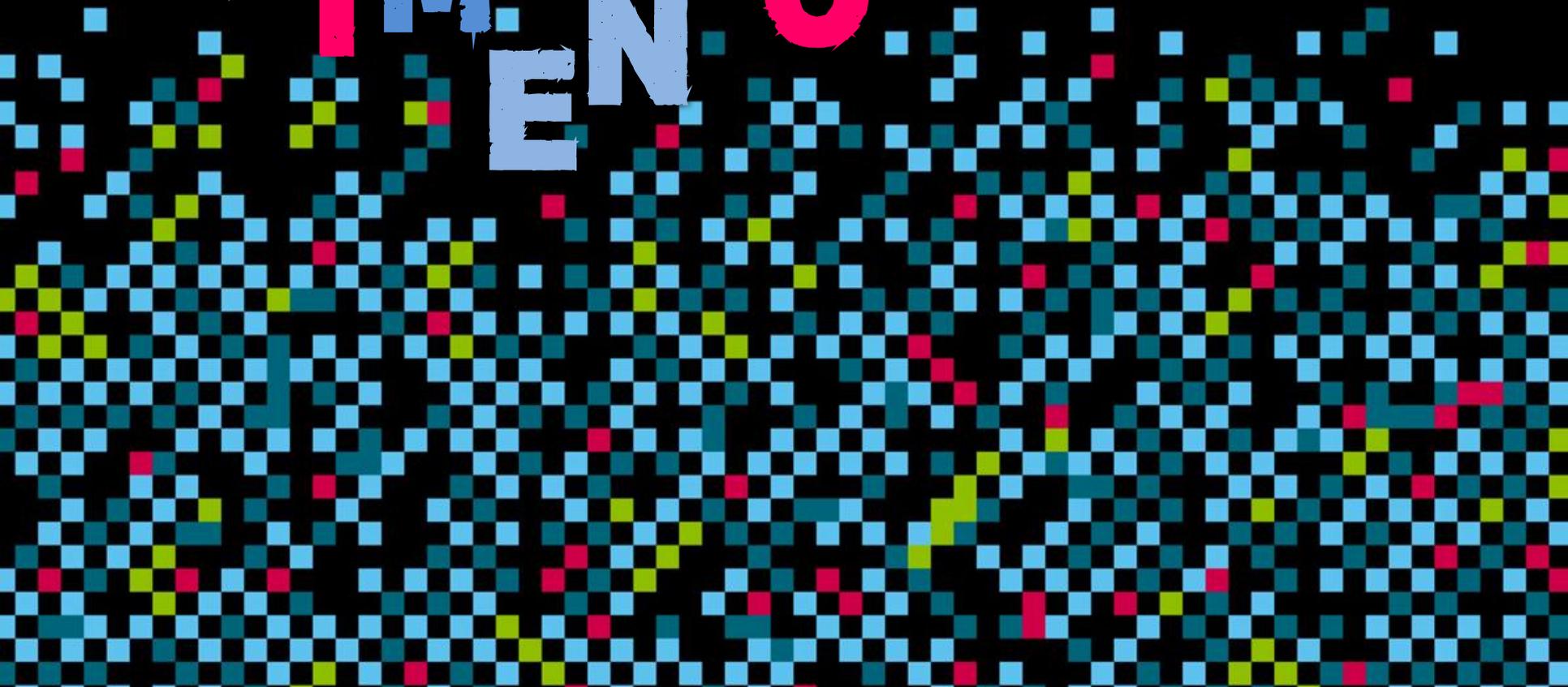
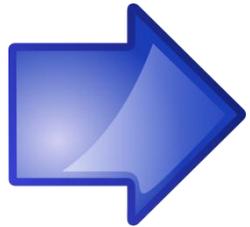


ANÁLISIS DE ALIMENTOS

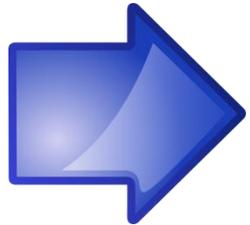


ANÁLISIS DE ALIMENTOS



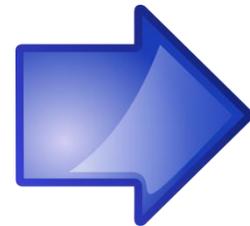
Aplicaciones

Investigación y desarrollo
Monitoreo de la calidad
Rotulado



Objetivos

Composición
Estructura
Propiedades físicas, químicas y biológicas



Tipos

De acuerdo al objetivo y alimento

COMPOSICIÓN

Análisis proximal o de Weende (Humedad, Ceniza, Proteína Cruda, Extracto Etéreo, Fibra Cruda y Extracto Libre de Nitrógeno)
Análisis específicos (β -caseína, fósforo, colesterol)

ESTRUCTURA

Macro

Micro (glóbulos grasos)

Ultraestructura (micelas de caseína)

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS y SENSORIALES

Análisis sensorial (flavor, aroma)

Análisis reológico (dureza, elasticidad)

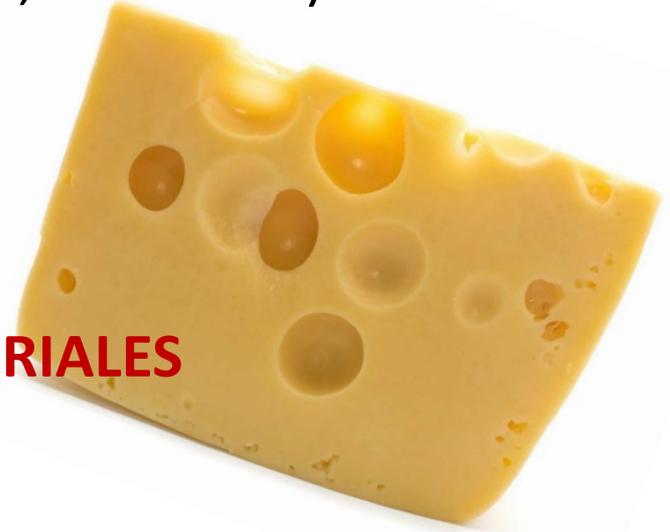
Estabilidad (oxidación de lípidos, exudado de suero)

Propiedades térmicas (perfil de fusión)

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Crecimiento de microorganismos (bacterias starters, hongos)

Procesos y productos metabólicos (péptidos, enzimas)



Análisis proximal o de Weende

Reseña

Ideado por Henneberg y Stohmann (1867) en la estación experimental de Weende (Alemania).

Aplicaciones

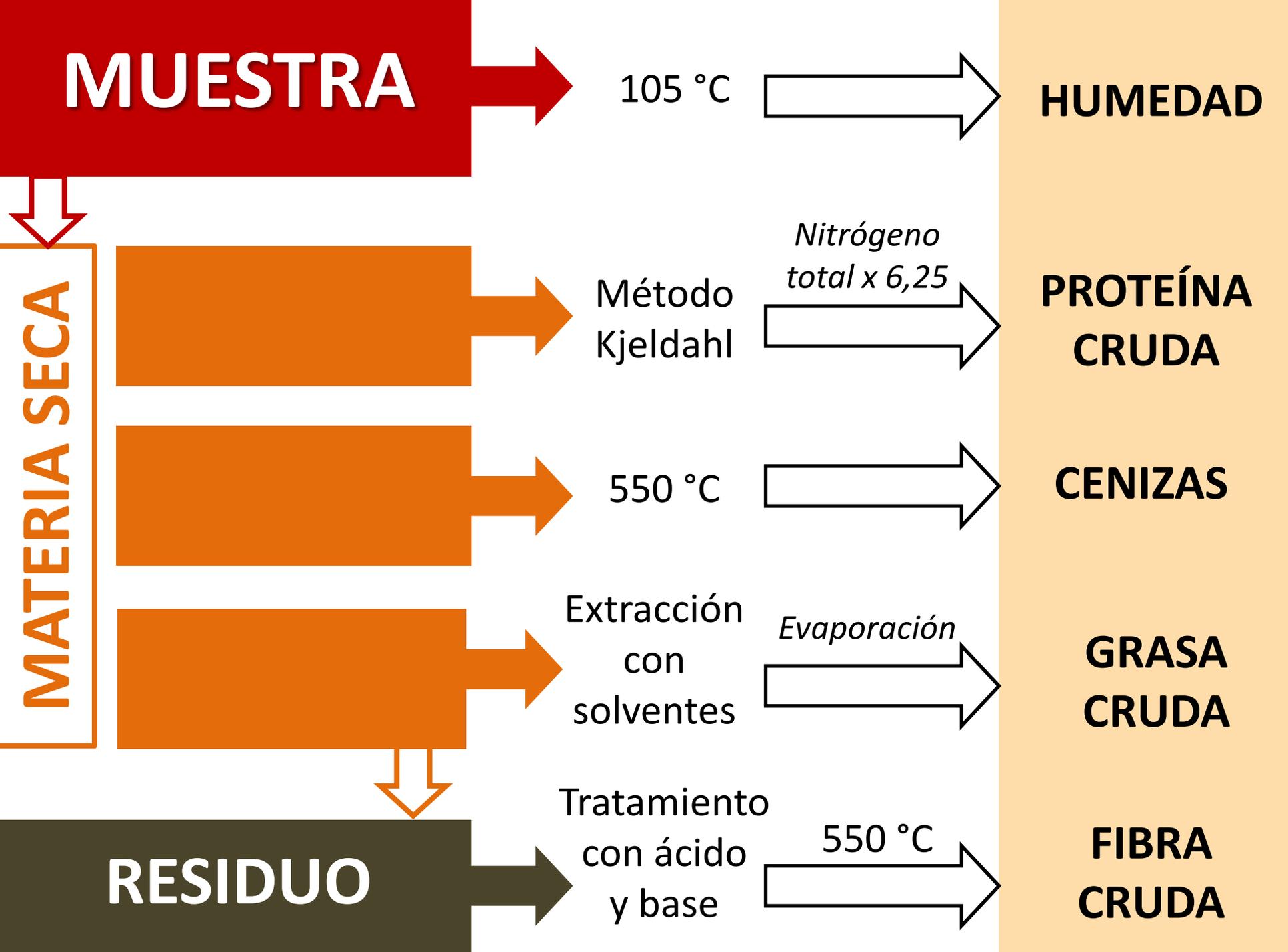
Materiales para formular una dieta como fuente de proteína o de energía
Alimentos terminados, como control para verificar que cumplan con las especificaciones o requerimientos establecidos durante la formulación.

Fundamento y objetivo

Separar, a partir de la muestra seca, una serie de fracciones con características comunes. Se determinan grupos de compuestos con propiedades similares, no compuestos individuales. Se denominan contenidos brutos o crudos.

Determinaciones

Humedad, proteína cruda (nitrógeno total), fibra cruda, Extracto etéreo o lípidos crudos, ceniza y extracto libre de nitrógeno.



MUESTRA

105 °C

HUMEDAD

MATERIA SECA

Método Kjeldahl

Nitrógeno total x 6,25

PROTEÍNA CRUDA

550 °C

CENIZAS

Extracción con solventes

Evaporación

GRASA CRUDA

RESIDUO

Tratamiento con ácido y base

550 °C

FIBRA CRUDA

M U E S T R A

AGUA			
MATERIA SECA	MATERIA INORGÁNICA		
	MATERIA ORGÁNICA	PROTEÍNA BRUTA	Proteínas Aminoácidos Péptidos Ácidos nucleicos Amidas Nitratos
		GRASA BRUTA	Triglicéridos Ácidos grasos Ceras Esteroles Pigmentos Vitaminas liposolubles
		FIBRA BRUTA	Celulosa* Hemicelulosas* Lignina* Cutina
		EXTRACTO LIBRE DE N	Almidón, glucógeno Azúcares Pectinas Celulosa*, hemicelulosas* Lignina* Vitaminas hidrosolubles* Ácidos orgánicos*, pigmentos*

Fracciones obtenidas

Cenizas: sustancias inorgánicas

Proteína Bruta: proteínas + péptidos + aminoácidos + bases nitrogenadas + amidas + N vitamínico

Grasa bruta o extracto etéreo: triglicéridos + ácidos grasos + ceras + lípidos complejos + vitaminas liposolubles

Fibra bruta: celulosa* + hemicelulosas* + lignina* + cutina

Extracto libre de N: almidón, glucógeno + azúcares + celulosa* + hemicelulosa* + lignina* + pectinas + pigmentos + ácidos orgánicos + vitaminas hidrosolubles

**POR
ANÁLISIS**

**POR
DIFERENCIA**

() fracciones del total*

Principal deficiencia del Sistema Weende

Valores de fracción hidrocarbonada del alimento tienen poca precisión (fibra bruta y ELN)

Otros sistemas propuestos para salvar esta deficiencia

MUESTRA

Método Van Soest y Wine, 1967

Ebullición

Detergente neutro

**Fracción soluble
(SND)**

**Fibra detergente
neutro (FDN)**

Contenido celular

Lípidos

Azúcares

Almidón

Proteínas

Ácidos orgánicos

Pectinas

Componentes de la pared celular

Ebullición

Detergente ácido

**Fibra detergente
ácido (FDA)**

*Fracción soluble
(hemicelulosas
hidrolizadas)*

Celulosa

Lignina

Cutina

Nitrógeno no proteico

**TÉCNICAS
GENERALES
DE ANÁLISIS**





CENIZAS

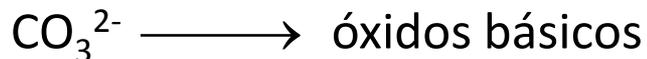
CENIZAS

Componentes minerales que resultan de incinerar la muestra seca a más de 500 °C

- T media de calcinación: 550 °C
- > 600 °C: pérdidas de halogenuros alcalinos
- “Digestión seca”, se elimina toda la materia orgánica:



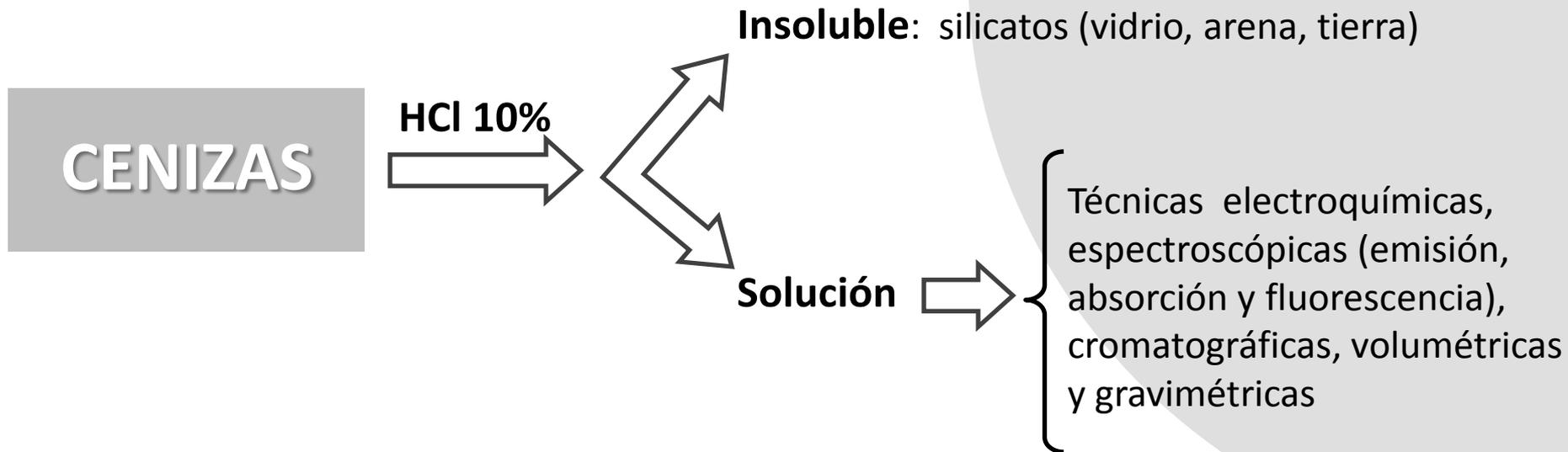
- Algunas sales se descomponen:



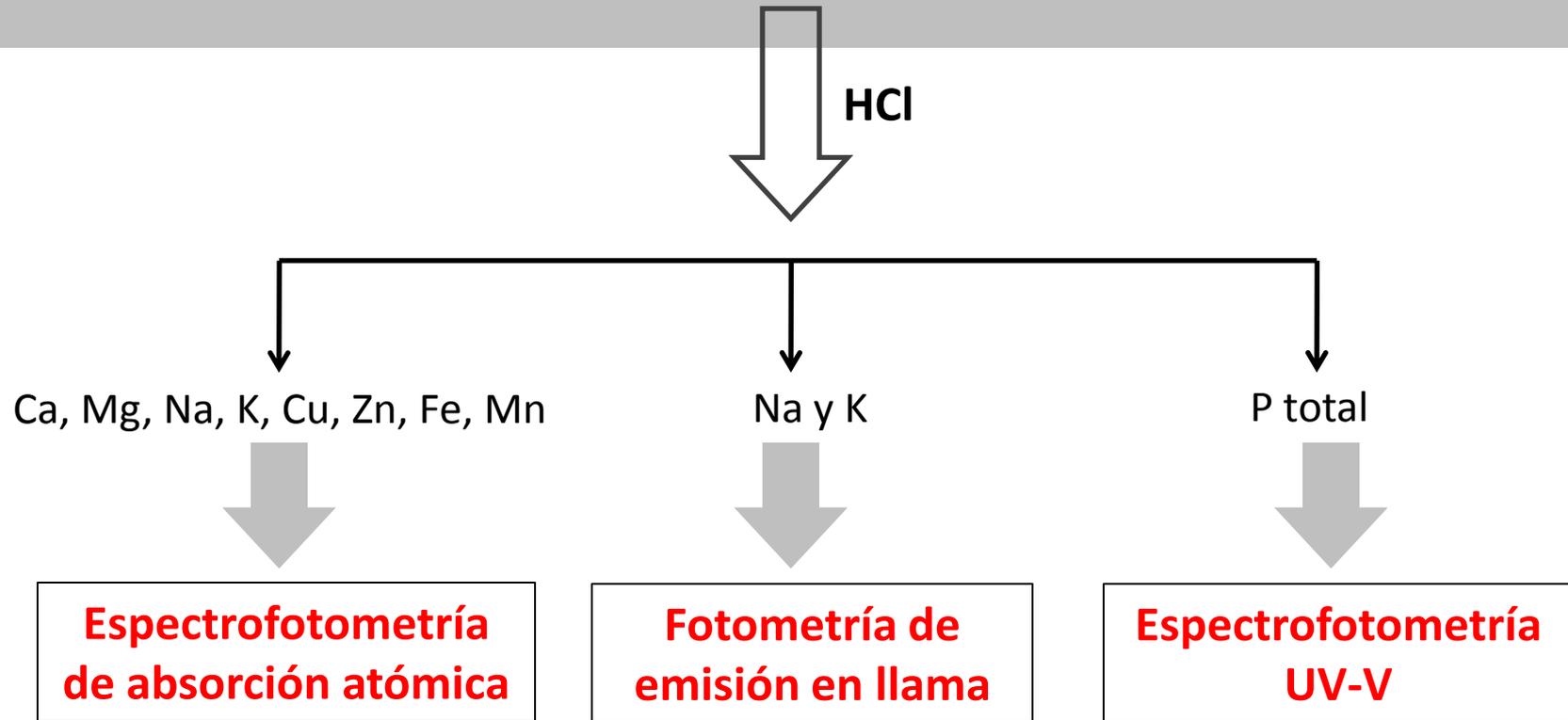
- Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} (de Na, K, Ca, Mg, etc.) no se modifican
- Se expresan en base fresca del alimento (salvo casos especiales)

ANÁLISIS DE MICRONUTRIENTES

- A partir de cenizas de la muestra
- A partir de la muestra luego de tratarla con H_2SO_4 o HNO_3 (oxidación de materia orgánica por digestión húmeda)
- En casos específicos, directamente de extractos de la muestra

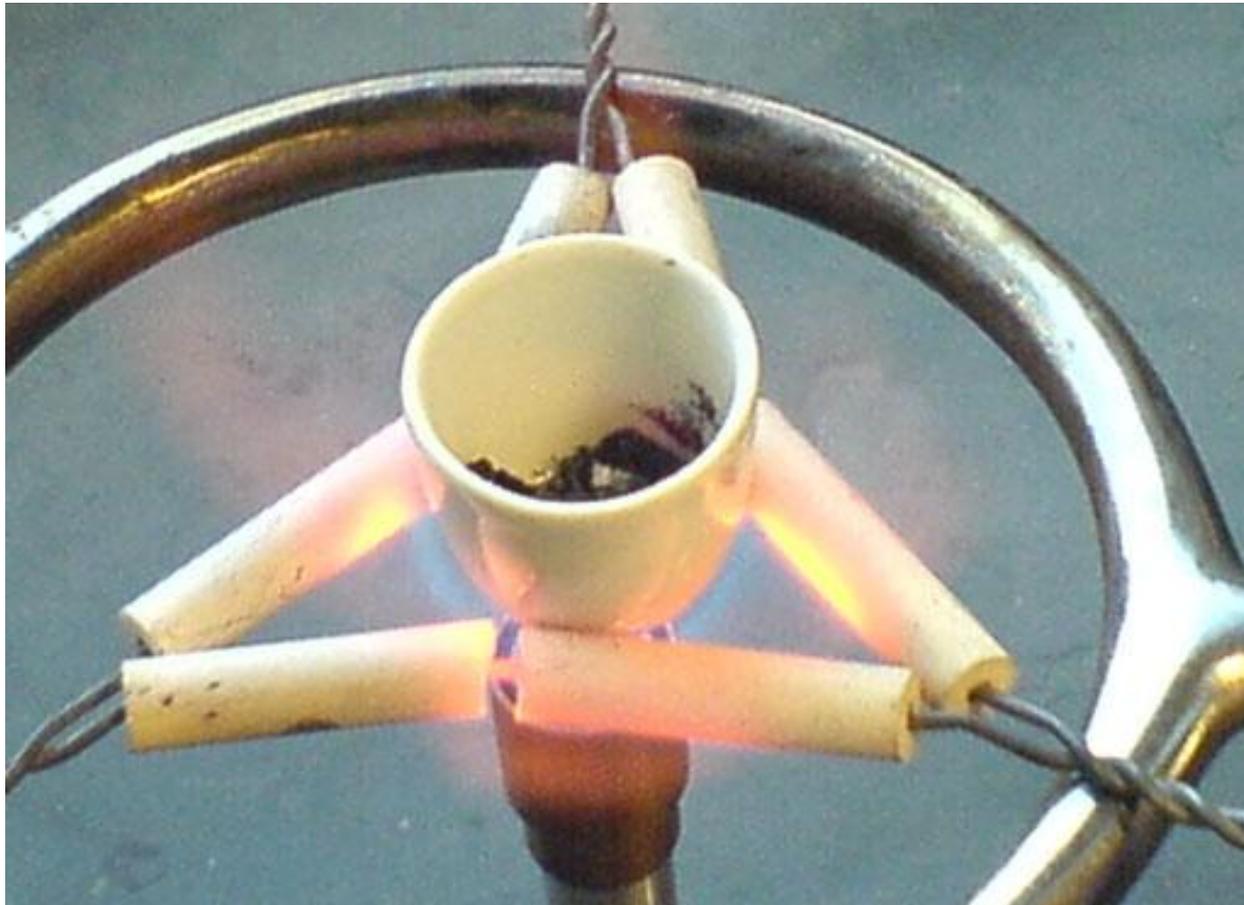


CENIZAS



Análisis de cloruros: se realiza en un extracto del alimento (Ej. volumetría de precipitación: Método de Mohr)

Incineración de la muestra en crisol mediante una llama





Crisoles (porcelana, platino) y hornos mufla



HUMEDAD

(MATERIA SECA)

HUMEDAD

El agua es el constituyente más abundante de la mayoría de los alimentos naturales (excepto granos y frutos secos)

- Agua de tejidos animales y vegetales puede estar más o menos disponible (percebibilidad)
- Agua libre y confinada (en general, predominante) se libera con facilidad: estimada en los métodos convencionales usados para determinar humedad
- Eliminar agua ligada puede requerir temperaturas a las que el alimento se degrada

Métodos de determinación de humedad

Directos: Estiman la cantidad de agua perdida del alimento por algún método de deshidratación o directamente la cantidad de agua extraída del alimento

Indirectos: Estiman la cantidad de agua presente en un alimento mediante la medida de alguna propiedad que dependa de dicha cantidad

MÉTODOS DIRECTOS

I. Por determinación de la materia seca del alimento

- Resultados confiables (asumiendo que la muestra no se descompone térmicamente y/o que no hay eliminación de otros componentes volátiles)
- Debe ajustarse temperatura y tiempo (fijo, hasta peso constante, etc.)
- Distintas técnicas de secado:

Estufa de aire (de convección natural o forzada): 70-140 °C

Estufa de vacío: < 60 °C; alimentos ricos en proteínas y azúcares

Balanza con lámpara de luz infrarroja: secado rápido



Estufa de convección natural



Estufa de convección forzada

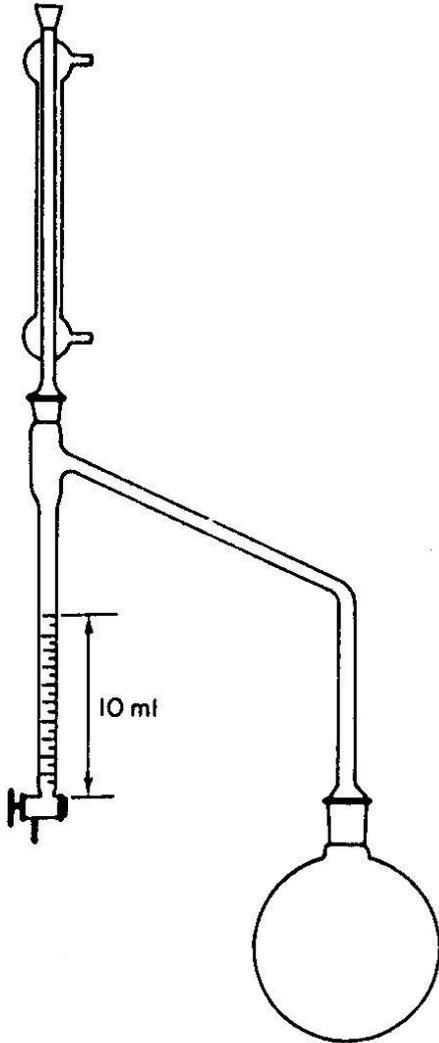


Balanza con IR



Estufa de vacío

II. Por medida de la cantidad de agua extraída del alimento



- Destilación continua con un solvente inmiscible de punto de ebullición mayor al del agua (desde 110 °C para el tolueno hasta aproximadamente 140 °C para los xilenos)
- Aplicable a alimentos grasos y a productos con cantidades apreciables de volátiles distintos del agua
- Puede presentar problemas en muestras que sufren descomposición térmica
- **Método de Dean y Stark:** agua de la muestra, junto con tolueno, destilan a T de ebullición constante de un azeótropo a 84 °C
- Se recoge el destilado bifásico y se mide cantidad de agua en tubo graduado

MÉTODOS INDIRECTOS

- Se mide alguna propiedad física del producto que cambia de manera conocida con el contenido de agua del mismo
- Requieren calibración previa
- Aptitud del método depende de sensibilidad y presencia de interferencias
- Aplicables a alimentos con contenidos de agua del 5 al 95%

Medidas eléctricas

Conductividad
Resistencia
Capacitancia
Constante dieléctrica

Análisis espectroscópicos

RMN
IR

Medidas físicas

Densidad
Presión de vapor
Índice de refracción

MÉTODOS QUE DEPENDEN DE LA REACTIVIDAD QUÍMICA DEL AGUA

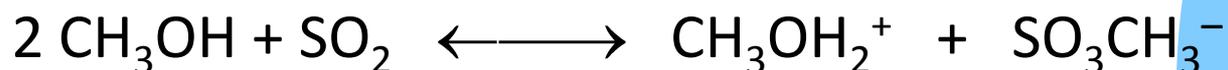
Titulación de Kart Fischer (1935)

- Ideado para determinar pequeñas cantidades de agua en solventes orgánicos
- Recomendado para alimentos de bajo contenido de humedad (< 10 %, azúcar de pastelería, chocolates, melazas, legumbres secas, etc.)
- Agua de la muestra se extrae con metanol y extracto se titula con una solución metanólica de yodo, SO₂ y piridina
- Punto final se determina por cambio de color ante el primer exceso de yodo o electrométicamente
- En ausencia de interferencias (aldehídos y cetonas) la reacción es prácticamente estequiométrica
- Exactitud del método depende de calibración y de eficiencia con que se evita captación de humedad de la muestra durante el análisis

Fundamento

- El método original consiste de una mezcla de I₂ en metanol a la que se le agrega piridina y SO₂
- La reacción propuesta original ha sido corregida y se ha reemplazado la piridina por otras sustancias básicas menos nocivas (imidazol)

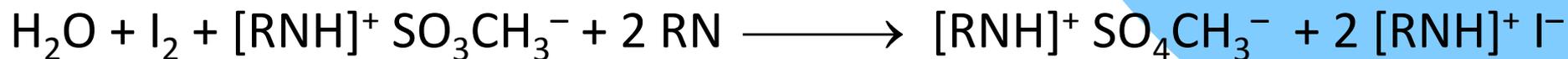
Se establece el siguiente equilibrio:



que la sustancia básica desplaza hacia la derecha:



produciéndose la siguiente reacción neta:



1 : 1



PROTEÍNAS

PROTEÍNAS

Macromoléculas nitrogenadas complejas de origen animal y vegetal que representan la fuente prácticamente exclusiva de N proveniente de la dieta

Métodos de determinación de proteínas

Extractivos: requieren de una solubilización previa de la proteína del alimento. Pueden requerir diferentes grados de purificación

Métodos químicos

Biuret

Bradford

Lowry

Métodos físicos

Espectrofotometría UV

(280nm → aa aromáticos, 190 nm → uniones peptídicas)

IR

Fluorimetría (se excita a 275 nm y se emite a 340 nm)

Turbidimetría (proteínas insolubles, DO a 600 nm)

No extractivos: no se requiere una separación previa de la proteína del alimento

Determinación de N

Kjeldahl (proteína cruda o bruta)

Sorensen (N amínico)

Dumas

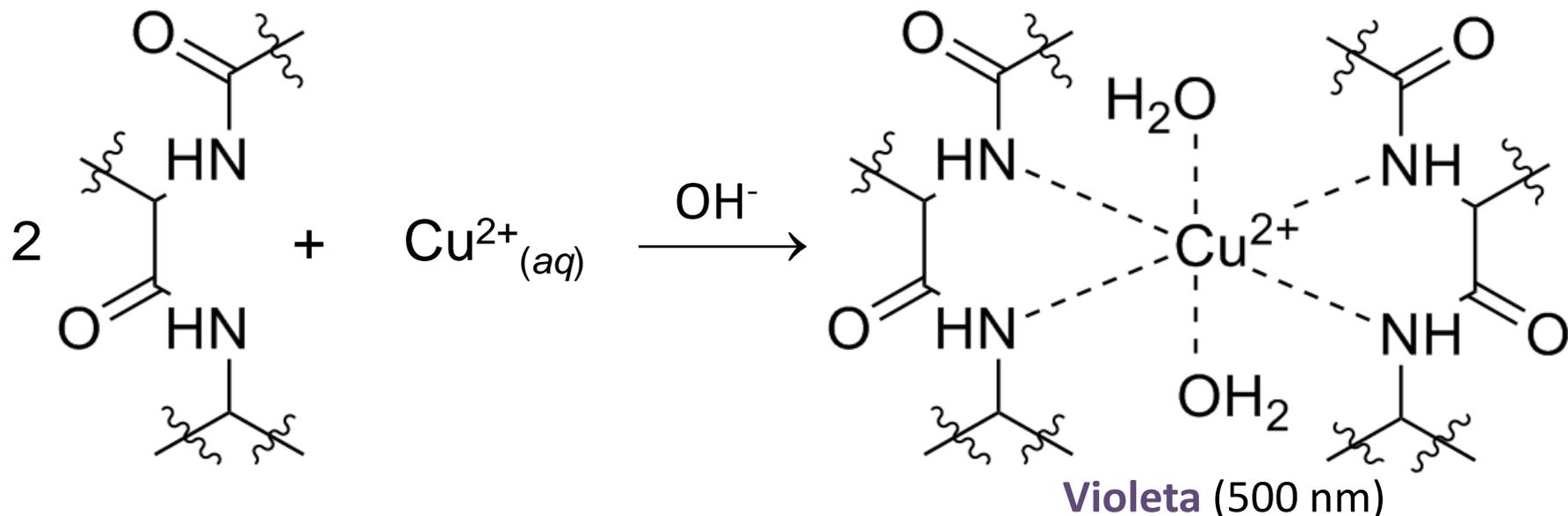
Interacción proteína-colorante (método UDY)

NIR (reflectancia)

El análisis de la composición aminoacídica de una proteína, en general, requiere una extracción, purificación y posterior hidrólisis para su estudio mediante técnicas instrumentales tales como HPLC.

Reacción de Biuret

Se forma un complejo entre iones Cu^{2+} y uniones amida de enlaces peptídicos, en solución fuertemente alcalina



- Cada Cu^{2+} quela de 4 a 6 N peptídicos, dependiendo de la proteína
- Reaccionan compuestos con dos grupos $-\text{CO}-\text{NH}-$ ligados:
 - directamente* (e.g., diamida de ácido oxálico: $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$)
 - via N* (biuret: $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$)
 - via C* (e.g., diamidas de ácido malónico: $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ y succínico: $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ y en productos de hidrólisis de proteínas)

Consideraciones generales método de Biuret

- Aminoácidos libres no reaccionan
- Péptidos de prolina no forman complejos con Cu^{2+} (gelatina poco reactiva)
- Caseína y proteínas miofibrilares producen color menos intenso a igual concentración que albúminas y proteínas sarcoplásmicas
- Sales como tartrato y citrato aumentan la estabilidad de los reactivos utilizados
- Método simple y rápido
- Poco sensible y específico (interfieren tioles, DNA, sacáridos y lípidos)
- Varias modificaciones disponibles de acuerdo a interferencias

Método de Lowry (1951)

Se forma un compuesto coloreado entre el reactivo de Folin-Ciocalteu y los enlaces peptídicos de proteínas, péptidos y aminoácidos aromáticos en medio alcalino

La reacción procede en dos etapas:

1. Reacción Biuret: se forma el complejo con Cu^{2+} que contiene al menos dos enlaces peptídicos
2. Reducción del ácido fosfomolibdico (reactivo de Folin) en presencia del complejo formado a un compuesto con molibdeno de color azul

Interferencias

El reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con otros compuestos tales como: aminoácidos, tioles, sacarosa y otros sacáridos, ácidos grasos, aminas, agentes quelantes (EDTA)

Absorción a 280 nm

- La mayoría de las proteínas absorben a 280 nm por presencia de fenol de tirosina e indol del triptófano
 - Método no destructivo y no requiere reactivos
 - Debe tomarse en cuenta absorción del solvente de la muestra
 - Interfieren compuestos con purinas y pirimidinas
 - Debe realizarse curva de calibración
- 

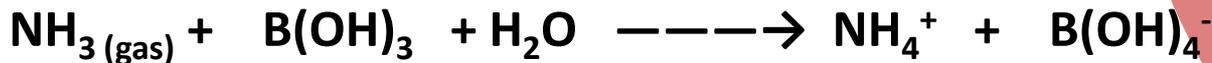
Método de Kjeldahl (1883)

Comprende la mineralización de la materia orgánica de la muestra usando una mezcla de ácido sulfúrico y sales a ebullición entre 340 y 370 °C. En esta digestión, el N orgánico se convierte en sulfato de amonio. Alcalinizando la solución resultante, se libera amoníaco que se recoge cuantitativamente mediante una destilación por arrastre de vapor, para luego ser determinado por titulación.

Digestión de la muestra



Neutralización del digerido: liberación de amoníaco y captura del mismo



Titulación del amonio



N en formas oxidadas como nitratos o nitritos y en general, N de heterociclos aromáticos no representan fuentes de error en la determinación de amoníaco

Compuestos	Recuperación (%)
Nitratos, nitritos (orgánicos e inorgánicos)	< 1
Heterociclos nitrogenados aromáticos (piridina, pirimidina, tiazol, imidazol, pirazol)	1- < 80
Azo compuestos	30-85
Hidrazinas	< 50

Reacción general de oxidación de compuestos que contienen N orgánico:



Nombre	Grupo funcional	Producto de degradación	Fracción
Amida Amina N heterogénico Imina Isocianuro Isooxocianato Isotiocianato Oxocianato Péptido Nitrilo	—CONH ₂ —NH ₂ —N— =NH ₂ —NC —NCO —NCS —OCN —CONH— —CN	NH₃	<i>a</i>
Hidroxilamina Isonitro Nitro Oxima	—NHOH —NOOH —NO ₂ —NOH	HNO₃	<i>b</i>
Nitroso Azo Azino Diazonio Hidrazona Hidrazina	—NO —N=N— =N—N= —N≡N ⁺ —N—NH—R —NHNH ₂	N₂	<i>c</i>

Cuadro 7.3 Factores para la conversión de los valores de nitrógeno en proteínas (por g de N)*

<i>Producto alimenticio</i>	<i>Factor</i>	<i>Producto alimenticio</i>	<i>Factor</i>
Productos animales		Productos vegetales	
Carne y pescado	6,25	Trigo	
Gelatina	5,55	entero	5,83
Leche y productos lácteos	6,38	salvado	6,31
Caseína	6,40	embriones	5,80
Leche humana	6,37	endosperma	5,70
Huevos		Arroz y harina de arroz	5,95
enteros	6,25	Centeno y harina de centeno	5,83
albúmina	6,32	Cebada y harina de cebada	5,83
vitelina	6,12	Avena	5,83
		Mijo	6,31
		Maíz	6,25
		Frijoles	6,25
		Soja	5,71
		Nueces	
		almendras	5,18
		nueces del Brasil	5,46
		maníes	5,46
		otras	5,30

* (Cuando no se indica ningún factor específico, se debe utilizar el de 6,25 hasta que se haya determinado uno más apropiado).

Fuente: FAO/OMS, 1973.



Unidad de digestión y depurador de gases



Unidad de destilación

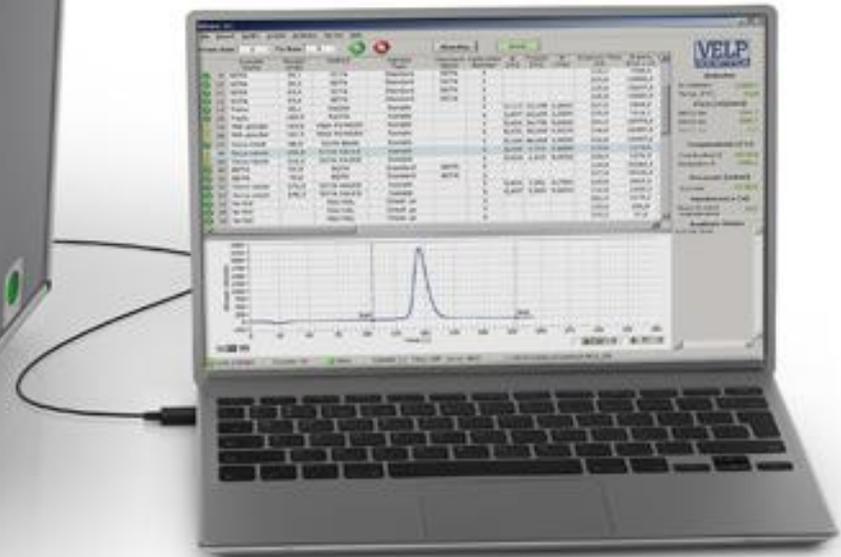
Método de Dumas (1826)

- Combustión seca de la muestra a 900 °C y en presencia de O₂
- Se libera CO₂ H₂O y N₂
- Los gases pasan por una columna para separar el N₂ controlando el eluato con un detector de conductividad térmica
- Requiere calibración con muestras de concentración de N₂ conocida
- Se usan factores para obtener el valor de proteína cruda

Ventajas y desventajas

- Fácil de usar y posibilidad de automatización
- Más rápido que el método de Kjeldahl
- No se utilizan reactivos tóxicos y corrosivos
- Alto costo
- Se detecta N no proteico
- Se requiere un factor por proteína (de acuerdo a secuencia aminoacídica)

Equipo de determinación de N₂ por el método de Dumas con estación de procesamiento de datos



Métodos basados en la interacción proteína-colorante

- Colorantes conteniendo grupos sulfónicos ácidos ($-\text{SO}_3\text{H}$) reaccionan con grupos funcionales de proteínas, especialmente básicos (arginina, lisina e histidina) y reducen el colorante en proporción a la cantidad de proteína presente
- La proteína se liga al colorante mediante interacciones iónicas, electrostáticas y de van der Waals
- La reacción es óptima en medio ácido fuerte y genera complejos solubles o insolubles
- La concentración de proteína se determina midiendo A de la solución del colorante antes y después de la adición de la muestra con proteína o por separación del complejo insoluble por centrifugación o filtración
- Colorantes de aplicación común en alimentos: Amido Black 10B, Coomassie Brilliant Blue G-250, Orange G y Acid Orange 12

Método de Bradford (1976)

- Colorante: Coomassie Brilliant Blue G-250
- Se produce un complejo poco soluble
- Proteína puede precipitarse a 0°C o mediante TCA

Método de Udy (1971)

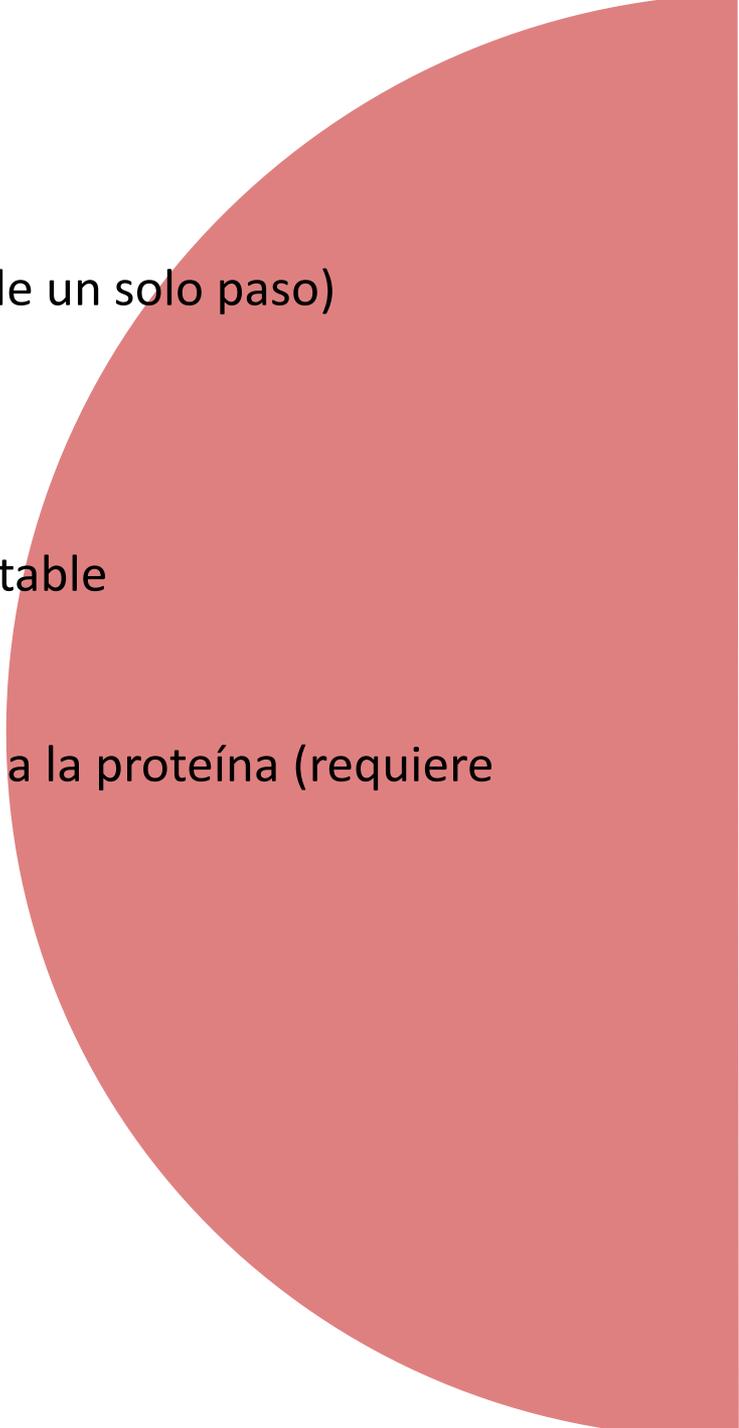
- Colorante: Acid Orange 12
- Se produce un precipitado proteína-colorante

Técnicas recomendadas para:

Proteínas de leche (Método AOAC 967.12)

Alimentos de bajo contenido proteico (cerveza, vino, jugos de frutas, etc.)

Ventajas y desventajas

- Métodos simples y rápidos (especialmente los de un solo paso)
 - Aptos para rutina
 - Muy sensibles y de bajo costo
 - El color se desarrolla en menos de 5 min y es estable
 - Pocas interferencias
 - Diferente afinidad de un colorante de acuerdo a la proteína (requiere calibración según tipo de proteína)
- 



LÍPIDOS

LÍPIDOS

Grupo de biomoléculas insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos no polares (hexano, éter etílico, cloroformo)

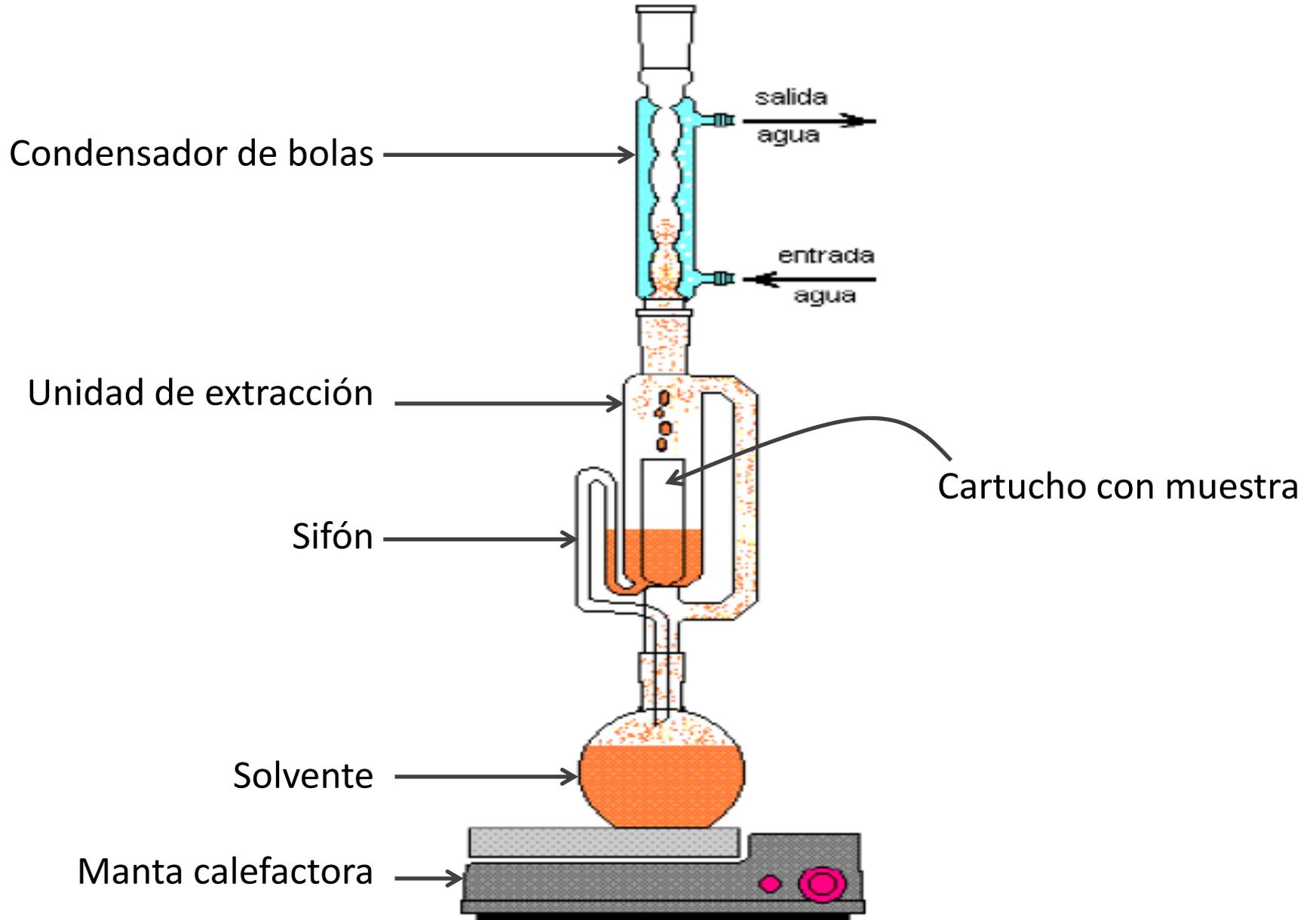
- Triglicéridos: principales componentes de grasas y aceites
- Otros lípidos comunes en alimentos: fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, carotenoides

MÉTODOS PARA DETERMINACIÓN DE GRASA TOTAL O BRUTA

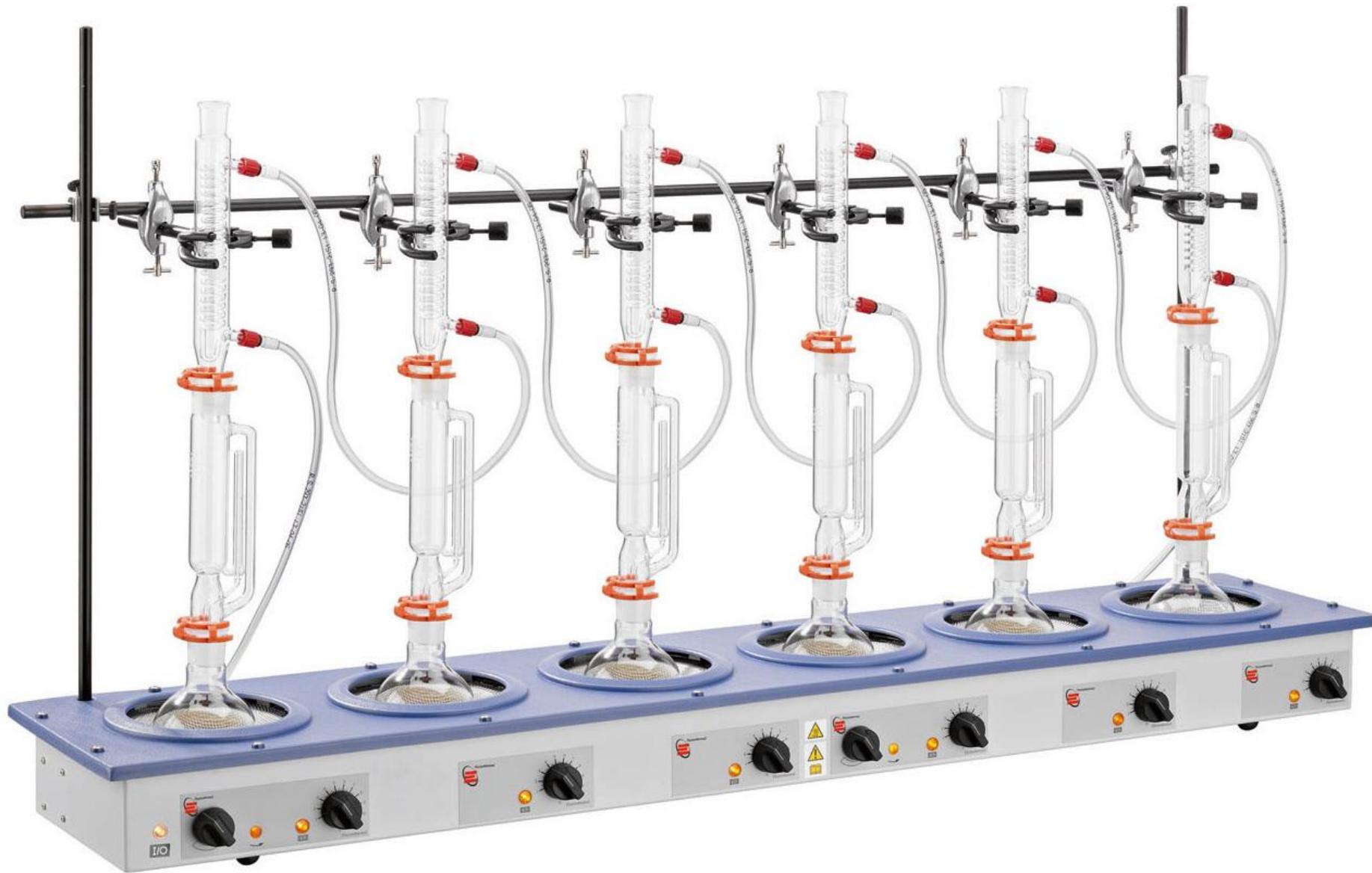
Método de extracción de Soxhlet (1939)

- Extracción semicontinua con solventes no polares como éter etílico o hexano
- Extrae con eficiencia lípidos no polares
- Poca eficiencia para fosfo y glicolípidos

EQUIPO DE EXTRACCIÓN SOXHLET



Batería de extractores Soxhlet



Método de Goldfish: extracción continua

Para extraer lípidos polares deben usarse otros solventes. Debe tenerse en cuenta el contenido de agua de la muestra

Método de Folch

- 1 g de muestra se extrae con 20 mL de una mezcla cloroformo:metanol, 2:1
- El agua de la muestra representa el tercer solvente de la mezcla monofásica
- Se agrega agua o solución salina
- Se obtienen en el equilibrio dos fases: inferior contiene lípidos

Método de Bligh y Dyer

- Desarrollado para pescado. Aplicable a numerosos tejidos animales y vegetales
- Usa cloroformo:metanol:agua endógena, 1:2:0,8
- Se agrega cloroformo: agua, 1:1 (monofase)
- Se obtienen en el equilibrio dos fases: inferior contiene lípidos

HIDRATOS DE CARBONO



CARBOHIDRATOS

Polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas en forma de monómeros, dímeros, oligómeros y polímeros de distinta complejidad estructural

Métodos para carbohidratos totales

Método fenol-sulfúrico (Dubois, 1956)

- Azúcares en presencia de ácidos fuertes y T se deshidratan dando derivados del furano que condensan con el fenol para dar productos coloreados
- Método fácil, rápido y eficaz
- Pueden determinarse todos los carbohidratos simples, oligo y polisacáridos (hidrolizan dando monosacáridos)
- La reacción no es estequiométrica y depende de estructura del azúcar
- Debe realizarse curva patrón

Análisis de Almidón

Extracción del almidón

Agua caliente: extrae la mayor parte de amilosa y dextrinas

CaCl_2 : para almidón de cereales

HClO_4 : se extrae almidón de muestra seca y se precipita como complejo de yodo. Luego se hidroliza y analiza la glucosa liberada

Etanol y HClO_4 : extracción de azúcares libres con etanol acuoso y luego almidón con HClO_4

DMSO: almidón se dispersa en este solvente y se convierte cuantitativamente en D-glucosa con α -amilasa termoestable y glucoamilasa

Cuantificación del almidón

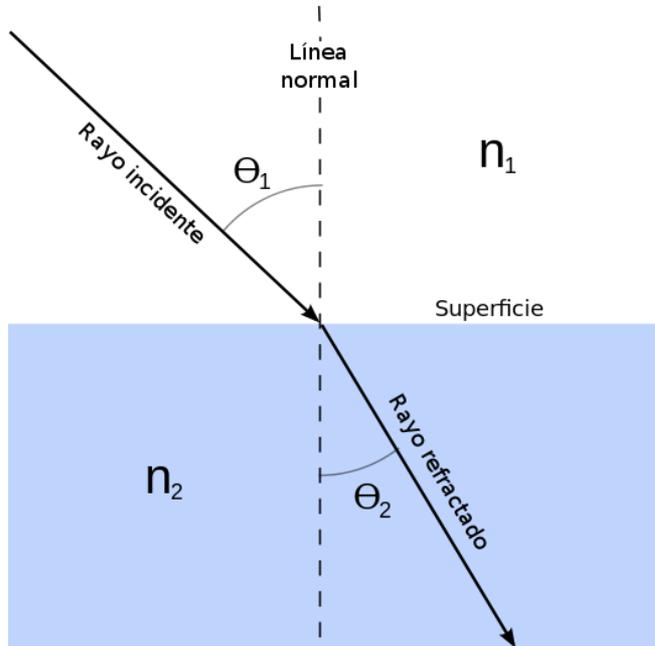
Hidrólisis directa con H_2SO_4 0,2 M durante 4 h en reflujo

Proteínas y ácidos grasos interfieren al dar productos de condensación

Reacción con yodo: amilosa forma un complejo de inclusión

ANÁLISIS DE AZÚCARES TOTALES EN SOLUCIÓN

Medición del índice de refracción



$$\text{Ley de Snell: } n_1 \text{ sen}\theta_1 = n_2 \text{ sen}\theta_2$$

n_1 : índice de refracción del primer medio

θ_1 : ángulo de incidencia

n_2 : índice de refracción del segundo medio

θ_2 : ángulo de refracción

- Varía con naturaleza del compuesto, T, long de onda de la luz y concentración del compuesto
- Se determinan sólidos totales en solución
- Para obtener la concentración de azúcar, los valores deben corregirse

Distintos métodos basados en poder reductor (ej. Fehling)



Refractómetro de Abbe
con sistema de control de T



Refractómetro
manual



FIBRA

ALIMENTARIA

FIBRA ALIMENTARIA

Fracción del alimento que no es digerido por las enzimas del tracto digestivo humano

Determinación de Fibra Cruda

(harinas, AOAC 920.86 y forrajes AOAC 962.09)

- Digestiones sucesivas de la muestra con ácido diluido y base en ebullición
- Corrección final por cenizas

Se pierde la fracción soluble en su totalidad

Se pierden cantidades variables de la fracción insoluble

Se determinan parcialmente lignina y celulosa

Valores obtenidos representan 10-40% y 50-90%, respectivamente, de valores verdaderos

Determinación de Fibra Alimentaria Total (FAT)

(Método enzimático-gravimétrico, AOAC 985.29, Prosky y col., 1988)

- Digestiones enzimáticas secuenciales de la muestra (solubilizan almidón y proteínas)
- Precipitación de la Fibra Alimentaria Soluble (FAS) con etanol 95% y filtración
- Residuo (*celulosa, hemicelulosas, lignina y pectinas*)
- Se realizan correcciones por proteínas residuales y cenizas
- Para determinar Fibra alimentaria Insoluble (FAI) y FAS se filtra digerido antes de agregar etanol

Residuo: FAI

Filtrado: se obtiene FAS por adición de etanol

MUESTRA

α-amilasa (pH 6.0, 30 min, 100 °C)

proteasa (pH 7.5, 30 min, 60 °C)

amiloglucosidasa (pH 4.5, 30 min, 60 °C)

- Precipitación con etanol 95 %
- Filtración sobre Celite

Sobrenadante

Residuo

- Lavado con etanol y acetona
- Secado a 105 °C
- Pesado
- Corrección de blanco, cenizas y proteínas

FAT

=

FAI

+

FAS

Filtración sobre Celite

Residuo

Sobrenadante

- Lavado con etanol y acetona
- Secado a 105 °C
- Pesado
- Corrección de blanco, cenizas y proteínas

- Precipitación con etanol 95 %
- Filtración sobre Celite
- Pesado del residuo
- Corrección de blanco, cenizas y proteínas

Consideraciones del método enzimático-gravimétrico

- Tratamientos enzimáticos a temperaturas muy diferentes de las fisiológicas
- Valores corresponden a alimentos secados, molidos y hervidos
- En la práctica no se consigue eliminar almidón completamente (altera FAI)
- Etanol pueden co-precipitar otros componentes del alimento
- Componentes de la fracción de FAS no precipitan
- Correcciones de cenizas y proteína poco significativas
- Método óptimo para cereales y alimentos ricos en almidón