

prácticas de:
INICIACIÓN A LA BROMATOLOGÍA
- protocolos de análisis químico -
(análisis químico de alimentos)



recopilación, adaptación y puesta a punto:

Francesc Fernández Borràs
profesor de Análisis i Química Industrial

prácticas de:
INICIACIÓN A LA BROMATOLOGÍA
(análisis químico de alimentos)

recopilación, adaptación puesta a punto:

Francesc Fernández Borràs
profesor de Análisis y Química Industrial

ÍNDICE

	código	Pág.
<i>Prólogo del autor</i>	--	4
<i>Tratamiento previo de las muestras</i>	1.1	5
<i>Preparación de disoluciones reactivas</i>	3.1	7
<i>Substancias volátiles a 100°C</i>	4.1	9
<i>Humedad por el método de disolventes</i>	4.2	11
<i>Proteína bruta</i>	5.1	13
<i>Caseína en la leche en polvo</i>	5.2	17
<i>Grasa bruta en muestras sólidas</i>	6.1	19
<i>Determinación de cenizas</i>	7.1	22
<i>Fibra bruta</i>	7.2	24
<i>pH del agua</i>	8.1	27
<i>Residuo seco en el agua</i>	8.2	29
<i>Dureza del agua</i>	8.3	31
<i>Alcalinidad del agua</i>	8.4	33
<i>Dióxido de carbono libre en el agua</i>	8.5	36
<i>Amonio en el agua</i>	8.6	38
<i>Determinación del calcio</i>	9.1	40
<i>Haluros en agua</i>	9.2	43
<i>Haluros no volátiles en alimentos sólidos</i>	9.3	45
<i>Identificación de plomo</i>	10.1	48
<i>Identificación de mercurio</i>	10.2	51
<i>de arsénico</i>	10.3	52
<i>Fósforo por espectrofotometría</i>	11.1	54
<i>Hierro en agua por espectrofotometría</i>	11.2	58
<i>Hierro en alimentos (espectrofotometría)</i>	11.3	61
<i>Sodio por fotometría de llama</i>	12.1	64
<i>Humedad por centrifugación (grasas)</i>	13.1	67
<i>Humedad por desecación (grasas)</i>	13.2	68
<i>Punto de fusión en grasas</i>	13.3	70
<i>Acidez en grasas</i>	13.4	72
<i>Residuo sólido en grasas</i>	13.5	74
<i>Índice de saponificación</i>	13.6	76
<i>Índice de yodo en grasas</i>	13.7	78
<i>Índice de peróxidos de una grasa</i>	13.8	80
<i>Insaponificable de una grasa</i>	13.9	82
<i>Ácidos oxidados en grasas</i>	13.10	84
<i>Identificación de almidón en cárnicos</i>	15.1	87
<i>Azúcares reductores</i>	15.2	88
<i>Azúcares totales</i>	15.3	92
<i>Determinación espectrofotométrica de almidón</i>	15.4	94
<i>Análisis organoléptico del vino</i>	16.1	97
<i>Título alcohométrico del vino</i>	16.2	99

	código	Pág.
<i>Acidez volátil del vino</i>	16.3	102
<i>Acidez total del vino</i>	16.4	105
<i>Extracto seco total del vino</i>	16.5	107
<i>Acidez total del vinagre</i>	16.6	109
<i>Grasa en leche</i>	17.1	111
<i>Fenolftaleína en la leche en polvo</i>	17.2	114
<i>Lactosa en la leche</i>	17.3	115
<i>Carotenos y xantofilas en el pimentón</i>	19.1	117
<i>Harina de pumas (microscopia)</i>	20.1	121
<i>Ácidos grasos por C.G.</i>	22.1	122
<i>Aminoácidos por C.G.</i>	22.2	126
<i>Apéndice I: Boletín de análisis</i>	--	132
<i>Apéndice II: Propuesta de trabajos</i>	--	134
<i>Bibliografía</i>	--	135

PRÓLOGO DEL AUTOR

De entrada, pido disculpas por adjudicarme el título de autor, pues no soy el creador de los métodos descritos; únicamente me he limitado a hacer una recopilación de métodos clásicos de análisis y solo en algunos casos he hecho alguna pequeña adaptación o modificación.

Los protocolos de análisis descritos corresponden a las prácticas de los cursos de análisis químico de alimentos subvencionados por el CECOT y el Fondo Social Europeo, que se realizaron en el IPFP de Terrassa. Dichas prácticas están orientadas a:

- Selección de prácticas para ciclos profesionales de Grado Medio y Superior de Química.
- Selección de prácticas para estudiantes universitarios de Química Analítica, Veterinaria, Farmacia o Agricultura, y estudios de postgrado o masteres de estas especialidades.
- Consulta para profesionales de estas especialidades que trabajen en el campo del análisis químico de alimentos.

Espero que esta obra les sea de utilidad. Un cordial saludo:

El Autor

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 1.1
TRATAMIENTO PREVIO DE LAS MUESTRAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

La práctica tiene por objeto el tratamiento previo de las muestras con el objeto de dejarlas en condiciones que faciliten su ulterior análisis.

Las muestras a analizar deben estar homogeneizadas, a fin de que sean representativas del conjunto de la población a la que pertenecen. Si se trata de muestras sólidas deberán estar reducidas a estado pulverulento o de harina (molturadas), por tal de facilitar su ataque por los diversos agentes químicos. La molturación implica una mejor homogeneización (representatividad) de la muestra, especialmente en aquellos casos, relativamente frecuentes, en que se precisa trabajar con poca cantidad de sustancia problema.

En muestras líquidas suele ser suficiente con una buena agitación mecánica.

En esta práctica se describe el tratamiento previo para una muestra sólida, obviando el paso inicial de la toma de la misma.

El procedimiento seguido es apropiado para preparados alimentarios granulados y en polvo grosero, piensos, cereales en grano, legumbres secas, turtós, harinas de carne y de pescado y en general para todas aquellas substancias de características similares a las de los productos mencionados.

MATERIAL

Trapo de algodón.

Espátula grande.

Estufa de desecación

Hoja grande de papel (aproximadamente DIN A2).

Molinillo de laboratorio (aunque puede servir un molinillo doméstico de café).

Pincel.

REACTIVOS

Agua corriente.

Agua destilada.

Alcohol etílico PA.

METODOLOGÍA

- 1.- Extender la muestra en un montón sobre la hoja de papel.
- 2.- Con la espátula, dividir el montón en cuatro cuadrantes aproximadamente iguales.
- 3.- Construir otro montón con dos cuadrantes opuestos, rechazando los otros dos.

4.- Proceder sucesivamente del modo mencionado hasta obtener un montón de un tamaño apropiado para ser contenido en los frascos de guardar las muestras (tener en cuenta que los frascos deben ocuparse hasta sus 2/3 de capacidad) y guardar en dichos frascos.

5.- Tomar una cantidad apropiada para el molino y molturar hasta reducir a harina, agitando simultáneamente el molino para evitar centrifugaciones selectivas y apelmazamientos del material. Guardar la muestra molturada en los frascos para muestra molturada.

6.- Antes y después de la molturación, limpiar el interior del molinillo con el pincel y, si es preciso, con un trapo limpio humedecido con agua y alcohol. El pincel debe limpiarse posteriormente con agua y alcohol y secarse en estufa.

CÁLCULOS

No es preciso ningún tipo de cálculo en la realización de esta práctica.

OBSERVACIONES

La molturación de aquellas muestras que precisen de un tiempo prolongado de uso del molino, se efectuará en varias etapas, intercalando períodos de descanso, a fin de evitar recalentamientos.

Las muestras con alto contenido graso deben molturarse en sucesivos y breves períodos, con agitación manual continuada del molino, a fin de evitar la formación de grumos.

Las muestras con alto contenido de humedad suelen presentar dificultades en su molturación; en este caso procederemos previamente a una desecación de la muestra (es preciso determinar simultáneamente su contenido de humedad).

Si el secado de las muestras con alto contenido de humedad presentase algún inconveniente (como podrían ser la variación o alteración de sus componentes, etc...), se podría proceder a la licuación de la muestra (en muchos casos puede servir una licuadora doméstica convencional); en este caso debe prestarse especial atención en el proceso de trasvase de la licuadora al frasco de muestra para que no haya pérdida de representatividad durante el proceso.

Cuestionario 1.1.- Tratamiento previo de las muestras

1.- ¿Qué precauciones deberemos considerar en el uso de un molinillo corriente de café para molturar las muestras?

2.- Describir detalladamente la metodología a seguir para la preparación previa de las siguientes muestras:

trigo

chicharrones

pastillas de caldo concentrado

lechuga (para análisis que incluye determinación de sustancias que se descomponen con el calor)

3.- Describir la preparación de la siguiente muestra:

Muestra: Caramelo relleno de composición muy heterogénea, de unos 10 gramos de peso (para determinación de azúcares reductores).

Iniciación a la bromatología (prácticas)

Protocolos de análisis

Ref: 3.1

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES REACTIVAS**OBJETIVO Y FUNDAMENTOS**

Se trata de establecer un procedimiento general para preparar disoluciones reactivas.

MATERIAL

Agitadores magnéticos.
Balanza analítica.
Balanza granataria.
Desecador.
Embudos.
Estufa de desecación.
Filtros de papel, rápidos.
Frascos de polietileno de 1 litro, con tapón roscado.
Matraces aforados de diferentes volúmenes.
Papel de filtro.
Pesasubstancias.
Pipetas aforadas de diferentes volúmenes.
Placas calefactoras.
Varillas.
Vasos de precipitados de diferentes volúmenes.

REACTIVOS

(Además de las propias sustancias reactivas)
Ácido clorhídrico concentrado PA.
Agua destilada.
Amoníaco concentrado PA.

METODOLOGÍA

La metodología adecuada varía según las características de cada disolución reactiva a preparar.

CÁLCULOS

Partiremos del criterio de tener los datos de la concentración de la disolución que pretendemos preparar en gramos/litro. Para pasar de normalidad a gramos/litro aplicamos la expresión:

$$c = N \cdot p_e$$

en que **c** es la concentración en gramos/litro, **N** la normalidad y **pe** el peso equivalente.
La cantidad que debe pesarse para preparar un volumen **v** de disolución de concentración **c**, es:

$$m = c \cdot v$$

Si la cantidad resultara demasiado pequeña, podemos pesar una cantidad mayor y rediluir posteriormente.

Para preparar una disolución diluida a partir de otra más concentrada, el volumen que se debe tomar de disolución concentrada es:

$$V_c = \frac{V_d \cdot C_d}{C_c}$$

donde **V_c** es la cantidad que debe tomarse de disolución concentrada, **V_d** el volumen de disolución diluida a preparar, **C_d** su concentración (en gramos/litro, molaridad o normalidad) i **C_c** la concentración de la disolución concentrada (en gramos/litro, molaridad o normalidad).

OBSERVACIONES

Deben seguirse siempre las precauciones de uso inherentes a cada producto.

Cuestionario 3.1. - Preparación de disoluciones reactivas

1.- Definir los siguientes conceptos:

- a) reactivo pa
- b) reactivo sv
- c) material volumétrico clase A
- d) material volumétrico clase B
- e) volumen por contenido
- f) volumen por vertido
- g) reactivo pr
- h) solución extemporánea

2.- Precauciones en la preparación y conservación de reactivos de las siguientes características:

- a) disoluciones de reactivos muy corrosivos
- b) disoluciones de reactivos reductores
- c) disoluciones de reactivos oxidantes
- d) disoluciones muy inestables

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 4.1
SUBSTÁNCIAS VOLÁTILES A 105 °C		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se trata de una gravimetría por volatilización. En la mayoría de las muestras, casi toda la materia volátil es agua, por lo cual al método también se le denomina "determinación de humedad por desecación en estufa".

El método es aplicable a todas las sustancias que no presentes caramelización o cualquier tipo de descomposición o volatilización a la temperatura de 105 °C .

MATERIAL

Balanza analítica.
Estufa de desecación.
Desecador.
Pesasubstancias.

REACTIVOS

Agente desecante (gel de sílice u otros).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar una cantidad de sustancia de entre 5 y 20 gramos en un pesasubstancias tarado y completamente seco (guardado en desecador).
- 2.- Pasar el pesasubstancias con la muestra a la estufa con una temperatura no inferior a 105°C y no superior a 110°C durante 2 horas.
- 3.- Sacar el pesasubstancias con la muestra de la estufa y pasar a un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- 4.- Pesar.
- 5.- Repetir sucesivamente desde el punto 2, pero con tiempo de permanencia en la estufa de $\frac{1}{2}$ hora, hasta peso constante.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "humedad y materias volátiles a 105°C":

$$\% = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

en donde:

m_1 = peso inicial de pesasubstancias + muestra.

m_2 = peso de pesasubstancias + muestra al alcanzar constancia de peso.

m_0 = peso del pesasubstancias.

% = % de humedad y materias volátiles a 105°C

OBSERVACIONES

Para aquellas muestras que puedan presentar proyecciones de material, con la consecuente pérdida, deberán mezclárseles una cantidad de arena lavada y tarada.

Cuestionario 4.1. - Substancias volátiles a 105°C

1.- Confeccionar una lista de agentes desecantes, indicando sus campos de aplicación y sus ventajas e inconvenientes.

2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en el apartado "cálculos" .

3.- Explicar, elaborando el protocolo de análisis, el procedimiento a seguir para muestras que puedan presentar proyección de material a 105°C (y sin utilizar arena).

4.- ¿Son las siguientes sustancias aptas para su determinación de humedad y materias volátiles a 105°C? (indicar "apta", "con arena" y "no apta"):

- a) arroz
- b) manteca de cerdo
- c) azúcar
- d) mezcla de aminoácidos
- e) pienso para gallinas

5.- Sugerir un método alternativo para las sustancias del apartado anterior clasificadas como "no apta".

6.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 4.2
HUMEDAD POR EL MÉTODO DE LOS DISOLVENTES		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El método determina la cantidad total de agua no combinada; está especialmente indicado para grasas i sustancias semilíquidas. El agua de la muestra se destila mediante arrastre con xilol y se mide su volumen mediante su recogida sobre en un tubo graduado.

MATERIAL

Aparato especial que consta de un tubo cilíndrico, graduado en ml y provisto de llave de purga en su extremo inferior, con boca esmerilada en la parte superior que conecta con un refrigerante de reflujo y un tubo entre el cuello y el cilindro graduado que comunica con un tubo paralelo a este (ver esquema).

Balanza analítica.

Manta calefactora.

Matraz de cuello corto, esmerilado, de 500 ml.

Refrigerante de reflujo.

REACTIVOS

Piedra pómez.

Xileno.

METODOLOGÍA

Asegurar la total limpieza del montaje, en especial del interior del tubo graduado. Si es preciso, proceder a un prelavado con mezcla crómica antes del lavado con agua destilada y acetona. Secar.

1.- Pesar alrededor de 25 gramos de muestra, en el matraz.

2.- Añadir de 150 a 200 ml de xileno y unos trozos de porcelana porosa o de piedra pómez.

3.- Montar el utillaje y proceder a destilar hasta que el xileno separado se vea "limpio" y no arrastre más agua.

4.- Dejar reposar hasta perfecta separación de les capas de xileno (superior) y agua (inferior).

Leer el volumen de agua.

CÁLCULOS

Calcular el contenido de agua expresado en porcentaje:

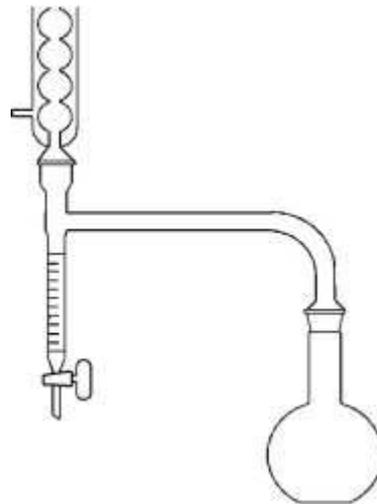
$$\text{Agua (\%)} = \frac{100 \cdot V}{m}$$

en donde **V** es el volumen recogido de agua en cc, leído en el tubo graduado, y **m** el peso de la muestra en gramos.

OBSERVACIONES

Es preciso tener en consideración que no deben quedar gotas de agua adheridas a la pared del tubo, ni gotas de disolvente en la fase acuosa.

ESQUEMA DEL MONTAJE:



Cuestionario 4.2. - Humedad por el método de los disolventes

- 1.- Relacionar 10 sustancias con las que resulte especialmente indicado el procedimiento de esta práctica.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en el apartado de "cálculos".
- 3.- ¿Cual es la función de la piedra pómez (o de la porcelana porosa)?
- 4.- ¿Por qué escogemos xileno como disolvente?
- 5.- ¿Qué otros disolventes podríamos utilizar, además del xileno?
- 6.- ¿Porqué en esta práctica, el resultado se expresa como "humedad" y en la anterior como "humedad y materias volátiles"?
- 7.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

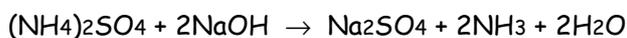
Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 5.1
PROTEÍNA BRUTA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El método que aquí se describe es el llamado método de Kjeldhal.

Entendemos por proteína bruta el nitrógeno total de la muestra expresado como proteína. El método no es apto para aquellas sustancias que presentan enlaces N-N, NO i NO₂.

Se somete la muestra a un ataque con ácido sulfúrico concentrado, durante el cual el nitrógeno pasa a forma amoniacal (como sulfato amónico); el amonio del sulfato amónico pasa a amoníaco libre por tratamiento con hidróxido de sodio:



y el amoníaco así formado se separa mediante destilación y se recoge sobre una cantidad exactamente conocida de disolución ácida titulada. El amoníaco formado se determina mediante valoración del exceso de ácido titulado.

MATERIAL

Aparato semimicro Kjeldhal según esquema adjunto.

Balanza analítica.

Batería digestora de mantas eléctricas.

Bureta de 25 ml.

Campana-vitrina extractora.

Frasco lavador.

Matraz erlenmeyer de 100 ml o de 250 ml.

Matraz Kjeldhal forma pera de cuello largo de 100 ml.

Pipeta de 25 ml

Pipeta de 5 ml.

Probeta de 25 ml.

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 0'1 N, titulado.

Ácido sulfúrico concentrado.

Agua destilada.

Disolución de hidróxido de sodio 50% p/v.

Indicador mixto Shiro-Thasiro.

Mezcla catalítica .

Papel de fumar.

Preparación de reactivos:

INDICADOR MIXTO.- Mezclar dos partes de solución de rojo de metilo al 0'2 % con una parte de azul de metilo al 0'2 %, y dos de alcohol etílico del 96. Guardar en frasco tapado. Viraje: rojo violáceo a verde-gris.

SOLUCIÓN DE SOSA AL 50 % P/V .- Disolver 500 gramos de NaOH i 50 gramos de tiosulfato de sodio en agua hasta 1 litro, agitando continuamente y enfriando simultáneamente el recipiente en baño de agua fría, con cuidado de no salpicar.

MEZCLA CATALÍTICA.- Mezclar y homogeneizar 150 gramos de sulfato de potasio pa, 4 gramos de óxido cúprico pa y 12 gramos de sulfato cúprico cristalizado pa. Molturar hasta reducir a polvo fino y homogeneizar de nuevo.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar, en papel de fumar, al cual se le habrá eliminado la parte engomada, una cantidad de muestra molturada y homogeneizada que contenga entre 100 y 120 miligramos de proteína bruta.
- 2.- Pasar la muestra, envuelta en el papel de fumar, al interior del matraz Kjeldhal.
- 3.- Añadir alrededor de 2'5 gramos de mezcla catalítica y 6 ml de ácido sulfúrico concentrado . Tapar el matraz con un embudo pequeño.
- 4.- Calentar la muestra con la batería calefactora en vitrina-campana y poner en marcha el extractor; el calentamiento será suave durante los 5 primeros minutos y fuerte a continuación. Continuar el calentamiento hasta que el líquido sea de color verde-azul claro y totalmente transparente. El tiempo de digestión varía según el tipo de muestra (alrededor de $\frac{3}{4}$ de hora).
- 5.- Enfriar, y cuando el líquido esté frío, añadir entre 5 y 10 ml de agua destilada, lavando el cuello del matraz.
- 6.- Pasar el líquido al destilador, lavando el matraz tres o cuatro veces con pequeñas cantidades de agua destilada.
- 7.- Con todas las llaves del aparato cerradas, añadir de 20 a 25 ml de disolución de sosa; pasar al cuerpo del destilador dejando una pequeña cantidad en el embudo que actuará como cierre hidráulico.
- 8.- Lavar el embudo con agua destilada, dejando pasar todo el líquido de lavado, excepto una pequeña porción que actúa de cierre hidráulico.
- 9.- Destilar y recoger el amoníaco en un erlenmeyer de 100 ml, sobre 25 ml de HCl 0'1 N titulado, con unas gotas del indicador mixto.
- 10.- Después de recoger unos 40-50 ml de destilado, comprobar que ya no destila amoníaco, mediante una tira de papel indicador.
- 11.- Valorar el exceso de ácido titulado con disolución titulada de NaOH 0'1 N.
- 12.- Periódicamente, efectuar un blanco con papel de fumar del tipo empleado en las determinaciones. El volumen correspondiente de ácido titulado empleado se considera consumido como blanco. Es preciso que el papel de fumar sea siempre de l misma marca y tipo; en caso contrario, deberá efectuarse una comprobación en blanco.
- 13.- Una vez finalizado el proceso, deberá procederse a la limpieza del aparato , procediendo al efecto de la siguiente forma: continuando el paso de vapor y con las laves cerradas, llenar con agua destilada el embudo; el extremo del refrigerante se sumerge en unos 100 ml de agua destilada. Se interrumpe la producción de vapor y se abre ligeramente la llave del embudo, cerrándola antes que toda el agua pase al interior del aparato. La reducción de presión succiona el agua del vaso al interior del aparato, lavándolo. La llave del tubo de purga se abre a continuación a

fin de vaciar el líquido recogido en la camisa exterior. Se repite el proceso volviendo a permitir la producción de vapor.

CÁLCULOS

Para expresar el resultado como contenido en nitrógeno:

$$\%N = \frac{(V \cdot N - V' \cdot N') \cdot 14}{m} \cdot 100$$

en donde:

% N = Contenido de nitrógeno de la muestra, expresado en %

V = Volumen, en ml del ácido titulado

N = Normalidad del ácido titulado.

V' = Volumen de base titulada empleado en la valoración.

N' = Normalidad de la base empleada en la valoración.

m = masa pesada de muestra, en miligramos.

si la normalidad de la base = normalidad del ácido = 0'1000 N y el volumen del ácido es de 25 ml, la expresión anterior quedará de la forma:

$$\%N = \frac{(25 - V') \cdot 14}{m} \cdot 100$$

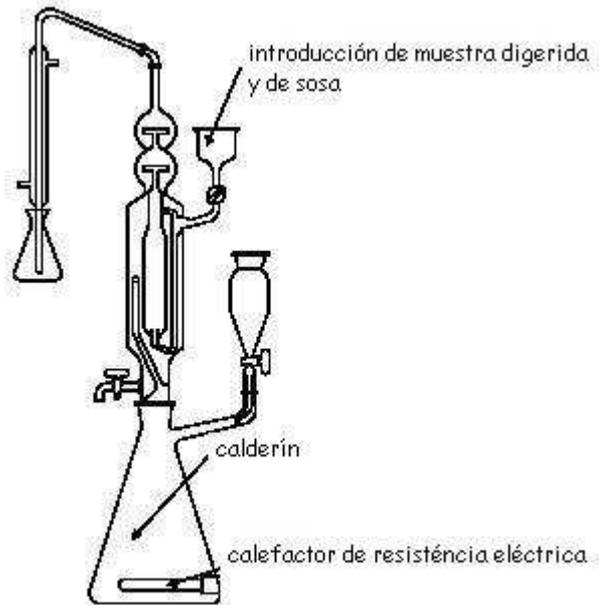
para expresar el resultado en contenido de proteína bruta, debe multiplicarse el contenido de nitrógeno por un factor que depende del tipo de muestra y que, en general, tiene un valor que oscila alrededor de 6'25.

OBSERVACIONES

Hay otros tipos de mezclas catalíticas (las más empleadas, además de la mencionada en esta práctica, son a base de selenio o de mercurio). El objetivo de las mezclas catalíticas es el de reducir el tiempo de digestión, que de no usarse mezcla catalítica, se prolongaría durante varias horas. Debe tenerse en consideración que la mayoría de las mezclas catalíticas son tóxicas y hay que tomar las precauciones de no respirar sus vapores y evitar el contacto con la piel.

Para la dosificación de la mezcla catalítica, podemos hacer una estimación experimental del volumen aproximado del peso indicado (2'5 gramos en este caso) y así evitarnos el pesarla cada vez que procedamos a un análisis.

Aparato Kjeldhal semimicro para determinación de nitrógeno:



Cuestionario 5.1.- Determinación de la proteína bruta

- 1.- Escribir las reacciones que tienen lugar en el curso de la práctica.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Calcular el factor de conversión de nitrógeno a proteína para una muestra de un pequeño péptido formado por la siguiente secuencia de aminoácidos:
glicina-alanina-glicina-glicina
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 5.2
CASEÍNA EN LA LECHE EN POLVO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El procedimiento se basa en disolver la leche en polvo en agua tibia y precipitar la caseína en su punto isoeléctrico. Se aísla la caseína pura eliminando el suero y las impurezas por lavado y se determina el nivel proteico del precipitado, restando el blanco correspondiente. El método es aplicable a leche en polvo descremada, semidescremada i completa.

MATERIAL

Montaje completo para la determinación de la proteína bruta y, además:

Balanza analítica.

Baño de agua con termostato a 40°C.

Centrífuga con capacidad para 4.000 rpm.

Embudo cónico.

Frasco lavador.

Papel de filtro Albet 240 o similar.

Pipeta aforada de 20 ml.

Pipetas aforadas de 5 ml (2).

Placa calefactora.

Varilla de vidrio.

Vaso de precipitados de 100 ml.

Vasos de precipitados de 250 ml (2).

REACTIVOS

Reactivos necesarios para la determinación de la proteína bruta y, además:

Ácido acético al 10 % (Llevar 100 ml de ácido acético glacial hasta 1000 ml).

Acetato de sodio 1 M (Pesar 20'5 gramos de acetato de sodio pa i disolver hasta 250 ml.).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar 2 gramos de muestra en un vaso de pp de 100 ml y disolver en 40 ml de agua destilada calentada a 40-45°C.
- 2.- Centrifugar a 4000 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Tomar 20 ml de disolución, transferir a un vaso de 100 ml calentar en baño de agua a 40°C durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 5 ml de ácido acético al 10% y dejar precipitar durante 10 minutos.
- 5.- Agregar 5 ml de disolución de acetato de sodio y esperar 10 minutos.
- 6.- Filtrar sobre papel de filtro y lavar con agua destilada hasta conseguir una cuajada de caseína

pura.

7.- Determinar el contenido en nitrógeno del precipitado, según el método de Kjeldhal.

CÁLCULOS

El factor de conversión de nitrógeno a proteína para la caseína pura es de 6'38:

$$\text{Caseína(\%)} = N \cdot 6'38$$

siendo N el % de nitrógeno (ver práctica 5.1).

Cuestionario 5.2.- Caseína en la leche en polvo

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- ¿Cuál es la función del ácido acético y del acetato de sodio en el procedimiento de esta práctica?
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 6.1
GRASA BRUTA EN MUESTRAS SÓLIDAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El objeto de esta práctica consiste en la determinación de sustancias solubles en éter (la mayor parte del extracto soluble en éter está constituido por grasas), mediante extracción continua con un aparato de Soxhelt

Tradicional y normativamente, esta extracción se efectúa con éter etílico, pero está comprobado empíricamente que los resultados obtenidos con éter de petróleo PA son casi igual de exactos e incluso algo más reproducibles. La ventaja del uso del éter de petróleo está en la disminución del peligro de inflamación y sobre todo, en la disminución del peligro de explosión.

MATERIAL

Balanza analítica.

Bomba de vacío con equipo de protección ó trompa de vacío.

Estufa de desecación.

Evaporador rotatorio con baño termostático.

Extractor tipo Soxhelt.

Placa calefactora.

Tubo de ensayo de 2 cm de diámetro.

REACTIVOS

Algodón desengrasado.

Éter de petróleo, calidad para análisis.

Papel de filtro.

METODOLOGÍA

- 1.- Preparar un cartucho cilíndrico de papel de filtro, ayudándose del tubo de ensayo como molde y rellenar interiormente la base del cartucho con un poco de algodón desengrasado, presionándolo.
- 2.- Pesar unos 5 gramos de muestra y introducirla en el interior del cartucho. Poner un tapón de algodón desengrasado, ejerciendo una presión ligera y cerrar el cartucho.
- 3.- Pesar, estando completamente seco, el matraz del extractor Soxhelt.
- 4.- Montar el equipo extractor y llenar el cuerpo central con éter hasta que sea succionado al matraz; añadir un poco más de éter al matraz.
- 5.- Introducir el cartucho preparado con la muestra en el cuerpo central.
- 6.- Proceder a la extracción, conectando el refrigerante poniendo en marcha la placa calefactora. Es suficiente con 15-20 ciclos; en todo caso, durante las últimas extracciones el éter del cuerpo

central estará completamente incoloro.

7.- Antes de empezar la última succión, desconectar la placa calefactora, sacar el matraz y substituirlo rápidamente por otro.

8.- Eliminar el éter por destilación en evaporador rotatorio al vacío y introducir el matraz con el residuo en la estufa de desecación a 105°C durante 1 hora. Enfriar en desecador i pesar. Comprobar la pesada a intervalos de desecación de 20 minutos hasta peso constante.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "contenido en gasa bruta, por el método de extracción continua sin hidrólisis previa":

$$\% \text{ grasa bruta} = \frac{m' - m''}{m} \cdot 100$$

en donde:

m' = peso del matraz con el residuo.

m'' = peso del matraz sin el residuo.

m = peso de la muestra.

OBSERVACIONES

Caso de efectuar el vacío con bomba, deberá protegerse esta con el equipo de protección adecuado..

El cartucho debe estar correctamente construido a fin de evitar pérdidas de muestra durante el proceso de extracción, que serian arrastradas al matraz, dando consecuentemente un error por exceso en el resultado del análisis.

EXTRACTOR SOXHELT:



Cuestionario 5.3. - Grasa bruta de muestras sólidas

- 1.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en el apartado "cálculos".
- 2.- Redactar el apartado de "metodología", para el caso de que no dispusiéramos de evaporador rotatorio (sugerencia: observar el funcionamiento i diseño del aparato extractor Soxhelt).
- 3.- Sugerir alguna variante en el diseño del aparato Soxhelt que facilite el trabajo en caso supuesto de la cuestión 2.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 7.1
DETERMINACIÓN DE CENIZAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Determinación de cenizas por incineración. El contenido de cenizas da una idea del contenido total de minerales en la muestra.

MATERIAL

Balanza analítica.
Quemador (mechero) de Bunsen.
Desecador.
Estufa de desecación.
Horno eléctrico con regulación de temperatura.
Crisol de cerámica para cenizas.
Triángulo de cerámica.
Vitrina extractora.

REACTIVOS

Agua oxigenada aprox. de 30 volúmenes (si se necesita).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar alrededor de 5 gramos de muestra (excepto si se trata de productos voluminosos o que tengan tendencia a aumentar de volumen al quemarse), en un crisol previamente calcinado y tarado.
- 2.- Incinerar la muestra con el quemador Bunsen, colocando el crisol en posición inclinada sobre el triángulo, hasta desaparición de los humos (trabajar en vitrina-extractora).
- 3.- Introducir el crisol con la muestra en el interior de un horno a 550°C hasta obtención de cenizas blancas, gris claro o gris-rojo.
- 4.- Enfriar en desecador.
- 5.- Pesar rápidamente.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "porcentaje de ceniza bruta sobre la materia natural":

$$\% \text{ cenizas} = \frac{m' - m''}{m - m''} \cdot 100$$

en donde:

m' = peso del crisol con las cenizas.

m'' = peso del crisol .

m = peso del crisol con la muestra.

OBSERVACIONES

Si se sospecha, por el color de las cenizas, que la calcinación no es total, después de enfriar añadir unas gotas de agua oxigenada, introducir unos minutos en estufa a 105°C y después $\frac{1}{4}$ de hora en el horno a 550°C.

Cuestionario 7.1 .- Determinación de cenizas

- 1.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Describir un método para determinar las cenizas de una muestra líquida.
- 4.- ¿Por qué deben pesarse rápidamente las cenizas?
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 7.2
DETERMINACIÓN DE LA FIBRA BRUTA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Determinación de la fibra bruta, mediante separación del resto de componentes por disgregación hidrolítica y filtración.

MATERIAL

Alargadera para crisol de 30 mm.
Balanza analítica.
Estufa de desecación.
Frasco lavador.
Horno de mufla con termostato.
Crisol con placa filtrante del nro 2, de 30 mm.
Manta calefactora para balones de 1 litro.
Manchón de caucho para crisol de 30 mm.
Matraz forma balón de 1 litro.
Matraz Kitasato de 2 litros y boca de 30 mm.
Refrigerante de reflujo.
Tapón de caucho, taladrado, de 30 mm.
Trompa de vacío.
Varilla policia.
Vaso de pp de 50 ml.

REACTIVOS

Acetona RA.
Ácido sulfúrico aprox. 0'26 N.
Agua destilada.
Hidróxido de potasio aprox. 0'23 N.
Papel indicador
Silicona antiespumante.

Preparación de los reactivos

ÁCIDO SULFÚRICO APROX 0'26 N.- En un vaso de pp de 250 ml, con 100 ml de agua destilada, añadir, despacio y con agitación suave y continuada, 14'5 ml de ácido sulfúrico ra del 96 %; dejar enfriar y transferir a matraz aforado de 2 litros: completar con agua destilada hasta enrase y homogeneizar. Transferir a dos frascos de 1 litro con tapón hermético.

HIDRÓXIDO POTÁSICO APROX 0'23 N.- En un granatario, pesar rápidamente 30'5 gramos de hidróxido de potasio ra del 85 %. Transferir a un vaso de pp de 500 ml con 250 ml de agua

destilada y agitar hasta disolución completa. Si el calentamiento producido fuera excesivo, esperar a que se enfríe antes de continuar. Filtrar al vacío sobre placa filtrante y pasar el filtrado a un matraz aforado de 2 l. Homogeneizar. Transferir a 2 frascos de polietileno de 1 l con tapón hermético.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar unos 3 gramos de muestra y transferir al balón de 1 l con ayuda de una pequeña cantidad de agua destilada.
- 2.- Añadir 250 ml de ácido sulfúrico 0'26N y unas gotas de antiespumante. Llevar a ebullición en manta calefactora.
- 3.- Conectar el refrigerante de reflujo y mantener la ebullición durante 30 minutos, agitando de vez en cuando el matraz para evitar adherencias de material a las paredes del recipiente.
- 4.- Desconectar la manta calefactora y añadir unos 50 ml de agua destilada, por la cabeza del refrigerante para detener la ebullición. Desconectar el refrigerante.
- 5.- Filtrar, con vacío muy suave, sobre placa filtrante calcinada a 550°C, lavando el residuo varias veces con agua muy caliente
- 6.- Transferir el residuo arrastrado al interior del crisol filtrante, de nuevo al interior del matraz, ayudándonos con pequeñas cantidades de agua destilada y con la varilla policia.
- 7.- Añadir 250 ml de hidróxido de potasio 0'23N y unas gotas de antiespumante. Llevar a ebullición y proceder a continuación como en los puntos 3, 4 y 5.
- 8.- Transferir cuantitativamente el residuo del interior del matraz al interior del crisol filtrante, arrastrando con agua muy caliente.
- 9.- Continuar los lavados del crisol filtrante con agua caliente hasta la neutralización del líquido filtrado (comprobar con papel indicador).
- 10.- Lavar 3 veces con acetona ra.
- 11.- Secar el crisol filtrante en estufa de desecación a 110°C y enfriar en desecador. Pesar y repetir este punto hasta peso constante.
- 12.- Introducir 1 hora en el horno a 500°C. Enfriar en desecador y pesar.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en "porcentaje de fibra bruta sobre muestra total":

$$\%(\text{fibra bruta}) = \frac{m' - m''}{m} \cdot 100$$

en donde:

m = peso de la muestra.

m' = peso del crisol con el residuo.

m'' = peso del crisol con el residuo calcinado.

OBSERVACIONES

Los recipientes calientes deben manipularse con guantes de amianto o pinzas para matraces recubiertas de amianto.

Cuestionario 7.2. - Determinación de la fibra bruta

- 1.- La placa filtrante debe estar previamente calcinada a 550°C y posteriormente debe trabajarse calcinando la placa con la muestra a 500°C (50°C menos). Porqué?
- 2.- Cuando la placa filtrante ha sido usada para 6 ó 7 determinaciones de fibra bruta, es rechazada . Porqué?
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 8.1
pH DEL AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Determinación potenciométrica del pH del agua con un pHmetro equipado con electrodo de vidrio.

MATERIAL

Electrodo combinado de vidrio específico para determinaciones de pH.

Frasco lavador.

pHmetro.

Vasos de pp de 50 ml (3).

REACTIVOS

Agua destilada.

Disolución amortiguadora estándar de pH=4'00.

Disolución amortiguadora estándar de pH=7'00.

Disolución de KCl 3M

METODOLOGÍA

1.- Conexión:

1.1.- Conectar el aparato a la red eléctrica.

1.2.- Conectar el electrodo combinado a la base coaxial .

1.3.- Con el selector en posición 0, accionar el interruptor.

2.- Calibración (una vez al día, antes de empezar las sesiones de trabajo):

2.1.- Situar el selector "temperatura" en el valor correspondiente a la temperatura de las disoluciones amortiguadoras estándar (suministradas con el aparato).

2.2.- Lavar el electrodo con agua destilada y secar con un pañuelo de papel, con precaución de no rayarlo (al electrodo).

2.3.- Sumergir el electrodo en la disolución amortiguadora de pH=7 y esperar que se equilibre.

2.4.- Situar el selector en posición de pH. La lectura se estabiliza en unos 30 segundos.

2.5.- Accionar el cursor de calibración hasta obtener la indicación 7'00 estabilizada; volver a situar el selector en la posición cero.

2.6.- Retirar el electrodo, lavar con agua destilada y secar con cuidado.

2.7.- Sumergir el electrodo en otro vaso con disolución amortiguadora estándar de pH=4'00. Situar el selector en "pH".

2.8.- Una vez estabilizada la lectura, llevar el cursor "slope" a la posición necesaria para que la lectura sea 4'00. Llevar el selector a cero.

2.9.- Retirar el electrodo, lavar con agua destilada y secarlo con cuidado. Si el electrodo no ha de ser utilizado de inmediato, guardarlo protegido en el capuchón con KCl 3M.

3.- Medición del pH:

3.1.- Después de lavar el electrodo con agua destilada y secarlo, sumergirlo en el líquido problema.

3.2.- Situar el cursor "temperatura" en la posición correspondiente a la temperatura del problema.

3.3.- Situar el selector en posición pH. Una vez estabilizada, la lectura indica el pH del problema. Finalizada la lectura, retornar el selector a 0.

3.4.- Retirar el electrodo de la disolución, lavar con agua destilada y secar con suavidad con un pañuelo de papel. Si no ha de utilizarse de nuevo en corto espacio de tiempo, sumergir en KCl 3M.

OBSERVACIONES

El mismo procedimiento es útil para la determinación del pH en vino, zumos de fruta y otros líquidos alimentarios.

Cuestionario 8.1.- pH del agua

1.- Indicar como preparar 1 litro de disolución tampón de pH=4'00, partiendo de ácido acético 0'2M y acetato de sodio (pKa del ácido acético = 4'74)

2.- Indicar como preparar 1 litro de disolución tampón de pH=7'00 partiendo de ácido acético 2M, agua destilada y acetato de sodio.

3.- Indicar como preparar 1 litro de disolución tampón de pH=7'00 partiendo de disolución de hidróxido amónico 2M (pKb = 4'74), agua destilada y cloruro amónico

4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 8.2
DETERMINACIÓN DE RESIDUO SECO EN AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Determinación del residuo seco en agua a 180°C.

MATERIAL

Balanza analítica.

Baño María.

Cápsula de porcelana o vidrio Pírex de 250 ml.

Desecador.

Estufa de desecación de temperatura regulable.

REACTIVOS

Agua destilada, exenta de residuos.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar una cápsula de 250 ml, completamente limpia y seca.
- 2.- Medir 200 ml de agua en una probeta.
- 3.- Pasar alrededor de aproximadamente 1/3 del agua medida a la cápsula y poner en un baño María.
- 4.- Ir añadiendo el resto del agua problema a medida que se va evaporando. Continuar de esta forma hasta sequedad aparente.
- 5.- Pasar la cápsula con el residuo a la estufa a 180°C, hasta peso constante.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "residuo seco a 180°C, en miligramos por litro de agua":

$$\text{Residuo seco} = 5.000 \cdot (m - m')$$

en donde:

m = peso de la cápsula con el residuo

m' = peso de la cápsula.

OBSERVACIONES

5.000 es el factor de cálculo resultante de:

$$\frac{1.000 \text{ miligramos/gramo}}{0'2 \text{ litros de muestra}}$$

El agua del baño María debe ser agua destilada totalmente exenta de residuos, a fin de evitar incrustaciones en la pared externa de la cápsula.

Cuestionario 8.2. - Determinación de residuo seco en el agua

- 1.- Realizar el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 8.3
DUREZA DEL AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Denominamos como dureza del agua a su contenido en sales de calcio y magnesio, medido en grados hidrotimétricos franceses (°HTF), de forma que 1 °HTF equivale a una cantidad tal de calcio que originaría 1 centigramo de carbonato de calcio por cada litro de agua.

El contenido total de (calcio + magnesio) expresado en °HTF es la dureza total. La dureza residual que permanece después de provocar la precipitación por calentamiento al punto de ebullición, de las sales precipitables de calcio y magnesio es la dureza permanente y la concentración de las sales precipitables de calcio y magnesio es la dureza temporal.

Un método rápido, sencillo y fiable de determinación de la dureza total y permanente del agua, consiste en la valoración complexométrica con disolución de la sal disódica del ácido etilendiamintetraacético (EDTA-Na₂), complexona II.

Las reacciones de la complexona son de captación (bloqueo), de los cationes Ca⁺⁺ i Mg⁺⁺, determinantes de la dureza del agua, ocluyéndolos ("secuestro") en el interior de la molécula.

MATERIAL

Bureta de 25 ó de 50 ml.

Embudo cónico.

Frasco lavador.

Matraces erlenmeyer de 250 ml.

Papel de filtro de paso rápido.

Placa calefactora.

Probeta de 100 ml.

Vaso de precipitados de 250 ml.

Vidrio de reloj.

REACTIVOS

Disolución titulada de EDTA-Na₂ 0'01M.

Agua destilada exenta de dureza.

Disolución amortiguadora de pH=10 (se prepara con 67'5 gramos de cloruro amónico y 570 ml de amoniaco concentrado, completando el volumen a 1 litro con agua destilada).

Negro de eriocromo T (0'15 gramos en 25 ml de metanol).

METODOLOGÍA

Para la dureza total:

- 1.- Pasar 100 ml de agua problema a un erlenmeyer de 250 ml.
- 2.- Añadir 2 ml de disolución amortiguadora y 2 gotas de indicador.
- 3.- Valorar con la solución titulada de complexona II hasta viraje de rojo a azul débil persistente.

Para la dureza permanente:

- 1.- Pasar 100 ml de agua problema a un vaso de pp de 250 ml.
- 2.- Tapar con vidrio de reloj y llevar a ebullición suave durante 15 minutos, procurando que el volumen no disminuya excesivamente.
- 3.- Trasvasar las salpicaduras del vidrio de reloj al vaso, ayudándonos con una pequeña cantidad de agua destilada exenta de dureza.
- 4.- Filtrar sobre un matraz erlenmeyer, lavando con pequeñas porciones de agua destilada exenta de dureza.
- 5.- Proceder con el filtrado como en los puntos 2 i 3 del subapartado anterior.

CÁLCULOS

Trabajando del modo mencionado en el apartado "metodología", la dureza es igual al volumen consumido de complexona II.

Obviamente, la dureza temporal es la diferencia entre la dureza total y la permanente.

OBSERVACIONES

Si se tratara de agua de dureza muy elevada, puede procederse tomando una muestra de 10 ml con pipeta aforada y añadir agua destilada exenta de dureza hasta completar aproximadamente 100 ml. En este caso la dureza será: $^{\circ}\text{HTF} = 10 \cdot \text{vol complexona}$.

Cuestionario 8.3. - Dureza del agua

- 1.- Escribir las reacciones que tienen lugar durante la valoración.
- 2.- Calcular las cantidades de cloruro amónico i amoníaco ($pK_b = 4,74$) empleadas en la preparación de disolución amortiguadora de $pH=10$.
- 3.- Dibujar el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Deducir razonadamente porqué, trabajando según el protocolo especificado en la metodología, la dureza en $^{\circ}\text{HTF}$ coincide muy aproximadamente con el volumen consumido de reactivo.
- 5.- ¿Por qué debe mantenerse un control del pH durante la valoración?
- 6.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref:8.4
ALCALINIDAD DEL AGUA		

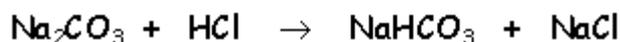
OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se trata de determinar el contenido de hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos presentes en el agua.

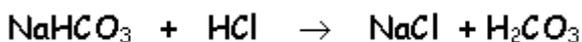
Se efectúa una valoración con disolución valorada de un ácido mineral fuerte, referida a los puntos de equivalencia correspondientes a los OH^- y CO_3^{2-} (pH=8'3, zona de viraje de la fenolftaleína) y del HCO_3^- (pH=4'5, zona de viraje del naranja de metileno).

En una muestra pueden coexistir carbonatos y bicarbonatos juntos ó hidróxidos y carbonatos juntos, pero no hidróxido y bicarbonato.

Las reacciones en la valoración hasta el viraje de la fenolftaleína son del tipo siguiente (el catión no tiene porqué ser necesariamente sodio ni el ácido titulante necesariamente clorhídrico):



y, a partir de aquí, y hasta el viraje del anaranjado de metilo:



siendo el bicarbonato reaccionante en esta fase el que tenía originariamente la muestra más el procedente de la transformación del carbonato en la fase anterior.

MATERIAL

Bureta de 50 ml.

Matraces erlenmeyer de 250 ml.

Pipetas (el volumen depende del tipo de muestra).

REACTIVOS

Ácido clorhídrico titulado 0'1N (o de normalidad menor).

Agua destilada.

Fenolftaleína al 0'5% en agua/alcohol 1:1.

Anaranjado de metilo al 0'05% en agua.

METODOLOGÍA

- 1.- Tomar 100 ml de muestra i trasvasar a un erlenmeyer de 250 ml.
- 2.- Añadir dos gotas de indicador de fenolftaleína y valorar hasta desaparición del color (rosa a incoloro). Anotar el volumen consumido (V1).
- 3.- Añadir dos gotas de indicador de anaranjado de metilo y continuar la valoración hasta virar de amarillo-naranja a rojo. Anotar el volumen total consumido (V2). Caso de que se presenten dificultades para apreciar el cambio de color, hervir durante unos minutos, dejar enfriar y continuar la valoración.
- 4.- Efectuar un ensayo en blanco con agua destilada y restar de los valores del problema los obtenidos en el ensayo en blanco.

CÁLCULOS

Los resultados se expresan en miliequivalentes por litro de agua.

Si $V_2 = V_1$ (viraje inmediato del anaranjado de metilo), la muestra únicamente contiene hidróxidos.

Si $V_2 = 2 \cdot V_1$ la muestra únicamente contiene carbonatos.

Si $V_1 = 0$ la muestra únicamente contiene bicarbonatos.

Si $V_1 = V_2 = 0$ la muestra tiene alcalinidad negativa.

Si $V_2 > 2 \cdot V_1$ la muestra contiene carbonatos y bicarbonatos.

Si $V_2 < 2 \cdot V_1$ la muestra contiene carbonatos y hidróxidos.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores i llamando:

V_H al volumen consumido de ácido titulante correspondiente a los hidróxidos.

V_C ídem para los carbonatos.

V_B ídem para los bicarbonatos.

y que estos volúmenes son nulos para aquellos componentes inexistentes, podremos calcularlos (los volúmenes) mediante las expresiones:

$$\begin{aligned}V_1 &= V_C + V_H \\V_2 - V_1 &= V_C + V_B\end{aligned}$$

el contenido alcalino en miliequivalentes/litro se calcula según:

$$[\text{OH}^-] = V_H \cdot N \cdot 10$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = V_C \cdot N \cdot 10$$

$$[\text{HCO}_3^-] = V_B \cdot N \cdot 10$$

siendo **N** la normalidad del ácido titulante.

OBSERVACIONES

La normalidad del ácido titulante estará en función del contenido alcalino supuesto de la muestra. Todos los reactivos, así como el agua utilizada en las disoluciones y ensayos en blanco, deben ser de bajo contenido en CO_2 . El CO_2 de una muestra o de un agua destilada puede eliminarse mediante reducción de presión con trompa de vacío durante 15 minutos o por ebullición durante igual tiempo (y dejando enfriar en un ambiente exento de CO_2).

Si la alcalinidad del agua es muy alta, tomaremos una cantidad de muestra inferior a 100 ml, (que disolveremos en agua destilada si el volumen resultante fuera incómodo para la valoración). En este caso, los cálculos serán:

$$X = \frac{V \cdot N \cdot 1.000}{v}$$

siendo **X** el resultado (de carbonatos, hidróxidos. o bicarbonatos, según corresponda), **V** el volumen consumido, en ml, de reactivo (V_H , V_C ó V_B , según corresponda) i **v** el volumen de muestra en ml.

Cuestionario 8.4. - Alcalinidad del agua

- 1.- ¿Por qué no pueden coexistir en la misma muestra hidróxidos fuertes y bicarbonatos?
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 8.5
DETERMINACIÓN DE CO₂ LIBRE EN EL AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El método está basado en la reacción del CO₂ libre del agua con el NaOH, formando bicarbonato. Es aplicable a muestras de agua que no contengan cantidades apreciables de hidróxido amónico, aminas, fosfatos, boratos, silicatos, sulfuros y nitritos. También puede interferir la presencia de ácidos minerales y de sales de ácido fuerte y base débil y en menor grado la presencia de aluminio, hierro cromo y cobre.

MATERIAL

Bureta.
Matraz aforado de 1 litro.
Matraz erlenmeyer.
Pipeta de 20 ml.
Placa calefactora.
Probeta de 100 ml.
Tubo de goma.

REACTIVOS

Agua destilada.
Fenolftaleína 0'5% en agua-alcohol 1:1.
Hidróxido de sodio 1N titulado.

METODOLOGÍA

- 1.- Preparar disolución de NaOH 0'02N a partir de 20 ml de NaOH titulado 1N y enrasar a 1 litro con agua destilada exenta de dióxido de carbono (previamente llevada a ebullición durante 15 minutos o mediante vacío).
- 2.- Tomar 100 ml de muestra y pasar a matraz erlenmeyer de 250 ml.
- 3.- Añadir 5 gotas de disolución hidroalcohólica de fenolftaleína y valorar con la disolución preparada en el apartado 1, hasta viraje (rojo a incoloro).

CÁLCULOS

El resultado se expresa en dióxido de carbono libre en mg por litro:

$$\text{mg/l de CO}_2 = \frac{V \cdot 0'02 \cdot 44.000}{V}$$

en donde;

V = ml consumidos de NaOH 0'02N.

v = volumen de muestra, en ml.

OBSERVACIONES

Debe valorarse rápidamente y la agitación deberá ser muy suave, a fin de no absorber CO₂ atmosférico.

La disolución de NaOH 0'02N debe prepararse el mismo día.

Cuestionario 8.5. - CO₂ libre en el agua

- 1.- Escribir la reacción que tiene lugar durante la valoración.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- ¿Por qué debe prepararse diariamente la disolución de NaOH 0'02N?
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 8.6
DETERMINACIÓN DE AMONIO EN EL AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El amoníaco destilado de la muestra se recoge sobre ácido bórico con un indicador adecuado y se valora con ácido sulfúrico titulado.

El método es aplicable a muestras con contenido amoniacal superior a 2 mg/litro de en amonio.

MATERIAL

Balanza analítica.

Bureta de 25 ml.

Equipo de destilación por arrastre de vapor.

Frasco lavador de polietileno.

Matraz aforado de 1 litro

Matraz erlenmeyer de 250 ml.

Probeta de 250 ml.

REACTIVOS

Ácido bórico PA, solución al 2 %.

Ácido sulfúrico 0'005N

Agua destilada.

Indicador Shiro-Thasiro.

Óxido de magnesio PR.

Preparación de los reactivos

ÁCIDO BÓRICO AL 2 %.- Disolver 2 gramos de ácido bórico PA en agua destilada hasta 100 ml.

INDICADOR SHIRO TAHSIRO.- Disolver 0'125 gramos de rojo de metilo y 0'080 gramos de azul de metileno en 100 ml de alcohol etílico del 96 % (PA).

ÁCIDO SULFÚRICO 0'005N.- Disolver 50 ml de ácido sulfúrico 1N titulado hasta 1 litro en agua destilada.

METODOLOGÍA

- 1.- Poner en funcionamiento el equipo de destilación durante unos 5 minutos, haciendo pasar vapor de agua, para eliminar posibles restos de amoníaco.
- 2.- Poner 250 ml de muestra en el matraz de destilación, junto con 1 gramo de óxido de magnesio y iniciar la destilación.

3.- Recoger el destilado en un matraz erlenmeyer de 250 ml en el cual se hallan 10 ml de ácido bórico y dos gotas de indicador, estando el pico del colector del refrigerante sumergido en el líquido del matraz.

4.- Después de recoger entre 50 y 100 ml de destilado, comprobar la total destilación del amoníaco con un trozo de papel indicador.

5.- Valorar el destilado con la disolución de ácido sulfúrico (viraje de verde a violeta).

CÁLCULOS

El resultado se expresa como mg de NH_4^+ por litro:

$$\text{NH}_4^+(\text{mg/l}) = V \cdot f \cdot 0'09 \cdot 4$$

siendo **V** el volumen de ácido sulfúrico consumido en la valoración i **f** el factor de corrección de la normalidad del ácido

OBSERVACIONES

El factor **f** es 1 si trabajamos con disoluciones "nuevas" tituladas de normalidad garantizada.

Cuestionario 8.6. - Determinación de amonio en el agua

1.- Escribir la reacción que tienen lugar durante la valoración.

2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.

3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.

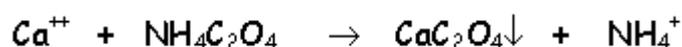
4.- ¿A qué es debido que el ácido bórico (un ácido), no interfiera en el resultado de la valoración con ácido sulfúrico (también un ácido)?

5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

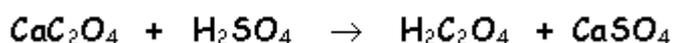
Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 9.1
DETERMINACIÓN DEL CALCIO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

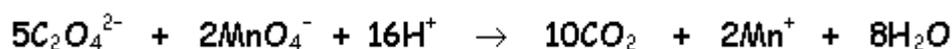
El ión calcio es precipitable cuantitativamente como oxalato de calcio, mediante la acción del oxalato amónico:



El precipitado de oxalato cálcico es soluble en ácido sulfúrico, pasando a la forma de ácido oxálico:



El ácido oxálico formado se valora con disolución titulada de permanganato potásico:



MATERIAL

Balanza analítica
Baño de agua
Quemador Bunsen
Erlenmeyer de 250 ml
Frasco lavador
Horno de mufla con regulación de temperatura
Crisol de placa filtrante del núm. 4
Crisol para cenizas
Matraz aforado de 250 ml
Triángulo de cerámica
Vitrina-campana extractora

REACTIVOS

Ácido clorhídrico d=1'14
Ácido nítrico 40 °Bé
Ácido sulfúrico d=1'13
Agua destilada
Amoníaco d=0'98
Disolución al 30 % (p/v) de ácido cítrico

- Disolución al 5 % (p/v) de cloruro amónico
- Disolución de verde de bromocresol al 0'04 %
- Disolución saturada de oxalato amónico
- Disolución titulada de permanganato potásico 0'1 N

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar alrededor de 5 gramos de muestra en un crisol de cenizas.
- 2.- Situar el crisol inclinado sobre un triángulo de cerámica y calentar con la llama oxidante del quemador Bunsen, hasta carbonización (en campana-vitrina).
- 3.- Calcinar a 550°C hasta convertir la muestra al estado de cenizas (puede aprovecharse para determinar el contenido de cenizas totales).
- 4.- Trasvasar las cenizas a un matraz erlenmeyer de 250 ml y añadir 40 ml de ácido clorhídrico (d=1'14), 60 ml de agua destilada y unas gotas de ácido nítrico.
- 5.- Llevar a ebullición y mantenerla unos 30 minutos.
- 6.- Enfriar y trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 250 ml, completando el volumen con agua destilada y homogeneizar.
- 7.- Filtrar (sin lavar el filtro!) y recoger una porción alícuota de filtrado que contenga entre 10 i 40 miligramos de calcio y pasar a un matraz erlenmeyer de 250 ml; añadir 1 ml de la disolución de ácido cítrico y 5 ml de la disolución de cloruro amónico; completar el volumen aproximadamente a unos 100 ml con agua destilada.
- 8.- Llevar a ebullición, añadir 10 gotas de disolución de verde de bromocresol y 30 ml de disolución caliente de oxalato amónico Si aparece un precipitado, disolver con unas gotas de ácido clorhídrico de d=1'14
- 9.- Añadir amoníaco hasta virar el indicador.
- 10.- Colocar el erlenmeyer en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos, dejar reposar el precipitado formado.
- 11.- Retirar el erlenmeyer del baño y dejar reposar 1 hora. Filtrar con crisol del nº 4, lavando erlenmeyer y crisol con agua hasta la total eliminación del exceso de oxalato amónico (ausencia de cloruros - ensayo con nitrato de plata en medio ácido).
- 12.- Disolver el precipitado pasando por el filtro unos 50 ml de ácido sulfúrico de d=1'13.
- 13.- Lavar el crisol con agua caliente hasta completar un volumen de alrededor de 100 ml.
- 14.- Calentar a 70-80°C y valorar con disolución de permanganato de potasio 0'1 N hasta obtención de color rosa persistente por un tiempo de como mínimo 1 minuto.

CÁLCULOS

1 ml de permanganato 0'1000 N equivale a 2'004 miligramos de calcio.
Expresar el resultado en % de calcio en la muestra:

$$\text{Ca}(\%) = \frac{f \cdot V \cdot 501}{m \cdot v} \cdot 100$$

OBSERVACIONES

Si la muestra está constituida exclusivamente de materiales minerales (no orgánicos), como por ejemplo un corrector mineral para piensos, proceder a la disolución mediante ácido clorhídrico sin

incineración previa.

Si se sospecha que el contenido en magnesio en la muestra es muy alto, proceder a una segunda precipitación con oxalato de calcio.

Cuestionario 9.1. - Determinación del calcio

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico..
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 9.2
DETERMINACIÓN DE HALUROS EN AGUA		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El método se basa en la reacción de los haluros con el nitrato de plata y formación de un precipitado cuantitativo de haluro de plata.

MATERIAL

Bureta de 25 ml.
Frasco lavador.
Matraz erlenmeyer 250 ml esmerilado 29/32, con tapón.
Pipeta aforada de 25 ml.
Probeta de 10 ml.
Probeta de 100 ml.

REACTIVOS

Ácido nítrico concentrado.
Agua destilada
Disolución 0'1N, titulada, de sulfocianuro potásico
Disolución de nitrato de plata 0'1000N, titulada.
Disolución saturada de sulfato férrico amónico.
Nitrobenceno.

Disolución titulada de tiocianato potásico.- Desecar alrededor de 10 gramos de tiocianato potásico pa a 105°C durante dos horas, dejar enfriar en desecador y pesar con exactitud de 1 mg, alrededor de 9'717 gramos. Disolver hasta un litro en agua destilada. Buscar el factor de la disolución mediante valoración con disolución titulada de nitrato de plata 0'1000 N.

Disolución saturada de sulfato férrico.- Disolver lentamente sulfato férrico amónico, calidad PA, en 200 mililitros de agua destilada, hasta que la disolución no admita más soluto. Clarificar con 2 ml de ácido nítrico concentrado. Filtrar.

METODOLOGÍA

- 1.- Pasar 100 ml de agua problema a un matraz erlenmeyer de 250 ml, esmerilado 29/32. Añadir unas gotas de ácido nítrico concentrado y 25 ml de disolución de nitrato de plata 0'1000N (aparición de un precipitado blanco).
- 2.- Añadir unos 7 ml de nitrobenceno y 1 ml de disolución de sulfato férrico amónico. Tapar y agitar con emergencia.

3.- Lavar el tapón y el cuello del matraz con un chorrito de agua destilada. Valorar con la disolución de tiocianato potásico hasta virar a color salmón.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "contenido total de haluros, expresado como cloruro de sodio":

$$\text{gramos/litro de NaCl} = \frac{(2'5 - V \cdot N) \cdot 58'45}{100}$$

en donde **V** es el volumen consumido, en ml, durante la valoración, de tiocianato de potasio y **N** su normalidad (exacta).

OBSERVACIONES

Es preciso que los reactivos utilizados estén totalmente exentos de cloruros; si se sospechase su presencia, debe efectuarse un ensayo en blanco.

El método también es aplicable a vino y líquidos en general. Si la muestra tuviese un contenido excesivamente alto de haluros, diluir previamente en agua destilada.

Cuestionario 9.2. - Determinación de haluros en agua

- 1.- Escribir la reacción que tiene lugar en la valoración.
- 2.- ¿Cual es la acción del nitrobenceno?
- 3.- Sugerir un procedimiento substitutorio del uso del nitrobenceno.
- 4.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 5.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 6.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 9.3
HALUROS NO VOLÁTILES EN ALIMENTOS SÓLIDOS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El método se basa en la reacción de los haluros con el nitrato de plata, con formación de precipitado cuantitativo de haluros de plata.

A la muestra se le añade una cantidad exactamente conocida de disolución titulada de nitrato de plata, determinándose el exceso de nitrato de plata por valoración con disolución titulada de tiocianato.

La sustancia orgánica interfiere en la valoración i debe eliminarse previamente por calcinación.

MATERIAL

Balanza analítica.

Quemador Bunsen.

Bureta de 25 ml.

Frasco lavador.

Horno incinerador.

Crisol para cenizas.

Matraz erlenmeyer de 250 ml, esmerilado 29/32 con tapón.

Pipeta aforada de 25 ml.

Probeta de 10 ml.

Soporte, aro y nuez.

Triángulo cerámico.

Vitrina extractora.

REACTIVOS

Disolución de nitrato de plata 0'1000N, sv

Disolución 0'1N, sv, de sulfocianuro potásico.

Disolución saturada de sulfato férrico amónico.

Ácido nítrico concentrado.

Nitrobenceno.

Agua destilada.

Preparación de los reactivos

DISOLUCIÓN TITULADA DE TIOCIANATO POTÁSICO.- Desecar alrededor de 10 gramos de tiocianato potásico a 105°C durante dos horas, dejar enfriar en desecador y pesar exactamente alrededor de 9'717 gramos. Disolver hasta un litro en agua destilada. Buscar el factor de la disolución mediante valoración con disolución titulada de nitrato de plata 0'1000 N.

DISOLUCIÓN SATURADA DE SULFATO FÉRRICO-AMÓNICO.- Disolver lentamente en 200 mililitros de agua destilada, sulfato férrico-amónico, calidad PA, hasta que la disolución no admita más soluto. Clarificar la disolución con 2 ml de ácido nítrico concentrado. Filtrar.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente unos 5 gramos de muestra en un crisol calcinado y tarado y hacer cenizas según la metodología de la práctica 7.1.
- 2.- Dispersar las cenizas con una pequeña cantidad de agua destilada y unas gotas de ácido nítrico 6 N, y trasvasar, lavando el crisol, a un vaso de pp de 100 ml.
- 3.- Filtrar sobre un erlenmeyer esmerilado de 250 ml; lavar el residuo sobre el filtro con pequeñas porciones de agua destilada, hasta test de cloruros negativo del filtrado (el volumen deberá ser de aproximadamente 100 ml) y acidificar con un poco de ácido nítrico.
- 4.- Añadir 25 ml de disolución titulada de nitrato de plata 0'1000N (aparición de un precipitado blanco) y a continuación, entre 7 y 10 ml de nitrobenzeno.
- 5.- Tapar el erlenmeyer y agitar enérgicamente durante 1 minuto; destapar y arrastrar con agua destilada las porciones de partículas y de disolución adheridas al tapón y a las paredes del erlenmeyer.
- 6.- Añadir 1 ml de disolución saturada de sulfato férrico amónico y valorar con disolución titulada 0'1 N de sulfocianuro potásico, hasta coloración rosa salmón suave.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "contenido total de haluros, expresado en cloruro de sodio":

$$\%(\text{ClNa}) = \frac{(2'5 - V \cdot N) \cdot 58'45}{m} \cdot 100$$

en donde **V** es el volumen consumido, en ml, durante la valoración, de tiocianato de potasio, **N** su normalidad y **m** la masa de la muestra en miligramos.

OBSERVACIONES

Los reactivos utilizados deben estar totalmente exentos de cloruros; en el caso de sospechar su presencia, debe efectuarse un ensayo en blanco.

Si el contenido de cloruros fuese muy elevado, se aconseja filtrar la muestra reducida a cenizas (punto 3), sobre un matraz aforado de 250 ml, enrasar con agua destilada, homogeneizar y proceder con una porción alícuota.

Cuestionario 9.3. - Haluros no volátiles en alimentos sólidos

- 1.- ¿Por qué este procedimiento no es apto para la determinación de haluros volátiles?
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Escribir las reacciones que tienen lugar en los subapartados 4 i 6 del apartado "metodología".
- 4.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 10.1
IDENTIFICACIÓN DE PLOMO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se trata de identificar la presencia de plomo en alimentos.

La materia orgánica es destruida por tratamiento con ácido perclórico y adición de los reactivos de Carrez y el plomo es identificado según el procedimiento de Arribas Gimeno.

MATERIAL

Balanza granataria.
Centrífuga.
Cuentagotas.
Frasco lavador.
Papel de filtro.
Pipetas graduadas de 2 ml.
Placa calefactora.
Tubos de ensayo de 20 ml.
Tubos de ensayo de 3 ml.
Varillas de vidrio.
Vasos de pp de 25 ml.
Vasos de pp de 50 ml.
Vidrios de reloj.

REACTIVOS

Ácido clorhídrico aprox. 2N (1 parte de ácido clorhídrico pa del 35 % en 5 partes de agua destilada).
Ácido nítrico concentrado.
Ácido perclórico del 30 % (Mezclar a partes iguales, agua destilada con ácido perclórico del 60 % pa)
AEDT al 5 % (pesar 5 gramos de AEDT pa y llevar a volumen hasta 100 ml en agua destilada).
Agua destilada.
Agua oxigenada al 3 %.
Carbonato de sodio 1N (53 gramos de carbonato de sodio anhidro pa hasta 1 litro en agua destilada).
Cromato potásico 0'5N (4'9 gramos de cromato potásico pa hasta 100 ml en agua destilada).
Hidróxido de sodio 1N y 0'1N sv.
Nitrato amónico 0'5N (4'05 gramos de nitrato amónico pa en agua destilada hasta a 100 ml)
Papel indicador.
Reactivo de Carrez I (24 gramos de acetato de zinc pa y 3 gramos de ácido acético glacial pa hasta 100 ml en agua destilada).

Reactivo de Carrez II (10'6 gramos de ferrocianuro potásico trihidrato pa en agua destilada hasta 100 ml).

Sulfato amónico, disolución (13'2 gramos de sulfato amónico pa en agua destilada hasta 100 ml).

METODOLOGÍA

- 1.- Tomamos una cantidad de muestra homogeneizada y molturada de alrededor de 1 gramo y se pasa a un vaso de pp de 50 ml.
- 2.- Añadir 5 ml de ácido perclórico al 30 % y dejar en reposo durante 1/2 hora, tapando con un vidrio de reloj y agitando de vez en cuando.
- 3.- Añadir 10-15 ml de agua destilada y filtrar sobre un vaso de pp, hasta recoger unos 10 -15 ml de filtrado.
- 4.- Adicionar al filtrado 2 ml de reactivo Carrez I, agitando 5 minutos sobre placa magnética.
- 5.- Añadir 2 ml de reactivo Carrez II y agitar en placa magnética. 5 minutos.
- 6.- Filtrar, hasta recoger unos 15 ml de filtrado, sobre un vaso de pp pequeño y apartar unos 5 ml para la práctica 10.3 (determinación de arsénico).
- 7.- Añadir, agitando, disolución de carbonato de sodio 1N hasta reacción alcalina.
- 8.- Añadir 3 ml más de disolución de carbonato de sodio y llevar a ebullición suave durante 5 minutos.
- 9.- Centrifugar; *la no aparición de precipitado indica ensayo negativo de plomo, y no es preciso continuar (en todo caso, efectuar el punto 10 si se desea determinar mercurio y/o arsénico). Si aparece precipitado, continuar.*
- 10.- Separar el líquido claro (reservarlo para la práctica 10.2 - determinación de mercurio -). Lavar el precipitado con agua caliente, separándolo de los líquidos de lavado mediante centrifugación.
- 11.- Secar todo lo que se pueda el precipitado con una tira de papel de filtro y tratamiento al baño María.
- 12.- Tratar el precipitado con 1 ml de ácido nítrico concentrado y calentar cuidadosamente a la llama (icuidado con las proyecciones!) hasta casi sequedad. Si el residuo oscurece notablemente, añadir unas gotas de agua oxigenada.
- 13.- Añadir 1 ml de agua destilada, 10 gotas de nitrato amónico 0'5 N y 1 gota de ácido nítrico diluido; dejar 5 minutos al baño María, centrifugar y separar el líquido claro.
- 14.- Al líquido claro, añadirle 1 ml de HCl 2N y continuar, si es preciso, hasta total precipitación. Si obtenemos precipitado, continuamos en el punto siguiente, y si no, pasamos al punto 16.
- 15.-Lavar el pp con agua hirviendo, centrifugar y separar el líquido cuando todavía está caliente. Pasar el líquido claro a un tubo de ensayo y añadir dos gotas de cromato potásico 0'5N; *precipitado amarillo indica plomo en cantidades considerables (en este caso, no es preciso continuar). Reservar el precipitado para la práctica 10.2*
- 16.- Al líquido procedente del punto 14, añadir 20 gotas de disolución de sulfato amónico, calentar hasta ebullición i dejar 10 minutos al baño María. *La no aparición de precipitado confirma ensayo negativo del plomo (no seguir). Si aparece precipitado, centrifugar, lavando el residuo con agua destilada y descargar el líquido.*
- 17.- Añadir al pp 1 ml de AEDT al 5%. Calentar ligeramente y centrifugar. Separar el líquido.
- 18.- Al líquido procedente del punto anterior, añadir disolución de sosa hasta pH alcalino y unas gotas de disolución de sulfuro sódico; *precipitado negro indica presencia de plomo.*

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

- Ensayo del punto 9 negativo (no hay precipitado) = **NEGATIVO**.
 - Ensayo del punto 16 negativo = **NEGATIVO**.
 - Ensayo del punto 18 positivo = **POSITIVO (Presencia de Pb)**.
 - Ensayo del punto 15 positivo = **POSITIVO (Presencia de Pb en cantidad notable)**.
-

Cuestionario 10.1. - Identificación de plomo

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Escribir las reacciones de los ensayos correspondientes a los subapartados 9, 15, 16 i 18 del apartado "metodología".
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 10.2
IDENTIFICACIÓN DE MERCURIO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se trata de identificar la presencia de mercurio en alimentos.

La materia orgánica es destruida por tratamiento con ácido perclórico y adición de los reactivos de Carrez y se identifica el mercurio según el procedimiento de Arribas Gimeno.

MATERIAL

El mismo que para la práctica 10.1 y además, una placa de gotas.

REACTIVOS

(Además de parte de los necesarios para la práctica 10.1).

Amoníaco 2N sv.

Cloruro estannoso, disolución 2N.

Hidróxido de sodio 2N sv.

METODOLOGÍA

- 1.- Si se ha obtenido residuo en el punto 15 de la práctica 10.1, continuar por el punto siguiente; en caso contrario pasar al punto 3.
 - 2.- Al residuo del punto 15 de la práctica 10.1 añadir 1 ml de amoníaco 2N; mezclar y centrifugar. **Aparición de pp negro indica mercurio (en forma mercuriosa)** y no es preciso continuar. De no aparecer pp negro, pasar al punto siguiente
 - 3.- En una depresión de una placa de gotas, depositar 3 gotas de disolución de cloruro estannoso y añadir gotas de hidróxido de sodio 2N Hasta total dilución del eventual pp formado inicialmente, y en todo caso hasta pH alcalino. Añadir 3 gotas del líquido separado en el punto 10 de la práctica 10.1; **aparición de un pp negro indica presencia de mercurio.**
-

Cuestionario 10.2.- Identificación de mercurio

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Escribir las reacciones que tienen lugar en los subapartados 2 y 3 del apartado "metodología".
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 10.3
IDENTIFICACIÓN DE ARSÉNICO		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

Se trata de identificar la presencia de arsénico en alimentos.

La materia orgánica es destruida mediante tratamiento con ácido perclórico y adición de los reactivos de Carrez y el arsénico se identifica según el procedimiento de G. Charlot.

MATERIAL

(Además del necesario para la práctica 10.1 hasta el punto 6)

Baño María.

Centrífuga.

Frascos lavadores.

Papel de filtro.

Tubos de ensayo de 3 ml.

Tubos de centrífuga.

Vitrina de gases.

REACTIVOS

(Además de los necesarios para la práctica 10.1 hasta el punto 6)

Ácido clorhídrico aprox. 2N (1 parte de ácido clorhídrico concentrado pa i 5 partes de agua).

Aluminio en láminas.

Antimonio porfirizado pa.

Hidróxido de sodio 4N (33 gramos de hidróxido de sodio pa hasta 100 ml en agua destilada).

Nitrato de plata, disolución (2'5 gramos de nitrato de plata hasta 10 ml en agua destilada).

METODOLOGÍA

1.- A 1 ml de la disolución preparada en el punto 6 de la práctica 10.1, añadir 1 ml de HCl 2N. Separar por centrifugación la eventual aparición de precipitado.

2.- Tomar 4 gotas de la disolución anterior y añadir 8 gotas de sosa y 2 o 3 pequeñas láminas. de aluminio, en un tubo de ensayo.

3.- Situar una tira de papel de filtro impregnado con 2 o 3 gotas de disolución de nitrato de plata en la boca del tubo de ensayo y calentar 2 minutos al baño María; **aparición de una mancha de color variable del amarillo al negro indica ensayo positivo** y no es preciso continuar; en caso contrario, continuar.

4.- Tomar unas 10 gotas de la disolución del punto 1, añadir una punta de espátula de antimonio en polvo y llevar a ebullición.

5.- Continuar como en los puntos 2 i 3. ***Aparición de la mencionada mancha confirma la presencia de arsénico.***

OBSERVACIONES

El método no es efectivo en presencia de mercurio y cantidades notables de cobre.

Cuestionario 10.3.- Identificación de arsénico

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico
- 2.- Escribir las reacciones que tienen lugar en el subapartado 3 del apartado "metodología".
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)

Protocolos de análisis

Ref: 11.1

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE FÓSFORO**OBJETO Y FUNDAMENTOS**

Los compuestos fosforados forman un compuesto ortofosforado de color amarillo característico que absorbe la luz a 430 nm, al reaccionar con el reactivo nitromolibdovanadato amónico.

MATERIAL

Balanza analítica.

Baño de arena.

Quemador Bunsen.

Espectrofotómetro

Frasco lavador.

Horno de mufla.

Crisol de incineración de porcelana.

Matraz aforado de 500 ml.

Pipetas aforadas de 10 ml (2).

Triángulo cerámico.

Tubos de ensayo de 30 ml, boca esmerilada, con tapón (2).

Para la curva de calibrado:

(Además de parte del material anterior)

Estufa de desecación.

Matraz aforado de 1 litro.

Matraces aforados de 100 ml (4)

Pipeta aforada de 1 ml.

Pipeta aforada de 2 ml

Tubos de ensayo de 30 ml, boca esmerilada, con tapón (5).

REACTIVOS

Ácido clorhídrico concentrado pa.

Ácido nítrico concentrado aprox. del 70 %.

Carbonato de calcio pa.

Fosfato monopotásico, pa (para la curva de calibrado).

Reactivo de nitromolibdovanadato, partiendo de la disolución preparada de molibdato amónico y la de metavanadato amónico, según el método descrito a continuación:

Disolución de molibdato amónico: Disolver en agua caliente 100 gramos de molibdato amónico tetrahidratado, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; añadir 10 ml de amoníaco concentrado, transferir a matraz aforado de 1 litro, enfriar, enrasar y homogeneizar.

Disolución de metavanadato amónico: Disolver 2'35 gramos de metavanadato amónico, NH_4VO_3 ,

en un vaso de 500 ml con 400 ml de agua destilada caliente y añadir lentamente una mezcla previamente preparada de 7 ml de ácido nítrico concentrado con 13 ml de agua. Transferir a matraz aforado de 1000 ml, enfriar, enrasar con agua destilada y homogeneizar.

Preparación del reactivo de nitromolibdovanadato: En matraz aforado de 1 litro, mezclar 200 ml de disolución de molibdato amónico con 200 ml de disolución de metavanadato amónico; añadir 134 ml de ácido nítrico concentrado y completar con agua destilada hasta el enrase.

METODOLOGÍA

- 1.- Preparar una curva de calibrado según el procedimiento indicado al final de este apartado.
- 2.- Pesar una cantidad de muestra que contenga entre 2'5 y 10 miligramos de fósforo en un crisol de cenizas.
- 3.- Mezclar con una cantidad aproximada de 1 gramo de carbonato de calcio y hacer cenizas a 550°C.
- 4.- Pasar las cenizas a un vaso de 100 ml con 10 ml de agua, lavando el crisol con ácido clorhídrico concentrado, hasta que no haga efervescencia y añadir 10 ml más de ácido (en vitrina extractora).
- 5.- Evaporar hasta sequedad, mediante calefacción a ebullición suave (en vitrina extractora!).
- 6.- Enfriar y disolver el residuo con 10 ml de ácido nítrico aproximadamente del 10 %, preparado con 1 parte de nítrico concentrado y 5 ó 6 de agua; calentar unos 5 minutos, llevando a ebullición, pero sin llegar a sequedad (vitrina extractora!).
- 7.- Añadir agua destilada y filtrar sobre matraz aforado de 250 ml, lavando el residuo con agua destilada; enrasar y homogeneizar.
- 8.- Transferir 10 ml de la disolución anterior a un tubo de ensayo de 30 ml con boca esmerilada y añadir 10 ml del reactivo de nitromolibdovanadato. Mezclar y dejar reposar 10 minutos. Proceder análogamente con un blanco formado por 10 ml de agua destilada y 10 ml del reactivo.
- 9.- Leer la absorbancia a 430 nm, calibrando el 100 % de transmitancia (absorbancia 0), con el blanco. Determinar la concentración correspondiente con la curva de calibrado.

Preparación de la curva de calibrado

- 1.- Pesar 4'394 gramos de fosfato monopotásico patrón, previamente desecado, disolver en matraz aforado de 1 litro con agua destilada, enrasar y homogeneizar. Esta disolución madre contiene 1 miligramo de fósforo por litro (si no se ha pesado la cantidad indicada, hacer la corrección adecuada en los cálculos).
- 2.- Preparar disoluciones de calibrado pasando porciones de 1, 2, 3 i 4 ml a matraces aforados de 100 ml, enrasar con agua destilada y homogeneizar. Las disoluciones así preparadas corresponden a concentraciones de 10, 20, 30 y 40 miligramos/litro.
- 3.- Pasar 10 ml de cada una de las disoluciones de calibrado a tubos de ensayo de 30 ml con boca esmerilada, junto con 10 ml de reactivo de nitromolibdovanadato; tapar y mezclar. Proceder igualmente con un blanco formado con 10 ml de agua destilada y esperar 10 minutos para el desarrollo del color.
- 4.- Leer la absorbancia a 430 nm frente al blanco a absorbancia cero.
- 5.- Construir la curva de calibrado, representando en abscisas las concentraciones y en ordenadas las absorbancias

CÁLCULOS

El resultado se expresa en % de fósforo:

$$P(\%) = \frac{2'5 \cdot C}{m}$$

siendo **P(%)** el contenido de fósforo en tanto por ciento, **C** la concentración correspondiente según la curva de calibrado y **m** el peso de la muestra en gramos.

OBSERVACIONES

Las cantidades a pesar de cada tipo de muestra son:

muestra	cantidad (gramos)	observaciones
almendras (peladas)	1'500	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
harina de avena	1'800	Homogeneizar
cacahuetes (pelados)	1'800	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
cebada	1'700	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
magro de cerdo	6'400	Cortar en pequeñas tiras antes de pesar y secar parcialmente en estufa antes de hacer cenizas.
guisantes frescos	5'500	Antes de pesar, debe aplastarse la muestra en un mortero y después de pesar, secar parcialmente en estufa antes de hacer cenizas.
guisantes secos	1'800	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
huevos (sin cáscara)	3'900	Batir con un tenedor antes de pesar.
judías secas	1'500	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
habas secas	2'000	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
habas tiernas (sin vaina)	5'300	Antes de pesar, debe aplastarse la muestra en un mortero y después de pesar, secar parcialmente en estufa antes de hacer cenizas.
lentejas secas	1'600	Molturar con molinillo hasta reducir a harina
ostras (parte comestible)	4'500	Cortar en pequeñas tiras antes de pesar y secar parcialmente en estufa antes de hacer cenizas.
queso	1'000	Rayar antes de pesar
ternera (magro)	3'200	Cortar en pequeñas tiras antes de pesar y secar parcialmente en estufa antes de hacer cenizas.

Cuestionario 11.1.- Fósforo total (espectrofotometría)

- 1.- ¿Por qué se le añade carbonato de calcio a la muestra en el momento de hacer cenizas?
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 11.2
HIERRO EN AGUA (ESPECTROFOTOMETRÍA)		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

La ortofenantrolina reacciona con el Fe^{++} , originando un complejo de color rojo característico que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible de alrededor de 505 nm. El Fe^{+++} no presenta absorción a esa longitud de onda y debe ser reducido a Fe^{++} mediante un agente reductor apropiado, como el clorhidrato de hidroxilamina. La reacción es cuantitativa i reproducible en un amplio intervalo de pH, siendo el óptimo entre 6 i 9.

MATERIAL

Cubetas para espectrofotómetro.

Dosificador gotero

Espectrofotómetro

Frasco lavador

Matraces aforados de 100 ml (2).

pHmetro

Pipeta aforada de 2 ml

Pipeta aforada de 50 ml

Pipetas aforadas de 5 ml

Vasos de pp de 100 ml (2).

Para la curva de calibrado:

(Además de parte del material anterior)

Balanza analítica

Bureta de 25 ml

Matraz erlenmeyer de 250 ml

Matraces aforados de 100 ml (6)

Pipeta aforada de 1 ml

Pipeta aforada de 2 ml

Pipeta aforada de 5 ml

Vasos de pp de 100 ml

REACTIVOS

1,10-fenantrolina (Disolver 0'50 gramos de ortofenantrolina monohidrato en agua destilada, calentando y agitando. Dejar enfriar y llevar a volumen hasta 100 ml en matraz aforado).

Clorhidrato de hidroxilamina (Disolver 10 gramos en 100 ml de agua destilada).

Ácido sulfúrico concentrado y ácido sulfúrico diluido.

Amoníaco concentrado y amoníaco diluido.

Agua destilada.

Para la curva de calibrado:

Sulfato de amonio ferroso, pa.

Disolución de permanganato de potasio 0'1 N (no es preciso que esté titulada).

METODOLOGÍA

- 1.- Preparar una curva de calibrado tal como se describe al final de este apartado.
- 2.- Tomar 50 ml de muestra y transferir a un vaso de pp de 100 ml.
- 3.- Añadir 5 ml de la disolución de clorhidrato de hidroxilamina y 2 ml de disolución de reactivo de ortofenantrolina.
- 4.- Comprobar que el pH esté entre 6 i 9. Si no es así, corregir con disolución de amoníaco o de ácido sulfúrico.
- 5.- Transferir a matraz aforado de 100 ml, enrasar y homogeneizar.
- 6.- Proceder desde el punto 2 con un blanco de agua destilada exenta de hierro.
- 7.- Esperar un tiempo mínimo de 1 hora i leer la absorbancia a 505 nm, calibrando el 0 de absorbancia (100 % de transmitancia) con el blanco.
- 8.- Determinar la concentración correspondiente a la curva de calibrado.

Obtención de la curva de calibrado:

- 1.- Disolver 0'7022 gramos de sulfato ferroso amónico pa, con ayuda de unas gotas de ácido sulfúrico concentrado, en un erlenmeyer de 250 ml.
- 2.- Añadir, con bureta, disolución de permanganato de potasio hasta coloración rosa persistente.
- 3.- Transferir a un matraz aforado de 1 litro, enrasar y homogeneizar; un ml de esta disolución madre contiene 0'1 miligramos de hierro (si no se ha pesado exactamente la cantidad indicada, efectuar la corrección oportuna).
- 4.- Preparar disoluciones de trabajo, transfiriendo a vasos de precipitados de 100 ml con 50 ml de agua destilada exenta de hierro, porciones de 0 ml (blanco), 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml y 5 ml de disolución madre, junto con 5 ml de solución de clorhidrato de hidroxilamina y 2 ml de solución del reactivo de ortofenantrolina.
- 5.- Comprobar y corregir el pH (entre 6 i 9), ayudándose, si ello fuera necesario, de amoníaco o de ácido sulfúrico.
- 6.- Transferir las disoluciones de trabajo a matraces aforados de 100 ml, enrasar i homogeneizar.
- 7.- Esperar un tiempo mínimo de 1 hora i leer las absorbancias a 505 nm frente al blanco.
- 8.- Construir una gráfica representando en abscisas las concentraciones en miligramos/litro y en ordenadas la absorbancia (las disoluciones de trabajo de 1, 2, 3, 4 y 5 ml de solución madre corresponden respectivamente a concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 miligramos/litro).

CÁLCULOS

El resultado se expresa en ppm (partes por millón); una parte por millón equivale a un miligramo de hierro por cada litro de agua:

$$\text{ppm(Fe)} = \frac{100}{v} \cdot C$$

siendo v el volumen de la muestra en ml y C la concentración determinada en la curva de calibrado.

OBSERVACIONES

En aguas de alto contenido en hierro, proceder con cantidades menores de muestra (y corregir adecuadamente los cálculos); en todos los casos, la cantidad de muestra deberá ser tal que el contenido de hierro en la misma deberá estar comprendido entre 0'1 y 0'5 miligramos.

El método es apto para aguas incoloras y con niveles inapreciables o muy bajos de cobre y/o cobalto.

Si no disponemos de espectrofotómetro pero disponemos de un colorímetro de filtros, trabajaremos con un filtro con haz entre 460 y 520 nm.

Cuestionario 11.2. - Hierro en agua (espectrofotometría)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 11.3
HIERRO EN ALIMENTOS (ESPECTROFOTOMETRÍA)		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

(Ver el apartado correspondiente de la práctica 11.2)

MATERIAL

Crisol para cenizas
Triángulo cerámico
Quemador Bunsen
Horno de mufla
Vasos de pp de 100 ml (2).
Matraces aforados de 100 ml (2).
Pipeta aforada de 5 ml
Pipeta aforada de 2 ml
Embudo cónico
Frasco lavador
Dosificador gotero
Espectrofotómetro
Cubetas para espectrofotómetro
pHmetro
Balanza analítica

Para la curva de calibrado:

(Ver práctica 11.2)

REACTIVOS

(Ver práctica 11.2)

METODOLOGÍA

- 1.- Preparar una curva de calibrado tal como se describe en la práctica 11.2
- 2.- Pesar una cantidad de muestra que contenga entre 0'1 y 0'5 miligramos de hierro en un crisol de cenizas calcinado y tarado.
- 3.- Hacer cenizas a 525°C.
- 4.- Disolver las cenizas con una pequeña cantidad de ácido sulfúrico diluido (aprox. 1:5) y filtrar sobre vaso de pp de 100 ml; lavar rápidamente con pequeñas porciones de agua destilada hasta completar un volumen total no superior a 50 ml.
- 5.- Continuar como en los puntos 3 al 8 de la metodología de la práctica 11.2.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en ppm (partes por millón); una parte por millón equivale a un miligramo de hierro por cada kg de sustancia problema:

$$\text{ppm(Fe)} = \frac{100}{m} \cdot C$$

siendo **m** el peso de la muestra en gramos y **C** la concentración determinada en la curva de calibrado, en miligramos/litro.

OBSERVACIONES

El método es apto para sustancias que no contengan cantidades apreciables de cobre y/o cobalto.

Para muestras con alto contenido en cobre, como por ejemplo algunos piensos compuestos para cerdos, terneros u otros, debe separarse previamente el hierro del cobre por precipitación del hierro con amoníaco y posterior redisolución del precipitado con disolución ácida (pH < 2).

Si en lugar de un espectrofotómetro disponemos de un colorímetro de filtros, deberemos proceder con un filtro de haz entre 460 i 520 nm.

La cantidad a pesar de muestra será alrededor de los siguientes valores (en gramos):

almendras peladas	6'600
harina de avena	6'800
harina de trigo (integral)	10'000
legumbres secas	3'100
cacahuetes pelados	10'000
cebada	6'300
espinacas	7'000
ostras (parte comestible)	5'700
carne de ternera	8'600

Aquellas muestras que presenten un contenido alto de humedad (como pe. espinacas, ostras y carne), deberán ser cortadas previamente en trozos pequeños con unas tijeras antes de pesarlas y posteriormente secar parcialmente en estufa antes de incinerar.

Cuestionario 11.3. - Hierro en alimentos (espectrofotometría)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 4.- El cobre interfiere notablemente en esta determinación. Diseñar una metodología para separar el cobre de la muestra según el procedimiento indicado en el apartado "observaciones"; deberá ser razonado con el apoyo de los cálculos adecuados (sugerencia: tomar en consideración los productos de solubilidad de los hidróxidos de hierro y de cobre y el efecto del pH).

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 12.1
SODIO POR FOTOMETRÍA DE LLAMA		pdf → 

OBJETO Y FUNDAMENTOS

El sodio presenta una emisión característica amarilla de tipo "línea atómica" , cuando quemamos, en el seno de una llama, una sustancia que contenga compuestos de sodio.

La calcinación de la muestra no es estrictamente necesaria, pero la efectuaremos a fin de facilitar una mejor dilución y una filtración más cómoda.

MATERIAL

Equipo para fotometría de llama, con filtro para sodio o con selector de longitud de onda.

Vasos pequeños (contenedores de muestra).

Frasco lavador.

Balanza analítica.

Vaso de pp de 100 ml.

Vidrio de reloj.

Pipeta graduada de 5 ml.

Embudo cónico.

Matraz aforado de 250 ml.

Papel de filtro.

Crisol para cenizas.

Triángulo cerámico.

Quemador Bunsen.

Horno de mufla.

Desecador.

Cuentagotas.

Para la curva de calibrado:

Matraz aforado de 1 litro.

Matraces aforados de 100 ml (5).

Papel milimetrado.

Pipetas aforadas de 5, 10 i 25 ml.

REACTIVOS

Agua destilada exenta de CO_2 (expulsión del CO_2 mediante ebullición).

Ácido clorhídrico concentrado pa.

Cloruro de sodio pa (para la curva de calibrado).

Gas combustible.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar alrededor de 2 gramos de muestra y hacer cenizas (no es preciso que queden blancas, a no ser que se quiera determinar simultáneamente el contenido en cenizas de la muestra - en tal caso se aconseja pesar una cantidad algo mayor -).
- 2.- Transferir las cenizas a un vaso de pp de 100 ml y disolver en agua y un poco de ácido clorhídrico, tapando con un vidrio de reloj en caso de producirse efervescencia.
- 3.- Lleva a ebullición suave durante 5 minutos, teniendo precaución de que el volumen no disminuya excesivamente.
- 4.- Filtrar sobre matraz aforado de 250 ml y enrasar con agua destilada exenta de CO₂.
- 5.- Llevar una porción de muestra a un vasito portamuestras y pasar por el quemador del fotómetro de llama, previamente calibrado según se indica en el apartado "Preparación de la curva de calibrado".

Preparación de la curva de calibrado:

- 1.- Pesar 0'2542 gramos de cloruro de sodio pa previamente desecado.
- 2.- Disolver en agua destilada exenta de CO₂.
- 3.- Transferir a matraz aforado de 1 litro, enrasar y homogeneizar.
- 4.- Transferir cantidades de solución madre de 5, 10, 25, 50 y 75 ml a matraces aforados de 100 ml. Enrasar con agua destilada y homogeneizar.
- 5.- Ajustar la respuesta 0 del aparato con agua destilada y la respuesta 100 con la disolución madre y leer las emisiones de las diferentes disoluciones de trabajo (es conveniente reajustar el 0 y el 100 antes de cada lectura).
- 6.- Construir la curva de calibrado, representando la emisión en ordenadas y la concentración de sodio en abscisas. Las concentraciones correspondientes de cada disolución de trabajo son:

ml disolución madre	conc. dis. trabajo (mg/ml)
5	0'005
10	0'010
25	0'025
50	0'050
75	0'075
sol. madre	0'100

En el caso (muy probable), de que la cantidad pesada de NaCl patrón no sea exactamente el mencionado (pero que en todo caso será un valor muy próximo), las concentraciones de trabajo serán las indicadas multiplicadas por el factor de corrección $s/0'2542$, siendo s el peso en gramos de patrón de NaCl.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en % de sodio:

$$\text{Na}(\%) = \frac{C \cdot V \cdot 100}{m}$$

siendo **C** la concentración que corresponde según la curva de calibrado, en mg/ml, **V** el volumen de disolución de la muestra y **m** el peso de la muestra en miligramos.

OBSERVACIONES

Si el contenido de sodio de la muestra es bajo, deberá diluirse la muestra a un volumen inferior a los 250 ml mencionados en la metodología.

Si el contenido de sodio fuese tan alto que al leer la emisión del problema el valor quedase fuera de la escala, tomaremos una porción de la disolución y la diluiremos más. En este caso, deberemos multiplicar la expresión del apartado anterior (cálculos), por el correspondiente factor de dilución.

Cuestionario 12.1. - Sodio por fotometría de llama

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 4.- Siempre debe construirse la curva de calibrado en la misma sesión de trabajo en que se determina el Na de la muestra: por qué?
- 5.- Idear un método alternativo de determinación de sodio por fotometría de llama, sin construcción de curva de calibrado (supondremos la linealidad de la respuesta).

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.1
HUMEDAD POR CENTRIFUGACIÓN EN GRASAS		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

El método no nos proporciona una idea rigurosamente exacta de la proporción de humedad, pero resulta apropiado si lo que nos interesa es tener una idea suficientemente aproximada de forma muy rápida del contenido de agua en un aceite o en una grasa líquida.

MATERIAL

Centrífuga eléctrica.
Placa agitadora con imán de teflón.
Probeta de 25 ml.
Tubos de centrífuga de 10 ml, graduados (2).
Vaso de pp de 250 ml.

METODOLOGÍA

- 1.- Transvasar unos 100 ml de muestra a un vaso de pp de 100 ml y agitar 1 minuto en placa agitadora.
- 2.- Transferir 2 porciones de 10 ml exactos a 2 tubos de centrífuga graduados, de 10 ml; centrifugar durante 5 minutos. El volumen centrifugado de agua nos proporciona una idea aproximada del contenido de humedad de la muestra.

Cuestionario 13.1.- Humedad por centrifugación (grasas)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.2
HUMEDAD POR DESECACIÓN EN GRASAS		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

El método determina la cantidad total de agua y materias volátiles a 105-110°C en grasas y aceites; utiliza un sencillo artificio para evitar la proyección de la muestra durante el proceso de desecación, consistente en mezclarla con arena.

MATERIAL

Balanza analítica.
Desecador.
Estufa de desecación.
Pesasubstancias.

REACTIVOS

Gel de sílice.
Arena lavada y desecada.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar un Pesasubstancias limpio y seco lleno hasta aproximadamente 1/3 de su capacidad de arena lavada y totalmente seca (por calefacción a temperatura superior a los 110°C).
- 2.- Pesar, en el Pesasubstancias con arena, unos 10 gramos de muestra.
- 3.- Desecar en estufa hasta peso constante, a 105°C.

CÁLCULOS

El resultado se expresa como "humedad y materias volátiles a 105°C":

$$H(\%) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100$$

en donde:

m1 = peso de pesasubstancias + arena

m2 = peso de pesasubstancias + arena + muestra (húmeda)

m3 = peso de pesasubstancias + arena + muestra (seca)

Cuestionario 13.2.- Húmeda por desecación (aceites y grasas)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.3
PUNTO DE FUSIÓN EN GRASAS		

OBJETO Y FUNDAMENTOS

Las grasas naturales no tienen punto de fusión neto y definido, sino que presentan un intervalo de fusión definido por dos temperaturas: la inicial o de ablandamiento fluido y la final, o de desaparición de la turbidez.

MATERIAL

Anillos de goma.

Quemador de Bunsen.

Lupa.

Pinzas y soportes.

Termómetro hasta 70°C, graduado en décimas de °C.

Tubo de Thiele

Tubos cerrados por un extremo de aproximadamente 1'5 mm de diámetro.

REACTIVOS

Ácido sulfúrico u otro líquido no volátil de alto punto de ebullición.

METODOLOGÍA

- 1.- Introducir una pequeña cantidad de grasa en el interior del tubo, ayudándonos de un hilo de platino o de acero inoxidable (también puede fundirse la grasa y meterla en el interior del tubo, por inmersión de este en la grasa); la columna de grasa será de 1 cm aproximadamente.
- 2.- Introducir el tubo con la grasa en el interior de un frigorífico durante unos minutos.
- 3.- Acoplar el tubo al termómetro, en las proximidades del bulbo, con ayuda de un anillo de goma.
- 4.- Introducir el conjunto termómetro-tubo en un tubo de Thiele, de tal forma que el bulbo quede entre las dos bifurcaciones del codo y que no toque las paredes del Thiele (es preciso un montaje apropiado con ayuda de pinzas, nueces y soporte).
- 5.- Acercar la llama del quemador Bunsen al codo del tubo de Thiele, manteniéndolo a la distancia suficiente para que el incremento de temperatura sea lento y controlable.
- 6.- Observar, con ayuda de una lupa, el aspecto del tubo que contiene la grasa. La temperatura inicial es aquella en que se observa una fluidez; la temperatura final es aquella en que desaparece la turbidez y el líquido se observa nítido.

Cuestionario 13.3. - Punto de fusión en grasas

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref 13.4
ACIDEZ EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se conoce como acidez o también como grado de acidez al contenido, en tanto por ciento, de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico.

El índice de acidez expresa los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar un gramo de materia grasa.

MATERIAL

Matraces erlenmeyer de 250 ml (2).

Pipetas de 25 ml (2).

Balanza analítica.

Bureta.

REACTIVOS

Alcohol etílico pa.

Éter etílico pa.

Fenolftaleína 1 % (disolver 1 gramo de Fenolftaleína en 100 ml de alcohol metílico pa)

Potasio hidróxido 0'1N sv etanólica

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar entre 5 i 7 gramos de grasa en un erlenmeyer de 250 ml.
- 2.- Disolver en 25 ml de alcohol etílico + 25 ml de éter etílico.
- 3.- Valorar, agitando continuamente, con disolución de potasio hidróxido 0'1N sv etanólica, hasta viraje del indicador a color rosado.
- 4.- Efectuar un ensayo en blanco con una mezcla éter + alcohol como la utilizada en el problema.

CÁLCULOS

Sea V el volumen de reactivo consumido en la valoración del problema, Vo el volumen de reactivo consumido en la valoración del blanco y m el peso de la muestra en gramos.

El grado de acidez se expresa como el % de ácidos grasos expresados en ácido oleico:

$$\text{grado de acidez} = \frac{2'825 \cdot (V - V_0)}{m}$$

El índice de acidez es la cantidad, en miligramos, de hidróxido de potasio necesario para neutralizar un gramo de grasa:

$$\text{índice de acidez} = \frac{5'61 \cdot (V - V_0)}{m}$$

OBSERVACIONES

Para muestras con grado de acidez superior a 2, es conveniente utilizar hidróxido de potasio sv 0'5N etanólica en lugar de 0'1N; en ese caso, en los cálculos deben multiplicarse las expresiones anteriores por el factor de corrección 5.

Si la grasa a analizar tiene un color intenso (como es el caso de ciertos aceites de pescado en bruto o de residuos de aceite de ballena u otros casos), debe utilizarse un pHmetro como medio de indicación del punto final.

Cuestionario 13.4. - Acidez en grasas

- 1.- Escribir la reacción que tiene lugar durante la valoración.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente las fórmulas del apartado "cálculos".
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.5
RESIDUO SÓLIDO EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El objetivo es la determinación de los residuos sólidos insolubles en éter etílico i alcohol.

MATERIAL

Balanza analítica.
Desecador.
Embudo cónico.
Erlenmeyer de 250 ml
Estufa de desecación.
Papel de filtro.
Probeta de 25 ml.
Varilla de vidrio.
Vaso de pp de 100 ml.

REACTIVOS

Alcohol etílico pa.
Éter etílico pa.
Gel de sílice (para el desecador)

METODOLOGÍA

- 1.- Poner un papel de filtro durante unos minutos en la estufa de desecación a 105°C, guardar en el desecador $\frac{1}{2}$ hora y pesar.
- 2.- Pesar, en un vaso de pp de 100 ml, alrededor de 10 gramos de muestra y disolver en 50 ml de mezcla de éter y alcohol a partes aproximadamente iguales.
- 3.- Filtrar sobre un erlenmeyer, lavando el vaso con un poco de mezcla éter-alcohol.
- 4.- Lavar el filtro con pequeñas porciones de mezcla éter-alcohol hasta que quede desengrasado.
- 5.- Poner el filtro en la estufa durante 10 minutos, con cuidado de no perder el residuo, y después durante $\frac{1}{2}$ hora en el desecador.
- 6.- Pesar el filtro con el residuo.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en tanto por ciento de residuo sólido insoluble:

$$\%(\text{residuo}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \cdot 100$$

En que m_1 es el peso del papel de filtro, m_2 el peso del papel de filtro con el residuo i m el peso de la muestra.

Cuestionario 13.5. - Residuo sólido en grasas

- 1.- Realizar el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente las fórmulas del apartado "cálculos".
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.6
ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El índice de saponificación se define como el peso en miligramos de hidróxido de potasio necesario para saponificar 1 gramo de grasa.

Si la grasa es aceptablemente pura, el método constituye un sistema de clasificación de los aceites y grasas, puesto que el índice de saponificación está inversamente relacionado con la longitud de los ácidos grasos constituyentes de los glicéridos de la grasa.

El método es aplicable a aceites y grasas con un contenido de ceras no superior al 5 %.

MATERIAL

Balanza analítica.

Bureta.

Matraces erlenmeyer de 250 ml, esmerilado 29/32 (2).

Pipeta aforada de 25 ml.

Placas calefactoras (2)

Refrigerantes de reflujo, esmerilado 29/32 (2)

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 0'5N sv

Potasio hidróxido 0'5N sv etanólica

Fenolftaleína sol. al 1 %.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente alrededor de 2 gramos de muestra en un erlenmeyer de 250 ml esmerilado.
- 2.- Añadir 25 ml exactos de potasio hidróxido 0'5N sv etanólica i adaptar el refrigerante de reflujo.
- 3.- Llevar a ebullición y mantenerla durante 60 minutos.
- 4.- Retirar de la fuente de calor y añadir 4 o 5 gotas de indicador de Fenolftaleína; valorar cuando todavía está caliente con la disolución de HCl 0'5N sv.
- 5.- Realizar un ensayo en blanco en las mismas condiciones.

CÁLCULOS

El resultado representa los miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar 1 gramo de grasa, y se expresa como "Índice de saponificación":

$$\text{Índice de saponificación} = \frac{56.1 \cdot N \cdot (V - V')}{m}$$

en donde:

N = Normalidad de la disolución de ácido clorhídrico utilizada

V = Volumen utilizado (en ml) de disolución de ácido clorhídrico en el ensayo en blanco.

V' = Volumen utilizado (en ml) de disolución de ácido clorhídrico en el ensayo de la muestra.

OBSERVACIONES

Algunas grasas de difícil saponificación necesitan un tiempo de reflujo superior a los 60 minutos.

Cuestionario 13.6. - Índice de saponificación en grasas

- 1.- Escribir la reacción de saponificación (subapartados 2 y 3 de la metodología).
- 2.- Escribir la reacción de valoración (subapartado 4 de la metodología).
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Deducir razonadamente la fórmula del apartado "cálculos".
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.7
ÍNDICE DE YODO EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El índice de yodo de una grasa depende de su grado de insaturación (el yodo se fija en los enlaces insaturados de las cadenas de glicéridos).

Se determina añadiéndole a la muestra un exceso de reactivo halogenado y valorando el reactivo excedente.

MATERIAL

Balanza analítica

Bureta.

Erlenmeyers de 250 ml, esmerilado 29/32, con tapón (2)

Frasco lavador.

Pipeta aforada de 10 ml.

Pipeta aforada de 25 ml.

Probeta de 10 ml.

Probeta de 100 ml.

REACTIVOS

Agua destilada

Almidón soluble (disolver en agua caliente, hasta ebullición).

Yoduro de potasio 10 % p/v (disolver 50 gramos de yoduro de potasio pa, exento de yodo y yodatos hasta 500 ml en agua destilada)

Tetracloruro de carbono pa inerte al reactivo de Hanus.

Tiosulfato de sodio 0'1N sv

Reactivo de Hanus 0'2N re.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar una cantidad de muestra entre 0'2 y 0'25 gramos, exenta de humedad, en matraz erlenmeyer de 250 ml, esmerilado.
- 2.- Disolver la muestra en 10 ml de tetracloruro de carbono.
- 3.- Añadir rápidamente 25 ml exactos de reactivo de Hanus.
- 4.- Tapar rápidamente y mezclar con agitación suave. Dejar reposar en la oscuridad durante 1 hora, agitando de vez en cuando..
- 5.- Añadir 20 ml de yoduro de potasio al 10 % y 100 ml de agua. Mezclar.
- 6.- Valorar con tiosulfato de sodio 0'1N, agitando constantemente, añadir el indicador de

disolución de almidón soluble un poco antes de finalizar la valoración (viraje por decoloración).
7.- Realizar una prueba en blanco en idénticas condiciones.

CÁLCULOS

El índice de yodo es el peso de yodo absorbido por cien partes en peso de grasa y se expresa como "índice de yodo":

$$\text{Índice de yodo} = \frac{(V - V')}{m} \cdot 1269$$

OBSERVACIONES

Si no se dispone de reactivo de Hanus, puede prepararse disolviendo 10 gramos de yodo monobromuro prs en 500 ml de ácido acético glacial pa (guardar en frasco topacio).

Cuestionario 13.7.- Índice de yodo en grasas

- 1.- Escribir la reacción de fijación del yodo en los enlaces insaturados.
- 2.- ¿Cual es la función del yoduro de potasio en este procedimiento?
- 3.- Escribir la reacción de valoración (subapartado 6 de la metodología)
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Deducir razonadamente la fórmula del apartado "cálculos".
- 6.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.8
ÍNDICE DE PERÓXIDOS EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Llamamos "*índice de peróxidos*" a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un Kilogramo de grasa, calculados a partir del yodo liberado del yoduro de potasio, operando en las condiciones especificadas según la metodología analítica.

Las sustancias que oxidan al yoduro de potasio en las condiciones descritas, las consideramos peróxidos u otros productos similares provenientes de la oxidación de las grasas, por lo cual el índice obtenido es considerado, con una aproximación bastante aceptable, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la grasa muestra.

MATERIAL

Balanza analítica.

Bureta.

Frasco lavador

Matraces erlenmeyer esmerilados 29/32, con tapón (2).

Probeta de 10 ml.

Probeta de 100 ml.

Probeta de 25 ml

REACTIVOS

Disolución acuosa extemporánea de tiosulfato de sodio 0'01N, preparada a partir de tiosulfato de sodio 0'1N sv (10 ml hasta 100 ml).

Solución indicadora de almidón al 1 %.

Disolución saturada de yoduro de potasio (preparación extemporánea a partir de yoduro de potasio pa).

Agua destilada.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar una cantidad adecuada de grasa en un matraz erlenmeyer limpio y seco.
- 2.- Añadir 10 ml de cloroformo pa i disolver rápidamente la grasa por agitación; añadir 15 ml de ácido acético glacial pa y 1 ml de disolución saturada de yoduro de potasio.
- 3.- Tapar el matraz y agitar suavemente por rotación durante 1 minuto; dejar reposar 5 minutos en un lugar oscuro.
- 4.- Añadir 75 ml de agua destilada, sacudir con energía y valorar el yodo liberado con disolución de tiosulfato de sodio 0'01N, utilizando disolución de almidón como indicador.
- 5.- Paralelamente, efectuar un ensayo en blanco.

CÁLCULOS

El índice de peróxidos (IP) se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra:

$$IP = \frac{(V - V') \cdot N \cdot 1.000}{m}$$

en donde:

V = volumen de disolución de tiosulfato de sodio, en ml, consumido en el ensayo de la muestra.

V' = volumen de disolución de tiosulfato de sodio, en ml, consumido en el blanco.

N = normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio.

m = peso, en gramos, de la muestra.

OBSERVACIONES

La cantidad de muestra a pesar será:

índice supuesto	peso muestra (gramos)
0 - 20	1'2 - 2
20 - 30	0'8 - 1'2
30 - 50	0'5 - 0'8
50 - 100	0'3 - 0'5

Para aceites de índices inferiores a 20, es recomendable utilizar tiosulfato de sodio 0'002N.

Cuestionario 13.8. - Índice de peróxidos en grasas

- 1.- Escribir la reacción entre los peróxidos y el yoduro de potasio.
- 2.- Escribir la reacción de valoración (subapartado 4 de la metodología).
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Deducir razonadamente la fórmula del apartado "cálculos". Deducir, además, otra para índices de yodo bajos (utilizando tiosulfato de sodio 0'002N).
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.9
FRACCIÓN INSAPONIFICABLE EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Fracción insaponificable de una grasa es el peso en gramos de sustancias no saponificables, insolubles en agua y solubles en el disolvente empleado en la determinación, contenidos en 100 gramos de grasa.

El método descrito es satisfactorio para grasas de contenido insaponificable bajo y medio.

MATERIAL

Balanza analítica.
Baño de agua.
Desecador.
Embudos de decantación de 500 ml.
Estufa de desecación.
Frasco lavador.
Matraces esmerilados 29/32 de 250 ml (2)
Montaje para destilación.
Placa calefactora.
Probeta de 25 ml.
Probeta de 50 ml.
Refrigerante de reflujo.

REACTIVOS

Agua destilada.
Alcohol etílico del 96% pa.
Éter de petróleo pe 40-60 °C pa.
Gel de sílice.
Hidróxido de potasio 2N, sol. alcohólica (disolver 28'3 gramos de hidróxido de potasio del 85 % en lentejas pa. hasta 250 ml en alcohol etílico del 96 % pa).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente alrededor de 5 gramos de grasa exento de humedad en un matraz esmerilado 29/32.
- 2.- Añadir 50 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio 2N y dejar 1 hora a reflujo suave.
- 3.- Separar la fuente de calor y añadir 50 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante ; sacudir y dejar enfriar.
- 4.- Transvasar el contenido del matraz a un embudo de decantación, lavando el matraz con

pequeñas porciones de éter de petróleo, hasta totalizar 50 ml.

5.- Agitar enérgicamente durante 1 minuto. Dejar en reposo para separar las dos fases. Pasar la fase jabonosa hidroalcohólica otro embudo de decantación .

6.- Extraer la fase jabonosa del segundo embudo de decantación con 50 ml de éter de petróleo; separar las dos fases, transfiriendo la fase jabonosa al matraz de reflujo y la fase etérea al primer embudo de decantación.

7.- Pasar la fase jabonosa del matraz de reflujo al segundo embudo de decantación, lavando con 50 ml de éter de petróleo; hacer otra extracción.

8.- Rechazar la fase jabonosa y reunir todas las fases etéreas en el primer embudo de decantación. Lavar tres veces con porciones de 50 ml de alcohol-agua (1:1).

9.- Transferir la fase etérea a un matraz de 250 ml esmerilado 29/32, seco i previamente tarado y eliminar el disolvente por destilación al baño de agua hirviente (sugerencia: utilizar un montaje Shoxlet, para mayor comodidad).

10.- Secar en estufa a 105°C durante 20 minutos y enfriar en desecador. Repetir la operación hasta peso constante.

CÁLCULOS

Resultado expresado en % de fracción insaponificable:

$$\text{Insaponificable(\%)} = \frac{100 \cdot m'}{m}$$

siendo m' el peso del residuo insaponificable y m el peso de la muestra.

OBSERVACIONES

En los certificados de análisis debe indicarse "*método del éter de petróleo*".

Cuestionario 13.9. - Fracción insaponificable en grasas

- 1.- Escribir la reacción de saponificación de una grasa.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 13.10
ÁCIDOS OXIDADOS EN GRASAS		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Este método determina los ácidos oxidados en una grasa, expresados como materia grasa insoluble en éter de petróleo.

MATERIAL

Balanza analítica.
Baño de agua.
Cápsula de porcelana.
Mechero Bunsen.
Desecador.
Embudos de decantación (2).
Estufa de desecación.
Frasco lavador.
Horno de mufla,
Matraces esmerilados 29/32 de 250 ml (2).
Placa calefactora.
Probeta de 100 ml.
Probeta de 25 ml.
Probeta de 50 ml
Refrigerante de reflujo.
Triángulo cerámico.

REACTIVOS

Acido clorhídrico 1N sv.
Agua destilada.
Alcohol etílico neutro 96 % pa.
Éter de petróleo 40-60°C bidestilado pa.
Éter etílico pa.
Gel de sílice.
Hidróxido de potasio 2N sv alcohólica (para su preparación, consultar la práctica 13.9).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente alrededor de 5 gramos de grasa exenta de agua en un matraz esmerilado 29/32 de 250 ml.
- 2.- Añadir 50 ml de disolución alcohólica de hidróxido de potasio 2N y dejar 1 hora a reflujo suave.

- 3.- Separar la fuente de calor añadir 25 ml de agua destilada por la parte superior del refrigerante ; sacudir y dejar enfriar.
- 4.- Transvasar el contenido del matraz a un embudo de decantación, lavando con 25 ml de agua destilada y 100 ml de éter etílico pa.
- 5.- Tapar y sacudir durante 1 minuto. Dejar reposar para separar dos capas. Si aparece una emulsión persistente, añadir unas gotas de ácido clorhídrico 1N sv.
- 6.- Separar la capa hidroalcohólica y transferirla al matraz de saponificación; pasar la capa etérea a un segundo embudo de decantación y lavarla dos veces con porciones de 40 ml de agua destilada; juntar las aguas de lavado con la fracción hidroalcohólica
- 7.- Conectar el matraz de la fase hidroalcohólica y de las aguas de lavado del éter a un montaje para destilación (puede servir un Shoxlet) y evaporar hasta eliminación del alcohol etílico y de las trazas de éter (apreciar con el olfato).
- 8.- Trasvasar el contenido del matraz a un embudo de decantación, arrastrar el residuo con agua destilada hasta totalizar un volumen aproximado de 150 ml.
- 9.- Añadir disolución de ácido clorhídrico 1N sv hasta que no quede espuma después de sacudir durante 2 minutos (comenzar inicialmente con 51 ml de solución ácida).
- 10.- Añadir 100 ml de éter de petróleo y sacudir 1 minuto; dejar reposar un mínimo de 12 horas.
- 11.- Decantar el agua ácida y filtrar la fracción etérea sobre un filtro lento.
- 12.- Lavar dos veces el tubo de decantación con 25 ml de éter de petróleo y filtrar (si es preciso, efectuar más lavados con pequeñas porciones).
- 13.- Disolver los ácidos oxidados contenidos en el tubo decantación y en el filtro con alcohol etílico caliente (3 o 4 lavados con porciones de 25 ml) y transferir la solución alcohólica de ácidos oxidados a un matraz esmerilado 29/32 de 250 ml.
- 14.- Evaporar el alcohol hasta un volumen muy pequeño (unos pocos ml).
- 15.- Transvasar el residuo a una cápsula de porcelana calcinada y tarada, lavando con pequeñas porciones de éter etílico.
- 16.- Evaporar en baño de agua, hasta desaparición del olor a éter y a alcohol y aparición de olor acre.
- 17.- Desechar en estufa a 103°C durante 1/2 hora; enfriar en desecador. Repetir el proceso hasta peso constante.
- 18.- Calcinar el residuo (para determinar las sales minerales extraídas conjuntamente con los ácidos oxidados), dejar enfriar la cápsula en el desecador y pesar.

CÁLCULOS

Resultado expresado en % de ácidos oxidados:

$$\text{Ácidos oxidados (\%)} = \frac{100 \cdot (m' - m'')}{m}$$

en donde:

m' = peso en gramos de ácidos oxidados + sales minerales.

m'' = peso en gramos de las sales minerales.

m = peso en gramos de la muestra.

OBSERVACIONES

El método tiene un carácter eminentemente empírico y debe observarse estrictamente la metodología descrita. Cualquier modificación que se ensaye debe ser rigurosamente verificada y contratada.

Cuestionario 13.10.- Ácidos oxidados en grasas

- 1.- ¿Que tipo de compuestos pueden originarse por oxidación de los ácidos grasos?; escribir la fórmula de unos cuantos.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 15.1
IDENTIFICACIÓN DE ALMIDÓN (EN CÁRNICOS)		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

El almidón es identificable por dar coloración azul con el yodo.

MATERIAL

Balanza granataria.
Frasco cuentagotas.
Frasco lavador.
Matraz erlenmeyer de 100 ml.
Pipeta de 10 ml.
Placa calefactora.
Tubo de ensayo de 30 ml.

REACTIVOS

Agua destilada.
Solución yodo-yodurada (mezclar 1 gramo de yodo resublimado prs y 2 gramos de yoduro de potasio pa en agua destilada hasta 200 ml. Guardar en frasco cuentagotas).

METODOLOGÍA

Partir de muestra triturada:

- 1.- Introducir unos 10 grs de muestra finamente triturada en un erlenmeyer de 100 ml.
- 2.- Añadir unos 40 ml de agua destilada y llevar a ebullición; mantener la ebullición unos 5 minutos y después enfriar exteriormente el matraz al chorro de agua fría.
- 3.- Tomar 10 ml del líquido inferior, con una pipeta a través de la capa grasa superior, y pasarlos a un tubo de ensayo.
- 4.- Añadir 5 ml de disolución yodo-yodurada; **coloración azul (o azul-negra) indica ensayo positivo.**

Cuestionario 15.1.- Identificación de almidón en productos cárnicos

- 1.- Escribir la reacción que tiene lugar en el subapartado 4 de la metodología.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 15.2
AZÚCARES REDUCTORES		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Azúcares reductores son aquellos que, como la glucosa, fructosa, lactosa y maltosa presentan un carbono libre en su estructura y pueden reducir, en determinadas condiciones, a las sales cúpricas.

El método analítico se basa en la eliminación de todas las materias reductoras que no sean azúcares mediante defecación con los reactivos Carrez I y II, previa dilución de los azúcares en medio hidroetanólico y valoración de los azúcares reductores según el método de Luff.

MATERIAL

Agitador mecánico.
Balanza analítica.
Quemador Bunsen.
Bureta de 25 ml.
Embudo cónico.
Frasco lavador.
Frascos cuentagotas.
Matraz aforado de 200 ml,
Matraz aforado de 250 ml
Matraces erlenmeyer esmerilados de 250 ml (2),
Papel de filtro,
Pipeta aforada de 10 ml,
Pipetas aforadas de 25 ml (2),
Pipetas aforadas de 5 ml (2),
Pipetas graduadas de 25 ml (2),
Placa calefactora,
Probeta de 250 ml,
Refrigerante de reflujo.
Reloj.
Tela metálica con agujero central de 6 cm de diámetro.

REACTIVOS

Etanol al 40 % v/v.
Disolución de Carrez I (disolver 24 gramos de acetato de zinc pa y 3 gramos de ácido acético glacial pa en agua destilada hasta 100 ml).
Disolución de Carrez II (disolver 10'6 gramos de ferrocianuro potásico trihidrato pa y añadir agua destilada hasta 100 ml).
Tiosulfato de sodio 0'1N sv.

Disolución de almidón soluble al 1%
 Disolución de ácido sulfúrico 6N.
 Disolución de yoduro de potasio al 30 % p/v
 Piedra pómez granulada.
 Alcohol iso-amílico pa.
 Reactivo de Luff de.
 Agua destilada.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar 2'5 gramos de muestra e introducirla en un matraz aforado de 250 ml.
- 2.- Añadir 200 ml de etanol al 40 %(v/v) y mezclar durante 1 hora en agitador mecánico.
- 3.- Añadir 5 ml de disolución de Carrez I y agitar 1 minuto.
- 4.- Añadir 5 ml de disolución de Carrez II y agitar 1 minuto.
- 5.- Enrasar a 250 ml con disolución etanólica; homogeneizar y filtrar.
- 6.- Tomar 200 ml del filtrado y evaporar hasta reducir el volumen aproximadamente a la mitad.
- 7.- Transferir el residuo a un matraz aforado de 200 ml, lavando con agua caliente; enfriar, enrasar con agua destilada y filtrar en el caso de apreciar turbidez.
- 8.- Tomar 25 ml del reactivo de Luff y pasar a un erlenmeyer esmerilado de 250 ml. Añadir una cantidad de la disolución del problema preparada en el punto 7 que no contenga más de 60 mg de azúcares reductores y cuyo volumen no sobrepase los 25 ml; añadir agua en cantidad suficiente para completar los 25 ml de disolución problema.
- 9.- Añadir algo de piedra pómez y calentar con agitación.
- 10.- Situar rápidamente el erlenmeyer sobre una tela metálica con un agujero de unos 6 cm de diámetro y calentar, regulando la llama de manera que solamente se caliente la base del erlenmeyer; acoplar inmediatamente un refrigerante de reflujo hervir durante 10 minutos exactos.
- 11.- Enfriar inmediatamente al chorro de agua fría durante 5 minutos.
- 12.- Añadir 10 ml de disolución de yoduro potásico; seguidamente, y con cuidado, añadir 25 ml de ácido sulfúrico 6N.
- 13.- Valorar con disolución de tiosulfato de sodio 0'1N hasta aparición de coloración amarillenta; añadir un chorrillo de disolución de almidón y terminar la valoración.
- 14.- Efectuar un ensayo en blanco, sin hervir, con 25 ml de reactivo de Luff, 25 ml de agua, 10 ml de disolución de yoduro de potasio y 25 ml de disolución de ácido sulfúrico.

CÁLCULOS

Establecer, mediante la tabla adjunta, la cantidad de glucosa en miligramo que corresponde a la diferencia de los volúmenes de tiosulfato consumido en las dos valoraciones.

El resultado se expresa en % de azúcares reductores, expresados en glucosa:

$$\text{Azúcares reductores} = \frac{25.000 \cdot q}{v \cdot m}$$

siendo **q** los miligramos de glucosa según la tabla adjunta, **v** el volumen de la muestra en la valoración **i** **m** el peso de la muestra en miligramos.

OBSERVACIONES

Si durante la ebullición se formase una exagerada cantidad de espuma, añadir 1 ml de alcohol isoamílico (por la parte superior del refrigerante).

Reservar el resto del líquido obtenido en el punto 7 y que no se utiliza, para la determinación de azúcares totales (práctica 15.3).

Para 25 ml de reactivo de Luff-Schoorl:

tiosulfato 0'1N	glucosa - fructosa		lactosa		maltosa	
	ml	mg	inc.	mg	inc.	mg
1	02'4	2'4	03'6	3'6	03'9	3'9
2	04'8	2'4	07'3	3'7	07'8	3'9
3	07'2	2'5	11'0	3'7	11'7	3'9
4	09'7	2'5	14'7	3'7	15'6	3'9
5	12'2	2'5	18'4	3'7	19'6	3'9
6	14'7	2'5	22'1	3'7	23'5	4'0
7	17'2	2'6	25'8	3'7	27'5	4'0
8	19'8	2'6	29'5	3'7	31'5	4'0
9	22'4	2'6	33'2	3'8	35'5	4'0
10	25'0	2'6	37'0	3'8	39'5	4'0
11	27'6	2'7	40'8	3'8	43'5	4'0
12	30'3	2'7	44'6	3'8	47'5	4'1
13	33'0	2'7	48'4	3'8	51'6	4'1
14	35'7	2'8	52'2	3'8	55'7	4'1
15	38'5	2'8	56'0	3'9	59'8	4'1
16	41'3	2'9	59'9	3'9	63'9	4'1
17	44'2	2'9	63'8	3'9	68'0	4'2
18	47'1	2'9	67'7	4'0	72'2	4'3
19	50'0	3'0	71'7	4'0	76'5	4'4
20	53'0	3'0	75'7	4'1	80'9	4'5
21	56'0	3'1	79'8	4'1	85'4	4'6
22	59'1	3'1	83'9	4'1	90'0	4'6
23	62'2		88'0		94'6	

Cuestionario 15.2. - Azúcares reductores

- 1.- Escribir las reacciones que tienen lugar en los subapartados 8 al 13 (inclusive) de la metodología
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 15.3
AZÚCARES TOTALES		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Eliminación de todas las materias reductoras que no sean azúcares mediante defecación con los reactivos de Carrez I y II, previa dilución de los azúcares en medio hidroetanólico Valoración de los azúcares según el método de Luff, previa inversión de todos ellos.

MATERIAL

(Además del necesario para la práctica 15.2)

Baño de agua.

Matraz aforado de 50 ml.

Pipeta aforada de 25 ml

Pipetas graduadas de 20 ml (2)

REACTIVOS

(Además de los necesarios para la práctica 15.2)

Ácido clorhídrico 0'1N sv.

Ácido clorhídrico 4N (1 parte de HCl con. pa y 2 partes de agua destilada)

Disolución de rojo de metilo al 0'1% en alcohol.

Hidróxido de sodio 0'1N sv.

METODOLOGÍA

- 1.- Proceder como en los puntos 1 al 7 de la práctica 15.2.
- 2.- Tomar 50 ml de la disolución anterior y llevar a un matraz aforado de 100 ml; añadir unas gotas de disolución de rojo de metilo i, lentamente, ácido clorhídrico 4N hasta viraje al rojo.
- 3.- Añadir 15 ml de ácido clorhídrico 0'1N y sumergir en baño de agua a ebullición durante 30 minutos.
- 4.- Enfriar hasta temperatura ambiente y añadir 15 ml de disolución de hidróxido de sodio 0'1N; enrasar a 100 ml con agua y homogeneizar.
- 5.- Proceder como en los puntos 8 al 14 de la práctica 15.2.

CÁLCULOS

Establecer, mediante la tabla adjunta en la práctica 15.2, la cantidad de glucosa en miligramos. El resultado se expresa en % de azúcares totales, expresados en glucosa:

$$\text{Azúcares totales (\%)} = \frac{50.000 \cdot q}{v \cdot m}$$

siendo **q** los miligramos de glucosa según la tabla, **v** el volumen de la muestra en la valoración y **m** el peso de la muestra en miligramos.

OBSERVACIONES

Si durante la ebullición se formase una exagerada cantidad de espuma, añádase 1 ml de alcohol isoamílico (por la parte superior del refrigerante).

Puede expresarse el resultado en sacarosa, multiplicando la expresión en glucosa por el factor 0'95.

El tanto por ciento de sacarosa es igual a la diferencia entre los azúcares totales y los reductores, expresados en glucosa y multiplicado por el factor 0'95.

Cuestionario 15.3. - Azúcares totales

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 15.4
ALMIDÓN (ESPECTROFOTOMETRÍA)		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Eliminación de los azúcares por extracción, solubilización del almidón y reacción colorimétrica con reactivo de antrona.

MATERIAL

Balanza analítica.
Baño de agua con regulación de temperatura.
Centrífuga.
Embudo cónico.
Espectrofotómetro.
Frasco lavador.
Escala.
Matraz aforado de 200 ml.
Matraz erlenmeyer de 100 ml.
Matraces aforados de 100 ml (8)
Papel de filtro.
Papel milimetrado.
Pipetas de 5 ml.
Tubos de ensayo de 20 ml.
Tubos de centrífuga de 100 ml, con tapón esmerilado.
Tubos para espectrofotómetro.

REACTIVOS

Ácido perclórico del 52% (preparado a partir de ácido perclórico del 60% pa y agua destilada).
Agua destilada.
Alcohol etílico al 80 % (a partir de alcohol etílico del 96% pa y agua destilada).
Alcohol etílico del 96 % pa.
Éter de petróleo 50-70°C pa.
Reactivo de antrona (preparación extemporánea, máximo 4 días a 0°C; disolver 0'2 gramos de antrona pa en 100 ml de ácido sulfúrico del 96% pa).

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar entre 0'4 y 2 gramos de muestra (según sea el supuesto contenido de almidón) en un erlenmeyer de 100 ml.
- 2.- Añadir 25 ml de disolución alcohol-éter, tapar y sacudir con energía durante 3 o 4 minutos.

- 3.- Pasar a un tubo de centrífuga de 100 ml, lavando con un poco de alcohol-éter y centrifugar; decantar y reservar la disolución alcohol-éter.
- 4.- Añadir 10 ml de alcohol etílico caliente al 80 %, sacudir y centrifugar; decantar y reservar la disolución alcohólica. Repetir la extracción con alcohol.
- 5.- Añadir 5 ml de agua destilada y agitar.
- 6.- Añadir 6'5 ml de disolución de ácido perclórico al 52% y agitar durante 5 minutos; dejar reposar 15 minutos.
- 7.- Añadir 20 ml de agua destilada y centrifugar. Pasar el líquido a un matraz aforado de 100 ml.
- 8.- Repetir los pasos 5 y 6, pero dejando reposar 30 minutos.
- 9.- Transferir todo (líquido y residuo) al matraz aforado, agitar, enrasar y homogeneizar.
- 11.- Filtrar; tomar 5 ml de filtrado y transferir a un matraz aforado de 200 ml, enrasar y homogeneizar .
- 12.- Pipetear 5 ml de la disolución anterior a un tubo i añadir 10 ml de reactivo de antrona; mezclar y calentar durante 5 minutos en baño de agua a 100°C; enfriar a continuación a temperatura ambiente y determinar la absorbancia a 630 nm frente a un blanco con agua y reactivo, antes de que pasen 30 minutos.

Curva patrón de glucosa

- 1.- Preparar una disolución madre de glucosa, disolviendo 0'1 gramos de D(+)- glucosa anhidra pa hasta 100 ml en agua destilada.
- 2.- Preparar disoluciones de trabajo disolviendo 1, 2, 5, 7 i 10 ml de disolución madre de glucosa hasta 100 ml en agua destilada; las concentraciones correspondientes son de 0'01, 0'02, 0'05, 0'07 y 0'10 mg/ml.
- 3.- Proceder con cada disolución de trabajo como en el punto 12 de la metodología y construir una curva de calibrado, representando las concentraciones de glucosa (abscisas) frente la absorbancia (ordenadas).

CÁLCULOS

Determinar la concentración correspondiente de glucosa en la curva de calibrado, expresándolo en glucosa equivalente.

$$\text{Almidón (\%)} = \frac{400 \cdot C}{m}$$

C = concentración de glucosa en la curva de calibrado en mg/ml.

m = masa de muestra en gramos.

OBSERVACIONES

Para muestras con un contenido alto de azúcares, es preciso repetir más veces las extracciones de los primeros pasos.

Si queremos expresar el resultado como "almidón real", deberá considerarse que el factor de conversión glucosa/almidón es de 1'06

Cuestionario 15.4. - Almidón (espectrofotometría)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 16.1
ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DEL VINO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Análisis basado en la observación visual y olfativa y degustación del vino.

MATERIAL

Copas de cristal fino, incoloras y perfectamente transparentes, de forma ovoide o de tulipa.
Servilleta.
Cuchillo pequeño.
Sacacorchos de espiral.

METODOLOGÍA

- 1.- Sacar los precintos del tapón, cortando alrededor del cuello de la botella y a medio dedo de la boca de la misma; limpiar la boca de la botella con una servilleta limpia y inodora.
- 2.- Extraer el tapón, con ayuda del sacacorchos, con cuidado de no atravesarlo y tirar una pequeña porción del vino (para eliminar eventuales restos del corcho).
- 3.- Llenar la copa a 1/3 de su capacidad, observando si se forman burbujas más o menos persistentes (anotar); sostener la copa por la base, utilizando los dedos pulgar, índice y central.
- 4.- Apreciar visualmente el color.
- 5.- Agitar el vino en la copa y observar el aspecto y características de la espuma formada.
- 6.- Observar si el vino es turbio, claro o brillante y la presencia de depósitos (prueba de nitidez).
- 7.- Agitar con suavidad, haciendo girar el vino y oler, apreciando y caracterizando el olor.
- 8.- Catar el vino, sin apurar la copa, haciéndolo deslizar suavemente por la lengua y dejándolo unos segundos en el interior de la boca antes de tragarlo o escupirlo.
- 9.- Si hay que realizar otros análisis organolépticos, enjuagarse la boca con agua mineral.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Utilizar las siguientes calificaciones de color para vinos tintos o rojos:

- *rojo rubí*
- *morado*
- *cebolla*
- *viraje amarillento.*

Según la intensidad del color, el vino tinto se clasifica en:

- *negro* (también llamado *tinto*)
- *rosado*
- *clarete*

según tenga más o menos color dentro de estas clasificaciones, diremos que tiene *mucha* o *poca* *capa*.

En vinos blancos, utilizar las siguientes nomenclaturas de color:

- *verde*
- *casi incoloro*
- *amarillo*
- *dorado*
- *ambarino*
- *paja*
- *paja oscura (ó rancia)*

Formación de espuma; observar la cantidad, la persistencia y el color.

Los pasos 7 y 8 de la metodología consisten en la "*degustación o cata*"; deben consignarse:
olores:

vinoso, afrutado, floral, joven, ácido, intenso, suave, amaderado, así como olores que puedan denotar defectos o alteraciones.

paladar:

con cuerpo, aterciopelado, ligero, fresco, ácido, agrio, etc.

La apreciación aproximada del grado alcohólico se hace en la degustación, así como la del tiempo, si bien en esta última apreciación también Puede ayudar la observación visual.

OBSERVACIONES

Si hay que efectuar una cantidad relativamente alta (más de 3 ó 4) de análisis organolépticos, no debe ingerirse el vino, a fin de evitar alteraciones en la capacidad analítica del laborante.

Deberán abstenerse de efectuar esta práctica aquellas personas que sufran alguna patología en que el vino resulte contraindicado (alcoholismo, hepatopatias, etc...)

Durante las horas anteriores al análisis organoléptico no se deben comer huevos ni queso, ni beber ningún tipo de bebida alcohólica, ni fumar ni tomar ningún alimento o bebida que dejen sabor persistente.

Cuestionario 16.1. - Análisis organoléptico del vino

1.- Por qué no deben comerse huevos durante las horas inmediatamente anteriores a la práctica?

2.- Por qué no debe comerse queso durante les horas inmediatamente anteriores a la práctica?

3.- Hacer un informe ("nota de cata") para cada uno de los vinos analizados donde se hará constar (no utilizar boletines de análisis; hacerlo en hojas corrientes de papel):

color y intensidad del color

capa del color

cantidad, persistencia y color de la espuma (si la hay)

olores

paladar

apreciación aproximada del grado alcohólico.

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 16.2
TÍTULO ALCOHOMÉTRICO DEL VINO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se define el título alcohométrico como la cantidad de litros de alcohol contenidos en 100 litros de vino, medidos ambos a la temperatura de 20°C.

Se determina por destilación simple del vino, en medio alcalino (para evitar arrastres de la acidez volátil) y determinando el contenido alcohólico del destilado mediante medición de su densidad.

MATERIAL

Aerómetro.

Frasco lavador.

Matraz aforado de 250 ml.

Montaje por destilación, completo, con columna rectificadora.

Pipeta de 10 ml.

Probeta de 250 ml.

REACTIVOS

Agua destilada.

Lechada de cal (120 gramos de óxido de calcio escoriforme por hasta 1000 ml en agua destilada).

Papel indicador.

Piedra pómez.

METODOLOGÍA

- 1.- Medir 250 ml de vino en matraz aforado y anotar la temperatura.
- 2.- Introducir el vino en un matraz de destilación, con unos trocitos de piedra pómez, lavando 3 ó 4 veces el matraz aforado con pequeñas porciones de agua destilada.
- 3.- Añadir 10 ml de lechada de cal. Tomar una gota con una varilla de vidrio y comprobar la alcalinidad con papel indicador; si el medio no es alcalino, añadir más lechada de cal.
- 4.- Montar el equipo de destilación y destilar, recogiendo el destilado en el mismo matraz aforado utilizado para medir el vino, previamente lavado con agua destilada, conteniendo unos 20 ml de agua destilada, en la cual se sumerge el pico de un tubo-alargadera desde el extremo de salida del refrigerante.
- 5.- Destilar hasta obtener un volumen, como mínimo, de unos 200 ml.
- 6.- Agitar y enrasar con agua destilada; homogeneizar.
- 7.- Transferir el líquido a una probeta y determinar el grado alcohométrico con un aerómetro graduado en grados alcohólicos aparentes (utilizar lupa si se presentan dificultades de lectura y hacer tres lecturas como mínimo).

CÁLCULOS

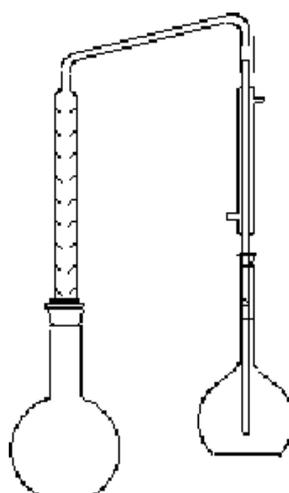
Calcular el grado alcohólico internacional OIV a 20°C, utilizando la tabla adjunta, añadiendo o restando al grado alcohólico aparente (fila superior) a t°C la corrección correspondiente.

°C		7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
10	SUMAR	1'16	1'24	1'34	1'44	1'58	1'73	1'89	2'06	2'24	2'43	2'63	2'84
11		1'06	1'16	1'25	1'34	1'46	1'59	1'73	1'88	2'04	2'43	2'63	2'84
12		1'00	1'07	1'15	1'23	1'32	1'43	1'55	1'68	1'82	1'97	2'13	2'27
13		0'90	0'95	1'02	1'10	1'18	1'28	1'38	1'48	1'60	1'72	1'85	1'99
14		0'79	0'85	0'90	0'96	1'03	1'11	1'19	1'28	1'39	1'49	1'59	1'71
15		0'68	0'72	0'77	0'82	0'87	0'94	1'01	1'09	1'17	1'26	1'34	1'44
16		0'55	0'58	0'62	0'66	0'71	0'76	0'82	0'88	0'94	1'01	1'08	1'15
17		0'43	0'46	0'48	0'51	0'55	0'58	0'63	0'67	0'71	0'76	0'81	0'85
18		0'30	0'31	0'33	0'34	0'36	0'39	0'42	0'45	0'47	0'50	0'53	0'56
19		0'15	0'16	0'16	0'17	0'18	0'20	0'21	0'23	0'24	0'26	0'28	0'29
20													
21	RESTAR	0'15	0'16	0'17	0'18	0'19	0'20	0'21	0'23	0'24	0'26	0'28	0'30
22		0'32	0'34	0'35	0'37	0'40	0'42	0'44	0'44	0'48	0'51	0'54	0'57
23		0'49	0'51	0'54	0'56	0'60	0'63	0'67	0'71	0'74	0'78	0'82	0'86
24		0'67	0'70	0'73	0'77	0'81	0'85	0'89	0'94	0'99	1'04	1'09	1'14
25		0'84	0'89	0'93	0'98	1'02	1'07	1'12	1'18	1'24	1'32	1'38	1'44
26		1'04	1'09	1'14	1'19	1'24	1'30	1'36	1'43	1'51	1'57	1'65	1'73
27		1'23	1'28	1'34	1'40	1'46	1'53	1'60	1'68	1'76	1'85	1'93	2'02
28		1'44	1'50	1'56	1'62	1'68	1'75	1'83	1'92	2'02	2'11	2'21	2'31
29		1'64	1'71	1'78	1'85	1'92	2'00	2'08	2'17	2'28	2'39	2'50	2'62
30		1'85	1'93	2'00	2'07	2'15	2'23	2'33	2'45	2'55	2'67	2'79	2'91

OBSERVACIONES

Para vinos jóvenes, de aguja o espumosos (Ribeiro, Empordà, cavas, etc..) eliminar previamente el gas carbónico antes de proceder a la metodología general. Agitar enérgicamente 250 ml de vino en un matraz de 500 ml bien seco, al que se habrán añadido 3 gotas de solución al 1 % de silicona soluble.

montaje destilación:



Cuestionario 16.2. - Título alcohométrico del vino

- 1.- Cual es la función de la piedra pómez en el procedimiento analítico?
- 2.- Cual es la función de la lechada de cal?
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis"
- 5.- Diseñar un método alternativo para la determinación del título alcohométrico que no esté basado en la determinación de la densidad (sugerencia: puede servir un método óptico).

Iniciación a la bromatología (prácticas)

Protocolos de análisis

Ref: 16.3

ACIDEZ VOLÁTIL DEL VINO**OBJETIVO Y FUNDAMENTOS**

La acidez volátil del vino es debida a las sustancias ácidas volátiles, generalmente ácidos grasos ligeros de la serie acética.

Se determina por arrastre con vapor de agua y rectificación de los vapores. No se considera la acidez debida al CO_2 libre, que debe eliminarse, ni la del anhídrido sulfuroso libre o combinado, que hay que corregir según el método de Jaulmes, en el que se considera la influencia del SO_2 combinado como la mitad de la del SO_2 libre.

MATERIAL

Aparato de destilación según esquema adjunto.

Balanza granataria.

Bureta.

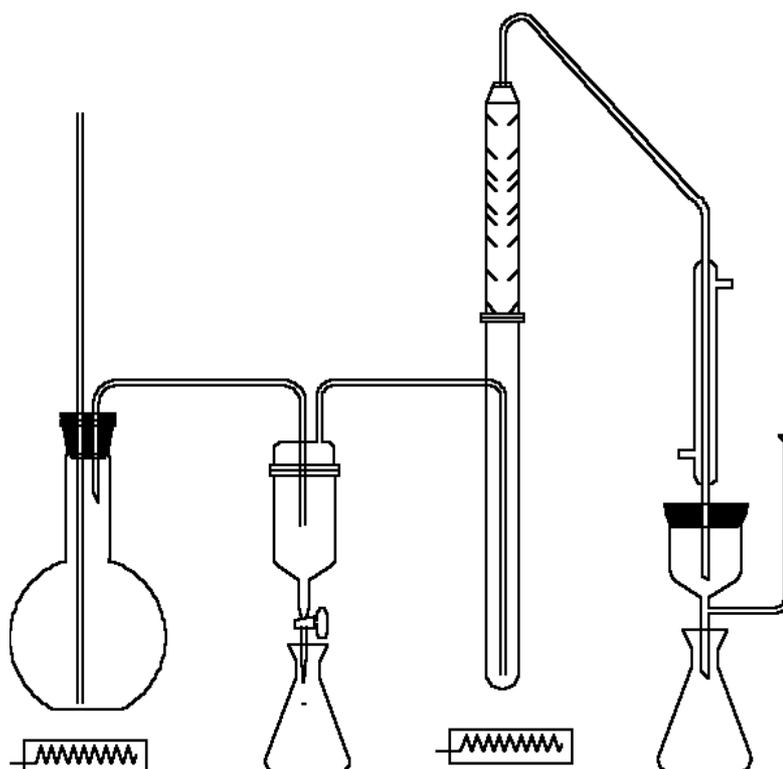
Cuentagotas.

Frasco lavador.

Matraz erlenmeyer de 500 ml.

Pipeta aforada de 20 ml.

Montaje para determinación de acidez volátil del vino:



REACTIVOS

Ácido clorhídrico concentrado pa.
Ácido L(+)-tartárico pa.
Agua de cal.
Agua destilada.
Disolución de yodo 0'01N (diluir yodo 0'02N sv en agua destilada).
Fenolftaleína al 1% en alcohol.
Hidróxido de sodio 0'1N sv
Yoduro de potasio, cristales, pa.
Almidón soluble, solución al 1 %.
Sodio tetraborato decahidratado, disolución saturada.

METODOLOGÍA

- 1.- Alimentar el generador de vapor con agua de cal o agua de barita; poner en el burbujeador 20 ml de vino exento de gas carbónico (ver práctica 16.2).
- 2.- Añadir al vino unos 0'5 gramos de ácido L(+)-tartárico pa.
- 3.- Poner en funcionamiento el generador de vapor, manteniendo abierta la salida del tubo purgador de vapor; después de cerrar esta, calentar el burbujeador (durante la operación, regular que el volumen de líquido en el burbujeador no sobrepase en exceso de los 20 ml iniciales).
- 4.- Destilar 250 ml en unos 10 minutos.
- 5.- Valorar con hidróxido de sodio 0'1N, en presencia de Fenolftaleína
- 6.- Valorar el sulfuroso libre, añadiendo una gota de HCl concentrado pa y valorar el SO₂ libre con solución de yodo 0'01N, añadiendo 2 ml de solución de almidón soluble (indicador) y un cristal de yoduro de potasio pa.
- 7.- Determinar el ácido sulfuroso combinado con acetaldehído, añadiendo 20 ml de disolución saturada de tetraborato sódico decahidratado pa (el líquido toma una coloración rosa pálido) y valorar de nuevo con disolución de yodo 0'01N.

CÁLCULOS

Se calcula la acidez volátil expresada en gramos/litro de ácido acético.

$$\text{Acidez volátil} = 0'03 \cdot \left(V - \frac{V'}{10} - \frac{V''}{20} \right)$$

en donde:

V = volumen en ml de NaOH 0'1N

V' = volumen en ml de yodo 0'01N en la oxidación del sulfuroso libre

V'' = volumen en ml de yodo 0'01N en la oxidación del sulfuroso combinado.

OBSERVACIONES

Contenidos altos de ácido sórbico falsean el resultado, por lo cual conviene hacer una determinación aparte de ácido sórbico a fin de efectuar la correspondiente corrección. Puede substituirse el montaje de destilación específico de la acidez volátil por un destilador Kjeldhal semimicro, perfectamente limpio, sin ningún residuo de disolución de sosa en el interior del cuerpo, trabajando con volúmenes de muestra inferiores y efectuando las correcciones adecuadas en el método de trabajo y en los cálculos correspondientes.

Cuestionario 16.3.- Acidez volátil del vino

- 1.- Escribir las reacciones de los subapartados 5, 6 y 7 de la metodología.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 16.4
ACIDEZ TOTAL DEL VINO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

La acidez total del vino se define como el total de ácidos titulables al llevar el vino a pH = 7 por adición de una solución alcalina valorada. No se consideren como integrantes de la acidez total al anhídrido sulfuroso libre o combinado ni al ácido carbónico.

Para realizar esta práctica, es preciso hacer antes la 16.3 con una muestra del mismo vino problema.

MATERIAL

Bureta de 25 ml.

Matraz Kitasato de 2 litros.

pHmetro con electrodo de vidrio.

Pipeta aforada de 20 ml.

Placa magnética agitadora con imán de teflón.

Probeta de 250 ml.

Tapón ajustable al matraz Kitasato.

Trompa de vacío.

Vaso de pp de 100 ml.

REACTIVOS

Hidróxido de sodio 0'1N sv.

METODOLOGÍA

- 1.- Poner entre 100 y 200 ml de vino en un matraz Kitasato de 2 litros y hacer el vacío para eliminar el CO₂; desconectar el vacío en el momento en que se detiene el desprendimiento de burbujas.
- 2.- Tomar 20 ml del vino desgasificado y transferir a un vaso de 100 ml.
- 3.- Situar el vaso sobre una placa magnética, instalar el montaje para la medición potenciométrica del pH y añadir mediante una bureta disolución de hidróxido de sodio 0'1N sv, hasta que el pHmetro marque pH = 7.

CÁLCULOS

Se expresa en meq/litro, según la expresión:

$$\text{Acidez total} = 10 \cdot \frac{V}{2} - 0'35 \cdot V' - 0'35 \cdot V''$$

También puede expresarse en gramos de ácido tartárico:

$$\text{Acidez total} = 0'75 \cdot \left(\frac{V}{2} - 0'035 \cdot V' - 0'025 \cdot V'' \right)$$

siendo:

V = volumen en ml de NaOH 0'1N.

V' = volumen en ml de yodo 0'01N utilizado para la oxidación del anhídrido sulfuroso libre (práctica 16.3)

V'' = volumen en ml de yodo 0'01N utilizado para la oxidación del anhídrido sulfuroso combinado (práctica 16.3).

OBSERVACIONES

Algunos laboratorios y organismos enológicos, consideran como punto de viraje el de pH = 8'2 en lugar de 7, por tratarse de una valoración de ácidos débiles con una base fuerte.

Cuestionario 16.4. - Acidez total del vino

- 1.- Escribir la reacción que tiene lugar durante la valoración.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 16.5
EXTRACTO SECO TOTAL DEL VINO		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Se conoce como extracto seco o materia seca total al conjunto de sustancias no evaporables por destilación.

Se calcula indirectamente midiendo la densidad del "residuo sin alcohol", es decir la que tendría el vino sin alcohol, restituyendo el volumen correspondiente con agua.

MATERIAL

Densímetro.

Frasco lavador.

Matraz aforado de 250 ml.

Montaje para destilación, completo, con columna rectificadora.

Probeta de 250 ml.

REACTIVOS

Agua destilada.

Piedra pómez.

METODOLOGÍA

- 1.- Destilar el vino tal como se describe en la práctica 16.2, pero sin adicionar lechada de cal.
- 2.- Pasar el residuo de destilación al matraz en el que se midió el volumen, lavando el matraz de destilación con agua destilada; enrasar y homogeneizar.
- 3.- Determinar la densidad.

CÁLCULOS

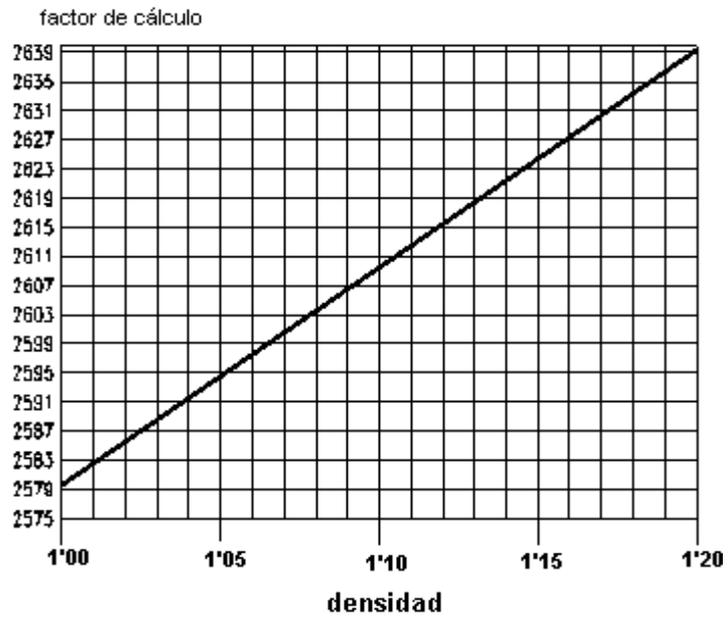
El extracto seco se expresa como la cantidad de sacarosa que, disuelta en agua hasta 1 litro, da una disolución de la misma densidad que el residuo sin alcohol, referido a 20°C, según la fórmula siguiente:

$$\text{Extracto seco} = F \cdot (d - 1)$$

en que **d** es la densidad del destilado en g/cc (con una precisión mínima de hasta la milésima) y **F** es un factor de cálculo empírico que depende de la densidad y que se determina con el gráfico adjunto:

factor de cálculo

resíduo sin alcohol y extracto seco



Cuestionario 16.5.- Extracto seco total del vino

- 1.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 16.6
ACIDEZ TOTAL DEL VINAGRE		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

La acidez total del vinagre se determina mediante una volumetría de neutralización en presencia de Fenolftaleína alcohólica como indicador.

MATERIAL

Bureta de 50 ml.
Matraz erlenmeyer de 250 ml.
Pipeta aforada de 10 ml.

REACTIVOS

Agua destilada.
Fenolftaleína alcohólica al 1 %.
Hidróxido de sodio 0'5N sv.

METODOLOGÍA

- 1.- Medir 10 ml de vinagre y transferir al matraz erlenmeyer.
- 2.- Añadir agua destilada suficiente (100 ml como mínimo), recién hervida y fría, para conseguir una coloración suficientemente débil como para poder apreciar el viraje de la Fenolftaleína.
- 3.- Añadir 6 gotas de disolución de Fenolftaleína y valorar con hidróxido de sodio 0'5N hasta viraje a rosado.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en gramos de ácido acético por 100 ml de vinagre:

$$\text{Grado acético} = a \cdot 10 \cdot 0'03$$

siendo **a** el volumen, en ml, de hidróxido de sodio 0'5N.

Cuestionario 16.6. - Acidez total del vinagre

- 1.- Escribir la reacción de valoración (subapartado 3 de la metodología).
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 5.- Describe una metodología para un vinagre suave y de coloración extraordinariamente intensa.

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 17.1
GRASA EN LECHE		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

La grasa se extrae con disolventes orgánicos y se determina gravimétricamente su contenido.

MATERIAL

Balanza analítica.
Balón de 250 ml, esmerilado.
Desecador.
Embudo de decantación de 300 ml.
Estufa de desecación.
Matraz erlenmeyer esmerilado, de 250 ml, con tapón.
Montaje para destilación.
Pipeta aforada de 2 ml.
Probeta de 10 ml.
Probeta de 25 ml.

REACTIVOS

Agua destilada.
Alcohol etílico 96% v/v pa.
Amoníaco al 25 % pa.
Éter de petróleo de pe 40-60°C pa.
Éter etílico pa exento de peróxidos.

METODOLOGÍA

- 1.- En un matraz erlenmeyer esmerilado de 250 ml se pesan unos 10 ml de leche. Si la muestra no es homogénea (puede suceder si se trata de leche natural, no homogeneizada), se calientan lentamente en un vaso de pp de 250 ml unos 100 ml de leche, hasta 35°C y se agita suavemente hasta disolver los grumos, evitando la formación de espuma; dejar enfriar y pesar unos 10 ml en el matraz erlenmeyer esmerilado de 250 ml.
- 2.- Añadir 1'5 ml de disolución de amoníaco al 25 % y mezclar; añadir 10 ml de alcohol etílico del 96 % v/v y mezclar con suavidad.
- 3.- Añadir 25 ml de éter etílico pa, cerrar el erlenmeyer y agitar vigorosamente durante 1 minuto, abriendo de vez en cuando el tapón, con cuidado.
- 4.- Añadir 25 ml de éter de petróleo, lavando el cuello del matraz y el tapón; cerrar y agitar, esta vez con suavidad, durante 30 segundos.
- 5.- Transferir a un embudo de decantación, lavando con un poco de los disolventes y de agua destilada.

- 6.- Dejar en reposo hasta la total separación de dos capas (línea de separación bien definida y capa superior completamente nítida).
- 7.- Trasvasar la capa inferior al matraz erlenmeyer, despacio, mediante la llave del embudo.
- 8.- Añadir unos 10 ml de agua destilada al embudo de decantación; agitar 30 segundos, dejar separar las dos capas y pasar la capa inferior al erlenmeyer; repetir de nuevo con 10 ml de agua destilada. Pasar la capa inferior al erlenmeyer esmerilado de 250 ml.
- 9.- Repetir dos veces los pasos 3 al 8, pero esta vez utilizando 15 ml de éter etílico y 15 de éter de petróleo en los pasos 3 y 4.
- 10.- Transferir la capa superior del embudo de decantación a un balón esmerilado, limpio, seco y tarado y evaporar por destilación hasta que no persista olor de disolvente; desecar en la estufa hasta peso constante.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en % de grasa:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{p_1 - p_2} \cdot 100$$

expresión en la cual:

m_1 = peso del balón con el residuo graso.

m_2 = peso del balón.

p_1 = peso del erlenmeyer lleno de muestra.

p_2 = peso del erlenmeyer.

OBSERVACIONES

a).- El método es utilizable en leche en polvo, condensada o evaporada, previa conversión en leche líquida. Se pesa la cantidad necesaria para hacer 100 ml de leche líquida, se restituye con 80 ml de agua destilada, se pasa a matraz aforado de 100 ml, lavando con agua destilada y enrasando y homogeneizando; a partir de aquí se procede como en la metodología descrita. Los 10 ml de leche se toman con pipeta aforada y no es preciso pesarlos; los cálculos son:

$$\text{Grasa (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 1000$$

siendo m la cantidad de leche pesada.

b).- Verificar que el éter etílico esté totalmente exento de peróxidos (peligro de explosión).

Ensayo de peróxidos en éter.- Transferir 10 ml de éter etílico a una probeta esmerilada provista de tapón de vidrio, limpia y seca; añadir 1 ml de disolución al 10 % de yoduro de potasio recién preparado, agitar y dejar 1 minuto en reposo. No debe formarse coloración amarilla en ninguna de las dos capas.

Conservación del éter etílico.- Sumergir láminas de zinc en tiras (80 cc por litro, por lo menos), preparadas sumergiendo zinc pa en una disolución ácida diluida de sulfato cúprico pentahidrato pa durante 1 o 2 minutos y lavar después con agua destilada.

Cuestionario 17.1. - Grasa en leche

- 1.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 17.2
FENOLFTALEINA EN LA LECHE EN POLVO		

OBJETIVO I FUNDAMENTOS

Frecuentemente, a la leche en polvo destinada al consumo animal se le añade Fenolftaleína, fácilmente identificable en presencia de disolución alcalina, a fin de evitar que sea destinada al consumo humano.

MATERIAL

Frasco lavador.
Pipeta de 2 ml.
Probeta de 10 ml.
Tapón para tubo de ensayo.
Tubo de ensayo.

REACTIVOS

Agua destilada.
Hidróxido de sodio 2N sv.

METODOLOGÍA

- 1.- Poner unos 0'5 gramos de leche en polvo en un tubo de ensayo , añadir 10 ml de agua destilada y agitar hasta conseguir una emulsión uniforme.
- 2.- Añadir 2 ml de disolución de hidróxido de sodio 2N sv.
- 3.- Observar; la presencia de Fenolftaleína en la muestra se manifiesta por la aparición de puntos de color rojo-rosado que van aumentando su tamaño e intensificando su color, para ir desapareciendo después de un tiempo.

Cuestionario 17.2.- Fenolftaleína en la leche en polvo

- 1.- A veces, la leche destinada a consumo animal se somete a un proceso de desengrasado ("desnatado") y la grasa es parcialmente restituida por aceites vegetales de baja calidad. Sugerir un procedimiento para detectar esta eventualidad.
- 2.- Otra manera de desnaturalizar la leche en polvo consiste en la adición de harina de alfalfa deshidratada finamente molida. Como se detecta fácilmente esa eventualidad?,
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 17.3
LACTOSA EN LA LECHE		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Este es el método descrito en la norma FIL-28:1964 de la Federación Internacional de Lechería.

El método es aplicable a las leches naturales, homogeneizadas, esterilizadas i, previa reconstitución, a las leches concentradas, evaporadas, condensadas y en polvo.

El contenido en lactosa se determina indirectamente, una vez la leche desproteïnizada, por valoración de la cantidad de halógeno reducido al final de la reacción entre la lactosa y el reactivo de yoduro potásico-cloramina.

MATERIAL

Bureta.

Embudo cónico.

Frasco lavador.

Matraz aforado de 100 ml.

Matraces erlenmeyer con tapón, de 100 ml (2)

Papel de filtro.

Pipeta aforada de 20 ml.

Pipetas aforadas de 10 ml (3)

Pipetas aforadas de 5 ml (2)

Probeta de 25 ml..

Probeta de 50 ml.

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 2N sv.

Agua destilada.

Disolución de cloramina T 0'040N (5'70 gramos/litro).

Yoduro de potasio (disolución incolora extemporánea al 10 %, de yoduro de potasio pa en agua destilada).

Almidón soluble, sol al 1 %.

Reactivo de ácido tungsténico (disolver 7 gramos de tungstato de sodio 2-hidrato pa en 870 ml de agua destilada; añadir 0'1 ml de ácido ortofosfórico al 85% pa y 70 ml de ácido sulfúrico 1N sv).

Solución de almidón soluble al 1 %

Tiosulfato de sodio 0'05N (Disolver 25 ml de tiosulfato de sodio 1N sv hasta 500 ml en agua destilada).

METODOLOGÍA

- 1.- Tomar 10 ml de leche homogeneizada (ver práctica 10.1) y pasar a un matraz aforado de 100 ml.
- 2.- Añadir 25 ml de agua destilada, 40 ml del reactivo de ácido tungsténico y mezclar suavemente; completar, a continuación, con agua destilada hasta el enrase, mezclar y dejar que sedimente el precipitado.
- 3.- Filtrar y recoger en un matraz seco.
- 4.- Tomar 10 ml del filtrado y transferir a un matraz erlenmeyer de 100 ml.
- 5.- Añadir 5 ml de la disolución de yoduro de potasio y 20 ml de disolución de cloramina T; mezclar, tapar y mantener en la oscuridad durante 1 1/2 horas a temperatura ambiente.
- 6.- Añadir un poco de agua destilada y 5 ml de disolución de ácido clorhídrico 2N.
- 7.- Valorar con disolución de tiosulfato de sodio 0'05N, añadiendo indicador de almidón soluble cuando falte poco para el final de la valoración.
- 8.- Efectuar un ensayo en blanco siguiendo exactamente el método descrito, pero utilizando 10 ml de agua destilada en lugar del filtrado de leche.

CÁLCULOS

Considerando las disoluciones efectuadas y que un ml de tiosulfato 0'05N equivale a 0'0072 gramos de lactosa, expresando el contenido de lactosa en gramos/litro:

$$\text{lactosa(gramos/litro)} = f \cdot 7'2 \cdot t \cdot V$$

siendo **V** el volumen de disolución de tiosulfato (al que se le ha restado el volumen correspondiente del blanco), **t** un factor para corregir el volumen de precipitado (0'992 para leche entera y 0'996 por leche desnatada) y **f** el factor de la disolución de tiosulfato.

OBSERVACIONES

La disolución de tiosulfato es muy inestable y debe ser de preparación extemporánea o, en todo caso, debe determinarse el factor antes de cada valoración.

Cuestionario 17.3. - Lactosa en leche

- 1.- Describir las reacciones de los subapartados 2, 4 y 7 de la metodología.
- 2.- Deducir razonadamente la fórmula utilizada en los cálculos.
- 3.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 4.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis"

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 19.1
CAROTENOS Y XANTOFILAS EN EL PIMENTÓN		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Los colorantes naturales vegetales carotenos y xantofilas presentan una retención selectiva sobre alúmina.

La concentración de carotenos o xantofilas de cada fracción separada se determinan espectrofotométricamente.

MATERIAL

Balanza analítica.

Columna cromatográfica con sistema de vacío, según esquema adjunto, de unos 2 cm de Φ .

Embudo cónico.

Embudo pequeño para sólidos.

Frasco lavador.

Matraz aforado de 100 ml.

Matraces aforados de 50 ml (2)

Pesasustancias.

Pipeta aforada de 1 ml.

Pipeta aforada de 2 ml.

Pipetas aforadas de 25 ml.

Pipetas aforadas de 5 ml.

Pipetas graduadas de 5 i 10 ml.

Probetas de 100 y 50 ml.

Espectrofotómetro.

Cubetas para lectura espectrofotométrica

REACTIVOS

Agua destilada.

Alúmina para cromatografía en columna, actividad media.

Disolución de Na_2SO_4 al 10 % (disolver 50 gramos de sulfato de sodio pa hasta 500 ml en agua)

Disolución patrón de Sudán I [disolver 0'1241 gramos de Sudan I pa en 500 ml de acetona-isopropanol (1/1) pa].

Disolvente HAET (hexano, acetona, etanol y i tolueno, todos de calidad pa, en las proporciones 10/7/6/7).

Hexano pa.

Hexano-acetona 90/10 (calidad pa en las proporciones indicadas).

Hexano-acetona 96/4 (calidad pa en las proporciones indicadas).

Hexano-acetona-metanol 80/10/10 (calidad pa en las proporciones indicadas).

KOH al 40 %, disolución metanólica (disolver 47'1 gramos de hidróxido de potasio pa del 85% en alcohol metílico hasta 100 ml y filtrar con placa porosa si se presentara residuo insoluble).
Na₂SO₄ anhidro pa.

METODOLOGÍA

- 1.- Pesar exactamente alrededor de 0'5 gramos de harina de pimentón y pasar a un matraz aforado de 100 ml.
- 2.- Pipetear 30 ml de disolvente HAET en matraz aforado; tapar y agitar 1 minuto.
- 3.- Añadir 1 ml de agua, tapar, agitar 1 minuto y dejar reposar 16 horas en la oscuridad.
- 4.- Añadir 2 ml de disolución metanólica de KOH al 40 %, agitar 1 minuto y dejar reposar 1 hora en la oscuridad.
- 5.- Añadir, con pipeta, 30 ml de hexano, agitar 1 minuto y añadir disolución de Na₂SO₄ al 10 % hasta llenar parte del cuello del matraz (no es preciso enrasar exactamente); tapar y agitar con energía durante 2 minutos.
- 6.- Dejar reposar 1 hora en las oscuridad.
- 7.- Preparar una columna cromatográfica al vacío según el esquema. Llenarla asta 10-12 cm con alúmina, adicionando la alúmina en capas pequeñas y presionando con suavidad; pone encima una capa de 1 cm de sulfato de sodio anhidro.
- 8.- Poner 5 ml de la capa superior (zona del cuello) del matraz en la columna; hacer vacío muy suave hasta que los 5 ml añadidos queden absorbidos en la parte superior de la columna.
- 9.- Pasar por la columna hexano-acetona(96/4), hasta que comience a salir líquido por la parte inferior de la columna.
- 10.- Pasar hexano-acetona(90/10) hasta eluir la banda de carotenos, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml; llevar a volumen con hexano-acetona(90/10) y homogeneizar.
- 11.- Pasar hexano-acetona-metanol (80/10/10) hasta elución de la banda de les xantofilas, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml; llevar a volumen con el mismo disolvente y homogeneizar.
- 12.- Leer en espectrofotómetro la absorbancia de la disolución de carotenos a 435 nm y la de la disolución de xantofilas a 475 nm, frente a un blanco de los disolventes empleados en cada caso.

Determinación de los factores de corrección del espectrofotómetro

- 1.- Recalibrar el espectrofotómetro de manera que entre 470 y 480 nm, la absorbancia de la disolución patrón de sudan I (acabada de preparar), tenga el máximo de absorbancia a 475 nm.
- 2.- Determinar la absorbancia de la disolución extemporánea de patrón de sudan I, a 435 nm y a 475 nm y calcular los factores de corrección.

CÁLCULOS

El resultado se expresa en miligramos/kg (ppm):

$$\text{Carotenos} = 255 \cdot A_{435} \cdot \frac{V_f}{V_d} \cdot \frac{F_{435}}{m}$$

$$\text{Xantofilas} = 212 \cdot A_{475} \cdot \frac{V_f}{V_d} \cdot \frac{F_{475}}{m}$$

expresiones en las cuales:

A_{435} = Absorbancia a 435 nm.

A_{474} = Absorbancia a 475 nm.

V_f = Volumen final de la porción eluida.

V_d = Volumen de la porción que se pasa por columna.

F_{435} = Factor de corrección espectrofotométrico a 435 nm.

F_{475} = Factor de corrección espectrofotométrico a 475 nm.

m = peso de la muestra en gramos.

Los valores de los factores de corrección son:

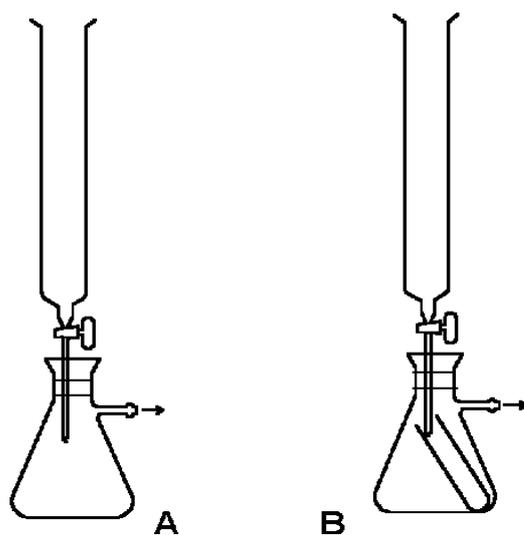
$$F_{435} = \frac{0'460}{A_{435}^o} \quad (\text{carotenos})$$

$$F_{475} = \frac{0'561}{A_{475}^o} \quad (\text{xantofilas})$$

en donde los A_o son las absorbancias de la disolución patrón de sudan I.

OBSERVACIONES

El método es aplicable, cambiando la cantidad a pesar y los volúmenes de elución y de enrase de los eluidos, parra alfalfa deshidratada, maíz, curry y piensos de contenido graso moderado.



Montaje para cromatografía en columna al vacío:

A) Sin recoger fracción

B) Recogiendo fracción

Cuestionario 19.1. - Carotenos y xantofilas en pimentón

- 1.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos (considerando que la actividad óptica del sudan I en las condiciones mencionadas equivale a la de 255 mg de carotenos y 212 mg de xantofilas, considerando las eluciones hasta el punto 9).
- 2.- Que objeto tiene la adición de KOH (subapartado 4 de la metodología)?
- 3.- Por que motivo se deja reposar la muestra en la oscuridad en los puntos 3, 4 y 6 de la metodología?
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 20.1
HARINA DE PLUMAS (MICROSCOPIA)		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

La harina de plumas tiene un alto contenido de proteínas, pero se trata de proteínas de difícil digestión, es decir, de baja calidad nutritiva.

No se utiliza en preparados alimentarios para consumo humano, estando limitado su uso para los piensos de consumo animal.

También se utiliza fraudulentamente para adulterar harinas de carne o de pescado.

La harina de plumas es identificable microscópicamente.

MATERIAL

Microscopio y accesorios para microscopía.

REACTIVOS

Lactofenol (mezclar 20 gramos de ácido fénico, 10 gramos de ácido láctico, 20 gramos de glicerina y 10 gramos de agua destilada, todos ello de calidad para microscopía).

METODOLOGÍA

- 1.- Poner 2 gotas de lactofenol en un porta, extenderlo y dejar caer, con ayuda de una espátula vibratoria, una pequeñísima cantidad de muestra finamente pulverizada.
- 2.- Tapar con el "cubre" y observar en el microscopio a 200-400 aumentos; la presencia de plumas se manifiesta por la visualización de pequeñas estructuras en forma de "caña de bambú".

Questionario 20.1. - Harina de plumas (microscopía)

- 1.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 2.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 22.1
ÁCIDOS GRASOS POR CG		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos pueden ser separados y cuantificados por cromatografía de gases.

La separación y cuantificación de los ácidos grasos constituye un método fiable y rápido para la tipificación y clasificación de una grasa.

La metilación tiene lugar en dos fases; una primera fase consiste en la interacción con metilato de sodio como agente saponificante en medio metanólico (agente esterificante) y una segunda fase mediante la acción del metanol acidificado con ácido clorhídrico.

MATERIAL

Balanza analítica.

Balanza granataria.

Balón de 250 ml, esmerilado.

Columna de las características indicadas en la metodología.

Cromatógrafo de gases provisto de registrador-integrador, equipamiento complementario y detector de ionización de llama.

Cronómetro.

Fluxómetro de burbuja.

Matraz aforado de 100 ml.

Microjeringa para C.G., graduada, de 10 μ l.

Pipetas aforadas de 25 ml.

Placa calefactora.

Refrigerante de reflujo.

Tubos de ensayo, de 10 ml, con tapón roscado.

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 1'25N en alcohol metílico (Obtener ácido clorhídrico gaseoso y anhidro dejando caer ácido sulfúrico gota a gota sobre ácido clorhídrico concentrado, según se ve en el esquema adjunto. Trabajar en vitrina de gases y tomar las debidas precauciones para evitar succiones, observando continuamente el proceso. La cantidad absorbida de HCl se determina por pesadas sucesivas, hasta llegar a una concentración ligeramente superior a la deseada. Se admite cierta tolerancia, por la cual podemos utilizar una balanza granataria).

Aire sintético calidad cromatográfica.

Disolución saturada de NaCl (disolver NaCl pa en agua destilada hasta saturación).

Hexano pa.

Hidrógeno calidad cromatográfica

Metilato de sodio 0'2N (disolver 1'102 gramos de metilato de sodio ps hasta 1 litro en alcohol

metílico pa).

Nitrógeno cualidad cromatográfica.

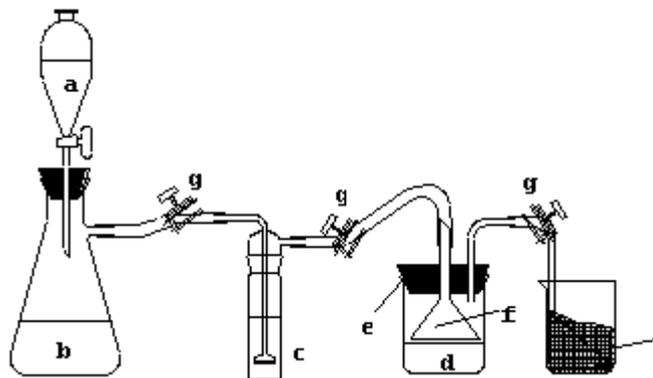
Trioleato de glicerina pa.

Esquema montaje para preparar HCl en metanol:

a)Ácido sulfúrico concentrado. b)Ácido clorhídrico concentrado (35 %). c)Torre de desecación

d)Metanol

e)Tapón. f)Embudo. g)Pinzas de Hoffman. h)Gel de sílice.



METODOLOGÍA

- 1.- Pesar alrededor de 1 gramo de grasa perfectamente homogeneizada en el balón de 250 ml.
- 2.- Añadir 25 ml de disolución de metilato de sodio 0'2N, conectar el refrigerante de reflujo y llevar a ebullición, manteniéndola un mínimo de 5 minutos.
- 3.- Interrumpir la calefacción y añadir 25 ml de la disolución metanólica de ácido clorhídrico; conectar de nuevo el refrigerante de reflujo y llevar a ebullición como mínimo 5 minutos más.
- 4.- Enfriar, pero no demasiado (el balón debe de quedar entre tibio y caliente) y transferir a un recipiente de cuello largo y estrecho (puede servir un matraz aforado de 100 ml), lavando con 10 ml de hexano, que se pasan también al matraz aforado.
- 5.- Agitar imprimiendo movimientos suaves de rotación durante 1 o 2 minutos.
- 6.- Añadir disolución saturada de cloruro de sodio, hasta que la fase hexánica ocupe la zona del cuello del matraz. Dejar sedimentar hasta que la disolución hexánica quede bien clarificada (podemos ayudar al proceso imprimiendo rotaciones muy suaves al matraz, en posición vertical, manteniendo la base del mismo apoyada sobre la mesa de trabajo).
- 7.- Tomar con microjeringa, previamente limpiada con hexano, unos 2 μ l de la fase hexánica e inyectar en el cromatógrafo de gases (si no se inyecta al momento, pueden guardarse 4 o 5 ml de fase hexánica en tubos de 10 ml con tapón roscado, durante unos cuantos días).

Parámetros cromatográficos :

Gas portador = nitrógeno

Flujo gas portador = 50 ml/mn.

Columna = 15% etilenglicolsuccinato sobre polvo refractario de 40/60 mallas. 2 m X 4 mm diam int. Acondicionada de 15 a 24 horas a 220°C (sin conectar al detector) a un flujo de gas portador

de 20 ml/mn.

Detector = Ionización de llama (FID), con llama de hidrógeno-aire

Temperatura de columna = 200 °C

Temperatura inyección = 250 °C.

Temperatura detector = 250 °C.

Atenuación de sensibilidad = entre 1.000 y 2.000.

Velocidad registro = 5 mm/mn.

El flujo de gas portador se verifica con un flujómetro de burbuja y un cronómetro a la salida de la columna. El valor que aquí sugerimos es únicamente orientativo. El valor óptimo puede determinarse experimentalmente de manera que el metiloleato (preparado a partir de un patrón de trioleato de glicerina) presente un tiempo de retención de alrededor de 14 o 15 minutos. Una vez establecido el flujo óptimo, lo utilizaremos en todas las determinaciones hasta que la columna empiece a envejecer.

CÁLCULOS

Expresaremos el resultado como composición relativa de los ácidos grasos en %, referidos al total de ácidos grasos. Consideremos que la cantidad de cada componente es proporcional al área del pico correspondiente (esta aproximación no es, en general, del todo exacta, pero para los ácidos grasos se considera aceptablemente satisfactoria).

El porcentaje de un determinado ácido graso será:

$$p(\%) = \frac{A_i}{A_T} \cdot 100$$

siendo A_i el área correspondiente del pico del ácido graso y A_T la suma de las áreas de todos los picos de todos los ácidos grasos.

OBSERVACIONES

Antes de realizar esta práctica deberá efectuarse un estudio previo y unas cuantas prácticas sencillas para familiarizar al estudiante con el uso del cromatógrafo de gases, en el caso de que no se tenga experiencia previa.

Para un cálculo más exacto deberían considerarse los factores de respuesta de los diferentes ácidos grasos, determinados teóricamente considerando la estructura de los ésteres metílicos y la respuesta relativa del FID para cada configuración química o, todavía mejor, experimentalmente utilizando patrones de los diferentes ácidos grasos; de todas formas, el cálculo sin tomar en consideración esos factores es, en general, suficientemente aproximado para efectos de la caracterización y clasificación de la grasa analizada.

Si se trata de ácidos grasos libres o de oleinas industriales de acidez superior al 80 %, puede omitirse la metanolisis alcalina.

El método no es apto para grasas con contenido insaponificable superior al 2 % (la mayoría de grasas no superan este valor).

Cuestionario 22.1. - Ácidos grasos por CG

- 1.- Por qué la temperatura de acondicionamiento de la columna es superior a la temperatura de trabajo?
- 2.- Como se detecta el envejecimiento de la columna?
- 3.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos.
- 4.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico.
- 5.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 6.- Por qué puede omitirse la metanolisis alcalina en los ácidos grasos libres?
- 7.- Como serian los cálculos teniendo en cuenta los factores de respuesta?
- 8.- Idear el esquema de un protocolo de análisis para calcular los factores de respuesta, trabajando con patrones puros de ácidos grasos.

Iniciación a la bromatología (prácticas)	Protocolos de análisis	Ref: 22.2
AMINOÁCIDOS POR CG		

OBJETIVO Y FUNDAMENTOS

Los trifluorobutilésteres de los aminoácidos pueden ser separados y cuantificados por cromatografía de gases. Estos trifluorobutilésteres aminoácidos experimentan una retención selectiva dependiente de la temperatura, con etilenglicoladipato (EGA) o con metil-fenil-silicona ("rubber"), (OV-17)

La obtención de los trifluorobutilésteres requiere:

1ro.- Hidrólisis de las proteínas.

2do.- Trifluorobutilación mediante fases intermedias: a) Conversión en metilésteres b) Conversión de los metilésteres a butilésteres. c) Obtención de trifluorobutilésteres.

Se utiliza ornitina como patrón interno, por ser un aminoácido inexistente en las muestras objeto del análisis.

Debe prepararse una mezcla estándar de ornitina y los aminoácidos que interese determinar, simultáneamente con los problemas, a fin de calcular los factores de respuesta y los tiempos de retención relativos de cada aminoácido respecto a la ornitina.

MATERIAL

Balanza analítica.

Balanza granataria

Baló de 250 ml, esmerilado.

Columna de las características indicadas en la metodología.

Cromatógrafo de gases con registrador-integrador, equipamiento complementario y detector de ionización de llama.

Cronómetro.

Reloj avisador.

Flujómetro de burbuja.

Matraces aforados de 100 ml.

Microjeringa para C.G., graduada, de 10 μ l.

Pipetas aforadas de 25 ml.

Placa calefactora.

Refrigerante de reflujo.

Tubos de ensayo 10 ml, con tapón roscado.

Evaporador rotatorio ("Buchi") con dispositivo de vacío.

Bomba de bacilo.

Baño termostático de agua.

Instalación protectora de la bomba de vacío.

Baño de parafina con agitador y termostato regulable.

Baterías de agitadores magnéticos.

Para muestras con alto contenido azúcares, es preciso, además:

Matraz esmerilado forma balón de 1000 ml.

3 embudos de decantación esmerilados (en boca y en llave), de 500 ml.

Columna con placa filtrante y llave, esmerilado hembra, de 2 cm de Φ .

REACTIVOS

Ácido clorhídrico 1'25 N en alcohol metílico, obtenido según el procedimiento de la práctica 22.1 .

Ácido clorhídrico 1'25 N en butanol, obtenido según el procedimiento de la práctica 22.1, pero con butanol en lugar de metanol.

Agua destilada.

Aire sintético calidad cromatográfica.

Hexano pa.

Hidrógeno calidad cromatográfica

Nitrógeno calidad cromatográfica.

Cloruro de metileno anhidro, grado espectrométrico.

Anhídrido trifluoroacético, calidad C.G.

Parafina líquida transparente incolora.

Gel de sílice (para desecación).

Cloruro cálcico (para desecación).

Ácido clorhídrico ~6N ($\frac{1}{2}$ HCl conc. y $\frac{1}{2}$ H₂O dest.).

HCl 0'1N pa.

Clorhidrato de ornitina patrón.

Disoluciones de aminoácidos patrón para test: En un matraz aforado de 50 ml, disolver 130 mg de patrón de aminoácido en 20-25 ml de HCl 0,1N (si se presentan dificultades para disolver algún aminoácido, añadir unas gotas de HCl concentrado), enrasar a 50 ml con HCl 0'1N (una disolución para cada aminoácido). Proceder igualmente con la ornitina.

Para muestras con contenido alto de azúcares, es preciso, además:

Resina Dovex 50 WX-8 (40 cc).

Papel indicador.

Amoníaco 2N

NaOH diluido.

Nitrato de plata.

METODOLOGÍA 1 (para muestras con contenido de azúcares bajo o moderado)

1.- Pesar una cantidad de muestra, homogeneizada y molturada, que contenga unos 200-250 mg de proteína.

2.- Hidrolizar con HCl 6N a reflujo (~110 °C) durante 22 horas.

3.- Dejar enfriar. Filtrar, lavando el residuo y recogiendo el filtrado.

4.- Evaporar al vacío. a unos 60 °C hasta sequedad casi total. Redisolver con agua destilada y repetir la evaporación 2 veces más.

5.- Disolver en pequeñas cantidades de HCl 0'1 N y pasar a un matraz aforado de 100 ml. Enrasar y homogeneizar.

6.- Pasar 25 ml a un matraz esmerilado de forma pera de 100 ml. Añadir 2 ml del patrón interno de ornitina. Simultáneamente, preparar una muestra estándar con 2 ml de patrón interno y 2 ml de disolución patrón de cada uno de los aminoácidos que queremos determinar. A partir de aquí, procederemos paralelamente con esta muestra estándar.

- 7.- Evaporar al vacío. a 60 °C hasta sequedad.
- 8.- Dejar un mínimo de 15 horas en un desecador al vacío.
- 9.- Añadir 10 ml de metanol/HCl 1'25N y agitar durante 30 minutos en placa magnética, a temperatura ambiente y con el frasco tapado.
- 10.- Evaporar a 60 °C hasta sequedad.
- 11.- Añadir 10 ml de n-butanol/HCl 1'25N, tapar con un tapón de CaCl₂ y calentar en un baño de parafina a 100 °C ± 1 °C durante 2'5 horas y agitación magnética.
- 12.- Evaporar al vacío. a 60 °C hasta sequedad.
- 13.- Añadir 4 ml de diclorometano y 1 ml de anhídrido trifluoroacético.
- 14.- Colocar durante 15 minutos a temperatura ambiente y tapado.
- 15.- Pasar 2 ml a un tubo de presión con cierre hermético a rosca y dejar 5 minutos a 150 °C (ó 5 horas al ambiente).
- 16.- Enfriar el tubo con agua fría y guardar en frigorífico. Sacar del frigorífico solo el tiempo necesario para inyectar en el CG, a fin de que las condiciones del estándar y el problema sean lo más idénticas que sea posible..
- 17.- Inyectar 2 µl en el CG.

METODOLOGÍA 2 (para muestras de elevado contenido de azúcares)

- 1.- Proceder como en los puntos 1 al 3 del apartado anterior.
- 2.- Evaporar a casi sequedad al vacío. a 60 °C.
- 3.- Diluir en agua destilada y llevar a pH aprox. de 3, mediante solución de HCl o de NaOH. El volumen final no ha de sobrepasar de los 300 ml.
- 4.- Pasar por una columna de 2 cm de Φ rellena con 40 cc de resina Dowex WX-8, a un flujo máximo de 0'5 ml/mn (se puede dejar a un flujo mucho más durante la noche), según el proceso siguiente:
 - a) Activar la columna con 300 ml de HCl 6N.
 - b) Lavar con agua hasta test de cloruros negativo (prueba de turbidez con nitrato de plata).
 - c) Pasar la muestra por la columna (retención de los aminoácidos).
 - d) Pasar agua destilada hasta pH neutro (aproximadamente).
 - e) Pasar 250 ml de amoníaco 2N (elución de los aminoácidos)
 - f) Pasar 250 ml de agua (recoger estas dos últimas fracciones)
- 5.- Evaporar al vacío a 60 °C hasta sequedad.
- 6.- Proceder siguiendo desde el punto 5 de la Metodología 1.

Parámetros cromatográficos :

- Gas portador = nitrógeno
Flujo de gas portador = 80 ml/mn.
Flujo de hidrógeno = 50 ml/mn
Flujo de aire = 450 ml/mn.
Temperatura inicial = 75 °C
Temperatura final = 215 °C.
Gradiente de temperatura ("rate") = 4°C/mn
Detector = Ionización de llama.
Sensibilidad = 103 X 2.
Temperatura del detector = 350 °C
Temperatura inyector = 200 °C.

Columna = Vidrio, de 1'5 metros y 4 mm de diámetro interno, con fase estacionaria de etilenglicoladipato al 0'6 % sobre soporte "Chromosorb 60-100".

CÁLCULOS

$$\%A_x = 400 \cdot \frac{A_x}{A_{si}} \cdot \frac{m_{si}}{m} \cdot F_c$$

en donde:

%Ax = % del aminoácido considerado, sobre el total de la muestra.

Ax = área del pico del aminoácido considerado.

Asi = área del pico del patrón interno (ornitina).

msi = masa de patrón interno (ornitina)

m = masa de muestra.

Fc = factor de corrección del aminoácido.

El factor de corrección (**Fc**) se calcula considerando:

$$F_c = \frac{1}{F_r} = \frac{F_g}{F}$$

en donde:

Fr = factor de respuesta relativo = **F/F_e**

siendo **F** el factor de respuesta absoluto del aminoácido (*Área/masa*) i **F_e** el factor de respuesta absoluto del estándar (*Área del estándar / masa del estándar*).

OBSERVACIONES

El tiempo de hidrólisis de las muestras puede reducirse considerablemente, utilizando la presión (en autoclave). Kaiser, Gehrke y otros investigadores han utilizado el autoclave (4 horas a 145 °C), obteniendo resultados tan aceptables y reproducibles como los obtenidos por hidrólisis a 110 °C.

Basándome en el método de los investigadores mencionados, he comprobado empíricamente una relación entre el tiempo de hidrólisis y la temperatura adecuada de hidrólisis, que responde a la siguiente expresión:

$$e^{[a+b(418-T)]} = \theta$$

en que **T** es la temperatura en Kelvin y **θ** el tiempo en horas, siendo **a** i **b** unas constantes características para cada aminoácido; para la lisina estos valores son bastante aproximadamente de *a=1'300* i *b=0'0488* (determinados empíricamente). Teóricamente, cabe esperar ligeras desviaciones de los valores y la reproductibilidad de **a** y **b** para la serina, tirosina, isoleucina, valina y leucina, desviaciones bastante más apreciables para la metionina y francamente inadmisibles para el triptófano.

El método no es válido para determinar cistina y arginina (los picos no aparecen utilizando

columna EGA) ni para el triptófano, que queda destruido en buena parte durante la hidrólisis ácida. La metionina queda parcialmente destruida durante la hidrólisis.

Si se desea determinar cistina y/o arginina, se utilizará una columna de OV-17, pero hay que tener en cuenta que, por lo que respecta a los otros aminoácidos, los resultados obtenidos con esa columna son bastante menos fiables que los obtenidos con la columna EGA.

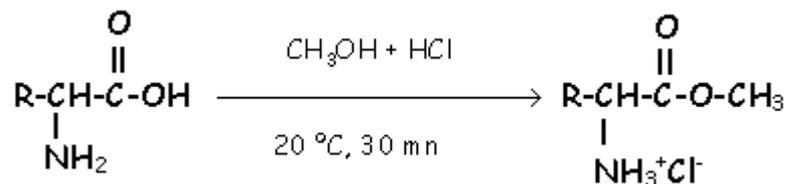
Para determinar triptófano, algunos autores han investigado con hidrólisis alcalinas o con disoluciones de ácido tioglicólico.

El error por defecto para la metionina, puede compensarse multiplicando el resultado obtenido por el factor empírico 1'25. Los resultados son, sin embargo, poco reproducibles si los comparamos con otros aminoácidos, pero por supuesto bastante mejores que los obtenidos mediante los métodos semicuantitativos por cromatografía en capa fina.

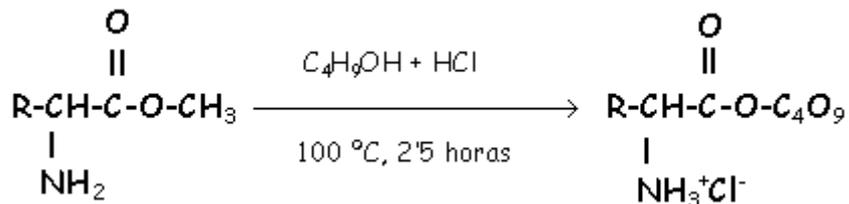
Puede suprimirse el paso de la metilación efectuando la butilación con n-butanol/HCl 3N y haciendo un tratamiento con ultrasonidos durante 15 minutos a 100 °C

Esquema de las reacciones químicas del proceso:

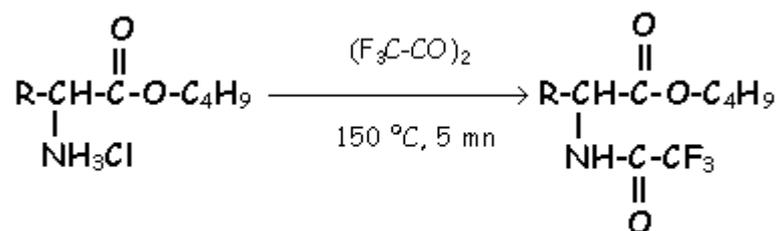
Metilación:



Butilación:



Trifluoroacetilación:



Aspecto de los cromatogramas

Los tiempos de retención relativos de los aminoácidos, referidos a la ornitina, con columnas EGA como la utilizada en esta práctica, son:

AMINOÁCIDO	t _R
alanina	0'26
valina	0'29
isoleucina	0'36
glicina	0'37
leucina	0'41
prolina	0'44
treonina	0'47
serina	0'53
hidroxiprolina	0'63
metionina	0'66
fenilalanina	0'70
asparagina	0'72
glutamina + ac. glutámico	0'83
tirosina	0'89
ornitina	1'00
lisina	1'07

El ácido glutámico y la glutamina aparecen como un único pico, por producirse una transformación del ácido glutámico en glutamina durante el proceso. El resultado se expresa como "ácido glutámico + glutamina expresados como glutamina".

El primer pico que aparece inmediatamente después de la inyección corresponde al disolvente (diclorometano). A continuación emerge un pico irregular y asimétrico que corresponde al exceso de reactivo. A veces también pueden aparecer cierta cantidad de pequeños picos correspondientes a productos de descomposición y impurezas.

Cuestionario 22.2. - Aminoácidos por CG

- 1.- Deducir razonadamente las fórmulas utilizadas en los cálculos
- 2.- Hacer el esquema gráfico del procedimiento analítico
- 3.- Confeccionar el correspondiente "boletín de análisis".
- 4.- Idear un procedimiento para la determinación de aminoácidos por CG, basado en ese mismo, para el caso de que no dispusiésemos de patrón de ornitina.
- 5.- Diseñar un protocolo de análisis para poder trabajar simultáneamente con varias muestras.

APÉNDICE I

Modelo de boletín de análisis

En la página siguiente podemos ver un modelo de boletín de análisis de tipo profesional. El de este ejemplo es para el caso de un análisis. Si se hacen varios análisis distintos, deberá también adjuntar-se otro modelo de boletín con los resultados de todos los análisis.

(aquí el nombre y datos de la empresa)	NOMBRE Y APELLIDOS:	
	ANÁLISIS:	
Ref. muestra:	fecha inicial:	fecha final:
<u>descripción de la muestra</u>		
<u>datos</u>		
<u>cálculos</u>		
<u>RÉSULTADOS</u>		
<u>observaciones</u>	<u>firma</u>	

APÉNDICE II

Propuesta de trabajos

Esto es una sugerencia sobre trabajos que pueden ser propuestos a estudiantes de ciclos profesionales de química (o ramas afines) y universitarios.

Propuesta 1.- Elaborar un procedimiento para la determinación de la acidez volátil del vino, utilizando el aparato de destilación semimicro Kjeldhal. Hacer un estudio experimental y estadístico comparativo de ambos métodos (el tradicional de la práctica de la acidez volátil y el nuevo método experimentado). Comentar los resultados obtenidos.

Propuesta 2.- Diseñar una optimización del protocolo de la práctica 22.2 (determinación de aminoácidos por C.G.) que reduzca el tiempo de análisis por muestra. Hacer las comprobaciones experimentales y estadísticas necesarias para confirmar la bondad del procedimiento.

Propuesta 3.- Considerando los siguientes datos referentes a los esteroides: elaborar y verificar una metodología para cuantificar esteroides en grasas

- a) Los esteroides de las grasas están contenidos en la fracción insaponificable¹.
- b) Pueden ser separados del resto de los insaponificables mediante TLC² (todos juntos en una única mancha)³. La fase estacionaria es gel de sílice con indicador de fluorescencia y la fase móvil cloroformo.
- c) Los esteroides son separables por C.G., con los siguientes parámetros cromatográficos⁴:
 - columna OV-17 2'5 %, vidrio, 2m X $\frac{1}{4}$ " sobre Chromosorb G80/100.
 - detector FID (ionización de llama)
 - temperatura = 250 °C
 - temperatura de inyección = 300 °C
 - flujo de gas portador = 30 ml/mn
- d) Los esteroides son solubles en cloroformo y en éter etílico⁵.

¹ Utilizar el extracto obtenido de 5 gramos de grasa disuelto en 0'5 ml de cloroformo.

² Cromatografía en capa fina

³ Como patrón de referencia, utilizar 35 µgr de colesterol en cada extremo de la placa. Aplicar un total de 75 – 150 µl de muestra (en banda o en múltiples gotas)

⁴ Estos parámetros son orientativos; pueden experimentarse variaciones.

⁵ Se aconseja hacer varias extracciones en cloroformo y la última en éter etílico.

BIBLIOGRAFÍA

- ARRIBAS JIMENO, S: "**Marcha Analítica de Cationes sin Precipitación de Sulfuros**". Gráficas Summa (Oviedo).
- FERNÁNDEZ, F: "**Introducció a l'Anàlisi Química Instrumental**" EiLibros.
- FERRANDO, R. i HENRY, N.: "**Determinación Microscópica de los Componentes de los Piensos**". Ed. Acribia (Zaragoza).
- PANREAC: Colección "**Métodos Analíticos en Alimentaria**". M & E. SA.
- PROBUS SA: "**Métodos de Análisis. Análisis de Piensos y sus Materias Primas**". Probus SA.
- VOGEL, A I: "**Química Analítica Cuantitativa**". Ed. Kapelusz (Buenos Aires)

