

TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO DE ALIMENTOS

ÍNDICE:

1. GENERALIDADES DEL ANALISIS DE ALIMENTOS
2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO.
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS FISICO – QUÍMICOS DE ALIMENTOS.
4. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES GENERALES DE LOS ALIMENTOS.
 - a. Agua y sólidos totales.
 - b. Compuestos nitrogenados.
 - c. Lípidos.
 - d. Hidratos de Carbono.
 - e. Vitaminas.
 - f. Sustancias minerales.
 - g. pH
 - h. Acidez valorable total
 - i. Alcohol

1. GENERALIDADES DEL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Es necesario realizar un análisis de alimentos para asegurar que sean aptos para el consumo y para asegurar que cumplen con las características y composición que se espera de ellos.

El análisis de alimentos comprende tres grandes aspectos:

- a. **Análisis de composición y valor nutritivo**
- b. **Análisis de impurezas**
- c. **Detección de fraudes**

En los dos primeros casos tenemos dos tipos de análisis:

- **Análisis inmediato:** en el que se realiza una evaluación de los componentes globales de los alimentos. Se evalúa el contenido global en grasa, proteínas, hidratos de carbono, humedad y cenizas.
- **Análisis último:** en el que se evalúan los componentes concretos y se determinan las impurezas que se puedan detectar.

Un **FRAUDE** es una acción que implica un engaño al consumidor. Hay cinco tipos de fraudes:

- ✓ **Adulteración:** consiste añadir o eliminar alguna sustancia en el alimento con el fin de variar su composición, peso o volumen; o bien corregir u ocultar algún defecto que lo haga de menor calidad.
 - Añadir agua a la leche
 - Añadir colorantes al vino para enmascarar defectos de color
- ✓ **Falsificación:** consiste en sustituir un alimento por otro de menor precio.
 - Vender harina de centeno (o mezcla) como harina de trigo
- ✓ **Alimentos alterados:** un alimento está alterado cuando por causas no provocadas presenta características o composición que mermen o anulen su valor nutritivo (aunque el alimento sea inocuo al consumirlo).
 - Alimento sometido a un tratamiento térmico excesivo en el que se han eliminado todas las vitaminas termolábiles.
- ✓ **Alimentos contaminados:** un alimento se considera contaminado cuando contiene gérmenes patógenos, toxinas o parásitos productores o transmisores de enfermedades. También alimentos que contienen agentes polucionantes o isótopos radioactivos en cantidades superiores a la legales. El consumo de estos alimentos no tiene por qué desencadenar daño sobre el consumidor.
- ✓ **Alimentos nocivos:** un alimento es nocivo cuando produce daño en el consumidor. Se puede dar a tres niveles:
 - Toxicidad aguda: consumo en una sola vez de cantidades grandes del tóxico, como mayonesa con Salmonella.
 - Toxicidad crónica: como consumir agua con plomo, que no se elimina y puede dar lugar a la enfermedad conocida como saturnismo.

- Toxicidad selectiva: productos nocivos para un grupo de consumidores, como que un celíaco coma pan.

A la hora de realizar un análisis sobre un alimentos, nos podemos encontrar con tres problemas principalmente:

- I. Gran variabilidad de componentes, que además no están en cantidades fijas en productos similares. Dificulta el análisis porque hay que buscar componentes que sólo se encuentren en un ingrediente del alimento. Por ejemplo, para saber la cantidad de huevo que tiene una pasta se estudia el colesterol, y sabiendo la cantidad mínima de colesterol que puede tener un huevo, sabremos cuántos huevos hay.
- II. Gran cantidad de componentes en el alimento, que hace que puedan aparecer un número alto de interferencias analíticas. Por esto, existen diversas etapas de extracción, purificación y separación.
- III. Muchas veces interesan componentes minoritarios, lo que obliga a realizar etapas de purificación y concentración y a emplear técnicas que sean lo suficientemente sensibles.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

Todo análisis se inicia con la toma, la conservación y el tratamiento de una muestra de la sustancia en cuestión.

Si la característica o las características que se quieren evaluar son la presencia o ausencia de una determinada sustancia en un producto alimenticio, el control de calidad es relativamente simple, ya que basta con inspeccionar uno de los alimentos para conseguir la información buscada.

En cambio, si la propiedad tiene carácter aleatorio, es decir, si su variación está asociada con una cierta probabilidad y, por tanto, sólo afecta a un cierto número de componentes de la "población" total de productos, la valoración es más difícil.

Tales características aleatorias pueden ser el contenido en una cierta sustancia, la carga bacteriana, el peso neto del producto...

Aunque el examen no sea destructivo, es prácticamente imposible examinar todos los elementos de un lote de fabricación o de almacenamiento; por tanto, debemos concretar el control a un grupo, que constituirá la **muestra**, y el estudio hecho sobre ella será la **estimación sobre el muestreo**.

Esta estimación se puede realizar sobre atributos, es decir, asignando cada uno de los elementos examinados a una de las dos categorías establecidas como aceptable o no aceptable, según la propiedad analizada.

Asimismo, es posible hacer la estimación por variables; en este caso, se mide el carácter analizado y, según esta medida, se ordenan los elementos objeto de estudio.

Esta segunda forma de trabajo suministra más información que la primera, pero es más compleja.

La muestra elegida debe cumplir con dos características primordiales:

***Aleatoriedad**, esto es, todos los elementos que constituyen la población han de tener la misma probabilidad de ser elegidos como componentes de la muestra.

***Representatividad**, es decir, en la muestra elegida han de estar representados todos los posibles subgrupos que componen la población total.

En ocasiones ambas condiciones pueden presentar contradicción, puesto que, por la primera, la aleatoriedad, es posible que no se escojan algunos elementos pertenecientes a un subgrupo determinado.

Es posible obviar este inconveniente mediante procedimientos de estratificación, es decir, subdividiendo la población inicial en subgrupos o estratos, según uno o más criterios que se interesen para el estudio y, dentro de esos estratos, seleccionando aleatoriamente elementos que, una vez juntos, compongan la muestra final.

Un problema frecuente es concretar la cantidad óptima de elementos de la muestra, ya que si ésta es demasiado pequeña, su representatividad no estará garantizada, y si es grande en exceso, multiplicaremos esfuerzo y tiempo inútilmente.

Hay un sistema de trabajo que consiste en obtener el número de elementos de la muestra aplicando diferentes criterios probabilísticos.

Para el análisis químico sencillo es suficiente determinar n elementos con la siguiente expresión:

$$N = C/n$$

En ella, N es la población total sobre la que se realiza el muestreo y C , un factor relacionado con el grado de precisión de éste y la homogeneidad de la población; para una población homogénea, C es menor que uno, pero, si la heterogeneidad es alta, llega a ser mayor.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una vez que se ha seleccionado la muestra, se preparará dependiendo según el tipo de análisis que se vaya a hacer.

Las muestras se preparan de acuerdo con las características de los productos; no obstante, todas las operaciones tienen por finalidad conseguir una muestra lo más homogénea posible, porque si el tratamiento es insuficiente, es posible que los resultados no sean representativos.

Existen diversas técnicas que aseguran un muestreo adecuado.

Una de las más simples que, además, es aplicable a la mayoría de los alimentos, excepto a los líquidos, es la **técnica del cuarteo**, que consiste en recoger el material de diferentes puntos del alimento, o de distintos grupos del alimento, en una cantidad superior a la necesaria para el ensayo. Este material se distribuye en cuatro cuadrantes, previa homogenización, y se recoge el correspondiente a dos cuadrantes opuestos, que se vuelve a mezclar y a presentar como cuatro cuadrantes, procediéndose de la misma manera, hasta llegar a conseguir la cantidad de muestra necesaria.

Con el objeto de facilitar la preparación del alimento del que se van a obtener las muestras, y teniendo en cuenta la enorme heterogeneidad de

los productos alimenticios, los agruparemos en cinco clases, según el tratamiento que reciba la muestra:

- **Alimentos duros:** chocolate, queso curado, frutos secos, etc. Se rallan las muestras, evitando la separación de la grasa todo lo que sea posible.
- **Alimentos secos:** cereales, legumbres, harinas, leche en polvo...Se mezclan y muelen; finalmente, se tamiza la preparación.
- **Alimentos húmedos:** carnes, pescados, frutas, etc. Se quitan las diferentes capas protectoras con cuchillos y trituradoras eléctricas y se homogenizan.

La muestra se guarda en frascos limpios y secos, que deben quedar llenos para prevenir pérdidas de humedad. Después, se almacena en refrigeración con el fin de evitar su deterioro o cualquier cambio de composición.

- **Alimentos líquidos:** zumos, salsas, yogures...Se recoge la muestra, al máximo posible, dentro de un vaso o de un mortero seco y se homogeniza el producto batiéndolo. Se pone la muestra a una temperatura próxima a los 20 ° C. Si se desea conservar, se realizará a temperaturas de refrigeración.
- **Alimentos grasos:** aceites o grasas sólidas. Si las muestras son líquidas, deben estar fluidas y estar perfectamente limpias. Si el producto presenta turbidez o materia depositada, en algunas determinaciones es suficiente con agitar enérgicamente antes de extraer la muestra; para otras determinaciones, sin embargo, es necesario calentarla, agitarla y dejarla decantar. A continuación, se filtra sobre papel, en estufa mantenida a una determinada temperatura. Los productos sólidos (mantequilla o manteca) se han de fundir y filtrar en caliente.

En todas las operaciones y manipulaciones del alimento, es preciso evitar su deterioro o cualquier cambio en su composición, ya sea de naturaleza enzimática, oxidativa o por contaminación.

Además, hay que evitar la pérdida de componentes volátiles y la absorción de humedad o de sustancias que puedan alterar su composición.

La cantidad de muestra está en relación con los análisis que se desee realizar y con los métodos aplicados; en todo caso, cuando se hagan las determinaciones específicas para cada uno de los alimentos, se tiene que seguir el procedimiento marcado para la preparación de la muestra. En general, se puede afirmar que, en condiciones adecuadas, ha de haber cantidad suficiente para dividirla en tres partes, que se conservarán por separado en recipientes limpios, secos y con un cierre que asegure su hermeticidad, debidamente etiquetadas con todos los detalles sobre su origen, cantidad, fecha, persona que realiza el muestreo, procedimiento de la toma, condiciones de conservación, si existen, etc.

En la conservación de las muestras se debe tener presente el tiempo previsto hasta el inicio del análisis y los conservantes, si se añaden, no han de interferir las determinaciones posteriores.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO EN ALIMENTOS

A continuación, vamos a ver algunas de las técnicas físico químicas que se utilizan en el análisis de alimentos.

VOLUMETRÍAS

Las volumetrías consisten en medir el volumen de una disolución de concentración conocida necesario para reaccionar con la sustancia problema. A partir del volumen gastado de la sustancia valorante, se puede determinar la cantidad de analito.

Cuando se termina la reacción se alcanza el punto de equivalencia. En ese momento ocurren diversos cambios físico - químicos que podemos percibir directamente o por el empleo de una sustancia indicadora. Cuando detectamos esos cambios, se alcanza el punto final. No siempre coincide el punto de equivalencia con el punto final, lo deseable es que coincidan.

GRAVIMETRÍAS

Las gravimetrías son técnicas en la que la determinación final se basa en una pesada en una balanza analítica. La mayor precaución que hay que tener es que si lo que vamos a pesar ha sido previamente calentado, el enfriamiento se realice en ausencia de humedad, para ello se usan desecadores. Esto es importante, porque sino se pesa agua.

EXTRACCIÓN

Las extracciones pueden ser sólido - líquido y líquido - líquido.

En las extracciones sólido - líquido, está el extractor continuo más característico que es el Soxhlet. Con este mecanismo llega solvente continuamente y entra en contacto con el producto. El solvente junto con el componente que se quiere extraer, cae en una cubeta. En ella se evapora el disolvente, no el soluto. Son extracciones muy eficaces.

DESTILACIÓN

La destilación es la técnica de separar mediante calor los distintos componentes de la mezcla. El fundamento de la destilación consiste en calentar una muestra y que uno de los componente destile, éste se enfría, condensa y se puede recoger. En la corriente de vapor de agua se arrastran también algunos componentes que luego se recogen por medio de vapor.

MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS

La mayoría de estas técnicas se basan en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Cuanto menor es la longitud de onda de una radiación, mayor es la energía asociada. Dependiendo de la longitud de onda tenemos distintas radiaciones.

Básicamente, existen cuatro tipos de interacciones entre materia y radiación:

- Absorción de energía. Es en lo que se basa la técnica de colorimetría. En esta técnica se mide la concentración de una sustancia coloreada, basándonos en que ésta es proporcional a la intensidad de color en un intervalo determinado. El color observado puede ser propio de la sustancia (cualquier colorante) o bien, puede formarse tras la adición de algún reactivo.
- Emisión de energía posterior a una absorción
- Refracción de la luz por la materia. Se mide por el índice de refracción. Cada sustancia tiene un índice de refracción específico, y por tanto, la medida de éste índice nos sirve para caracterizar sustancias o bien, para saber la cantidad de algún componente determinado.
- Rotación de la luz polarizada. La técnica en la que se basa es la polarimetría. La luz polarizada es aquella que vibra en un solo plano. Hay sustancias que tienen la capacidad de desviar el plano de la luz polarizada, unas hacia la derecha (dextrógiras) y otras hacia la izquierda (levógiras). El ángulo de desviación está relacionado con la concentración de la sustancia. Midiendo esta desviación en las polarimetrías, podemos estimar la cantidad de analito existente, por ejemplo la glucosa es dextrógira y la fructosa es levógira.

Las técnicas que se basan en estas propiedades pueden ser:

① **Espectrometría de UV visible**: se basa en que la absorción de luz por parte de la sustancia es directamente proporcional a la concentración de la misma. Esta técnica sirve para análisis cuantitativo fundamentalmente.

② **Espectrofotometría de fluorescencia**: se basa en que algunas sustancias vuelven a emitir en forma de luz una porción de la energía absorbida. Una parte de la luz absorbida produce luz fluorescente. En bajas concentraciones, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración.

③ **Espectrofotometría infrarroja**: se da un bombardeo en la zona del infrarrojo y se hacen barridos que nos permiten identificar estructuras características. En general, da más información sobre el compuesto que en el visible. Es una técnica muy usada para el análisis de cafeína, o para ver rasa y lactosa en la leche.

④ **Espectrometría de absorción atómica**: se hace una atomización en una cámara de grafito, de manera que se crea una niebla de la muestra. Hay un quemador con forma de ranura que da una llama con una determinada longitud de onda. Los átomos se les hace llegar una radiación con una longitud de onda específica, de forma que los átomos absorben energía a esa longitud de onda. La cantidad de luz absorbida después de pasar a través de la llama determina la cantidad de analito en la muestra. Cuanta mayor cantidad de componente hay en la llama,

mayor cantidad de energía se absorbe. Es una técnica muy sensible, se usa por ejemplo para detectar metales pesados.

⑤ **Fotometría de llama:** se mide la intensidad de la radiación emitida por una sustancia que ha absorbido energía al quemarse una llama. Es muy sensible, se usa para metales.

⑥ **Espectrometría de masas:** lo primero que hay que hacer en esta técnica es ionizar las sustancias y posteriormente romperlas en trozos. A continuación se separan los distintos trozos en base a la relación masa / carga. En los espectros se puede visualizar la abundancia de las distintas relaciones masa / carga. Así, cada sustancia tendrá un espectro de masas característico. La espectrometría de masas sirve para análisis cualitativo básicamente.

⑦ **Resonancia magnética nuclear (RMN) y Resonancia de spin electrónico (RSN):** En ambas se miden las propiedades magnéticas de los spines. Esta técnica permite obtener información sobre la composición de las sustancias y datos sobre las propiedades físicas.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía es un método de separación con alta resolución. Es un método físico de separación, donde los componentes se distribuyen en dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil, que se va moviendo y transporta a los componentes a distintas velocidades por el lecho estacionario. Los procesos de retención se deben a continuas adsorciones y desorciones de los componentes de la muestra a lo largo de la fase estacionario.

Hay varios tipos de cromatografía. Los más importantes son:

- ① **Cromatografía en columna:** que puede ser líquida o de gases.
- **Cromatografía líquida (HPLC):** En la cromatografía líquida, los componentes a separar se añaden de forma soluble por la parte superior de la columna, quedando retenidos en la misma. Posteriormente, los componentes se desplazan arrastrados por una fase móvil líquida. Dependiendo de la adsorción selectiva de cada uno de ellos por la fase estacionaria se desplazan a distintas velocidades, efectuándose la separación. Para alcanzar una alta resolución, sería necesario emplear columnas excesivamente largas o empaquetamiento muy compactos, lo que se traduce es un desarrollo muy lento. Estos inconvenientes se han resuelto en la cromatografía de alta presión (HPLC), en la que se trabaja con pequeñas columnas muy empaquetadas y forzando el paso de la fase móvil mediante elevadas presiones. Al final, tiene un sistema de registro gráfico (Cromatograma), que es un registro de picos donde para cada componente el área del pico es proporcional a la concentración. Este tipo de cromatografía tiene muchas aplicaciones, por ejemplo, para determinar aditivos, colorantes, vitaminas....

- Cromatografía de gases: se basa en la separación de los componentes de una muestra entre la fase móvil (gas portador) y la estacionaria (líquido no volátil adsorbido en un soporte). La separación se logra gracias a diferencias de solubilidad en la fase estacionaria y a diferencias de volatibilidad. La fase móvil es inerte, solo arrastra moléculas a través del sistema. La separación se debe solamente a las interacciones entre la muestra y la fase estacionaria.

② **Cromatografía en papel**: consiste en una tira de papel de filtro que actúa como soporte, en la cual se marca el lugar donde se añade la muestra dejando que el disolvente ascienda por capilaridad. Cada componente asciende hasta una altura. Cuando se termina, se marca la posición y se deja secar. Pueden aparecer manchas coloreadas según los distintos componentes o utilizar técnicas de revelado.

③ **Cromatografía en capa fina**: es una técnica que se ideó para solventar las limitaciones de la cromatografía en papel. Es una técnica de separación e identificación de sustancias por medio de un disolvente que se mueve en una capa delgada de un adsorbente depositado sobre una placa de vidrio que actúa como soporte inerte.

4. ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES GENERALES

Las determinaciones básicas de un alimento consisten en investigar una serie de elementos, en algunos casos de forma genérica; por eso se suele emplear el término "bruto" para indicar que lo que se determina no son compuestos individuales, sino conjuntos de sustancias más o menos próximas estructural y funcionalmente.

Estas determinaciones comprenden agua (humedad y sólidos totales), cenizas totales, fibra bruta, extracto etéreo (grasa bruta), nitrógeno y proteína bruta.

Al resto de sustancias se las llama sustancias extractivas no nitrogenadas, carbohidratos por diferencia o carbohidratos totales (en este caso está incluida la fibra bruta) y se las determina restando a 100 la suma de los porcentajes de agua, cenizas, fibra bruta, extracto etéreo y proteína bruta. Es posible también determinar directamente los hidratos de carbono por métodos físicos y químicos.

Además, es interesante determinar el pH y, en algunos alimentos, la acidez valorable, el alcohol y el potencial redox.

A partir de la determinación de algunas de estas sustancias se pueden identificar sus elementos constitutivos; así, por ejemplo, una vez extraído el extracto etéreo, se identifican los ácidos grasos o, en el caso de las cenizas, se pueden determinar los iones y los cationes.

1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN AGUA Y SÓLIDOS TOTALES

Todos los alimentos contienen agua en mayor o menor proporción; en los alimentos naturales hay entre un 60% y un 95 % de agua, como promedio. El hecho de conocer este contenido y poder modificarlo tiene aplicaciones inmediatas: saber cuál es la composición centesimal del producto, controlar las materias primas en el área industrial y facilitar su elaboración, prolongar su conservación impidiendo el desarrollo de microorganismos, mantener su textura y consistencia y finalmente, frenar los intentos de fraude y adulteración si el producto no cumple los límites fijados por la normativa vigente.

En algunas ocasiones, es difícil determinar con exactitud la cantidad de agua de un alimento. Se puede considerar apropiado cualquier método que proporcione buena reproductibilidad con resultados comparables, siempre que se siga estrictamente ese procedimiento mismo procedimiento en cada ocasión. También es admisible el uso de métodos rápidos para los que las casas comerciales suministran los correspondientes materiales, si sus

resultados se contrastan con los suministrados por algún otro método convencional.

Los resultados se suelen expresar como humedad, agua y sólidos totales. Se habla de humedad cuando la cantidad de agua que hay en un alimento es relativamente baja (harinas, legumbres...). Se habla de agua en alimentos con mayor contenido acuoso (vegetales y carnes) y de sólidos totales en alimentos líquidos que se obtienen restando a 100 la cantidad de agua.

La determinación de agua es necesaria ya que en muchos alimentos se regula su contenido máximo en base a alguna de las siguientes consideraciones:

1. La adición de agua en algunos alimentos puede suponer una adulteración.
2. Contenidos elevados de agua en alimentos dificultan la conservación.
3. Contenidos elevados de agua en los alimentos crean dificultades tecnológicas en algunos procesos.

Normalmente para su determinación se utilizan el método de desecación, que se basa en el cálculo de porcentaje en agua por la pérdida de peso debida a su eliminación. Ofrecen buenos resultados que se pueden interpretar sobre bases de comparación, pero hay que tener en cuenta ciertas precisiones, en algunos casos, si se utiliza calor, a temperaturas altas el alimento puede deteriorarse y facilitar la eliminación de otras sustancias de descomposición así como la pérdida de otras sustancias más volátiles que el agua.

Hay distintos métodos para determinar el contenido en agua:

MEDIDAS DE PARÁMETROS FÍSICOS

- Índice de refracción (miel)
- Densidad (alimentos líquidos)
- Punto de solidificación (alimentos líquidos)
- Absorbancia en el NIR
- Parámetros eléctricos (alimentos en polvo)

Todas estas medidas van a dar unos valores aproximados. Es necesario realizar una calibración o una comparación de resultados con otros métodos de análisis de agua.

TÉCNICAS DE SECADO

Se realiza una **gravimetría**. El fundamento de la técnica es: se pesa la sustancia con humedad, se seca y se vuelve a pesar la sustancia seca. Con la diferencia de pesos se puede hallar fácilmente el porcentaje de humedad.

Como la mayoría de los métodos de secado se emplea calor, es muy importante que el último enfriamiento se realice en ausencia de humedad (desecadores).

Para realizar el secado, contamos con:

■ **Estufas de desecación:** es la técnica más empleada. Se utilizan temperaturas de 102 – 105°C (siempre por encima del punto de ebullición del agua). Para garantizar la completa desecación de la muestra es necesario trocearla, para así aumentar la superficie de contacto; y en el caso de alimentos líquidos hacer previamente un baño de vapor y retirar la capa superior que se forma para facilitar la evaporación.

■ **Desecación con intermedio:** también se realizan en estufas y consiste en añadir una sustancia inerte que se mezcla con el alimento de manera que se aumente la superficie de desecación y así evitar la formación de costras.

■ **Desecación a vacío:** se utilizan para minimizar los problemas que pueden tener las temperaturas tan elevadas. Se emplea una estufa donde se genera un vacío de modo que el agua se evapora a menor temperatura y así no se produce la descomposición de sustancias.

■ **Desecación bajo corriente de aire seco:** se hace a temperatura ambiente o menor de 100°C, así no se produce descomposición.

■ **Desecación con agentes deshidratantes fuertes:** se hace a temperatura ambiente o menor de 100°C, así no se produce descomposición.

■ **Desecación bajo lámpara de infrarrojos:** se usa poco, pero es más rápida. Esta técnica provoca la evaporación del agua, hay que controlar que no se queme la muestra.

■ **Aplicación de microondas:** se usa poco, pero es más rápida. Son unos aparatos automáticos que tienen una balanza, se calientan y dan el resultado directamente.

En cualquiera de estas técnicas el cálculo final que se ha de aplicar es:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(M - m) \cdot 100}{M}$$

Siendo :

M = masa inicial, en g. de la muestra.

m = masa, en g., de la muestra seca.

TÉCNICAS BASADAS EN LA DESTILACIÓN

Se emplea un aparato llamado **Dean – Stark**, que consta de un matraz de fondo redondo acoplado a un refrigerante. En el matraz colocamos el alimento molido cuya humedad queremos determinar junto con un disolvente orgánico volátil de punto de ebullición próximo al del agua e inmiscible con ella. El conjunto de disolvente y alimento se calienta y se

produce una codestilación del disolvente y el agua del alimento. Al llegar al refrigerante condensan cayendo sobre una especie de bureta graduada donde ambos se separan, ya que son inmiscibles. Se mide el agua una vez que el proceso haya finalizado y se haya evaporado todo. El empleo de esta técnica evita los problemas de degradación de sustancias y también la pérdida de sustancias volátiles. El mayor inconveniente es que la lectura de un volumen es mucho menos precisa que una pesada.

MÉTODOS QUÍMICOS

Se basan en reacciones químicas en las cuales participa el agua. Estas reacciones se llevan a cabo en un medio anhidro de modo que el agua procede única y exclusivamente del alimento. Se suelen emplear en alimentos con bajos contenidos en agua. Estos métodos evitan problemas de degradación de sustancias y pérdida de volátiles. El más utilizado es:

■ **Método de Karl - Fischer:** Va bien para productos azucarados. Se basa en la reacción: $I_2 + H_2O + SO_2 \leftrightarrow 2I^- + 2H^+ + 2H_2SO_4$ valorándose el I_2 que no reacciona. La muestra se pone en contacto con metanol anhidro para que éste extraiga todo el agua y posteriormente se hace una valoración con el reactivo de Karl - Fisher, que contiene I_2 y SO_2 . El yodo del reactivo va reaccionando con el agua, de manera que el punto final de la reacción se detecta gracias al exceso de yodo cuando ya no queda agua. Este exceso se puede detectar de forma visual, fotométrica o electrométricamente.

La determinación de agua según este método suele emplearse cuando la determinación de agua o humedad por pérdida de peso es imprecisa (es decir, aquellos alimentos que tienen un contenido de humedad bajo). A pesar de la necesidad de utilizar procedimientos bastantes exactos para calibrar el proceso y que el número de muestras analizadas está limitado, muchos analistas recomiendan este método como procedimiento de referencia, particularmente para la determinación de niveles bajos de humedad en los alimentos. Es el que se emplea en primer lugar en productos como azúcar, chocolates, melazas y legumbres secas.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE AGUA

El parámetro que va a estar más relacionado con la alterabilidad de los alimentos no es el agua, sino la actividad del agua (a_w). La actividad de agua es una medida que nos da idea del agua disponible por parte de los microorganismos, es decir, agua que no está fuertemente retenida.

Para medirla se encierra el alimento en un compartimento, se alcanza un equilibrio y se mide la humedad en la capa de aire que rodea la muestra.

2. NITRÓGENO Y PROTEÍNA BRUTA

En un análisis elemental de un alimento, lo más frecuente y menos complejo es investigar la proteína bruta de los diferentes aminoácidos o proteínas específicas. No obstante, los procedimientos más utilizados no determinan directamente esta proteína, sino el contenido en nitrógeno, que se expresa como nitrógeno total y que se obtiene mediante una combustión líquida en la que, en un primer paso, el nitrógeno de la muestra se convierte en sulfato amónico, el cual luego se transforma en amoníaco. Este amoníaco se destila y se valora en una solución ácido normalizada.

Esta técnica desarrollada por Kjeldahl, se ha convertido en método de referencia con múltiples modificaciones. Determina la materia nitrogenada total, que incluye tanto al nitrógeno proteico como al no proteico.

La proteína bruta se halla multiplicando el nitrógeno total (N) por un factor, que se ha calculado considerando los componentes básicos de un gran número de muestras del mismo alimento, y expresando el resultado como proteína. Alguno de estos factores, universalmente aceptados, son los siguientes.

Factor General:	6,25
Leche y Derivados:	6,38
Harina de Trigo:	5,70
Gelatina:	5,55
Arroz:	5,95
Huevos:	6,68
Productos de soja:	6,00

La técnica más utilizada es el método Kjeldahl.

MÉTODO KJELDAHL

Este método se trata de una **volumetría**. El método puede resumirse en tres etapas:

a) Digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de catalizadores que aceleran el proceso, aumentando el punto de ebullición del ácido. Con esta digestión, transformamos el nitrógeno (en su mayor parte orgánico) en sulfato amónico (nitrógeno amoniacal). Pasamos a medio alcalino mediante la adición de hidróxido sódico concentrado, y se destila el nitrógeno en forma de amoníaco en corriente de vapor de agua. $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{NH}_3 \uparrow$.

b) El amoníaco desprendido se recoge sobre un exceso de ácido. $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ (exceso)} \rightarrow (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

c) Por último se valora el exceso de ácido mediante una base. $\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$.

Con este método, podemos calcular el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Multiplicando por un número que varía según el alimento, podemos estimar el porcentaje de proteínas.

La desventaja de este método es que se determina todo tipo de nitrógeno en la muestra, así, si un alimento tiene muchas bases nitrogenadas, el porcentaje de proteína se estima por encima del valor real. Las principales ventajas son que es un método rápido y además, económico.

MÉTODO DUMAS

En este método se hace una combustión de la muestra (entre 700 y 800°C) y el nitrógeno procedente de esta combustión se separa y cuantifica mediante cromatografía de gases con detector de conductividad térmica.

De este modo, podemos estimar la cantidad de nitrógeno en la muestra, hallar su porcentaje multiplicando por n factor, calcular el número de proteínas.

En este método, al igual que en el anterior, se determina todo tipo de nitrógeno en la muestra, por lo que en ocasiones, el porcentaje de proteína se estima por encima del valor real. Además, en este caso, el aparato es caro. Como ventaja tiene que es un método rápido.

3. DETERMINACIÓN DE GRASA BRUTA

Como en todas las determinaciones indicadas hasta aquí, con este procedimiento se logra identificar materia capaz de disolverse en solventes orgánicos muy eficaces para la grasa. No obstante, en los métodos en que se emplea calor, es posible que se pierda una parte de esa grasa por evaporación: en el mismo sentido, existen sustancias que se extraen de forma simultánea con la grasa verdadera, como es el caso de algunos colorantes, y que no pertenecen estrictamente a este grupo funcional, de ahí el adjetivo "bruta" utilizado.

Los procedimientos pueden ser la extracción directa mediante un disolvente; la extracción indirecta tras un tratamiento con un álcali o un ácido; la medida del volumen de grasa separada por centrifugado de una mezcla de la muestra con reactivos ácidos, alcalinos o neutros; y la medida de cambios en el índice de refracción o en el peso específico por variación de la concentración de la grasa en disolución. Los métodos implican el pesado de la grasa, aunque en análisis de rutina con una gran cantidad de muestras, se emplean métodos volumétricos más rápidos.

Los disolventes que se usan suelen ser el éter de petróleo, que es el mejor agente para muestras secas; el éter dietílico, más eficiente, pero extrae sustancias no grasas; el cloroformo; el sulfuro de carbono, el

tetracloruro de carbono... El rendimiento y la composición de los extractos resultantes difieren según el disolvente empleado; por eso, es necesario indicar siempre el disolvente o la técnica que se ha utilizado en la extracción.

Los métodos más generalizados y que sirven de referencia son los de extracción continua tipo Soxhlet o Bailey-Walker.

Si la muestra tiene interferencias en la determinación por su riqueza en proteínas, se hidroliza con ácidos o álcalis, o la proteína se precipita con alcohol y se disuelve en amoníaco antes de la extracción.

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

La extracción de grasa se hace por medio de disolventes. Los disolventes polares más empleados son el hexano y el éter de petróleo. Siempre que se realice un método de extracción hay que indicar el solvente empleado, ya que los distintos solventes no extraen los mismos componentes.

❶ Cuando se realiza una extracción y el alimento es sólido, hay que realizar una etapas previas para facilitarla:

1. Deseccación de la muestra: para que el solvente penetre mejor en las células. Además, algunos solventes como el éter dietílico son higroscópicos y pueden captar algo de agua.
2. Troceamiento y molturación: se rompen físicamente las estructuras del alimento. Al romper las células, el solvente extrae mejor los lípidos.
3. En alimentos ricos en proteínas, es necesario realizar una hidrólisis en medio ácido.
4. En algún caso se emplean intermedios (como la arena) que se mezclan en el alimento evitando aglomerados.

❷ Después de estas etapas se realiza la extracción con éter.

❸ A continuación se evapora el disolvente y se pesa el residuo; así, por diferencia, se puede conocer la cantidad de grasa y calcular el porcentaje de lípidos en el alimento.

CARACTERIZACIÓN DE GRASAS

Sobre una grasa, se pueden evaluar unos índices físicos y químicos que nos van a servir para caracterizarla. Estos índices son:

FÍSICOS

1. Índice de refracción.
2. Densidad.
3. Punto de solidificación.
4. Punto de fusión

QUÍMICOS

1. Índice de acidez.
2. Índice de peróxidos (mide el enranciamiento).
3. Índice de yodo (mide dobles enlaces).
4. Índice de saponificación.

CROMATOGRAMA DE ÁCIDOS GRASOS

Para hacer un estudio del perfil de ácidos grasos se hace una hidrólisis de los triglicéridos que pasan a ácidos grasos. Luego se separan y cuantifican por cromatografía de gases con detector de ionización de llama. Como los ácidos grasos no son cromatografiables hay que obtener derivados que sí lo sean. Lo más común es la obtención de ésteres metílicos de ácidos grasos. Estos ésteres se inyectan en el cromatógrafo, se separan los ácidos grasos y se cuantifican. Los ácidos grasos están directamente relacionados con la producción de colesterol.

4. ANÁLISIS DE HIDRATOS DE CARBONO

Normalmente, cuando se hace un análisis de principios inmediatos se determina: humedad, proteína bruta, lípidos (grasa bruta) y cenizas. Los hidratos de carbono normal mente se dan por diferencia.

Si queremos evaluar los hidratos de carbono, se siguen las siguientes etapas:

- ① Desecación de la muestra.
- ② Eliminación de lípidos (extracción con éter).
- ③ Extracción de hidratos de carbono.
- ④ Purificación y cuantificación por técnicas cromatográficas (HPLC).

ANÁLISIS DE ALMIDÓN

Se trata de una polarimetría. El método comprende una doble determinación. En la primera, la muestra se trata en caliente mediante ácido clorhídrico diluido. Previa defecación y filtración, se medirá mediante un polarímetro el poder rotatorio de la solución.

En el segundo, la muestra se extrae mediante etanol al 40%. Tras la acidificación del filtrado por el ácido clorhídrico, defecación y filtración, se mide el poder rotatorio en las mismas condiciones que en la primera determinación.

La diferencia entre las dos multiplicada por un factor común da como resultado el contenido en almidón de la muestra.

El método permite determinar el contenido en almidón y sus productos de degradación de alto peso molecular en los piensos, excepto de aquellos que contienen peladuras, pulpas, hojas o cuellos secos de remolacha, pulpa de patata, levadura deshidratada, productos ricos en inulina (por ejemplo, peladuras y harina de chufas) o chicharrones.

ANÁLISIS DE FIBRA

Dentro de los hidratos de carbono hay un grupo de hidratos de carbono complejos que nuestro organismo no es capaz de digerir y que por tanto se engloban dentro de la fibra alimentaria. Además de esta fibra, existen otros componentes que no son de naturaleza glucídica (no son hidratos de carbono) y esta fibra se suele analizar a parte.

Hay varios métodos, dependiendo del método empleado evaluaremos distintos tipos de fibra:

1. Determinación de fibra bruta

Determinación en los piensos de las sustancias orgánicas libres de grasa e insolubles en medio ácido y alcalino, convencionalmente denominadas fibra bruta (generalmente se evalúa el contenido en lignina y celulosa). La muestra, en su caso desengrasada, se trata sucesivamente con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio, de concentraciones determinadas. Se separa el residuo por filtración mediante filtro de vidrio poroso, se lava, se seca, se pesa y se calcina a una temperatura comprendida entre 475 y 500°C. La pérdida de peso debida a la calcinación corresponde a la fibra bruta de la muestra de ensayo.

2. Determinación de alimentaria o dietética.

La muestra se extrae con una solución de detergente neutro en caliente. Al residuo se le realizan ataques con una solución amilásica o proteásica y se filtra. El residuo resultante tras los ataques enzimáticos es más próximo a la fibra real. La determinación de las cenizas en el residuo filtrado permite conocer, por diferencia de peso, la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina de la muestra

5. ANÁLISIS DE VITAMINAS

Para el análisis de vitaminas existen diversos tipos de métodos:

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Se basan en cultivos de cepas de microorganismos cuyo desarrollo depende específicamente de una determinada vitamina. Se usan básicamente en vitaminas hidrosolubles. El medio de cultivo donde realizamos la siembra carece de la vitamina en cuestión y ésta es aportada por extractos del alimento donde queremos evaluar la vitamina. Paralelamente se hace un control donde sembramos el microorganismo sin vitaminas y también se siembra el microorganismo en diversos medios con contenido vitamínico diverso. Se compara el crecimiento.

MÉTODOS BIOLÓGICOS

Se observan los efectos curativos o fisiológicos de las vitaminas sobre animales de experimentación. Son los que menos se utilizan porque la experimentación animal es muy variable, además son ensayos muy largos e influye el factor ético. Además, los microbiológicos son mejores.

MÉTODOS FÍSICO - QUÍMICOS

Van bien para la mayoría de las vitaminas, aunque en la mayor parte de ellos nos encontramos con tres problemas fundamentales.

1. Son más inestables. Las vitaminas se pueden destruir por calor, ácidos, bases, luz... Por esto, durante todo el proceso (toma de muestras, almacenamiento, procesado y análisis) deben evitarse los factores que provoquen la destrucción de la vitamina.
2. Baja concentración de las vitaminas en los alimentos.
3. Existencia de diversos vitámeros, que son sustancias con actividad vitamínica y composición diferente.

Desde el punto de vista analítico hay dos tipos de vitaminas: las liposolubles o solubles en disolventes orgánicos y las hidrosolubles o solubles en agua. Esta clasificación es útil porque da idea de los procesos extractivos que hay que realizar.

Normalmente, las vitaminas se analizan por técnicas de **HPLC**.

6. ANÁLISIS DE SUSTANCIAS MINERALES

La determinación de ceniza se hace para realizar el análisis de sustancias minerales. Bajo el nombre de cenizas se engloba el conjunto de sustancias que quedan como residuo tras su incineración. Básicamente está formado por sustancias inorgánicas.

Este parámetro os puede indicar una posible adulteración del alimento, por ejemplo un alimento en polvo donde se añade cáscara de algún fruto seco.

DETERMINACIÓN DE CENIZAS

Se entiende por cenizas como el residuo inorgánico que queda tras eliminar totalmente los compuestos orgánicos existentes en la muestra, si bien hay que tener en cuenta que en él no se encuentran los mismos elementos que en la muestra intacta, ya que hay pérdidas por volatilización y por conversión e interacción entre los constituyentes químicos.

A pesar de estas limitaciones, el sistema es útil para concretar la calidad de algunos alimentos cuyo contenido en cenizas totales, o sus determinaciones derivadas, que son cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en ácido,

está bien definido. Facilita en parte, su identificación o permite clasificar el alimento examinado en función de su contenido en cenizas.

La determinación consiste en incinerar la muestra en horno mufla, hasta ceniza blanca en una cápsula. Los resultados se suelen expresar porcentualmente tras aplicar la siguiente relación:

$$\%cenizas = \frac{(P_1 - P_2) \cdot 100}{P - P_2}$$

P es el peso en gramos de la cápsula más el de la muestra; P1 es el peso en gramos de la cápsula más las cenizas; P2 es el peso en gramos de la cápsula en vacío.

Los recipientes más empleados para la obtención de cenizas son cápsulas de porcelana

7. DETERMINACIÓN DE pH

La acidez medida por el valor de pH, junto con la humedad son, probablemente, las determinaciones que se hacen con más frecuencia. El pH es un buen indicador del estado general del producto ya que tiene influencia en múltiples procesos de alteración y estabilidad de los alimentos, así como en la proliferación de microorganismos.

Se puede determinar colorimétricamente mediante los indicadores adecuados, pero, para su mayor exactitud, se ha de recurrir a métodos eléctricos mediante el uso de pH-metros.

8. ACIDEZ VALORABLE TOTAL

Además del grado de acidez expresado por el pH, el contenido total de ácido en un alimento informa sobre la formulación del producto. Se suele concretar valorando con hidróxido sódico y un indicador. Los resultados se dan en términos del ácido que predomina; por ejemplo, en la leche, como ácido láctico y en el vinagre, como acético. En algunos casos, se expresa en términos de equivalencia de peso de un álcali determinado; así, los fosfatos ácidos utilizados en la levadura en olvo se dan como bicarbonato sódico.

9. ALCOHOL

Normalmente, el alcohol se determina destilando un volumen medido de muestra, diluyendo con agua este destilado hasta el mismo volumen inicial y deduciendo el contenido en alcohol a partir de la densidad del líquido mediante tablas alcoholimétricas. La cantidad de alcohol se expresa porcentualmente en volumen.