	1.4750		
18.8	1.4895	1.4905	1.4850	24.8	1.4745		
				25.0	1.4740		

<sup>a</sup>-Valor para 20°C y 60°F son cálculo Wedmore, 40°C valores son calculados de la ecuación Auerbach y Borries. Valores >22.0% son extendidos por el Comité del Codex sobre Métodos de Análisis de Muestras (1968), <sup>b</sup>-Si el índice de refracción es medido a temperatura encima (abajo) 20°C, agregar (restar) 0.00023°C, encima (abajo) 20°C, antes de usar la tabla, <sup>c</sup>-Si el índice de refracción es medido a temperatura encima (abajo) 60°F, agregar (restar) 0.00013°F, encima (abajo) 60°F, antes de usar la tabla

## **Prueba 2: Cenizas** (i)

### A. Fundamento

La muestra se incinera hasta obtener cenizas. La diferencia de los pesos antes y después de la incineración permite la estimación del contenido de cenizas.

### B. Aparatos y Equipos

- Mufla
- Balanza analítica
- Lámpara infrarroja (IR)
- Plato de platino
- Desecador

### C. Determinación

Pesar en balanza analítica 5.0-10.0g de muestra en un plato de platino tarado. Colocar bajo una lámpara infrarroja de 375 vatios con una entrada de voltaje variable y aumentar lentamente el voltaje aplicado hasta que la muestra sea de color negro, en este momento ya no hay peligro de pérdida por la formación de espuma. Obtener la ceniza colocando la muestra en el horno a 600°C hasta obtener un peso constante (24h). Dejar enfriar en desecador y pesar.

## **Prueba 3: Acidez Libre, Láctona y Total** (i)

### A. Fundamento

El método consiste en determinar la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizado, expresando los resultados de la acidez titulable como el equivalente en masa.

#### B. Aparatos

- Balanza analítica
- Agitador magnético
- pHmetro
- Soportes metálicos
- Pinzas para bureta

#### C. Reactivos

- Hidróxido de sodio 0.05N
- Ácido clorhídrico 0.05N

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo 1

#### D. Cristalería

- Probeta 100mL
- Beaker 250mL
- Pipeta volumétrica 10.0mL
- Erlenmeyer 125mL
- Bureta 10.0mL

#### E. Determinación

Disolver 10g de la muestra en 75mL de agua destilada libre de dióxido de carbono en un beaker de 250mL. Agitar con agitador magnético, sumergir los electrodos del pHmetro en la solución y registrar la lectura. Valorar con hidróxido de sodio 0.05N a una velocidad de 5.0mL/min. Detener la adición de hidróxido de sodio a un pH de 8.50. Inmediatamente pipetear 10mL de hidróxido de sodio 0.05N y rápidamente titular con ácido clorhídrico 0.05N desde una bureta de 10mL a pH 8.30. Calcular como miliequivalentes/kg:

Cálculo de acidez libre:

$$\text{Acidez libre} = (\text{mL NaOH } 0.05N - \text{mL blanco}) \times 50 / \text{g de mx}$$

Cálculo de lactona:

$$\text{Lactona} = (10.00 - \text{mL de HCl } 0.05N) \times 50 / \text{g de mx}$$

Cálculo de acidez total:

$$\text{Acidez total} = \text{acidez libre} + \text{lactona}$$

#### **Prueba 4: pH** (xii)

##### A. Fundamento

El pHmetro mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de referencia (generalmente de plata /cloruro de plata) y un electrodo de vidrio que es sensible al ión hidrógeno. El pH es la concentración de iones hidronio ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) presentes en la muestra.

##### B. Material y Equipo

- pHmetro

##### C. Cristalería

- Beaker 250mL
- Termómetro
- Probeta 100mL

##### D. Procedimiento

Usando una solución al 10% (10g de muestra disueltos en 100mL de agua destilada) proceder utilizando un pHmetro de electrodo de referencia. Siga las instrucciones del fabricante para el potenciómetro utilizado. Compruebe el

medidor de pH antes y después de su uso contra un buffer estándar de ftalato ácido de potasio.

### **Prueba 5: Proteínas** <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

Por medio de la ebullición de la muestra en ácido sulfúrico concentrado se efectúa la destrucción oxidativa de la materia orgánica de la muestra y la reducción del nitrógeno orgánico a amoníaco, el amonio es retenido como bisulfato de amonio y puede ser determinado *in situ* o por destilación alcalina y titulación.

#### B. Material y Equipo

- Sistema de digestión Kjeldah
- Baño maría
- Balanza analítica
- Soporte
- Pinza para bureta
- Papel filtro
- Picnómetro: utilice cualquier picnómetro adecuado.

#### C. Reactivos

- Acetona GR
- Hidróxido de sodio sólido GR
- Oxido de mercurio (II)
- Mercurio metálico
- Sulfato de potasio
- Sulfato de sodio
- Ácido sulfúrico concentrado
- Tiosulfato de sodio

- Zinc metálico
  - Solución de hidróxido de sodio estándar
- Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo 1

#### D. Cristalería

- Pipeta volumétrica 25mL
- Balón de digestión
- Balón de destilación
- Picnómetro
- Probeta 25mL y 100mL
- Bureta 50mL
- Erlenmeyer 250mL

#### E. Procedimiento

Pesar en una balanza analítica 5.0g de muestra y diluir en un frasco volumétrico de 50mL con agua destilada caliente, enfriar. Transferir 25.0mL de esta solución a un matraz de digestión Kjeldahl y proceder de la siguiente manera: Rellenar un picnómetro limpio a fondo con agua recién destilada, tapar y sumergir en un baño de agua a temperatura constante con el nivel del baño por encima de la marca de graduación del picnómetro. Después de 30min, retirar el tapón y con el tubo capilar ajustar hasta que el fondo del menisco es tangente a la marca de graduación. Secar el interior del cuello del picnómetro con un pequeño rollo de papel filtro, tapar y sumergir en agua destilada a temperatura ambiente por 15min. Retirar el picnómetro, secar, dejar reposar 15min y pesar. Enjuagar con acetona el picnómetro vacío y secar bien con aire por succión. Dejar que el frasco vacío llegue a temperatura ambiente, tapar y pesar.

$$\text{Peso del aire de contenido de agua destilada} = W_p - W_v$$

$$\text{Gravedad específica en aire} = S/W$$

Dónde:  $W_p$  = peso del picnómetro lleno,  $W_v$  = Peso picnómetro vacío,  $S$  = peso de la muestra y  $W$  = peso del agua.

F. Determinar nitrógeno como sigue:

Pesar en una balanza analítica 5.0g de muestra y transferir a un matraz de digestión. Añadir 0.7g de óxido de mercurio ó 0.65g de mercurio metálico, 15g de sulfato de potasio en polvo o sulfato de sodio anhidro y 25mL de ácido sulfúrico. Use un volumen mayor de ácido sulfúrico si es necesario para completar la digestión. Colocar el frasco en posición inclinada y calentar suavemente hasta que la espuma cese (si es necesario, agregue una pequeña cantidad de parafina para reducir la formación de espuma), hervir vigorosamente hasta que la solución sea clara y luego por  $\geq 30$ min más (2h para muestras que contienen material orgánico), enfriar. Medir en una probeta 200mL de agua destilada y agregar al frasco, enfriar a  $< 25^\circ\text{C}$ , añadir 25mL de sulfato de sodio o solución de tiosulfato de sodio y mezclar para precipitar el mercurio. Añadir algunos gránulos de zinc para regular la ebullición, inclinar el frasco y añadir capas de hidróxido de sodio sin agitación (para cada 10mL de ácido sulfúrico usado, o su equivalente en ácido sulfúrico diluido, añadir 15g de hidróxido de sodio sólido o una solución suficiente para hacer que los contenidos sean fuertemente alcalinos) (una solución de tiosulfato o sulfato de sodio puede ser mezclado con la solución de hidróxido de sodio antes de la adición al matraz). Inmediatamente conectar el matraz al bulbo de destilación o condensador y con la punta del condensador inmersa en ácido estándar agregar 5-7 gotas de indicador en el recipiente, gire el matraz para mezclar el contenido fuertemente y luego calentar hasta que todo el amoníaco sea destilado ( $\geq 150$ mL de destilado). Quite el recipiente, lave la punta del condensador y valorar el exceso de ácido estándar en el destilado con la

solución de hidróxido de sodio estándar. Corrija para la determinación del blanco en los reactivos.

$$\% N = [(mL A \times N_a) - (mL B \times N_n)] \times 1.4007 / g mx$$

Dónde: A = mL de ácido estándar,  $N_a$  = normalidad del ácido, B = mL de hidróxido de sodio y  $N_n$  = normalidad del hidróxido de sodio. Calcular las proteínas, utilizando el factor  $N \times 6.25$

### **Prueba 6: Glucosa <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

Identificar utilizando el método de cromatografía de capa fina la presencia de glucosa a través del valor de  $R_f$ .

#### B. Aparatos y Equipos

- Centrifuga
- Jeringa cromatográfica
- Placa cromatográfica
- Cámara cromatográfica
- Estufa

#### C. Reactivos

- Reactivo cromogénico de anilina-difenilamina (reactivo revelador):  
Disolver 500mg de difenilamina.HCl y 0.55mL de anilina bidestilada en 50mL de acetona GR. Añadir 5mL de ácido fosfórico 85%. Preparación reciente.
- Etanol GR
- Acetona GR
- Fase móvil: alcohol n-propílico:acetato de etilo: agua destilada (7+1+2)

#### D. Cristalería

- Pipetas volumétricas 1.0mL, 2.0mL, 5.0mL, 10.0mL
- Probeta 25mL

#### E. Preparación de la Muestra

Diluir una cantidad de muestra con igual volumen de agua destilada. Colocar 0.5mL de esta solución en un pequeño tubo de centrífuga, añadir 4.0mL de etanol absoluto, agitar y centrifugar. Decantar el líquido sobrenadante transparente o ligeramente turbio, disolver el precipitado en 0.5mL de agua destilada, reprecipitar con 4mL de etanol absoluto y centrifugar. Decantar y disolver el precipitado en 0.1mL de agua destilada. Aplicar 2 $\mu$ L en la placa cromatográfica, las manchas de control como miel pura y/o melaza y jarabe de maíz tratarla de la misma manera. Realizar el sistema cromatográfico como sigue: Colocar el solvente en el tanque de desarrollo 15min antes de insertar la placa. Aplicar 2  $\mu$ L y 6 $\mu$ L de solución prueba (2x3 o 3x2) a la placa. Aplicar los puntos de control preparados anteriormente. Las soluciones control se pueden conservar mediante la congelación o el secado. Colocar la placa en el tanque cromatográfico de desarrollo hasta que el frente del solvente se aproxima a la parte superior de la placa. Retire la placa, secar y rociar con el reactivo revelador de color (*Precaución:* Evite el contacto con el spray). Dejar que la acetona se evapore y colocar en el horno a 90-95°C hasta que los puntos estén bien desarrollados (alrededor de 7-10min).

#### F. Cromatografía

Cromatografía ascendente o descendente puede ser usada. El solvente adecuado para la descendente es alcohol n-propílico-acetato de etilo-agua destilada (7+1+2). Equilibrar 45min y correr  $\geq$ 40h, dejando un goteo de solvente sobre el borde inferior del papel. El uso ascendente es más corto (aproximadamente 6h), colocar el rollo de papel en el cilindro, los bordes de

primera necesidad y que figuran en el vaso cilíndrico, utilizando alcohol isoamílico-piridina-agua destilada (7+6+7). Para obtener mayor resolución, secar el papel y repetir el recorrido  $\geq 1$  vez.

El recorrido se hace con el solvente adecuado, evaporar y secar el papel cromatográfico. Sumergir en el reactivo cromogénico, dejar evaporar la acetona y calentar 5-8min a 85-95°C hasta que los puntos de control de la miel tratados anteriormente se conviertan en azul. La miel o melaza demuestra que contiene 5% de glucosa comercial por una serie de manchas azules de maltodextrina de bajo Rf, convergiendo al origen. Los puntos de dextrina de la miel y melaza son claramente de color marrón o gris, no azul. Si el papel se calienta excesivamente, tanto los puntos de dextrina de la miel y los puntos de maltodextrina se acercarán a tonos de gris.

### **Prueba 7: Sacarosa <sup>(i)</sup>**

#### A. Fundamento

La polarimetría es una técnica que se basa en la medición de la rotación óptica producida sobre un haz de luz polarizada al pasar por una sustancia ópticamente activa. La actividad óptica rotatoria de una sustancia, tiene su origen en la asimetría estructural de las moléculas.

#### B. Aparatos

- Balanza analítica
- Polarímetro
- Papel litmus

### C. Reactivos

- Crema de Alumina: La crema de alúmina es idónea para clarificar los productos del azúcar ligeramente coloreados o como complemento de otros agentes cuando los azúcares se determinan por métodos polariscópicos o de azúcares reductores.
- Hidróxido de amonio concentrado
- Carbonato de sodio GR

### D. Cristalería

- Balón volumétrico 100.0mL
- Pipeta volumétrica 5.0mL
- Embudo de vidrio
- Tubos de polarimetría

### E. Determinación

Polarización directa inmediata: pesar en balanza analítica y transferir 26.0g de muestra a un balón volumétrico de 100mL, diluir con agua destilada, agregar 5mL de crema de alúmina [Preparar una solución saturada fría de alumbre en agua destilada. Agregar hidróxido de amonio con agitación constante hasta que la solución sea alcalina al papel litmus y el exceso de precipitado asiente, lavar por decantación con agua destilada hasta que el lavado con agua destilada de sólo una ligera prueba de sulfatos con solución cloruro de bario. Vertir el exceso de agua destilada y guardar la crema residual en botellas con tapón de vidrio, diluir a volumen con agua destilada a 20°C, filtrar y polarizar inmediatamente en un tubo de 200mm.

Polarización directa constante: Productos como la miel y glucosa comercial, que contienen glucosa u otros azúcares reductores en forma cristalina o en solución a alta densidad, pueden mostrar mutarrotación en condiciones que

prevalecen durante el análisis. Sólo la rotación constante puede ser utilizada en métodos polarimétricos. Para obtener esto, permitir que la solución preparada para la polarización repose durante la noche antes de hacer la lectura. Si se desea hacer la lectura de inmediato, calentar una solución neutra (pH aproximado 7.0) a su punto de ebullición o añadir algunas gotas de hidróxido de amonio, antes de diluir a volumen, o, si se ha hecho la solución a volumen, añadir bicarbonato de sodio seco hasta que este justo o ligeramente alcalino al papel litmus (no deje las soluciones ligeramente alcalinas reposar a temperaturas tan altas por períodos largos de tiempo porque pueden causar la destrucción de la fructosa). Determinar la finalización de mutarrotación haciendo lecturas a intervalos de 15 a 30min hasta que sea constante.

Mutarrotación: es la diferencia entre la polarización directa inmediata y la polarización directa constante.

### **Prueba 8: Fructosa (i)**

#### **A. Fundamento**

Utilizando el método cromatográfico de capa fina se identifica la presencia de fructosa en la muestra por medio del valor de R<sub>f</sub>.

#### **B. Material y Equipos**

- Columna de carbón: La columna es de 22mm od x 370mm de largo, con 1L de sección esférica y una unión reductora de 35/20 esférica estándar en la parte superior. El adsorbente es una mezcla de 1+1 de carbón Darco G-60 y filtro rápido de ayuda (Celite 545 o Dicalite 4200). Empacar con un tapón de fibra de vidrio fino en la base de la columna, cerca del tubo de salida y llenar parcialmente la columna con agua

destilada. Abrir la salida y dejar fluir agua destilada a través de la columna para eliminar las burbujas de aire. Cerrar la salida cuando el agua destilada este aproximadamente 10mL por encima de la fibra de vidrio, a continuación añadir suficiente suspensión coadyuvante de la filtración de 1cm de profundidad y dejar reposar por gravedad. Vierta en suspensión 12g de mezcla de adsorbente en 150mL de agua destilada. Drenar 5min, aplique 4psi (27.6kPa) de presión hasta que la superficie se estabilice y luego 10 psi (69kPa). Limpiar el exceso de adsorbente de la superficie por vacío. Agregar suficiente suspensión coadyuvante de la filtración para lograr 1-2cm de profundidad y lavar la columna con 500mL de agua destilada y 200mL de alcohol 50%, en las que puede ser almacenado. Antes de su uso lavar la columna con 250mL de agua destilada. (Operación de vacío puede ser utilizado, pero se prefiere la presión.) Velocidad de flujo de 8.5mL/min a 10psi es comúnmente logrado.

- Placas recubiertas con 250µm de espesor de gel de sílice G. Almacenadas en desecador.
- Jeringas cromatográficos
- Estufa
- Balanza analítica
- Baño maría
- Cámara cromatográfica

#### C. Reactivos

- Fase Móvil: n-butanol:ácido acético:agua destilada (2+1+1).
- Reactivo de color: Disolver 1mL de anilina redestilada y 1g de difenilamina.HCl en 50mL de acetona y añadir 5mL de ácido fosfórico. Como alternativa para la anilina redestilada, haga lo siguiente: disolver 1g de anilina en 50mL de acetona y decolorar con carbón decolorante

(No usar Darco G-60). Filtrar, diluir a 50mL y añadir difenilamina y ácido fosfórico. Preparación reciente o almacenar a 0°C.

- Alcohol etílico al 7% y 50%

#### D. Cristalería

- Beaker 50mL
- Pipeta volumétrica 10.0mL
- Probeta 25mL

#### E. Detección

Preparación de la muestra: Pesar en balanza analítica 1.0g de muestra en un beaker de 30 o 50mL. Añadir 10mL de agua destilada medida en probeta para disolver y colocar en la parte superior de la columna. Hacer pasar dentro de la columna con succión, pero no deje que se vacíe. Lavar el beaker con dos porciones de 5mL de agua destilada y luego forzar dentro de la columna. Lavar con 300mL de alcohol 7%, que se descartan y luego con 100mL de alcohol 50%. Evaporar lo eluido en un beaker de 50mL en un baño de vapor bajo corriente de aire o nitrógeno. Transferir el residuo a un tubo de ensayo de 13x100mm con un total de 1.0mL de agua destilada. Evaporar hasta sequedad en baño a 60°C en corriente de aire o nitrógeno. Disolver el residuo en 0.1-0.2mL de agua destilada.

Cromatografía: Colocar el solvente en el tanque 15min antes de insertar la placa. Aplicar 2 µL y 6µL (2x3 o 3x2) de solución prueba a la placa. Aplicar los puntos de control de la miel pura y adulterada, preparados como anteriormente se hizo. Las soluciones de control se pueden conservar mediante la congelación o el secado. Colocar la placa para el desarrollo en el tanque hasta que se aproxime el frente de solvente a la parte superior de la placa. Retire la placa, secar y rocíe fuertemente con el reactivo revelador de

color (*Precaución:* Evite el contacto con el spray). Evaporar la acetona y colocar en el horno a 90-95°C hasta que los puntos estén bien desarrollados (alrededor de 7-10min).

Interpretación: la jalea real mostrará 1 o 2 grandes manchas de color gris azulado o manchas azul marrón en  $R_f > 0.35$ . Las rayas azules o series de puntos que se extiende desde el origen proporciona evidencia presuntiva de la presencia de jarabe de maíz, jarabe de maíz de alta fructosa, incluidos los jarabes de alta fructosa, derivados del origen de la planta con excepción del maíz, si esto sucede, una prueba adicional debe llevarse a cabo para confirmar la adulteración. Repetir el pretratamiento de la columna con carbón de la siguiente manera: Preparar la muestra como se hizo anteriormente, excepto que la columna debe lavarse con 100mL de alcohol al 25%, descartar esta fracción y lavar con alcohol al 50%. Las rayas azules o serie de puntos que se extiende desde el origen de la placa cromatográfica siguiente al tratamiento proporcionan pruebas concluyentes de la adulteración.

### **Prueba 9: Lípidos y Fósforo Lipídico ( $P_2O_5$ ) (i)**

#### A. Fundamento

Las grasas reaccionan en caliente con hidróxidos descomponiéndose en los dos elementos que las integran: glicerina y ácidos grasos. Éstos se combinan con los iones del hidróxido para dar jabones, que son en consecuencia las sales sódicas o potásicas de los ácidos grasos. Luego de extraer los lípidos se determina por medio de diferencias de pesos y el fósforo lipídico por medio de una titulación.

#### B. Material y Equipos

- Balanza analítica
- Hot plate

- Baño maría
- Estufa
- Mufla
- Soporte
- Pinza para bureta

#### C. Reactivos

- Solvente: mezclar volúmenes iguales de cloroformo y etanol GR.
- Solución alcohólica de hidróxido de sodio: Preparar una solución libre de carbono disolviendo 100g de hidróxido de sodio en 100mL de agua destilada. Dejar reposar hasta que se aclare o filtrar con papel filtro previamente empapado en alcohol. (5mL de solución de hidróxido de sodio contiene 4g de hidróxido de sodio). Disolver 50mL de esta solución en 900mL de etanol y diluir con etanol a 1L.
- Cloroformo GR
- Ácido nítrico GR
- Hidróxido de amonio GR
- Fenolftaleína (Indicador)
- Etanol GR

#### D. Cristalería

- Balón volumétrico 100.0mL
- Pipetas volumétricas 25.0mL y 50.0mL
- Probeta 10mL, 25mL y 100mL
- Beaker 100mL
- Embudo de vidrio
- Vidrio reloj
- Erlenmeyer 500mL
- Bureta 25.0mL

#### E. Preparación de la Solución

Pesar en balanza analítica 4.0g de muestra y transferir a un balón volumétrico de 100mL. Añadir 25mL de solvente muy lentamente (gota a gota) desde una pipeta volumétrica mientras se agita constantemente hasta que las proteínas coagulen y después se rompan completamente. Añadir 60-65mL de solvente adicional y dejar reposar 1h agitando cada 5min. Diluir a volumen con el solvente, mezclar y dejar reposar la mezcla hasta que se aclare.

#### F. Determinación

Lípidos: Transferir una alícuota de 50mL a un beaker 150mL y evaporar el extracto hasta sequedad en baño de vapor. Colocar el beaker en un horno por 5-10min a 100°C para eliminar cualquier remanente de agua. Disolver el extracto seco en 5-10mL de cloroformo y filtrar en un beaker de 100mL pesado, a través de compresas de algodón embalado en el vástago del embudo, transfiriendo todo el extracto soluble al fondo y los lados del recipiente con cloroformo. Lavar el embudo (el filtrado debe ser claro). Evaporar el cloroformo en baño de vapor y secar el beaker y su contenido en horno a 100°C hasta peso constante (alrededor de 90min). Dejar el beaker enfriar hasta peso constante (alrededor de 30min), pesar y reportar el % de lípidos.

$$\% \text{ Lípidos} = (\text{g de residuo} / \text{g de muestra}) \times 100$$

Fósforo lipídicos ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ): disolver los lípidos secos en 2-3mL de cloroformo, añadir 10-20mL de solución alcohólica de hidróxido de sodio, evaporar hasta sequedad en baño de vapor y colocar el beaker en el horno por 30min a 100°C para eliminar cualquier agua restante. Transferir el beaker en caliente a un horno calentado a 500°C y mantener a esta temperatura por 1h. Enfriar, agregar unas gotas de agua destilada y romper el residuo con varilla de vidrio de extremo plano. Cubrir el beaker con un vidrio reloj, agregar lentamente 5mL de ácido nítrico (1+3), mezclar, lavar el vidrio reloj y el filtro, y coleccionar el filtrado

en un erlenmeyer de 300 o 500mL. Lavar bien el material carbonizado y el papel filtro con agua destilada. Pipetear en el beaker una alícuota correspondiente a 0.4g de la muestra para el contenido de  $P_2O_5$  de la muestra <5%, 0.2g de 5-20%, 0.1g de >20%. Añadir 5-10mL de ácido nítrico, añadir hidróxido de amonio hasta que el precipitado que se forma se disuelva lentamente con agitación vigorosa, diluir hasta 75-100mL y ajustar a 25-30°C. Si la muestra no da precipitado con hidróxido de amonio como prueba de neutralización, haga la solución ligeramente alcalina al papel litmus con hidróxido de amonio y después ligeramente ácida con ácido nítrico (1+3). Añadir solución de molibdato lo suficientemente acidificada para asegurar la precipitación completa (20-50mL). Agitar mecánicamente por 30min a temperatura ambiente, decantar y filtrar a través del filtro, lavar el precipitado dos veces por decantación con porciones de 25-30mL de agua destilada, agitando fuertemente. Transferir el precipitado al filtrado y lavar con agua destilada fría hasta que el filtrado pase por 2 rellenos de rendimientos de filtro de color rosa en la adición de fenolftaleína y 1 gota del álcali estándar. Transferir el precipitado y el filtrado a un beaker, disolver el precipitado en pequeño exceso del álcali estándar, añadir unas gotas de fenolftaleína y titular con ácido estándar. Reportar como % de lípidos.

$$\% \text{ Lípidos} = ((V \times C) \times \text{meq } P_2O_5 / \text{g de muestra}) \times 100$$

Dónde: V = volumen gastado de ácido, C = concentración del ácido

### **Prueba 10: Fósforo Total ( $P_2O_5$ ) (1)**

#### **A. Fundamento**

El fósforo se encontrarse en las muestras ya sea en compuestos orgánicos o inorgánicos. Para liberar el fósforo que está combinado en la materia orgánica,

es preciso someter la muestra a un proceso de digestión ácida. Tras la digestión, el fósforo está en forma de ortofosfatos, se determinan por métodos colorimétricos.

B. Aparatos

- Balanza analítica
- Hot plate
- Estufa
- Mufla
- Soportes metálicos

C. Reactivos

- Bicarbonato de sodio 10%
- Ácido nítrico (1+3)
- Hidróxido de amonio
- Fenolftaleína (Indicador)

D. Cristalería

- Beaker 250mL
- Probeta 25mL
- Vidrio reloj
- Erlenmeyer 500mL
- Pipetas volumétricas 5.0mL y 10mL
- Bureta 50.0mL

E. Preparación de la Solución

Mezclar bien la muestra y pesar cerca de 300g en un beaker de 250mL. Añadir 20mL de solución de bicarbonato de sodio al 10% y evaporar hasta sequedad en un hot plate o en horno durante la noche a 100-105°C. Transferir el beaker

mientras se encuentre caliente a un horno a 500°C durante 1h. Enfriar, agregar unas gotas de agua destilada, romper el residuo con una varilla de vidrio de extremo plano y cubrir el beaker con un vidrio de reloj, agregue lentamente 10mL de ácido nítrico (1+3) mientras se agita, mezclar, lavar el vidrio de reloj y el filtro, recolectando el filtrado en un erlenmeyer de 300 o 500mL. Lave bien el material carbonizado y el filtro con agua destilada.

#### F. Determinación

Pipetear en el beaker una alícuota correspondiente a 0.4g de la muestra para el contenido de  $P_2O_5$  de la muestra <5%, 0.2g de 5-20%, 0.1g de >20%. Añadir 5-10mL de ácido nítrico, dependiendo del método de solución (o su equivalente en nitrato de amonio), a continuación, añadir hidróxido de amonio hasta que el precipitado que se forma se disuelva lentamente con agitación vigorosa, diluir hasta 75-100mL, y se ajusta a 25-30°C. Si la muestra no da precipitado con hidróxido de amonio como prueba de neutralización, haga la solución ligeramente alcalina al papel litmus con hidróxido de amonio y después ligeramente ácida con ácido nítrico (1+3). Añadir solución de molibdato lo suficientemente acidificada para asegurar la precipitación completa (40-50mL). Agitar mecánicamente por 30min a temperatura ambiente, decantar y a la vez filtrar a través del filtro y lavar el precipitado dos veces por decantación con porciones de 25-30mL de agua destilada, agitando fuertemente y permitiendo que se revuelva. Transferir el precipitado al filtrado y lavar con agua destilada fría hasta que el filtrado pase por 2 rellenos de rendimientos de filtro de color rosa en la adición de fenolftaleína y 1 gota del álcali estándar. Transferir el precipitado y el filtrado a un beaker o vaso de precipitado, disolver el precipitado en pequeño exceso del álcali estándar, añadir unas gotas de fenolftaleína y titular con ácido estándar. Reportar como  $P_2O_5$  total.

### G. Cálculo

$$\% \text{P}_2\text{O}_5 \text{ total} = (\text{V} \times \text{C} \times \text{meq P}_2\text{O}_5 / \text{g mx}) \times 100$$

Dónde: V = volumen del ácido y C = concentración de ácido

**Tabla N° XXV:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.38.03:05 para Jalea Real

Prueba	Jalea Real Fresca		Jalea Real Liofilizada	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Humedad 12h a 70°C	60%	70%	5%	10%
Cenizas a 500°C	0.8%	1.0%	-	-
Proteínas N x 6.25	11%	15%	27%	40%
Glucosa	10%	15%	11%	26%
Sacarosa	-	5%	-	10%
Almidón	Ausencia		-	-
Lípidos Totales	3%	7%	10%	30%
pH solución al 5%	3.4	4.5	2%	5%
Índice de acidez (meq/100g)	23	48	-	-
Fósforo como P (mg)	-	-	1800mg	3500mg

**METODOS DE ANALISIS PARA  
PRODUCTOS LACTEOS: YOGURT**

## YOGURT

**Norma Consultada:** NSO 67.01.10:08 Productos Lácteos: Yogurt

### **Alcance:**

Aplica al yogurt natural, edulcorado y aquel que se le han agregado aromatizantes, saborizantes, frutas naturales o procesadas, cereales y otros productos naturales, yogurt light, ligero o liviano, sean fabricados en el país o importados.

### **Pruebas Organolépticas:**

- **Sabor:** El yogur tendrá el sabor característico para cada forma de presentación y estará libre de sabor excesivamente ácido por sobremaduración, sabor amargo o cualquier sabor extraño.
- **Olor:** El producto deberá tener el olor característico para cada forma de presentación y estará libre de cualquier olor extraño.
- **Color:** El yogur natural deberá tener color blanco o ligeramente amarillento; los otros productos deberán tener el color característico para cada forma de presentación.
- **Aspecto:** El yogur en cualquiera de sus formas de presentación, deberá tener aspecto de coágulo uniforme, libre de grumos y/o burbujas, y estará libre de suero separado. El producto con fruta deberá tener aspecto característico con la fruta uniformemente distribuida.

## Pruebas Fisicoquímicas:

**Tabla N° XXVI:** Resumen de métodos de análisis para cada prueba de Yogurt

Prueba	Método
Nitrógeno Total en Leche	Kjeldahl
Grasa en Leche	Extracción con Éter
Sólidos Totales en Leche	Diferencia de Pesos
Acidez en Leche	Titrimétrico

**Tabla N° XXVII:** Resumen de métodos de análisis según AOAC para Yogurt

Prueba	Método AOAC	
Nitrógeno Total en Leche	991.20	33.2.11
Grasa en Leche	989.05	33.2.26
Sólidos Total en la leche	925.23	33.2.09
Acidez de Leche	947.05	33.2.06

### Prueba 1: Nitrógeno Total en Leche <sup>(i)</sup>

Ver metodología para Helados en prueba “Proteínas en Sorbetes y Postres Congelados”, utilizando el Método Kjeldahl.

### Prueba 2: Grasa en Leche <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

La grasa se extrae con una mezcla de éteres de pesos conocidos de leche. El extracto de éter se decanta en el plato de pesaje seco y se evapora el éter. La

grasa extraída se seca hasta peso constante. El resultado es expresado en % de grasa en peso.

#### B. Material y Equipos

- Platos para pesar: Metal, 8.5-9.5cm de diámetro y de 4.5-5.5cm de altura, o vasos de 250mL de vidrio.
- Pesas de calibración: Clase S, pesas estándar de calibración para verificar la precisión de la balanza dentro de rango de peso que se utilizará para pesar los frascos vacíos y frasco con la muestra y pesar los platos para pesar vacíos y platos más grasa.
- Balanza analítica: Para leer con precisión de 0.0001g. Con precisión en la verificación dentro de 0.0002g. Revisar periódicamente y cuando la balanza es movida o limpiada. Mantener un registro de calibración de la balanza.
- Desecador: A temperatura ambiente. Para enfriar los platos de pesaje después del preliminar y secado final. Utilice desecante grueso (malla tamaño 6-16) que contiene mínimas de partículas finas y cambios color cuando se absorbe humedad.
- Pinzas: Para el manejo de los platos de pesaje.
- Hot plate: Baño de vapor u otro dispositivo de calefacción. Para la evaporación del éter a  $\leq 100^{\circ}\text{C}$ . Llevar a cabo la evaporación en campana.
- Tapones: Tapones de corcho natural de alta calidad (tamaño 5) para los frascos. Remoje los corchos en agua destilada varias horas para mejorar el sello.
- Estufa de vacío o aire forzado: Horno de vacío capaz de mantener la temperatura de  $70-75^{\circ}\text{C}$  a 50.8cm (20 pulgadas) de vacío, u horno de aire forzado capaz de mantener una temperatura de  $100\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- Baño de agua para templar las muestras de leche antes del pesaje: Con termómetro y dispositivo para mantener la temperatura de la leche de  $38\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Centrifuga

#### C. Reactivos

- Éter etílico: Grado ACS, peróxido libre. No deja residuos en la evaporación.
- Éter de petróleo: ACS grado, intervalo de ebullición  $30-60^{\circ}\text{C}$ . No deja residuos en la evaporación.
- Hidróxido de amonio: Concentrado, grado ACS, gravedad específica 0.9
- Alcohol etílico: 95%. No deja residuos en la evaporación.
- Agua destilada: Libre de residuos de hidrocarburos y minerales.
- Indicador de fenolftaleína: 0.5% (peso/volumen) en acetato alcohol.

#### D. Cristalería

- Frasco: frasco de extracción de éter estilo Mojonnier con un volumen de 21-23mL en el bulbo más bajo, más el cuello en la parte inferior del matraz. El frasco debe tener una apertura lisa, redonda en la parte superior que se sellará cuando se cierre con corcho.
- Pipetas volumétricas
- Erlenmeyer 250mL
- Probeta 10mL y 25mL

#### E. Determinación

Preparación de la muestra: Calentar la muestra a  $38^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua y mezclar hasta homogeneidad, utilizando un agitador, si es necesario, para reincorporar cualquier muestra adherida al recipiente o tapón. Cuando sea práctico y los remanentes de grasas se dispersen, enfriar la muestra calentada

a 20°C antes de transferir la porción de prueba. Pesar el frasco vacío con el tapón limpio y seco. Quitar el tapón. Pipetear 10.0mL de muestra en un matraz. Colocar el tapón en el frasco. Pesar cerca del 0.1mg. Compruebe el zero de la balanza entre las muestras.

Preparación de los platos de pesaje: el número de platos de pesaje limpios y pre-secados en las mismas condiciones que se utilizarán para el secado final después de la extracción de grasa. Asegúrese de que todas las superficies donde los platos de pesaje serán colocados (hot plate, desecador, etc.) estén limpios y libres de partículas. Al final del secado en el horno, coloque los platos en el desecador a temperatura ambiente y enfriar a temperatura ambiente. El mismo día de la extracción de la grasa pesar los platos con exactitud de 0.1mg y registrar los pesos. Comprobar el zero de la balanza después de pesar cada plato. Proteja los platos pesados de contaminación con materia extraña.

Extracción de grasa: Para muestras en un matraz añadir 1.5mL de hidróxido de amonio y mezclar bien. El hidróxido de amonio neutraliza cualquier ácido presente y disuelve la caseína. Añadir 3 gotas del indicador fenolftaleína para ayudar a afinar la apariencia visual de la interfaz entre éter y las capas acuosas durante la extracción. Añadir 10mL alcohol etílico, tapar con el tapón empapado de agua destilada y agitar el matraz por 15seg. Para la primera extracción, añadir 25mL de éter etílico, tapar y agitar el frasco vigorosamente por 1min, liberando la presión acumulada aflojando el tapón si es necesario. Añadir 25mL de éter de petróleo, tapar y repetir la agitación vigorosa durante 1min. Centrifugar los frascos a aproximadamente 600rpm durante  $\geq 30$ seg para obtener una separación limpia de la capa acuosa (rosa claro) y la fase de éter. Decantar la solución de éter en el plato de pesaje adecuado preparado como en la preparación de las pesas. Cuando la solución de éter se decante en los platos, tener cuidado de no verter cualquier sólido o

fase acuosa suspendida sobre el plato de pesaje. El éter puede ser evaporado a  $\leq 100^{\circ}\text{C}$  desde el plato mientras se realiza una segunda extracción.

Para la segunda extracción, añadir 5mL de alcohol etílico, tapar con el corcho y agitar vigorosamente por 15seg. A continuación, añadir 15mL de éter etílico, reemplace el corcho y agitar el frasco vigorosamente por 1min. Añadir 15mL de éter de petróleo, tapar con el corcho y repetir la agitación vigorosa durante 1min. Centrifugar el frasco a 600 rpm durante  $\geq 30$ seg para obtener una separación limpia entre la fase acuosa (rosa claro) y la fase de éter. Si la interfaz está por debajo del cuello del matraz, añadir agua destilada hasta que el nivel este aproximadamente a la mitad de camino hasta el cuello. Añadir agua destilada lentamente por la superficie interior del frasco para que no haya alteración mínima de la separación. Decantar la solución de éter de la segunda extracción en el mismo plato de pesaje utilizado para la primera extracción.

Para una tercera extracción, omita la adición de alcohol etílico y repetir el procedimiento utilizado para la segunda extracción. Evaporar completamente los solventes sobre un hot plate a  $\leq 100^{\circ}\text{C}$  (evitar salpicaduras). Seque la grasa extraída más el plato de pesaje hasta peso constante en el horno de aire forzado a  $100 \pm 1^{\circ}\text{C}$  ( $\geq 30$ min) o en estufa de vacío a  $70-75^{\circ}\text{C}$  en  $> 50.8$ cm (20 pulgadas) de vacío durante  $\geq 7$ min. Retire el plato de pesaje del horno y colóquelo en el desecador y enfriar a temperatura ambiente. Registre el peso de cada plato de pesaje más la grasa.

Realizar un par de blancos de reactivo cada día que se llevan a cabo las pruebas. Para ejecutar el blanco de reactivo, reemplace la muestra con 10mL de agua destilada y probar el funcionamiento como normal. Registre el peso de cualquier residuo seco recogido y usar el valor en el cálculo. El blanco de reactivo debe ser  $< 0.0020$ g de residuos. Si el blanco de reactivo para el conjunto de muestras es un número negativo usar ese número negativo en el cálculo

*Nota:* Para restar números negativos [peso promedio de residuos en blanco] en la siguiente ecuación, añadirlo a [(peso plato + grasa) - peso de plato].

Un blanco negativo por lo general indica que los platos no estaban completamente secos al comienzo de la determinación o la calibración de la balanza cambiando entre el peso de los platos vacíos y platos más grasa. Las causas de los blancos negativos deben ser identificadas y corregidas.

#### F. Cálculo

$$\% \text{ Grasa} = 100 \times \{[(A) - (B)] - (C)\} / \text{peso de leche}$$

Dónde: A = peso de plato + grasa, B = peso de plato, C = Promedio peso de residuo blanco.

Diferencia máxima recomendada entre los dos análisis es <0.03% de grasa.

A 3.6% de grasa:

$$s_r = 0.015\% \quad RSD_R = 0.512\%$$

$$s_R = 0.020\% \quad \text{valor}_r = 0.044\%$$

$$RSD_r = 0.396\% \quad \text{valor}_R = 0.056\%$$

### **Prueba 3: Sólidos Totales en Leche** <sup>(i)</sup>

#### A. Fundamento

La determinación del contenido de sólidos totales se basa en la evaporación total de agua en una muestra de leche. Separando por filtración el material suspendido y secando se puede conocer el contenido de sólidos totales por

diferencia de pesos de una muestra de peso conocido y la pesada del residuo seco.

B. Materiales y Equipos

- Estufa
- Balanza analítica
- Plato de platino
- Baño maría
- Lactómetro Quvenne
- Infrarrojo
- Desecador

C. Cristalería

- Termómetro

D. Método I - Acción Final

Llevar la muestra a unos 20°C, mezclar hasta homogeneidad en un frasco limpio y de forma repetida, y pesar rápidamente 2.5-3.0g de muestra. Si grumos de muestra no se dispersan, calentar la muestra en un baño de agua a 38°C y seguir mezclando hasta homogeneidad, usando un agitador si es necesario, para reincorporar cualquier muestra adherida al recipiente o tapón. Pesar dentro de un plato para pesar de 5cm de diámetro de fondo plano (usar un plato de platino de 5g si las cenizas se van a determinar en la misma porción). Calentar en un baño de vapor 10-15min, exponiendo la máxima superficie de la parte inferior del plato para aumentar el vapor, y luego calentar por 3h en estufa de aire a 98-100°C. Enfriar en desecador, pesar con rapidez y el reportar el % de residuo como “sólidos totales”.

$$\% \text{ Sólidos Totales} = (\text{g residuo} / \text{g muestra}) \times 100$$

#### E. Método II (Aproximado)

Determinar la gravedad específica de la leche con un lactómetro Quevenne (Lectura de la parte superior de meniscos), observar la temperatura y corregir la lectura  $L$  a 60°F (**tabla N° XXVIII**). Calcular los sólidos totales ya sea con la fórmula  $0.25L + 1.2F$ , en la que  $F =$  % de grasa en la leche, o desde **tabla N° XXIX**

#### F. Método infrarrojo-Primera Acción

Utilice el método estándar **D** para determinar el % de sólidos totales para la serie de  $\geq 8$  leches. Determinar el % de grasa, % de proteína y % de lactosa. Calcular la diferencia de los sólidos totales ( $ST$ ) -  $F - P - L = a$ , donde  $F$ ,  $P$  y  $L$  son estimaciones de grasa, proteína y lactosa, respectivamente. Para el control de rutina de calibración, analizar una serie adicional de leches y ajuste el valor para las diferencias de promedios de acuerdo con los datos acumulados.

$$\text{Calcular el \% de sólidos totales} = a + F + P + L$$

Alternativamente, calibrar por regresión múltiple para calcular la ecuación por estimación de TS o SNF como función de la grasa, proteína y lactosa sin corregir las señales. Para recalibraciones, utilice una ecuación de regresión lineal simple que relaciona las estimaciones de regresión y valores estándar de referencia, utilizando este último como variable dependiente, para corregir estas estimaciones y obtener resultado final. En los instrumentos anteriores, que no lo hacen porque no tiene esta capacidad en el software del instrumento, este cálculo debe ser realizado manualmente. Para realizar este cálculo, los datos de calibración se deben recoger en los días o semanas sucesivas, si es necesario para el registro de estimaciones de regresión así como para el resultado final. Esta alternativa, es el método preferido pues se ha demostrado ser más exacto.

## Prueba 4: Acidez de Leche <sup>(i)</sup>

### A. Fundamento

La leche fresca y productos de leche tienen una acidez titulable equivalente a 13 a 20 mL de hidróxido de sodio 0.1N/100 mL (0.12–0.18 % de ácido láctico) debido a su contenido de anhídrido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato. Normalmente la leche y sus derivados no contienen ácido láctico; sin embargo, por acción bacteriana la lactosa sufre un proceso de fermentación formándose ácido láctico y otros componentes que aumentan la acidez titulable.

### B. Aparatos

- Balanza analítica
- Pinzas
- Soportes

### C. Reactivos

- Fenolftaleína
- Hidróxido de sodio 0.1N

*Nota:* ver estandarización de reactivos en anexo 1

### D. Cristalería

- Pipeta volumétrica 2.0mL
- Bureta 50.0mL
- Erlenmeyer 250mL
- Beaker 100mL

## E. Determinación

Mida o pese cantidad adecuada (alrededor de 20mL o 20.0g) de muestra en un beaker adecuado y diluir con el doble de su volumen con agua destilada libre de dióxido de carbono. Añadir 2mL de fenolftaleína y valorar con hidróxido de sodio 0.1N a la primera coloración rosa persistente. Si se utilizó un volumen medido de la muestra, determinar su peso desde la gravedad específica de la muestra. Reporte la acidez como % de ácido láctico por peso (1mL de hidróxido de sodio 0.1N = 0.0090g de ácido láctico). Si se usan pipetas del método Babcock para la leche, 20mL de hidróxido de sodio 0.1N requeridos = % de ácido como ácido láctico.

Los resultados también pueden ser expresados como mL de hidróxido de sodio 0.1N/100g de muestra.

**Tabla N° XXVIII:** Tabla de Corrección para Gravedad Específica de la Leche (Lactómetro Quévenne)<sup>a</sup>

Lactometer	Temperature (°F)									
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
20	19.3	19.4	19.4	19.5	19.6	19.7	19.8	19.9	19.9	20.0
21	20.3	20.3	20.4	20.5	20.6	20.7	20.8	20.9	20.9	21.0
22	21.3	21.3	21.4	21.5	21.6	21.7	21.8	21.9	21.9	22.0
23	22.3	22.3	22.4	22.5	22.6	22.7	22.8	22.8	22.9	23.0
24	23.3	23.3	23.4	23.5	23.6	23.6	23.7	23.8	23.9	24.0
25	24.2	24.3	24.4	24.5	24.6	24.6	24.7	24.8	24.9	25.0
26	25.2	25.2	25.3	25.4	25.5	25.6	25.7	25.8	25.9	26.0
27	26.2	26.2	26.3	26.4	26.5	26.6	26.7	26.8	26.9	27.0
28	27.1	27.2	27.3	27.4	27.5	27.6	27.7	27.8	27.9	28.0
29	28.1	28.2	28.3	28.4	28.5	28.6	28.7	28.8	28.9	29.0
30	29.1	29.1	29.2	29.3	29.4	29.6	29.7	29.8	29.9	30.0
31	30.0	30.1	30.2	30.3	30.4	30.5	30.6	30.8	30.9	31.0
32	31.0	31.1	31.2	31.3	31.4	31.5	31.6	31.7	31.9	32.0
33	31.9	32.0	32.1	32.3	32.4	32.5	32.6	32.7	32.9	33.0
34	32.9	33.0	33.1	33.2	33.3	33.5	33.6	33.7	33.9	34.0
35	33.8	33.9	34.0	34.2	34.3	34.5	34.6	34.7	34.9	35.0

**Tabla N° XXVIII:** Continuación

Lactometer	Temperature (°F)									
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
20	20.1	20.2	20.2	20.3	20.4	20.5	20.6	20.7	20.9	21.0
21	21.1	21.2	21.3	21.4	21.5	21.6	21.7	21.8	22.0	22.1
22	22.1	22.2	22.3	22.4	22.5	22.6	22.7	22.8	23.0	23.1
23	23.1	23.2	23.3	23.4	23.5	23.6	23.7	23.8	24.0	24.1
24	24.1	24.2	24.3	24.4	24.5	24.6	24.7	24.9	25.0	25.1
25	25.1	25.2	25.3	25.4	25.5	25.6	25.7	25.9	26.0	26.1
26	26.1	26.2	26.3	26.5	26.6	26.7	26.8	27.0	27.1	27.2
27	27.1	27.3	27.4	27.5	27.6	27.7	27.8	28.0	28.1	28.2
28	28.1	28.3	28.4	28.5	28.6	28.7	28.8	29.0	29.1	29.2
29	29.1	29.3	29.4	29.5	29.6	29.7	29.9	30.1	30.2	30.3
30	30.1	30.3	30.4	30.5	30.7	30.8	30.9	31.1	31.2	31.3
31	31.2	31.3	31.4	31.5	31.7	31.8	31.9	32.1	32.2	32.4
32	32.2	32.3	32.5	32.6	32.7	32.9	33.0	33.2	33.3	33.4
33	33.2	33.3	33.5	33.6	33.8	33.9	34.0	34.2	34.3	34.5
34	34.2	34.3	34.5	34.6	34.8	34.9	35.0	35.2	35.3	35.5
35	35.2	35.3	35.5	35.6	35.8	36.9	36.1	36.2	36.4	36.5

<sup>a</sup>-Paul G. Heineman, Leche, W. B. Saunders Co., Filadelfia, 1921, página 144

**Tabla N° XXIX:** Tabla para la determinación de Sólidos Totales en Leche desde cualquier Gravedad Especifica tomada y porcentaje de Grasa (Shaw y Eckles), resultados expresados como % total de sólidos.

% Fat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
2.00	8.90	9.15	9.40	9.65	9.90	10.15	10.40	10.66	10.91	11.16	11.41
.05	.96	.21	.46	.71	.96	.21	.46	.72	.97	.22	.47
.10	9.02	.27	.52	.77	10.02	.27	.52	.78	11.03	.28	.53
.15	.08	.33	.58	.83	.08	.33	.58	.84	.09	.34	.59
.20	.14	.39	.64	.89	.14	.39	.64	.90	.15	.40	.65
.25	.20	.45	.70	.95	.20	.45	.70	.96	.21	.46	.71
.30	.26	.51	.76	10.01	.26	.51	.76	11.02	.27	.52	.77
.35	.32	.57	.82	.07	.32	.57	.82	.08	.33	.58	.83
.40	.38	.63	.88	.13	.38	.63	.88	.14	.39	.64	.89
.45	.44	.69	.94	.19	.44	.69	.94	.20	.45	.70	.95

Tabla N° XXIX: Continuación.

% Fat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
.50	.50	.75	10.00	.25	.50	.75	11.00	.26	.51	.76	12.01
.55	.56	.81	.06	.31	.56	.81	.06	.32	.57	.82	.07
.60	.62	.87	.12	.37	.62	.87	.12	.38	.63	.88	.13
.65	.68	.93	.18	.43	.68	.93	.18	.44	.69	.94	.19
.70	.74	.99	.24	.49	.74	.99	.24	.50	.75	12.00	.25
.75	.80	10.05	.30	.55	.80	11.05	.31	.56	.81	.06	.31
.80	.86	.11	.36	.61	.86	.11	.37	.62	.87	.12	.37
.85	.92	.17	.42	.67	.92	.17	.43	.68	.93	.18	.43
.90	.98	.23	.48	.73	.98	.23	.49	.74	.99	.24	.49
.95	10.04	.29	.54	.79	11.04	.30	.55	.80	12.05	.30	.55
3.00	.10	.35	.60	.85	.10	.36	.61	.86	.11	.36	.61
.05	.16	.41	.66	.91	.17	.42	.67	.92	.17	.42	.68
.10	.22	.47	.72	.97	.23	.48	.73	.98	.23	.48	.74
.15	.28	.53	.78	11.03	.29	.54	.79	12.04	.29	.55	.80
.20	.34	.59	.84	.09	.35	.60	.85	.10	.35	.61	.86
.25	.40	.65	.90	.16	.41	.66	.91	.16	.42	.67	.92
.30	.46	.71	.96	.22	.47	.72	.97	.22	.48	.73	.98
.35	.52	.77	11.03	.28	.53	.78	12.03	.28	.54	.79	13.04
.40	.58	.83	.09	.34	.59	.84	.09	.34	.60	.85	.10
.45	.64	.89	.15	.40	.65	.90	.15	.40	.66	.91	.16
.50	.70	.95	.21	.46	.71	.96	.21	.46	.72	.97	.22
.55	.76	11.02	.27	.52	.77	12.02	.27	.52	.78	13.03	.28
.60	.82	.08	.33	.58	.83	.08	.33	.58	.84	.09	.34
.65	.88	.14	.39	.64	.89	.14	.39	.64	.90	.15	.40
.70	.94	.20	.45	.70	.95	.20	.45	.70	.96	.21	.46
.75	11.00	.26	.51	.76	12.01	.26	.51	.76	13.02	.27	.52
.80	.06	.32	.57	.82	.07	.32	.57	.82	.08	.33	.58
.85	.12	.38	.63	.88	.13	.38	.63	.88	.14	.39	.64
.90	.18	.44	.69	.94	.19	.44	.69	.94	.20	.45	.70
.95	.24	.50	.75	12.00	.25	.50	.75	13.00	.26	.51	.77
4.00	.30	.56	.81	.06	.31	.56	.81	.06	.32	.57	.83
.05	.36	.62	.87	.12	.37	.62	.87	.12	.38	.63	.89
.10	.42	.68	.93	.18	.43	.68	.93	.18	.44	.69	.95
.15	.48	.74	.99	.24	.49	.74	.99	.25	.50	.76	14.01
.20	.54	.80	12.05	.30	.55	.80	13.05	.31	.56	.82	.07
.25	.60	.86	.11	.36	.61	.86	.12	.37	.62	.88	.13
.30	.66	.92	.17	.42	.67	.92	.18	.43	.68	.94	.19
.35	.72	.98	.23	.48	.73	.98	.24	.49	.74	14.00	.25
.40	.78	12.04	.29	.54	.79	13.04	.30	.55	.80	.06	.31
.45	.84	.10	.35	.60	.85	.10	.36	.61	.86	.12	.37
.50	.90	.16	.41	.66	.91	.16	.42	.67	.92	.18	.43
.55	.97	.22	.47	.72	.97	.22	.48	.73	.98	.24	.49
.60	12.03	.28	.53	.78	13.03	.28	.54	.79	14.04	.30	.55
.65	.09	.34	.59	.84	.09	.34	.60	.85	.10	.36	.61
.70	.15	.40	.65	.90	.15	.40	.66	.91	.16	.42	.67
.75	.21	.46	.71	.96	.21	.46	.72	.97	.22	.48	.73
.80	.27	.52	.77	13.02	.27	.52	.78	14.03	.28	.54	.79
.85	.33	.58	.83	.08	.33	.58	.84	.09	.34	.60	.85
.90	.39	.64	.89	.14	.39	.64	.90	.15	.40	.66	.91
.95	.45	.70	.95	.20	.45	.70	.96	.21	.46	.72	.97

Tabla N° XXIX: Continuación.

% Fat	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
5.00	12.51	12.76	13.01	13.26	13.51	13.76	14.02	14.27	14.52	14.78	15.03
.05	.57	.82	.07	.32	.57	.83	.08	.33	.58	.84	.09
.10	.63	.88	.13	.38	.63	.89	.14	.39	.64	.90	.15
.15	.69	.94	.19	.44	.69	.95	.20	.45	.70	.96	.21
.20	.75	13.00	.25	.50	.75	14.01	.26	.51	.76	15.02	.27
.25	.81	.06	.31	.56	.81	.07	.32	.57	.82	.08	.33
.30	.87	.12	.37	.62	.87	.13	.38	.63	.88	.14	.39
.35	.93	.18	.43	.68	.93	.19	.44	.70	.95	.20	.45
.40	.99	.24	.49	.74	14.00	.25	.50	.76	15.01	.26	.51
.45	13.05	.30	.55	.80	.06	.31	.56	.82	.07	.32	.57
.50	.11	.36	.61	.86	.12	.37	.62	.88	.13	.38	.63
.55	.17	.42	.67	.93	.18	.43	.69	.94	.19	.44	.69
.60	.23	.48	.73	.99	.24	.49	.75	15.00	.25	.50	.75
.65	.29	.54	.79	14.05	.30	.55	.81	.06	.31	.56	.81
.70	.35	.60	.85	.11	.36	.61	.87	.12	.37	.62	.87
.75	.41	.66	.91	.17	.42	.68	.93	.18	.43	.68	.93
.80	.47	.72	.97	.23	.48	.74	.99	.24	.49	.74	.99
.85	.53	.78	14.04	.29	.54	.80	15.05	.30	.55	.80	16.06
.90	.59	.84	.10	.35	.60	.86	.11	.36	.61	.86	.12
.95	.65	.90	.16	.41	.66	.92	.17	.42	.67	.92	.18
6.00	.71	.96	.22	.47	.72	.98	.23	.48	.73	.98	.24
.05	.77	14.02	.28	.53	.78	15.04	.29	.54	.79	16.04	.30
.10	.83	.08	.34	.59	.84	.10	.35	.60	.85	.10	.35
.15	.89	.14	.40	.65	.90	.16	.41	.66	.91	.16	.42
.20	.95	.20	.46	.71	.96	.22	.47	.72	.97	.22	.48
.25	14.01	.26	.52	.77	15.02	.28	.53	.78	16.03	.28	.54
.30	.07	.32	.58	.83	.08	.34	.59	.84	.09	.34	.60
.35	.13	.38	.64	.90	.14	.40	.65	.90	.15	.40	.66
.40	.19	.44	.70	.96	.20	.46	.71	.96	.21	.46	.72
.45	.25	.50	.76	15.02	.26	.52	.77	16.02	.27	.52	.78
.50	.31	.56	.82	.08	.32	.58	.83	.08	.33	.58	.84
.55	.37	.62	.88	.14	.38	.64	.89	.14	.39	.64	.90
.60	.43	.68	.94	.20	.44	.70	.95	.20	.45	.70	.96
.65	.49	.74	15.00	.26	.50	.76	16.01	.26	.51	.76	17.02
.70	.55	.80	.06	.32	.56	.82	.07	.32	.57	.82	.08
.75	.61	.86	.12	.38	.62	.88	.13	.38	.63	.88	.14
.80	.67	.92	.18	.44	.68	.94	.19	.44	.69	.94	.20
.85	.73	.98	.24	.50	.74	16.00	.25	.50	.75	17.00	.26
.90	.79	15.04	.30	.56	.80	.06	.31	.56	.81	.06	.32
.95	.85	.10	.36	.62	.86	.12	.37	.62	.87	.12	.38

**Tabla N° XXIX:** Continuación.

**Partes Proporcionales**

Lactometer Fraction	Fraction to Be Added to Total Solids	Lactometer Fraction	Fraction to Be Added to Total Solids	Lactometer Fraction	Fraction to Be Added to Total Solids
0.1	0.03	0.4	0.10	0.7	0.18
.2	.05	.5	.13	.8	.20
.3	.08	.6	.15	.9	.23

Tabla en la que se muestran las partes proporcionales de la cantidad a ser agregada cuando las lecturas del lactómetro están en números enteros y decimales.

**Tabla N° XXX:** Especificaciones para los parámetros requeridos por la NSO 67.01.10:08 para Yogurt

Producto	Materia grasa, gramos / 100g		Acidez como ácido láctico, gramos / 100g		Solidos totales, gramos / 100g	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Yogurt entero, natural, edulcorado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semillas	3.0	4.0	0.6	1.2	11.7	-
Yogurt semidescremado, natural, edulcorado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semillas	0.15	<3.0	0.6	1.2	8.85	-
Yogurt descremado natural o simple, azucarado, saborizado, aromatizado o con frutas y/o semillas	0.05	<0.15	0.6	1.2	8.7	-

## REFERENCIAS

- i. AOAC Internacional. Métodos Oficiales de Análisis. 16ª Edición, 4ª Revisión, 1998.
- ii. AOAC Internacional Online. Fecha de consulta: 20 de marzo de 2013.
- iii. Codex Alimentarius. Métodos de Análisis y Muestreo. Roma 1995. 2ª Edición.
- iv. Food Chemicals Codex, 5ª Edición, Febrero 1, 2004, Washington D.C.
- v. Asociación Europea de Productores de Sal. Procedimiento EuSalt/AS 005-2005. Fecha de consulta: 16 de septiembre de 2013.
- vi. Nielsen, S. Suzanne. Análisis de Alimentos. 4ª Edición. Editorial Springer 2010.
- vii. Sal Yodada y Sal Yodada Fluorada. NOM -040-SSA1-1993. Norma Oficial Mexicana.
- viii. Sal Fortificada con Yodo. NSO 67.20.01:05.
- ix. Café Soluble Instantáneo. NSO 67.31.03:04.
- x. Carne y Productos Cárnicos. Embutidos Crudos y Cocidos. NSO 67.02.13:98.
- xi. Productos Lácteos. Mantequilla. NSO 67.01.12:07.
- xii. Helados y Mezclas de Helados. NSO 67.01.11:04.
- xiii. Jalea Real. NSO 67.38.03:05.
- xiv. Productos Lácteos. Yogurt. NSO 67.01.10:08

**ANEXO**

## ANEXO N°1

### Estandarización de la solución de Nitrato de Plata <sup>(1)</sup>

#### A. Preparación de la solución estándar

Disolver un poco más del peso teórico de nitrato de plata (peso equivalente, 169.87) en agua destilada y diluir hasta volumen. Realizar en cristalería de vidrio perfectamente limpia y mantener la solución preparada en frascos ámbar con tapones de vidrio protegida de la luz.

#### Método de Mohr

#### B. Reactivos

- Cloruro de potasio (KCl): recristalizar el KCl 3 veces a partir de su disolución en agua destilada, secar a 110°C y luego calentar a aproximadamente 500°C hasta peso constante. El peso equivalente de KCl = 74.555.
- Solución de cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ) al 5%: pesar 5g de  $K_2CrO_4$  y diluir a 100mL con agua destilada.

#### C. Estandarización

Pesar suficiente cloruro de potasio para producir una titulación de aproximadamente 40mL (aproximadamente 0.3g para una solución al 0.1N) y transferir a un erlenmeyer de 250mL con tapón de vidrio con 40mL de agua destilada. Añadir 1mL de solución de cromato de potasio y titular con la solución de nitrato de plata hasta que aparezca el primer color perceptible marrón rojizo pálido. Del volumen de la titulación, restar los mL de la solución de nitrato de plata requeridos para producir el color del punto final en 75mL de agua destilada que contiene 1mL de solución cromato de potasio. Del volumen neto de nitrato de plata, calcular la normalidad:

$$\text{Normalidad} = \text{g KCl} \times 1000/\text{mL AgNO}_3 \times 74.555$$

### **Estandarización de la solución de Tiosulfato de Sodio <sup>(1)</sup>**

#### **A. Preparación de la solución estándar**

Disolver 25.0g de tiosulfato de sodio pentahidratado en 1L de agua destilada. Ebulir suavemente por 5min y transferir en caliente a un frasco de almacenamiento previamente limpiados con una solución de limpieza de ácido crómico caliente y enjuagado con agua tibia hervida. Guardar la solución en lugar oscuro, fresco, no devolver las cantidades no utilizadas al frasco. Si se desean soluciones menos concentradas de 0.1N, preparar por dilución con agua destilada hervida. Las soluciones más diluidas (son menos estables y debe prepararse justo antes de su uso)

#### **B. Estandarización**

Pesar 0.20 a 0.23g de cromato de potasio (secado por 2h a 100°C) y colocar en un frasco con tapón de vidrio. Disolver en 80mL de agua destilada que contiene 2g de yoduro de potasio. Agregar, con agitación, 20mL de ácido clorhídrico 1N y colocar inmediatamente en la oscuridad por 10min. Valorar con solución de tiosulfato de sodio, **A**, agregando solución de almidón después de que la mayor parte de yodo se ha consumido.

$$\text{Normalidad} = \text{g K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 1000/\text{mL Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 49.032$$

### **Estandarización de la soluciones Tiocianato de Amonio y Potasio <sup>(1)</sup>**

#### **A. Reactivos**

- Nitrato de plata purificado: Disolver 50g de nitrato de plata en 20mL de agua destilada en ebullición que contenga aproximadamente 5 gotas de ácido nítrico. Calentar para disolver, filtrar aún en caliente por un filtro de vidrio poroso, utilizando succión y recoger el filtrado en beaker limpio de borosilicato. Lavar el beaker y el filtro con aproximadamente 5mL de agua destilada caliente, agregando los lavados de filtrado. Dejar enfriar en baño de hielo, revolviendo para inducir la cristalización y colocar en refrigeración a 10°C hasta que se alcanza el equilibrio. Decantar el líquido a través del filtro de fibra de vidrio y transferir los cristales al filtro. Cubrir el filtro con un vidrio reloj y pasar aire a través del filtro para eliminar el líquido adherido. Trasladar los cristales a un pequeño y limpio beaker de borosilicato. Cubrir el beaker con un vidrio reloj y colocar dentro de un beaker más grande de borosilicato cubierto. Secar a 105°C y se fusionan en 220-250°C, sostener a esta temperatura aproximadamente 15min después de que los cristales se hayan fundido. Proteger contra el polvo durante la preparación. Enfriar en un desecador, quitar el producto del beaker, colocar el polvo en un mortero y secar por 0.5h a 105°C, guardar en frascos ámbar con tapón de vidrio en un lugar oscuro sobre un buen desecante.
- Solución de referencia: A una mezcla de 5mL de ácido nítrico (1+1), 2mL de solución de alumbre férrico y 115mL de agua destilada, añadir 0.02mL de tiocianato 0.1N, anotando el volumen exacto utilizado.

#### B. Preparación de la solución estándar

Preparar la solución 0.1N del reactivo que no muestra cloro, utilizando 7.612g de tiocianato de amonio o 9.718g de tiocianato de potasio/L.

### C. Estandarización

Pesar con precisión, en un vidrio reloj tarado, suficientemente nitrato de plata purificado para dar una titulación de 40mL (0.7g de solución 0.1N) y transferir con agua destilada través de embudo de vidrio a un erlenmeyer de 250mL con tapón de vidrio. Disolver en aproximadamente 75mL de agua destilada (libre de halógenos) y añadir 5mL de ácido nítrico (1+1) y 2mL de solución de alumbre férrico. Valorar con la solución de tiocianato hasta que la solución valorada logra un color marrón rojizo, que se mantiene después de agitar vigorosamente por 1min. Registrar la lectura de la bureta y dejar el frasco a un lado por 5min, agitando de vez en cuando, mantener el color del punto final mediante la adición de solución de tiocianato si es necesario. A continuación, añadir solución de tiocianato extra, si es necesario, para producir el color del punto final permanente, comparándolo con el color de la solución de referencia. Del volumen total de la solución de tiocianato utilizada en la titulación, restar el volumen contenido en la solución de referencia.

$$\text{Normalidad} = \text{g de nitrato de plata} \times 1000 / \text{mL titulados} \times 169.87$$

### **Estandarización de Solución de Hidróxido de Sodio <sup>(1)</sup>**

Método estándar de ftalato hidrogeno de potasio

#### A. Aparato

Utilizar una bureta y pipeta calibrada. Proteger las salidas de aire de buretas automáticas de contaminación de CO<sub>2</sub> con protectores adecuados de tubos que contienen sosa y cal. Utilice recipientes de vidrio resistente a los álcalis.

## B. Reactivos

- Agua libre de CO<sub>2</sub>: preparar mediante uno de los siguientes métodos: (1) Hervir el agua destilada por 20min y enfriar con la protección de sosa-cal, (2) pasando burbujas de aire a través del agua destilada, libre de CO<sub>2</sub>, a través del tubo de soda y cal por 12h.
- Solución de hidróxido de sodio (1+1): a 1 parte de hidróxido de sodio (calidad reactivo conteniendo % carbonato de sodio) en un frasco añadir 1 parte de agua destilada y agitar hasta que la disolución se haya completado. Tapar con el tapón de goma. Dejar reposar el carbonato de sodio hasta que se haya sedimentado, dejando perfectamente un líquido claro (aproximadamente 10 días).
- Ftalato ácido de potasio: NIST SRM para Acidimetría 84. Triturar, pasar por un tamiz N°100. Secar 2h a 120°C. Enfriar en un desecador que contiene ácido sulfúrico.

## C. Preparación de la solución estándar

La **tabla N° XXXI** brinda volúmenes aproximados de solución de NaOH (1+1) necesarios para hacer 10L de soluciones estándar. Añada el volumen necesario de solución de hidróxido de sodio (1+1) a 10L de agua destilada libre de CO<sub>2</sub>.

**Tabla N° XXXI:** Volúmenes de solución de hidróxido de sodio (1+1) requeridos para preparar soluciones de diferentes normalidades.

Normalidad aproximada	mL NaOH para ser diluidos a 10L
0.01	5.4
0.02	10.8
0.10	54.0
0.50	270.0
1.0	540.0

Comprobar la normalidad, la que debería ser un poco alta, como en **D**, ajustar a la concentración deseada con la siguiente fórmula:

$$V_1 = V_2 \times N_2 / N_1$$

Dónde:  $N_2$  y  $V_2$  representan la normalidad y el volumen de solución madre, respectivamente, y  $V_1$  el volumen de solución de reserva que debe ser diluido para obtener normalidad deseada,  $N_1$ .

#### D. Estandarización

Pesar exactamente suficiente ftalato hidrogeno de potasio ( $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ ) seco para valorar 40mL y transferir a un frasco de 300mL que ha sido barrido libre de  $\text{CO}_2$ . Añadir 50mL de agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ . Tapar el frasco y agitar suavemente hasta que la muestra se disuelva completamente. Valorar a pH 8.6 con solución previa estandarizada, teniendo precaución para excluir el  $\text{CO}_2$  y utilizando como indicador el electrodo de vidrio del pHmetro o 3 gotas de fenolftaleína. Determinar el volumen de hidróxido de potasio requerido para producir el punto final del blanco, haciendo coincidir el color en otro frasco que contiene 3 gotas de fenolftaleína y el mismo volumen de agua libre de  $\text{CO}_2$ . Reste el volumen requerido utilizado en la primera titulación y calcular la normalidad:

$$\text{Normalidad} = \text{g KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \times 1000 / \text{mL NaOH} \times 204.229$$

### **Estandarización de solución de Ácido Clorhídrico <sup>(1)</sup>**

#### A. Preparación de las soluciones estándar.

La **tabla N° XXXII** da los volúmenes aproximados requeridos de ácido clorhídrico 36.5-38% para hacer 10L de solución estándar.

**Tabla N° XXXII:** Volúmenes de ácido clorhídrico concentrado requeridos para preparar soluciones de diferentes normalidades.

Normalidad aproximada	mL HCl para ser diluidos a 10L
0.01	8.6
0.02	17.2
0.10	86.0
0.50	430.1
1.0	860.1

#### B. Método Estándar de sodio Hidróxido

Titular 40mL frente a solución alcalina estándar preparada para estandarizar la solución de hidróxido de sodio, **C-D**, de cerca de la misma concentración del ácido, se aplica la misma estandarización en un frasco de 300mL que ha sido barrido libre de CO<sub>2</sub>, utilizando agua destilada libre de CO<sub>2</sub> y 3 gotas de fenolftaleína.

$$\text{Normalidad} = (\text{mL estándar álcali} \times \text{normalidad del álcali}) / \text{mL de HCl}$$

Si más concentrado se desea, diluir la solución al valor de normalidad requerida con la siguiente fórmula:

$$V_1 = V_2 \times N_2 / N_1$$

Dónde: N<sub>2</sub> y V<sub>2</sub> representan la normalidad y el volumen de la solución madre, respectivamente, y V<sub>1</sub> = volumen de solución de reserva que debe ser diluida para obtener la normalidad deseada, N<sub>1</sub>.

Comprobar la concentración exacta de la solución final mediante titulación como se realizó anteriormente. La normalidad será exacta sólo si el mismo indicador se utiliza en la determinación como en la estandarización. Reestandarizar si otro indicador diferente a fenolftaleína es utilizado.

## **CAPITULO VI**

### **DISCUSION DE RESULTADOS**

## 6.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En El Salvador existen dentro de las Normativas Salvadoreñas para la evaluación y análisis de productos alimenticios las Normativas Salvadoreñas Obligatorias, Normativas Salvadoreñas Recomendadas y el Reglamento Técnico Centroamericano, en el presente trabajo de graduación se realizó una investigación bibliográfica de los productos Sal Fortificada con Yodo, Café Soluble Instantáneo, Carnes y Productos Cárnicos, Embutidos Crudos y Cocidos, Productos Lácteos: Mantequilla, Helados y Mezclas de Helados, Jalea Real y Productos Lácteos: Yogurt para las cuales solamente se encuentran disponibles las Normativas Salvadoreñas Obligatorias, como resultado se obtiene una guía de metodologías de análisis fisicoquímicas y sensoriales, que incluye una portada, introducción, objetivo de la guía, abreviaturas utilizadas, alcance por producto, los métodos de análisis organolépticos y fisicoquímicos para cada uno de ellos, fundamento de los métodos, especificaciones de los límites para cada componente evaluado y su referencia bibliográfica, así como el material, equipos, reactivos y cristalería necesaria para el análisis de estos.

Durante la investigación la mayor dificultad encontrada fue la revisión de bibliografía antigua recomendada por las Normas Salvadoreñas Obligatorias como las Normas Sanitarias de Alimentos en su primera edición, siendo sustituida por la bibliografía actual referente al análisis de productos alimenticios tales como Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC, el Codex Alimentarius, Análisis de Alimentos de Nielsen, entre otros. Dichos libros son específicos con respecto al método de análisis a utilizar para cada parámetro evaluado, excepto para algunos métodos, en el que da diferentes opciones de métodos para su evaluación, en este caso, cada laboratorio o institución interesada en el análisis, debe validar el método según las condiciones y equipos con que cuenten en sus instalaciones.

Como actualmente no existe un documento que incluya para estos productos todos los análisis fisicoquímicos y sensoriales recomendados y los límites para cada parámetro de los mismos, se considera que este trabajo de graduación representa un insumo importante para la industria alimentaria, docencia y estudiantil.

**CAPITULO VII**  
**CONCLUSIONES**

## 7.0 CONCLUSIONES

1. En El Salvador para los productos en estudio solamente se encuentran vigentes y disponibles al público las Normativas Salvadoreñas Obligatorias.
2. Las Normas Salvadoreñas Obligatorias proponen libros de referencia para el análisis de los productos, uno de los más referidos y en el que se encuentran una gran cantidad de metodologías fisicoquímicas para el análisis de alimentos en general, es la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC).
3. Algunas Normas Salvadoreñas Obligatorias proponen el uso de bibliografía de difícil acceso tal como las Normas Sanitarias de Alimentos en su primera edición, cuya obtención no fue factible debido a la antigüedad de la misma.
4. La Asociación Oficial de Químicos Analíticos propone métodos de análisis con reactivos y equipos específicos, por lo tanto, cada laboratorio debe realizar la adecuación requerida para el cumplimiento de los mismos, tomando en cuenta equipos, cristalería, reactivos y personal capacitado para la selección de un método y su posterior validación.
5. Las Normas Salvadoreñas Obligatorias indican las pruebas sensoriales necesarias en la evaluación de los alimentos.
6. Las Normas Salvadoreñas Obligatorias brindan para cada producto los parámetros a evaluar y los límites específicos para cada uno de ellos.

**CAPITULO VIII**  
**RECOMENDACIONES**

## 8.0 RECOMENDACIONES

1. Contar en forma impresa y/o digital con la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), además de otra bibliografía referente al análisis de alimentos.
2. Que las Normativas Salvadoreñas sugieran a bibliografía reciente y ediciones actualizadas, con el objetivo de facilitar la búsqueda de la información requerida para cada producto.
3. Elaborar una guía para las metodologías de análisis y especificaciones microbiológicas y métodos de muestreo de los productos que se contemplan en esta investigación.
4. Elaborar otras guías metodológicas de análisis sensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos para productos que no están incluidos en esta investigación.
5. Validar las metodologías de análisis que esta guía presenta dependiendo del alcance de cada laboratorio.
6. Que el Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica (OSARTEC) proponga elaborar los Reglamentos Técnicos Centroamericanos para los productos plasmados en esta guía.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFÍA

1. Araujo, G. El Café: Cualidades y Efectos Adversos. Instituto Nacional de Salud Pública, Año 3 N°3, Mayo-Junio 2011, Cuernavaca, Morelos.
2. Ardoino M., Muller S. Procesamiento de Carnes y Embutidos. Proyección de Gestión de Calidad en Fábricas de Embutidos. Diseño e impresión Centro Impresor Piedra Santa.
3. Asociación Mexicana de la Industria Salinera S.A., 1945; consultado el 12 de octubre de 2012. Disponible en:  
  
<http://www.amisac.org.mx>
4. Asociación de pequeñas y medianas Industrias Lácteas; consultado el 15 de octubre de 2012. Disponible en:  
  
[www.pymeslacteas.com.ar](http://www.pymeslacteas.com.ar)
5. Berkowitz D. Industria Alimentaria. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.
6. Calasin R., Claudia. Leyes, Decretos, Códigos, Ordenanzas, Reglamentos; consultado el 11 de septiembre de 2012. Disponible en:  
  
[www.elsalvadorleyes.com](http://www.elsalvadorleyes.com)
7. Código de Familia. Ley procesal de familia y Ley contra la violencia intrafamiliar. Editorial Jurídica Salvadoreña, 2001.
8. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, República de El Salvador, C.A.; consultado el 7 de octubre de 2012. Disponible en:

[www.conacyt.gob.sv](http://www.conacyt.gob.sv)

9. Constitución Política de la República de El Salvador, 1962. Editorial Jurídica Salvadoreña 65ª edición, Enero 2013.

10. Defensoría del Consumidor (sede Web). Leyes y Normas de Utilidad y de Protección al Consumidor actualizado lunes 28 de junio de 2010; consultado el 15 de octubre de 2012. Disponible en:

[http://www.defensoria.gob.sv/index.php?option=com\\_content&view=article&id=371&Itemid=224](http://www.defensoria.gob.sv/index.php?option=com_content&view=article&id=371&Itemid=224)

11. Diario Oficial, Tomo N° 92, San Salvador Viernes 26 de agosto de 2011 N° 158.

12. Directrices de las Naciones Unidas para la protección del consumidor (versión ampliada de 1999), Naciones Unidas, Nueva York 2003; consultado el 10 de septiembre de 2012. Disponible en:

[http://www.consumersinternational.org/media/33875/consumption\\_sp.pdf](http://www.consumersinternational.org/media/33875/consumption_sp.pdf)

13. Elaboración de Mantequilla, Senati; consultado el 15 de diciembre de 2012. Disponible en:

<http://www.infolactea.com>

14. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Análisis de Alimentos, Fundamentos y Técnicas, consultado el 10 de octubre de 2012. Disponible en:

[http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnalisisdeAlimentos\\_6501.pdf](http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTecnicasdeAnalisisdeAlimentos_6501.pdf)

15. Food Chemicals Codex, 5ª Edición, Febrero 1, 2004, Washington D.C.
16. Gómez, O. Guía para la Innovación de la Caficultura, San Salvador, El Salvador, Septiembre 2010.
17. González, J. Valor Nutritivo de los Helados, Volumen 26 Número 8, Septiembre 2007.
18. Gotas de Café. Boletín Informativo. Edición Quincenal 4 de Septiembre N°1 Año 2006. Procafe.
19. Guía para el Control y Prevención de la Contaminación, Industria Procesadora de la Carne, Santiago, Marzo 1998
20. Hernández, E. Evaluación Sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Bogotá, D.C. 2005
21. Huguet, N. La Evaluación Sensorial. Objetivos y Métodos de Análisis Sensorial. XI Congreso Anual Perpiñán (Francia) 16, 17 y 18 de junio del 2000.
22. Instituto de la Sal; consultado el 3 de diciembre de 2012. Disponible en:  
  
[www.institutodelasal.com](http://www.institutodelasal.com)
23. Leidy, J. Exportación de café en Grano, Facultad de Tecnología en Administración Comercial y Financiera. Negocios Internacionales; consultado el 11 de noviembre de 2012. Disponible en:  
  
<http://leydy-negociosinternacionales.blogspot.com/2011/06/exportacion-de-cafe-en-grano.html>
24. Lesur L. 1992. Manual de Salchichonería. Editorial Trillas, México, D. F.

25. Mantequillas, Margarinas y Minarinas. Revista del Consumidor N° 302, Abril 2002; consultado el 19 de noviembre de 2012. Disponible en:  
  
[http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_02/mantequilla.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_02/mantequilla.pdf)
26. Menchú, M.T., Méndez, H. Análisis de la Situación Alimentaria de El Salvador. Guatemala: INCAP, 2011
27. Mendoza, E. Composición y Propiedades de los Alimentos. Bromatología. México, Editorial Mc Graw Hill 2010
28. Mondino M. C., Ferratto J., El Análisis Sensorial, una herramienta para la evaluación de la calidad desde el consumidor. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Rosario, publicación cuatrimestral 04/2006; consultado el 5 de octubre de 2012. Disponible en:  
  
<http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/18/7AM18.htm>
29. Nielsen, S. S. Análisis de Alimentos. 4ª Edición. Editorial Springer 2010.
30. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Fundación Internacional Carrefour. Buenas Prácticas para la Industria de la Carne. Roma 2007
31. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. La Garantía de la Calidad en el Laboratorio Químico de Control de los Alimentos. Roma 1996
32. Organización de los Estados Unidos Americanos; consultado el 5 de diciembre de 2012. Disponible en:  
  
[www.science.oas.org](http://www.science.oas.org)

33. Pajuelo A. Los Productos Apícolas: Miel, Polen, Cera, Propóleos, Jalea Real, Venenos, Polinización. Diciembre 2009, España
34. Pérez, C. La Jalea Real, Numero 19/88 HD, Departamento de Producción Animal y Ciencias de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza
35. Red Hemisférica de Intercambio de Información para la Asistencia Mutua en Materia Penal y Extradición, El Salvador; consultado el 3 de octubre de 2012. Disponible en:  
  
<http://www.oas.org/juridico/MLA/sp/slv/index.html>
36. Ruiz, J.A., Ramírez, Matheus. Elaboración de Yogurt con probióticos (*Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus acidophilus*) e Inulina. Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela 2009
37. Saleedo, C., Font Mariné. Yogur: Elaboración y Valor Nutritivo. Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Madrid, Octubre 1988
38. Soto, C. Guía Técnica para el Beneficiado de Café protegido bajo una indicación geográfica o denominación de origen. Guatemala 2010
39. Zdzislaw E. Sikorski, Methods of Analysis of Food Components and Additives, Ege University Department of Food Engineering, Izmir, Turkey 2005