

# **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-086-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHOLICAS CON MODIFICACIONES EN SU COMPOSICION. ESPECIFICACIONES NUTRIMENTALES.**

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 194 fracción I, 197, 199, 201, 210 y 216 de la Ley General de Salud; 38 fracción II, y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 739, 741, 743 fracción II inciso b), 744, 752 fracción II inciso b), 785 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud.

## **PREFACIO**

En la elaboración de la presente norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

### **SECRETARIA DE SALUD**

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios  
Dirección General de Atención Materno Infantil  
Laboratorio Nacional de Salud Pública

### **INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

### **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Química

### **CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE LA TRANSFORMACION**

COCA COLA DE MEXICO, S.A. DE C.V.

COMPAÑIA NESTLE, S.A. DE C.V.

KELLOGG DE MEXICO, S.A. DE C.V.

PROCTER & GAMBLE DE MEXICO, S.A. DE C.V.

PRODUCTOS GERBER, S.A. DE C.V.

## INDICE

0. INTRODUCCION	
1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	
2. REFERENCIAS	
3. DEFINICIONES	
4. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	
5. CLASIFICACION	
6. DISPOSICIONES	
7. ESPECIFICACIONES NUTRIMENTALES	
8. ESPECIFICACIONES SANITARIAS	
9. MUESTREO	
10. METODOS DE PRUEBA	
11. ETIQUETADO	
12. ENVASE	
13. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	
14. BIBLIOGRAFIA	
15. OBSERVANCIA DE LA NORMA	
16. VIGENCIA	
17. APENDICES NORMATIVOS	
APENDICE A	
APENDICE B	
APENDICE C	

### **0 Introducción**

Las ciencias médico-biológicas comprueban día a día la correlación que existe entre la salud y la alimentación; debido a esto en nuestros tiempos se elaboran en grandes cantidades alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición por disminución, eliminación o adición de nutrimentos con la finalidad de contribuir a evitar deficiencias y prevenir excesos perjudiciales para la salud. Como consecuencia se hace necesario establecer las especificaciones nutrimentales a que deben sujetarse dichos productos, unificando sus denominaciones y orientando al consumidor sobre sus características.

### **1. Objetivo y campo de aplicación**

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones nutrimentales que deben observar:

1.1.1 Los alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición.

1.1.2 Los alimentos envasados y a base de cereales para lactantes y niños con adición de nutrimentos.

Quedan excluidos de esta norma las fórmulas para lactantes, las fórmulas de continuación y los productos para fines medicinales o terapéuticos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

### **2. Referencias**

Esta norma se complementa con lo siguiente:

NOM-051-SCFI-1994 Especificaciones Generales de Etiquetado para los Alimentos y Bebidas no Alcohólicas Preenvasados.\*

NOM-120-SSA1-1994 Prácticas de Higiene y Sanidad para el Proceso de Alimentos, Bebidas no Alcohólicas y Alcohólicas.

### **3. Definiciones**

Para fines de esta norma se entiende por:

3.1 Adicionar, añadir uno o más nutrimentos, contenidos o no normalmente en el producto.

3.2 Alimento con menor contenido de \_\_\_\_\_, es aquel al que se le han disminuido o eliminado el contenido de uno o más nutrimentos en relación a su concentración original.

3.3 Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, productos a los que se les han introducido cambios por adición, disminución o eliminación de uno o más de sus nutrimentos, tales como hidratos de carbono, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales; y que forman parte de la dieta habitual.

3.4 Buenas prácticas de fabricación, conjunto de normas y actividades relacionadas entre sí, destinadas a garantizar que los productos tengan y mantengan las especificaciones requeridas para su uso.

3.5 Edulcorante sintético, sustancia orgánico-sintética, que puede sustituir parcial o totalmente el dulzor de los edulcorantes naturales.

3.6 Enriquecer, es adicionar una o varias vitaminas, minerales o proteínas (aminoácidos) en concentraciones superiores a los que normalmente contiene el producto.

3.7 Envase, todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria.

3.8 Envase secundario, aquel que contiene al envase primario. Ocasionalmente agrupa los productos envasados con el fin de facilitar su manejo.

3.9 Etiqueta, todo rótulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o gráfica ya sea que esté impreso, marcado, grabado, en relieve, hueco, estarcido o adherido al empaque o envase del producto.

3.10 Fibra dietética, componentes del material vegetal (polisacáridos no amiláceos y lignina) que no son digeridos por las enzimas del sistema digestivo de los mamíferos.

3.11 Fortificar, es adicionar una o varias vitaminas, minerales o proteínas (aminoácidos) que normalmente no contiene el producto.

3.12 Gluten, aquellas proteínas que se encuentran en el trigo, triticales, centeno, cebada o avena.

3.13 Métodos de prueba, procedimientos analíticos utilizados en el laboratorio para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

3.14 Nutrimiento, sustancia que juega un papel metabólico y está habitualmente presente en la dieta.

3.15 Porción, cantidad de producto en unidades del sistema internacional que normalmente se consume por ingesta de acuerdo a lo establecido en el apéndice normativo A.

3.16 Recomendación nutrimental, es la cantidad de un nutrimento que las autoridades en materia de nutrición de un país, recomiendan ingerir a los distintos grupos de población, para cubrir sobradamente los requerimientos de ese nutrimento.

3.17 Restauración, adición de uno o más nutrimentos de los que se han perdido durante la elaboración, en una concentración igual a aquella contenida en el alimento original.

#### **4. Símbolos y abreviaturas**

Cuando en esta norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas, se entiende por:

a alfa

b beta

nm nanómetro

g gramo

mg miligramo

µg microgramo

kg kilogramo

ml mililitro

% por ciento

Kcal kilocaloría

BPF buenas prácticas de fabricación

G.R. grado reactivo

P.E. punto de ebullición

N normal

M molar

min minuto

h hora

°C grados Celsius

pH potencial de hidrógeno

m/v masa sobre volumen

v/v volumen sobre volumen

m/m masa sobre masa

No. número

± más, menos

> mayor que

< menor que

> mayor o igual

x por

rpm revoluciones por minuto

l litro

µl microlitro

cm<sup>2</sup> centímetro cuadrado

mm<sup>2</sup> milímetro cuadrado

pp. páginas

p. página

Cuando en la presente norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

## **5. Clasificación**

Los productos objeto de esta norma por la modificación en su composición, se clasifican de acuerdo a las siguientes denominaciones:

5.1 Productos con menor contenido de \_\_\_\_\_:

5.1.1 sodio

libres o sin

muy bajos

bajos

reducidos

5.1.2 grasa

sin

bajo

reducido

5.1.3 grasa saturada

bajo

reducido

5.1.4 colesterol

sin

bajo

reducido

5.1.5 calorías

sin

bajo

reducido

5.1.6 gluten

sin

5.1.7 azúcar

sin

reducido

5.2 Productos adicionados

restaurados

enriquecidos

fortificados

## **6. Disposiciones**

Los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

6.1 Cuando se haya identificado un alimento como fuente importante de energía o de nutrimentos esenciales en la alimentación, pueden restaurarse aquellos que se hayan perdido durante la elaboración.

6.2 Los nutrimentos que se permiten adicionar a los alimentos, siempre y cuando se cumpla con lo establecido en el punto 6.3, son los siguientes:

6.2.1 Aminoácidos: para mejorar la calidad nutritiva de las proteínas, pueden añadirse aminoácidos esenciales, únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, las cuales deben ser en su forma natural L.;

6.2.2 Las vitaminas: ácido ascórbico, niacinamida, riboflavina, tiamina, vitamina A, vitamina E, vitamina B6, vitamina B12, D-pantotenamida, ácido fólico, vitamina D, vitamina K y biotina;

6.2.3 Los minerales: calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio, zinc y yodo (como yodato de potasio);

6.2.4 Proteínas: de pescado, de soya, ovoalbúmina, de leche y de suero de leche y otras fuentes inocuas, y

6.2.5 Fibra dietética.

6.3 Los interesados que deseen adicionar o que adicionan nutrimentos a los productos objeto de esta norma, deben tener por escrito la siguiente información; misma que deberán poner a disposición de la Secretaría cuando ésta lo solicite. En caso de verificaciones sanitarias, dicha información se entregará al verificador sólo si el oficio lo señala.

6.3.1 Grupo de población al que va dirigido;

6.3.2 Fuentes del nutrimento en la dieta y el consumo global en la población;

6.3.3 Vehículo propuesto para la adición, incluyendo el volumen de producción anual de dicho alimento;

6.3.4 Nutrimento o nutrimentos que se van a adicionar, forma química, en qué cantidad y mediante cuál procedimiento;

6.3.5 Demostrar la estabilidad del nutrimento adicionado en el alimento durante su vida de anaquel. Si la empresa no cuenta con los recursos para dicha demostración, podrá auxiliarse de un organismo aprobado por la Secretaría y acreditado por la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial;

6.3.6 Soportes bibliográficos que demuestren la absorción del nutrimento en la forma química en la que se adicionó;

6.3.7 Para el caso de las vitaminas D, K, ácido pantoténico, biotina y demás nutrimentos para los que no exista una ingestión diaria recomendada, se debe justificar la adición con estudios nacionales o internacionales que demuestren la necesidad en la población nacional, y

6.3.8 En caso de generarse problemas de salud pública debidos a la carencia o a una alta ingestión de algún nutrimento, la Secretaría procederá conforme a lo establecido en la Ley General de Salud y su Reglamento.

## **7. Especificaciones nutrimentales**

Los productos objeto de este ordenamiento deben cumplir con las siguientes especificaciones:

7.1 Los productos con menor contenido de sodio son aquellos a los que se les ha disminuido o eliminado el sodio, denominándose de acuerdo a lo siguiente:

7.1.1 Productos libres de o sin sodio: su contenido de sodio es menor de 5 mg/porción.

7.1.2 Productos muy bajos en sodio: su contenido de sodio es menor o igual a 35 mg/porción. Cuando la porción sea menor o igual a 30 g, el contenido de sodio debe ser menor o igual a 35 mg/50 g de producto.

7.1.3 Productos bajos en sodio: su contenido de sodio es menor o igual a 140 mg/porción. Cuando la porción sea menor o igual a 30g, su contenido de sodio debe ser menor o igual a 140 mg/50 g de producto.

7.1.4 Productos reducidos en sodio: el contenido de sodio es al menos un 25% menor en relación al contenido de sodio del alimento original o de su similar.

7.2 Para efectos de la elaboración de alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, son sucedáneos de la sal (NaCl), las mezclas de sustancias inocuas que no contienen sodio, permitiéndose las siguientes:

7.2.1 Sales de potasio, calcio o amonio de los ácidos adípico, glutámico, carbónico, succínico, tartárico, cítrico, acético, clorhídrico u ortofosfórico, el contenido de potasio no debe exceder del 4% m/m y el de NH<sub>4</sub> de 3% de la mezcla sucedánea de la sal;

7.2.2 Sales de magnesio de los ácidos adípico, glutámico, carbónico, succínico, acético, clorhídrico u ortofosfórico, solas o mezcladas con los otros sucedáneos de la sal exentos de magnesio a que se refiere el punto 7.2. El contenido de Mg<sup>++</sup> no debe ser mayor del 20% m/m del total de cationes de K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> y NH<sub>4</sub> presentes en la mezcla sucedánea de la sal y el fósforo no debe exceder del 4% m/m de la mezcla sucedánea de la sal;

7.2.3 Sales de colina, de los ácidos acético, carbónico, láctico, tartárico, cítrico o clorhídrico, solas o mezcladas con los sucedáneos de la sal exentos de colina, a que se refiere el punto 7.2. El contenido de colina no debe exceder del 3% m/m de la mezcla sucedánea, y

7.2.4 Ácidos adípico, glutámico, cítrico, láctico o málico, sin límite.

7.3 Para los sucedáneos de la sal se permite la adición de sílice coloidal o silicato de calcio, individualmente o en combinación, como antiaglomerantes, sin excederse del 1% m/m de la mezcla sucedánea de la sal y como diluyentes a los azúcares, harina de cereales u otros vehículos inocuos exentos de sodio.

7.4 Los productos con menor contenido de grasa son aquellos productos a los que se les han reducido parcial o totalmente las grasas, con las denominaciones y límites que se señalan en lo siguiente:

7.4.1 Producto sin grasa: su contenido de grasa es menor a 0,5 g/ porción.

7.4.2 Producto bajo en grasa: su contenido de grasa es menor o igual a 3 g/porción. Cuando la porción sea menor o igual a 30 g su contenido de grasa debe ser menor o igual a 3g/50g de producto.

7.4.3 Producto reducido en grasa, aquel cuyo contenido de grasa es al menos un 25% menor en relación al contenido de grasa del alimento original o de su similar.

7.5 Los productos con menor contenido de grasa saturada son aquellos a los que se les han reducido parcial o totalmente las grasas saturadas, denominándose de acuerdo a lo siguiente:

7.5.1 Producto bajo en grasa saturada: su contenido de grasa saturada es igual o menor a 1 g/porción y no más del 15% de energía proveniente de la grasa saturada. Cuando la porción sea igual o menor a 30 g, el contenido de grasa saturada debe ser menor o igual a 1 g/100 g de producto y menos del 10% de energía proveniente de la grasa saturada.

7.5.2 Producto reducido en grasa saturada, aquel cuyo contenido de grasa saturada es al menos un 25% menor en relación al contenido de grasa saturada del producto original o de su similar.

7.6 Los productos con menor contenido de colesterol son aquellos productos a los que se les ha reducido parcial o totalmente el colesterol, denominándose de acuerdo a lo siguiente:

7.6.1 Producto sin colesterol: su contenido de colesterol es menor de 2 mg/porción y el de grasa saturada es menor o igual a 2 g/porción.

7.6.2 Producto bajo en colesterol: su contenido de colesterol es menor o igual a 20 mg/porción. Para porciones menores o iguales a 30 g, el contenido debe ser menor o igual a 20 mg/50 g de producto.

7.6.3 Producto reducido en colesterol: aquel cuyo contenido de colesterol es al menos un 25% menor en relación al contenido de colesterol del producto original o de su similar y contiene 2 g o menos de grasa saturada por porción.

7.7 Los productos con menor contenido de calorías son aquellos productos a los que en su elaboración se les ha disminuido parcial o totalmente el contenido calórico, denominándose de acuerdo a lo siguiente:

7.7.1 Producto sin calorías: su contenido de calorías debe ser menor de 5 calorías/porción.

7.7.2 Producto bajo en calorías: su contenido debe ser menor o igual a 40 calorías/porción. Cuando la porción sea menor o igual a 30 g, su contenido de calorías debe ser menor o igual a 40 calorías/50 g de producto.

7.7.3 Producto reducido en calorías: es aquel donde el contenido de calorías es al menos un 25% menor en relación al contenido de calorías del alimento original o de su similar.

7.8 Los productos sin gluten son aquellos a los que éste se les ha eliminado y cumplen con lo siguiente:

7.8.1 Que contenga básicamente como ingredientes cereales tales como trigo, triticale, centeno, cebada o avena o sus constituyentes de los que se les ha quitado el gluten, o

7.8.2 Que todos los ingredientes normalmente presentes y que contienen gluten hayan sido sustituidos por otros ingredientes que no lo contienen.

7.8.3 Para denominarse alimento exento de gluten, se requiere que el contenido total de nitrógeno de los granos de cereal que se empleen y que contengan gluten no excedan de 0,05 g /100g expresados en materia seca.

7.8.4 Los productos exentos de gluten, que se empleen en sustitución de alimentos básicos importantes, como harina o pan, deben suministrar aproximadamente la misma cantidad de vitaminas y minerales que los alimentos originales en cuya sustitución se emplean.

7.9 Los productos con menor contenido de azúcar son aquellos a los que se les ha reducido parcial o totalmente el azúcar, denominándose de acuerdo a lo siguiente:

7.9.1 Producto sin azúcar: su contenido de azúcar es menor a 0,5 g/porción.

7.9.2 Producto reducido en azúcar: el contenido de azúcar se ha reducido por lo menos en un 25% del contenido del alimento original o de su similar.

7.10 La sacarina y sus sales de sodio, calcio y amonio se permiten como sustitutos parcial o totalmente de los azúcares en los alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, ajustándose a los siguientes límites:

7.10.1 Para las presentaciones de mesa, las porciones no deben exceder de 20 mg de sacarina con poder edulcorante equivalente a una cucharadita de azúcar;

7.10.2 En bebidas no alcohólicas en cantidad que no exceda de 40 mg de sacarina por 100 g del producto, y

7.10.3 En los alimentos elaborados que no exceda de 30 mg de sacarina por porción.

7.11 En los alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición se permite el empleo de aspartame y acesulfame potásico (acesulfame K) como sustitutos de azúcares en productos objeto de esta norma de acuerdo a las BPF.

7.12 El edulcorante sorbitol se permite emplear como sustituto de azúcar en los productos objeto de esta norma dentro de los siguientes límites :

7.12.1 No más de un 99% en caramelos.

7.12.2 No más del 75% en chicles.

7.12.3 No más del 98% para dulces blandos, chocolates y pastillas de menta.

7.12.4 No más del 30% en mermeladas, jaleas, mezclas para hornear y productos horneados.

7.12.5 No más del 17% en postres fríos: nieves y helados de leche.

7.12.6 No más del 12% en otros alimentos.

7.13 Los edulcorantes xilitol y manitol se permiten emplear como sustitutos de azúcar de acuerdo a las BPF.

7.14 El edulcorante sucralosa se permite emplear como sustituto del azúcar en los productos objeto de esta norma dentro de los siguientes límites:

7.14.1 Para las presentaciones de mesa de acuerdo a las BPF.

7.14.2 No más de 0,1 % en cereales para desayuno.

7.14.3 No más de 0,025% en bebidas como se consumen.

7.14.4 No más de 0,025% en postres y rellenos como se consumen.

7.14.5 No más de 0,15% en gomas de mascar.

7.14.6 No más de 0,045% en jaleas.

7.14.7 No más de 0,04% en aderezos.

7.14.8 No más de 0,07% en dulces.

7.14.9 No más de 0,065% en mezclas para hornear y productos de panadería como se consumen.

7.14.10 No más de 0,04% en pudines.

7.14.11 No más de 0,15% para jarabes de mesa.

7.15 El edulcorante isomalt se permite emplear como sustituto de azúcar en los productos que se enlistan a continuación conforme las BPF: Bebidas no alcohólicas, gomas de mascar, edulcorante de mesa, chocolates y caramelos.

7.16 Los límites mínimos y máximos permitidos para la adición, fortificación y enriquecimiento de alimentos y bebidas no alcohólicas será del 5 al 100% por porción de la ingestión diaria recomendada (Apéndice normativo B), siempre y cuando el aporte del nutrimento en las condiciones normales o usuales de consumo, no sobrepase la ingestión diaria recomendada.

7.17 Los productos adicionados de fibra: son aquellos en los que el contenido de fibra es igual o mayor de 2,5 g/porción en relación al contenido del alimento original o de su similar.

## **8. Especificaciones sanitarias**

Los productos objeto de esta norma deben ajustarse a las características propias del alimento sin modificación, establecidas en el Reglamento o en las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes.

## **9. Muestreo**

El procedimiento de muestreo para los productos objeto de esta norma debe sujetarse a lo que establece la Ley General de Salud.

## **10. Métodos de prueba**

Para la verificación de las especificaciones nutrimentales que se establecen en esta norma se deben aplicar los métodos de prueba señalados en el Apéndice normativo C.

## **11. Etiquetado**

La etiqueta de los productos objeto de esta norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento y la Norma Oficial Mexicana correspondiente, debe sujetarse a lo siguiente:

11.1 Los productos restaurados, la leyenda: "RESTAURADO EN \_\_\_\_\_";

11.2 Los productos con menor contenido de sodio, el contenido de sodio al múltiplo de 5 mg más cercano por 100 g y por porción;

11.3 Los productos con menor contenido de grasa, grasa saturada y colesterol:

11.3.1 La denominación del producto de acuerdo al grado de disminución, como se establece en esta norma.

11.3.2 La cantidad de grasa, grasa saturada o colesterol en mg por porción.

11.4 Los productos con menor contenido de calorías:

11.4.1 La denominación del producto de acuerdo al grado de disminución, como se establece en esta norma, y

11.4.2 El contenido energético en kilocalorías por porción.

11.5 Los productos sin gluten:

11.5.1 Cerca de la denominación del producto la leyenda "SIN GLUTEN", y

11.5.2 La naturaleza y origen del almidón o los almidones.

11.6 Los productos con menor contenido de azúcares:

11.6.1 La denominación del producto de acuerdo al grado de disminución, como se establece en esta norma.

11.6.2 La cantidad de azúcar en mg por porción.

11.7 Para los productos que utilicen cualquiera de los edulcorantes enlistados en este documento, el contenido de éste expresado en mg o g/ 100 g del producto y las siguientes leyendas precautorias:

11.7.1 Los productos con aspartame, la leyenda "FENILCETONURICOS: CONTIENE FENILALANINA";

11.7.2 Aquellos productos que se presuma razonablemente que alcanzan un consumo diario de 50 g o más de sorbitol, la leyenda: "CONTIENE SORBITOL: EL ABUSO DE ESTE EDULCORANTE PUEDE CAUSAR EFECTOS LAXANTES", y

11.7.3 Para los productos con isomalt, la leyenda: "ESTE PRODUCTO PUEDE CAUSAR DIARREAS PASAJERAS Y FLATULENCIA".

11.8 Para los productos adicionados, su denominación de acuerdo a las especificaciones correspondientes en esta norma, así como el contenido total del nutrimento en el alimento por porción;

11.9 No está permitido emplear indicaciones que les atribuyan una acción terapéutica, preventiva o rehabilitatoria.

11.10 No está permitido incluir declaraciones que relacionen el contenido de un nutrimento con algún padecimiento.

11.11 No está permitido emplear términos descriptivos relacionados con modificaciones en la composición de alimentos y bebidas no alcohólicas distintos a los definidos en esta Norma Oficial Mexicana.

11.12 No está permitido emplear denominaciones distintas a las establecidas en esta Norma Oficial Mexicana.

## **12. Envase**

### 12.1 Envase

Los productos objeto de esta norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características físicas, químicas y organolépticas.

### 12.2 Envase secundario

Se deben usar envolturas de material resistente que ofrezcan la protección adecuada a los envases para impedir su deterioro exterior, a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

## **13 Concordancia con normas internacionales**

Esta norma no tiene concordancia con normas internacionales.

## **14. Bibliografía**

14.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

14.2 Secretaría de Salud. 1991. Ley General de Salud. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

14.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

14.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-SCFI-008-1993. Sistema Internacional de Unidades de Medida. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

14.5 Association Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis. 15 th Edition. pp. 1103-1106, 1167, 1173-1174.

14.6 Bender, A.E. 1973. Nutrición y alimentos dietéticos. Editorial Acribia, España.

14.7 Code of Federal Regulations. 1987. Food and Drugs. Vol. 21. Washington. Parts 170 to 199. pp. 44, 462 y 463.

14.8 Cuadernos de Nutrición. 1988. Glosario de términos para la orientación alimentaria. Publicación del Instituto Nacional de la Nutrición. Vol. 11:6. pp. 3-45.

14.9 Federal Register., 1993. Department of Health and Human Services. Vol. 58:3. Washington, pp. 2227-2300 y 2413-2430.

14.10 Hernández M., Chávez A. y Bourges H. 1987. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico. 10 a. Edición. Instituto Nacional de Nutrición. México, D.F. p. 5.

14.11 Instituto Nacional de Nutrición. "Salvador Zubirán" 1984. Manual de técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. México, D.F. pp. 55-56.

14.12 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Norma-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas.

14.14 Richard, J. Lewis. 1989. Food Additives Hand Book. Ed. Van Nostran Reinhold., New York.

14.15 Scheider, W.L. 1985. Nutrición conceptos básicos y aplicaciones. Mc.Graw Hill., México, D.F.

14.16 Secretaría de Salud. 1990. Control Físico-Químico de Alimentos Diversos. Métodos Generales. México, D.F. pp. 6-16, 22- 26.

14.17 Whitney, E.N and Hamilton, E.M. 1987. Understanding Nutrition. Fourth Edition. West Publishing Co. New York.

## **15. Observancia de la norma**

La vigilancia en el cumplimiento de la presente norma corresponde a la Secretaría de Salud.

## **16. Vigencia**

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor con su carácter obligatorio a los trescientos sesenta y cinco días siguientes a partir de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Atentamente

Sufragio Efectivo. No Relección.

México, D.F., a 15 de diciembre de 1995.- El Director General, José Meljem Moctezuma.- Rúbrica.

## **APENDICE NORMATIVO A**

## A. DE LAS PORCIONES DE ALIMENTOS Y BEBIDAS NO ALCOHOLICAS

Las porciones aquí señaladas son exclusivamente para el cumplimiento y verificación de las denominaciones descritas en esta norma y no con fines de etiquetado.

### 1 Porciones de alimentos

#### 1.1 Cereales, leguminosas, sus productos y botanas

Alimento Porción

Galletas 30 g

Pan 50 g

Pan de harina con centeno 50 g

Pan de dulce 55 g

Pan francés 110 g

Mezcla para preparar buñuelos 40 g

Barras de granos con o sin cobertura 40 g

Pies 125 g

Waffles 85 g

Pizzas 55 g

Pastelitos o pastelillos 45 g

Tortillas 50 g

Cereales precocidos u horneados 30 g

Cereales con frutas o a base de salvado 40 g

Botanas (palomitas de maíz, pretzels, botanas extruidas, papas fritas) 25 g

Pastas alimenticias para sopa

Menudas, huecas, fideos, fantasía (secas) 25 g

Pastas alimenticias

Largas (secas) 55 g

#### 1.2 Bebidas no alcohólicas

Bebidas de 200 ml

Bebidas sabor de 200 ml

Aguas minerales 240 ml

Agua purificada 240 ml

Jugos de frutas o de hortalizas 240 ml

Néctares 240 ml

Bebidas adicionadas 200 ml

Bebidas para deportistas 240 ml

Bebidas de menor contenido calórico 200 ml

Café, té y sus productos 200 ml

1.3 Lácteos y sus productos

Quesos 30 g

Sustitutos de crema líquida 15 ml

Sustitutos de crema en polvo 4 g

Leche condensada 70 g

Leche evaporada 100 ml

Leche y bebida a base de leche 240 ml

Crema 30 g

Yogurt 125 g

Yogurt para beber 200 g

Mantequilla 5 g

1.4 Condimentos, aderezos, aceites y grasas comestibles

Aderezos para ensaladas 30 g

Mayonesa 15 g

Sustituto de mantequilla en polvo 2 g

Margarina 5 g

Aceites vegetales 5 ml

1.5 Pescados, carne, pollo y sustitutos

Anchoas en conserva, caviar y sustitutos de tocino 15 g

Pescados y mariscos 55 g

Pescados y mariscos en salsa 140 g cocinados

Pescados y mariscos fritos sin salsa 85 g cocinados

Pescados y camarón ahumados 55 g

Jamón 60 g

1.6 Frutas, legumbres y jugos de fruta

Confitadas o en vinagre 30 g

Secas 40 g

Frutas en conserva o congeladas 140 g

1.7 Misceláneos

Goma de mascar 3 g

Hojuelas de maíz cubiertas con sabor chocolate 40 g

Nuez confitada 30-50 g

Mantequilla de cacahuete 35 g

Sopas condensadas 240 ml

Caramelo duro, pastillas refrescantes 2 g

Dulces blandos 3 g

1.8 Edulcorantes, derivados y postres

Jarabes usados principalmente como ingredientes 30 ml

Otros jarabes 60 ml

Gelatina preparada 130 g

Polvo para preparar gelatina 25 g

Polvo para preparar flan 17,5 g

Miel maple 50 g

Mermeladas, jaleas 15 ml

#### 1.9 Vegetales

Jugo de vegetales 240 ml

Vegetales con salsa, frescos, en conserva, congelados 110 g

Salsas o purés de vegetales 60 g

Salsa de tomate 15 g

Aceituna 15 g

Vegetales en salmuera 30 g

Pimiento, cebolla verde 30 g

2 Porciones de alimentos envasados y a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.

#### 2.1 En el periodo de ablactación

Frutas y vegetales 71 g

Cereales 15 g

Jugos 118 ml

#### 2.2 Alimentos colados

Frutas, vegetales, sopas, postres y carnes 113 g

Cereales 30 g

Jugos 118 ml

#### 2.3 Alimentos picados

Frutas, vegetales, sopas y cereales para desayuno 170 g

Carnes 113 g

Postres 113 g

Cereales 30 g

Jugos 118 ml

#### 2.4 Alimentos para niños en edad preescolar

Guisados 170 g

Cereales 40 g

Galletas 12 g

Entremeses 71 g

Jugos 177 ml

## **APENDICE NORMATIVO B**

B. DE LA INGESTION DIARIA RECOMENDADA ESTABLECIDA POR EL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

Nutrimentos Valores

Proteína g 75

Vitamina A  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol 1000

Vitamina E mg 10

Vitamina C mg 60

Tiamina mg 1,5

Riboflavina mg 1,7

Niacina mg equivalentes 20

Vitamina B6 mg 2

Folacina  $\mu\text{g}$  200

Vitamina B12  $\mu\text{g}$  2

Calcio mg 800

Fósforo mg 800

Hierro mg 15

Magnesio mg 350

Zinc mg 15

Yodo  $\mu\text{g}$  150

B. DE LA INGESTION DIARIA RECOMENDADA PARA NIÑOS ESTABLECIDA POR EL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

Nutrimentos Niños de 0 a 5 meses cumplidos

Energía kJ (kcal)/kg peso 460(110)

Proteína g 13

Vitamina A  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol 400

Vitamina E mg 3

Vitamina C mg 35

Tiamina mg 0,35

Riboflavina mg 0,45

Niacina mg equivalentes 6

Vitamina B6 mg 0,30

Acido fólico  $\mu\text{g}$  25

Vitamina B12  $\mu\text{g}$  0,3

Calcio mg 450

Fósforo mg 350

Hierro mg 10

Magnesio mg 40

Zinc mg 5

Yodo  $\mu\text{g}$  40

Nutrimentos Niños de 6 a 11 meses cumplidos

Energía kJ (kcal)/kg peso 418(100)

Proteína g 14

Vitamina A  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol 400

Vitamina E mg 4

Vitamina C mg 40

Tiamina mg 0,45

Riboflavina mg 0,55

Niacina mg equivalentes 7

Vitamina B6 mg 0,60

Acido fólico  $\mu\text{g}$  35

Vitamina B12  $\mu\text{g}$  0,5

Calcio mg 600

Fósforo mg 500

Hierro mg 10

Magnesio mg 60

Zinc mg 5

Yodo  $\mu\text{g}$  50

Nutrimientos Niños de 1 a 3 años cumplidos

Energía kJ (kcal)/kg peso 418(100)

Proteína g 20\*

Vitamina A  $\mu\text{g}$  equivalentes de retinol 400

Vitamina E mg 6

Vitamina C mg 40

Tiamina mg 0,7

Riboflavina mg 0,8

Niacina mg equivalentes 9

Vitamina B6 mg 1

Acido fólico  $\mu\text{g}$  50

Vitamina B12  $\mu\text{g}$  0,7

Calcio mg 800

Fósforo mg 700

Hierro mg 15

Magnesio mg 80

Zinc mg 15

Yodo  $\mu\text{g}$  70

## **APENDICE NORMATIVO C**

### **C. DE LOS METODOS DE PRUEBA**

#### **1 Determinación de grasa**

1.1 Método del Extracto etéreo. Para productos como chocolates, granos, polvos con chocolate, entre otros.

##### **1.1.1 Fundamento**

El método para la extracción de los lípidos libres, utiliza un agente deshidratante que absorbe la humedad de la muestra y arena de mar que provoca un medio poroso que permite que el disolvente pase con mayor facilidad a través de ésta, extrayendo la grasa presente. En la extracción de lípidos combinados se utiliza el medio ácido para disolver las proteínas y así permitir la separación de la grasa.

##### **1.1.2 Reactivos y materiales**

###### **1.1.2.1 Reactivos**

Acido clorhídrico (HCl) diluido al 33% v/v. Diluir 100 ml de HCl concentrado con 200 ml de agua destilada.

Arena de mar tratada

Eter de petróleo G.R. (P.E. 30 - 60°C), libre de grasa o éter etílico G.R. libre de peróxidos.

Sulfato de sodio anhidro G.R.

Tierra de diatomáceas (celite 503)

###### **1.1.2.2 Materiales**

Agitador de vidrio de 20 cm

Algodón libre en grasa

Cartucho de extracción de tamaño adecuado al extractor

Cuerpo de ebullición

Embudo de vidrio de 9 cm de diámetro

Extractor de Soxhlet

Matraz de boca esmerilada 24/40 de 250 ml

Matraz Erlenmeyer de 250 ml

Papel filtro Whatman No. 1 y No. 540

Papel indicador de pH

Material común de laboratorio

Vaso de precipitado de 50 ml

Vidrio de reloj de 4 cm de diámetro

### 1.1.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Baño de agua

Estufa con regulador de temperatura para mantener a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$

### 1.1.3 Procedimiento

#### 1.1.3.1 Extracción de lípidos libres

Pesar de 1-2 g de muestra finamente molida dentro de un cartucho de extracción, agregar igual cantidad de sulfato de sodio, mezclar con un agitador de vidrio.

Agregar de 1-2 g de arena de mar, mezclar nuevamente y sin retirar el agitador, colocar el cartucho en un vaso de precipitado de 50 ml. Secar en la estufa durante 6 h.

Cubrir la mezcla contenida en el cartucho, con una porción de algodón, colocar en el extractor de Soxhlet, ajustar en la parte inferior del extractor un matraz con cuerpos de ebullición a peso constante. Lavar el vaso donde fue secada la muestra con varias porciones de éter adicionando los lavados al extractor. Agregar suficiente éter hasta obtener de 2-3 descargas del extractor. Conectar el refrigerante al extractor y hacer circular el agua. Calentar el matraz hasta obtener un mínimo de condensación de 3-6 gotas por segundo.

Efectuar la extracción durante 4-6 h. Suspender el calentamiento, quitar el extractor del matraz y dejar caer una gota de éter del extractor sobre un papel filtro o un vidrio de reloj, si al evaporarse el éter se observa una mancha de grasa, ajustar el Soxhlet de nuevo al matraz y continuar la extracción.

Terminada la extracción, evaporar a baja temperatura el disolvente del matraz; secar en la estufa a  $100^\circ\text{C}$  hasta peso constante, enfriar en desecador y pesar.

#### 1.1.3.2 Extracción de lípidos combinados

Pesar de 1-2 g de muestra finamente molida dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 ml, agregar 50 ml de HCl diluido, unos cuerpos de ebullición y tapar con un vidrio de reloj.

Calentar en baño de agua durante una hora manteniendo el volumen constante por la adición de agua destilada.

Agregar 150 ml de agua caliente, alrededor de un gramo de tierra de diatomeas o alrededor de 100 cm<sup>2</sup> de papel filtro cortado en pequeñas piezas.

Filtrar a través de papel filtro Whatman No. 540 húmedo de 15 cm de diámetro (si se prefiere se puede usar doble), lavar el matraz Erlenmeyer y el vidrio de reloj con agua caliente agregando los lavados al papel filtro. Secar el matraz y el vidrio de reloj en la estufa.

Continuar lavando el papel filtro con agua caliente hasta que el filtrado esté libre de ácido.

Secar el papel filtro a 120°C sobre un vidrio de reloj o a 60°C por toda la noche si fue agregado de papel filtro cortado en piezas.

Con la ayuda de unas pinzas pasar el papel filtro seco al cartucho de extracción, tapar con una porción de algodón y colocar en el extractor de Soxhlet, ajustar en la parte inferior del extractor un matraz con cuerpos de ebullición a peso constante. Lavar el matraz Erlenmeyer y el vidrio de reloj secos con éter adicionando los lavados al extractor. Agregar suficiente éter hasta obtener de 2-3 descargas del extractor.

Proceder como se indica en la extracción de lípidos libres donde dice: "Conectar el refrigerante al extractor..."

#### 1.1.4 Cálculos

% de grasa =  $\frac{PG - PB}{PM} \times 100$

PM

En donde:

PG = Peso del matraz con grasa seca en g

PB = Peso del matraz con cuerpos de ebullición a peso constante en g

PM = Peso de la muestra en g

1.2 Método de Roesse-Gottlieb (Hidrólisis alcalina). Para fórmulas para lactantes, fórmulas de continuación, leches en polvo, entre otros.

#### 1.2.1 Fundamento

El método descrito es una modificación al de Roesse-Gottlieb. Se utiliza amoníaco para suavizar la caseína, alcohol etílico para romper la emulsión y la combinación grasa-proteína, así como favorecer la extracción de la grasa por el éter etílico. Se usa también éter de petróleo que disminuye la solubilidad del éter etílico en la capa acuosa. Extraída la grasa ésta se estima por diferencia de peso.

#### 1.2.2 Reactivos y materiales

##### 1.2.2.1 Reactivos

Hidróxido de amonio G.R.

Alcohol etílico de 96°

Eter etílico (libre de peróxidos)

Eter de petróleo (P.E. 30 - 60°C)

#### 1.2.2.2 Materiales

Tubos de Roesse-Gottlieb o de Mojonier

Vasos de precipitados de 125 ml

Pipetas de 10 ml graduadas en 0,1 ml

Perlas de vidrio

#### 1.2.3 Aparatos e instrumentos

Desecador

Estufa para secar que alcance una temperatura entre 70 a 80°C

Baño de agua caliente o placa caliente

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

#### 1.2.3 Procedimiento

1.2.3.1 Pesar de 1 a 2 g de muestra y colocarlos en el tubo, agregar 9 ml de agua hirviendo y agitar vigorosamente hasta que la muestra esté disuelta, enfriar a la temperatura ambiente. Agregar 1,5 ml de hidróxido de amonio y mezclar perfectamente. Agregar 10 ml de alcohol etílico, tapar y agitar fuertemente; agregar 25 ml de éter etílico, tapar y agitar vigorosamente por 90 segundos. Agregar 25 ml de éter de petróleo, tapar y volver a agitar suavemente por 90 segundos. Centrifugar a 600 rpm o dejar reposar hasta que el líquido superior esté prácticamente claro. Decantar la capa etérea en un vaso de precipitado a peso constante. Lavando el labio y el tapón del tubo con una mezcla de partes iguales de los dos éteres. Agregar estos lavados al vaso. Repetir la extracción del líquido sobrante en el tubo, dos veces más utilizando 25 ml de cada disolvente. Efectuar una tercera extracción con 20 ml de cada disolvente. Evaporar los disolventes del vaso en una placa caliente o un baño de vapor, a una temperatura apropiada que permita la eficiente evaporación, secar la grasa en estufa a 80°C, enfriar y pesar.

1.2.3.2 Después de introducir el producto en el tubo Mojonier, añadir aproximadamente 0,1 g de amilasa y un agitador magnético, para facilitar la suspensión, luego adicionar de 8 a 10 ml de agua destilada a 45°C, evitando que el nivel de agua suba demasiado.

Colocar el tubo Mojonier tapado por 2 h al baño de agua a 65°C. Remuévase ligeramente de vez en cuando.

Comprobar que el almidón se haya degradado por completo: al añadir dos gotas de solución de yodo aproximadamente 0,1 N no debe formarse coloración azul. En caso contrario, volver a colocar el tubo al baño de agua hasta que desaparezca la coloración. Enfriar el tubo Mojonier y continúe con el procedimiento.

#### 1.2.4 Cálculos

$$PG \times 100$$

$$\% G = \frac{\quad}{\quad}$$

$$Pm$$

En donde:

% G = Por ciento de grasa

PG = Peso de la grasa extraída

PM = Peso de la muestra

#### 1.2.5 Reproducción de la prueba

En la reproducción de la prueba, la diferencia máxima permisible para la determinación efectuada por duplicado, no debe ser mayor de 0,1%, en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

1.3 Por Hidrólisis ácida. Para harinas, pan, cereales y aquellos productos cuya presentación sea en galletas, barras, entre otros.

##### 1.3.1 Fundamento

Se basa en la disolución de la proteína en el ácido y la grasa que se separa, puede ser extraída utilizando como disolvente orgánico, una mezcla de éter etílico-éter de petróleo.

##### 1.3.2 Reactivos y materiales

###### 1.3.2.1 Reactivos

Acido clorhídrico (25+11) v/v

Alcohol etílico, G.R.

Eter de petróleo (P.E. 40 - 60°C), G.R. libre de grasa

Eter etílico, grado reactivo libre de grasa

###### 1.3.2.2 Materiales

Algodón absorbente libre de grasa

Cuerpos de ebullición

Embudo de filtración, tallo corto

Probetas graduadas

Tubo de extracción de Mojonnier

Vasos de precipitados, cápsulas de vidrio, níquel o aluminio de 125 ml

Material común de laboratorio

### 1.3.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

Baño de agua con sistema eléctrico para mantener a 70 - 80°C

Estufa con regulador de temperatura para mantener a 100°C

### 1.3.4 Procedimiento

1.3.4.1 Pesar de 1 a 2 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado de 50 ml (la muestra puede ser pesada directamente en el tubo de extracción de Mojonnier), agregar 2 ml de alcohol etílico y agitar adecuadamente para humedecer la muestra. Agregar 10 ml de ácido clorhídrico 25:11, 2 cuerpos de ebullición, mezclar y colocar en baño de agua durante 30-40 min, agitando ocasionalmente durante este tiempo. Agregar 10 ml de alcohol etílico, mezclar y dejar enfriar.

1.3.4.2 Vaciar la mezcla al tubo de extracción, lavar el vaso con 3 porciones y un total de 25 ml de éter etílico (pasando cada lavado al tubo de extracción). Tapar el tubo con un tapón de hule sintético y agitar vigorosamente durante un min. Agregar 25 ml de éter de petróleo y agitar nuevamente durante un min. Dejar el tubo en posición vertical hasta que el líquido superior esté prácticamente claro o centrifugar 20 min a aproximadamente 600 rpm.

1.3.4.3 Decantar tanto como sea posible la solución éter-grasa, sobre un filtro de algodón empacado con firmeza en el embudo de filtración, recibiendo el éter en un vaso o cápsula de 125 ml a peso constante (puede ser llevado a peso constante con cuerpos de ebullición). Lavar la boca del tubo de extracción y el tapón con varios ml de una mezcla de disolventes en partes iguales recibiendo en el mismo vaso.

1.3.4.4 Reextraer el líquido sobrante del tubo dos veces más, utilizando para este propósito 15 ml de cada disolvente en cada ocasión. Agitar bien después de cada adición de éter. Decantar la solución éter-grasa en el mismo embudo utilizado anteriormente; lavar el embudo y el tallo del embudo con varios ml de una mezcla de disolventes en partes iguales.

1.3.4.5 Evaporar la mezcla de disolventes lentamente sobre baño de vapor (en un sistema de extracción) secar la grasa en una estufa a 100°C hasta peso constante, enfriar en desecador y pesar.

Corregir el resultado por la determinación de un blanco de reactivos.

### 1.3.5 Cálculos

P2 - P1

% de grasa = \_\_\_\_\_

Pm

donde:

P2 = Peso del vaso o cápsula con grasa a peso constante

P1 = Peso del vaso o cápsula vacía a peso constante

PM = Peso de la muestra en g

PRECAUCION: El éter etílico es un disolvente orgánico extremadamente flamable. Se pueden formar peróxidos inestables cuando se almacenan mucho tiempo o se exponen a la luz solar. Puede reaccionar con explosión cuando está en contacto con el óxido de cloro, litio o con agentes fuertemente oxidantes. Por ello es recomendable el empleo de extractores de vapores efectivos y evitar la electricidad estática.

#### 1.4 Prueba para determinar la presencia de peróxidos en éter.

Medir 10 ml de éter en una probeta de 25 ml con tapón de vidrio previamente lavado con un poco de éter, agregar 1 ml de solución de yoduro de potasio al 10% recién preparada. Agitar y dejar reposar durante un min. No debe aparecer ninguna coloración amarilla en la capa etérea (esta prueba debe realizarse una vez por semana).

##### 1.4.1 Manera de prevenir la formación de peróxidos.

El éter etílico puede mantenerse libre de peróxidos por adición de una hoja de zinc húmeda, previamente sumergida durante un min. en una solución ácida diluida de sulfato de cobre y posteriormente lavada con agua. Para un litro de éter etílico usar aproximadamente 80 cm<sup>2</sup> de la hoja de zinc, cortada en bandas lo suficientemente largas como para alcanzar por lo menos la mitad del recipiente.

##### 1.4.2 Eliminación de los peróxidos.

Colocar en un embudo de separación un volumen conocido de éter etílico agregar igual cantidad de agua destilada y agitar enérgicamente. Desechar el agua. Repetir el lavado una vez más.

Al éter lavado agregar solución saturada de cloruro de sodio (de 50 - 100 ml/l), agitar y desechar el cloruro de sodio. Pasar el éter limpio a un frasco y agregar sulfato de sodio anhidro. Agitar para eliminar la humedad y hacer la prueba de peróxidos nuevamente.

Otro método recomendable para eliminar los peróxidos es haciendo pasar el éter a través de una columna de alúmina activada.

## 2 Determinación de azúcares

### 2.1 Reductores directos y totales

#### 2.1.1 Fundamento

La muestra primero se digiere para precipitar las proteínas, utilizando soluciones de acetato de zinc y ferrocianuro de potasio. En un volumen se determinan los azúcares reductores directos y otro

volumen es hidrolizado con ácido clorhídrico para determinar los azúcares reductores totales mediante una valoración volumétrica según el método de Lane y Eynon.

## 2.1.2 Reactivos y materiales

### 2.1.2.1 Reactivos y soluciones

Acetato de zinc

Ferrocianuro de potasio

Sulfato de cobre pentahidratado

Acido acético glacial

Tartrato de sodio y potasio

Hidróxido de sodio (NaOH)

Sacarosa G.R.

Acido clorhídrico concentrado (HCl)

Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%

Solución de hidróxido de sodio 1:1 m/v

Solución acuosa de azul de metileno al 0,2% ( $C_{37}H_{27}N_3O_3 \cdot 2NaSO_3$ ).- Disolver 0,2 g de azul de metileno en agua y diluir a 100 ml.

Solución de acetato de zinc.- Disolver 21,9 g de acetato de zinc ( $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$ ) cristalizado y 3 ml de ácido acético glacial en agua y diluir a 100 ml.

Solución de ferrocianuro de potasio ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ).- Disolver 10,6 g de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  en 100 ml de agua destilada.

Solución (A) de sulfato de cobre.- Disolver 34,639 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) en agua destilada y diluir a 500 ml utilizando un matraz volumétrico; filtrar a través de lana de vidrio.

Ajustar la solución, determinando el contenido de cobre en una alícuota con tiosulfato de sodio 0,1 N y ioduro de potasio al 20% hasta obtener 440 mg de cobre por cada 25 ml.

Solución (B) de Tartrato de sodio y potasio.- Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio ( $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4 H_2O$ ) y 50 g de NaOH en agua y diluir a 500 ml; dejar reposar 2 días y filtrar a través de lana de vidrio.

Solución patrón de sacarosa.- Pesar 9,5 g de sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) y disolver en 50 ml de agua, agregar 5 ml de HCl concentrado y diluir con agua a 100 ml. Guardar algunos días a temperatura ambiente (aproximadamente 7 días a 12-15°C o 3 días a 20-25°C o 15 min a 67°C) después de esta inversión diluir con agua a un litro (esta solución es estable por algunos meses en refrigeración).

Solución diluida de sacarosa.- Neutralizar una alícuota de 10 ml con NaOH 1 N y diluir a 100 ml con agua (1 ml= 1 mg de sacarosa)

#### 2.1.2.2 Materiales

Matraz volumétrico de 100 y 250 ml

Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 ml

Pipetas volumétricas de 5 y 50 ml

Vaso de precipitado de 50 ml

Bureta de 50 ml graduada en décimas

#### 2.1.3 Aparatos e instrumentos

Placa caliente

Baño de agua con capacidad para mantener la temperatura a 70°C.

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg

#### 2.1.4 Titulación de la solución A-B

Medir con pipeta volumétrica 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Agregar 100 ml de agua, unos cuerpos de ebullición, calentar en parrilla cerrada a ebullición y agregar poco a poco con una bureta, solución patrón de sacarosa diluida, hasta la reducción total del cobre. Agregar 1 ml de la solución de azul de metileno. Continuar la titulación hasta la desaparición del color azul (mantener continua la emisión de vapor para prevenir la reoxidación del cobre o del indicador). Si el gasto es menor de 15 ml o mayor de 50 ml de la solución de azúcar invertido, hacer la dilución apropiada o reformulación para que quede dentro de ese rango. Calcular los mg de sacarosa que se necesitan para titular la solución A-B. Este valor corresponde al factor F del reactivo.

$$F = V_1 \times D_1$$

En donde:

F = Factor de Fehling para lactosa

V<sub>1</sub> = Volumen de la solución de sacarosa gastada en la titulación de la solución A-B en ml.

D<sub>1</sub> = Dilución de la solución de sacarosa en mg.

#### 2.1.5 Procedimiento

##### 2.1.5.1 Determinación de reductores directos

Pesar de 10-12 g de muestra finamente molida en un vaso de precipitado de 50 ml transferir cuantitativamente con 200 ml de agua destilada caliente a un matraz volumétrico de 250 ml, mezclar y dejar reposar 30 min agitando ocasionalmente. Agregar 4 ml de la solución de acetato de

zinc, mezclar, agregar 4 ml de solución de ferrocianuro de potasio y mezclar. Diluir a la marca y filtrar.

Colocar el filtrado en una bureta y proceder como se indica en 2.1.4 usando el filtrado obtenido en lugar de la solución patrón de sacarosa.

#### 2.1.5.2 Determinación de reductores totales

Tomar 25 ml del filtrado y pasar a un matraz volumétrico de 100 ml. Agregar 20 ml de agua, 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y mezclar. Colocar el matraz con un termómetro sumergido en la solución en un baño de agua a 70°C y mantener por un periodo de 15 min contados a partir del momento en que la temperatura interna alcance 96°C. Enfriar inmediatamente, agregar unas gotas de fenolftaleína, neutralizar con solución de NaOH, enfriar y llevar a la marca.

Colocar la solución en una bureta y proceder como se indica en 2.1.4, usando la solución obtenida en lugar de la solución patrón de sacarosa.

#### 2.1.6 Cálculos

% de Reductores Directos =  $250 \times 100 \times F$

(en sacarosa)  $V \times PM$

En donde:

V = ml gastados de la muestra para titular la solución A-B según 2.1.5.1

PM= Peso de la muestra en g

F = Factor del reactivo de Fehling en g de sacarosa

### 3 Gluten

#### 3.1 Gluten húmedo

##### 3.1.1 Reactivos y materiales

###### 3.1.1.1 Reactivos

Solución de lugol.

###### 3.1.1.2 Materiales

Mortero

Probeta de 25 ml

Pipetas serológicas de 10 ml

Tamiz.

### 3.1.2 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con una sensibilidad de 0,2 mg

### 3.1.2 Procedimiento

Mezclar en un mortero 25 g del alimento y 12 ml de agua. Dejar reposar 30 min. Pasado este tiempo tomar la masa en las manos y lavar con cuidado debajo del chorro de agua, colocar bajo éste un tamiz donde se irá depositando el gluten. Suspender este proceso cuando el agua de lavado dé negativa la prueba de lugol. Comprimir el gluten con la mano, secar con un trapo y pesar.

Cálculos: % gluten húmedo = Peso del gluten x 4.

### 3.2 Gluten seco

#### 3.2.1 Aparatos e instrumentos

Estufa de secado con circulación de aire a 120°C o estufa de secado con vacío a 70°C.

Desecador con material secante.

#### 3.2.2 Procedimiento

El gluten obtenido en la técnica anterior se seca hasta que esté a peso constante.

Cálculos: % gluten seco = Peso de gluten seco x 4.

### 4 Determinación de sorbitol

#### 4.1 Método por cromatografía de gases.

##### 4.1.1 Principio

El sorbitol es extraído con metanol, en presencia de piridina se forma el derivado de acetato que es extraído con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y determinado por cromatografía de gases.

##### 4.1.2 Reactivos y materiales

Tierra de diatomáceas (celite 545, lavada con ácido)

Sorbitol G.R.

Piridina

Anhídrido acético

Metanol

Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>)

Material común de laboratorio

#### 4.1.3 Aparatos e instrumentos

Extractor Soxhlet

Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de flama.

Columna de vidrio en forma de U de 1,8 m de longitud y 4 mm de diámetro interno, empacada con DC-200 al 10% sobre Gas Chrom Q con malla de 100 a 120.

Condiciones de operación:

Temperatura de la columna 200°C (o la apropiada para que el tiempo de retención del acetato de sorbitol sea de 9 a 10 min).

Temperatura del inyector 230°C

Temperatura del detector 210°C

Relación de flujos (ml/min)

Nitrógeno 120

Aire 350 - 400

Hidrógeno Optimo para obtener una sensibilidad de  $0,4 \times 10^{-9}$  o equivalente.

#### 4.1.4 Procedimiento

4.1.4.1 Extracción. Colocar el producto húmedo en un horno con corriente de aire a 60°C hasta secar (aproximadamente 12 h). Cortar la muestra seca en un mezclador Hobart. Pesar una muestra que contenga aproximadamente 400 mg de sorbitol (usualmente 10 g), mezclar con 5 g de celite y colocar en un cartucho de extracción. Colocar fibra de vidrio en la parte superior de la muestra. Adicionar 125 ml de metanol anhidro y extraer 2 h a ebullición rápida. Transferir la cantidad de metanol extraído a un matraz de 200 ml con metanol y diluir al volumen con metanol.

4.1.4.2 Preparación de la curva estándar. Pesar exactamente 20, 40, 60 y 80 mg de sorbitol dentro de un matraz Erlenmeyer de separación con graduación estándar 24/40. Adicionar 3 ml de piridina y 10 ml de anhídrido acético. Colocar en un matraz adecuado con condensador de aire y refluja 1 h en baño vapor. Adicionar de 60 a 80 ml de agua, mezclar y enfriar. Extraer con 4 porciones de 20 ml y una porción de 15 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Llevar a 100 ml con  $\text{CHCl}_3$  en un matraz volumétrico. Inyectar aproximadamente 50  $\mu\text{l}$  dentro del cromatógrafo. Preparar la curva estándar graficando respuesta ( $\text{mm}^2$  del patrón/  $\mu\text{l}$  inyectados) contra mg de sorbitol pesados inicialmente.

4.1.4.3 Determinación. Colocar 25 ml de metanol extraído dentro de un matraz de 125 ml graduado 24/40. Evaporar el extracto hasta sequedad en un baño de vapor con corriente de aire. Proceder como en la preparación de la curva estándar, empezando en "Adicionar de 3 ml de piridina...", disolver el residuo tanto como sea posible.

4.1.5 Cálculos. Calcular el porcentaje de sorbitol como sigue:

% sorbitol = (mg a partir de la curva estándar x 0,8)/ g de muestra.

## 5 Determinación de sodio (Na)

### 5.1 Método de espectrofotometría de absorción atómica con aditamento de flama

#### 5.2.1 Fundamento

La muestra se somete a una digestión ácida con ácido nítrico concentrado para que el analito liberado sea cuantificado por espectrofotometría de absorción atómica.

#### 5.2.2 Reactivos y materiales

##### 5.2.2.1 Reactivos

Acido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado grado suprapuro

Acido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado G.R.

Estándar certificado de Na de 1000 µg/ml

Agua deionizada

##### 5.2.2.2 Materiales

Sistema de reflujo

Material común de laboratorio

Papel filtro No. 1

##### 5.2.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg

Espectrofotómetro de absorción atómica con aditamento de flama

Parrilla de calentamiento

Lámpara de cátodo hueco de sodio

##### 5.2.3 Preparación de la muestra para ensayo

###### 5.2.3.1 Productos sólidos

Tomar una cantidad representativa de la muestra a analizar. Si es necesario moler el producto mediante un molino o un mortero. Evitar cualquier contaminación durante esta manipulación. Mezclar bien.

###### 5.2.3.2 Productos líquidos

Mezclar bien el producto antes de abrir el recipiente. A continuación transvertir a un recipiente de vidrio o de plástico descontaminado. Guardar en el refrigerador (4°C). Mezclar bien antes del uso.

#### 5.2.4 Descontaminación del material

En una cubeta de polietileno (volumen aproximado de 15 l) introducir 10 l de mezcla ácido nítrico/ agua (1:1).

En este baño descontaminar durante una noche todos los matraces aforados, tapones, recipientes de polietileno o de polipropileno, así como todo el material de vidrio necesario. Enjuagar con agua destilada. Secar.

#### 5.2.5 Procedimiento

Se pesa de 1,0 a 2,0 g de muestra en un matraz de fondo plano de 250 ml con boca esmerilada, se le añaden 10 ml de HNO<sub>3</sub> grado suprapuro y se digieren por calentamiento en un sistema de reflujo durante 2 h o hasta digestión completa.

La muestra se enfría y se filtra a través de papel filtro No. 1 y se recibe en un matraz aforado de 100 ml. Se lava tres veces el matraz de la digestión con tres porciones de 10 ml de agua deionizada y los lavados se filtran y se reciben en el matraz aforado, se lleva a volumen con agua deionizada.

Ajustar el espectrofotómetro de acuerdo a las recomendaciones del fabricante usando un estándar certificado. Se leen las muestras y se anotan los resultados obtenidos en µg/ml.

Longitud de onda: 589,6 nm

Llama: aire-acetileno, oxidante

Nota: Se recomienda meter una muestra añadida para valorarla y hacer un blanco de reactivos para cada serie de digestiones.

#### 5.2.6 Cálculo

$$\text{mg/kg Na}^+ = \frac{(A-B) \times C}{D}$$

D

En donde:

A = µg/ml de Na<sup>+</sup> en la muestra

B = µg/ml de Na<sup>+</sup> en el blanco

C = ml de aforo de la muestra

D = peso de la muestra en g tomada para el análisis

#### 5.2.7 Sensibilidad del método

0,15 µg/ml para 1% de absorción

## 6 Determinación de colesterol

### 6.1 Principio

El lípido es extraído a partir de la muestra mediante mezcla de solventes y saponificación. De la fracción insaponificable que contiene colesterol y otros esteroides se extraen con benceno. Los esteroides derivados de la forma éter trimetil silil son determinados cuantitativamente por cromatografía de gases, usando 5 alfa-colestano como estándar interno.

### 6.2 Reactivos y materiales

#### 6.2.1 Reactivos

Soluciones estándar de colesterol:

Solución stock.- 1,0 mg/ml de N,N-dimetilformamida

Soluciones de trabajo.- Diluir solución stock con N,N-dimetilformamida para obtener un rango de concentración de 0,05 a 0,5 mg/ml.

Solución de estándar interno de 5 alfa-colestano:

Solución stock.- 1,0 mg/ml en n-heptano

Soluciones de trabajo.- Diluir solución stock con n-heptano para obtener una concentración de 0,2 mg/ml

Dimetildiclorosilano

Dimetilformamida

Fibra de vidrio

n-heptano

Hexametildisilazano (HMDS)

Solución concentrada de hidróxido de potasio.-Disolver 60 g de hidróxido de potasio en 40 ml de agua.

Alcoholes reactivos: etanol-metanol-isopropanol (90+5+5)

Tolueno (nanogrado, destilado en vidrio)

Trimetilclorosilano (TMCS)

Reactivo trimetilsilil (TMS): HMDS-TMCS-piridina (9+6+10)

Adsorbente (celite 545 lavada con ácido o equivalente)

#### 6.2.2 Materiales

Material común de laboratorio

Tapones de goma

Filtro Buchner

Matraces Erlenmeyer de 500 ml

Vasos de precipitados de 100 ml

Papel Whatman No. 1

Precaución: Los silanos son tóxicos.

### 6.3 Aparatos e instrumentos

Tubos de centrifuga de 15 ml.

Silanizar los tubos como sigue: lavar los tubos con metanol anhidro y secar 30 min a 110°C. Transferir los tubos al desecador. Llenar los tubos con solución de dimetildiclorosilano (DMCS) al 10% en tolueno, tapar los tubos y dejar en reposo durante 1 h. Decantar los tubos y enjuagar cuidadosamente con metanol anhidro. Secar en horno a 110°C antes de usar. Después del uso lavar los tubos con metanol, agua, metanol; en este orden. Secar a 110°C, antes de usarlos. Los tubos pueden reutilizarse sin silanizar si se evita el lavado con álcali fuerte.

Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama con sistema de inyección en columna de 2,4/3 ml

Columna de vidrio en forma de U de 2,4 m de longitud y 3 mm de diámetro interno empacada con Apiezon L al 0,5% sobre Gas-Chrom Q con malla de 80 a 100

Columna alternativa.- columna de vidrio en forma de U de 1,8 m de longitud y 4 mm de diámetro interno empacados con SE-30 al 1% sobre Gas-Chrom Q con malla de 80 a 100

Condiciones de operación:

Temperatura del detector 275°C

Temperatura del inyector 275°C

Temperatura de la columna 230°C

Relación de flujo (ml/min)

Nitrógeno 50 para eluir el colesterol de 9 a 11 min

Aire 350

Hidrógeno 35

Homogenizador

Parrilla de calentamiento con agitación magnética

Evaporador rotatorio o rotavapor

Mezclador de tubos de prueba

#### 6.4 Procedimiento

##### 6.4.1 Preparación y empacado de la columna del cromatógrafo.

6.4.1.1 Conectar la columna vacía al aspirador y correr a través de ella una solución de ácido hidrofúrico (HF) al 5%. Detener el vacío con una pinza, colocar rápidamente en los extremos de la columna tapones de goma y mantener la columna llena de una solución de HF al 5% durante 10 min.

6.4.1.2 Nuevamente conectar al aspirador, correr fuera la solución de HF al 5% y enjuagar con aproximadamente 150 ml de agua, seguidos por 150 ml de metanol anhidro. Finalmente enjuagar la columna con 150 ml de isooctano. Inyectar aire a través de la columna hasta secar. Llenar la columna con reactivo TMS, aplicar vacío para que pase lentamente. Tapar los extremos de la columna y reposar por 30 min. Correr TMS y enjuagar inmediatamente con 100 ml de metanol anhidro, seguido por 200 ml de isooctano. Dejar secar la columna con vacío.

6.4.1.3 Preparar el compuesto para el empacado como sigue: Pesar 0,5 g de Apiezon L dentro de un vaso de precipitado de 100 ml, adicionar 80 ml de tolueno, agitar hasta disolución completa y transferir a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, lavar el vaso con 4 porciones de 5 ml de tolueno. Pesar 10 g de Gas-Chrom Q mallas 80-100 y adicionarlo a la solución de Apiezon L. Inmediatamente pasar por filtro Buchner al vacío, agitar continuamente hasta que todo el líquido se haya filtrado. Medir el filtrado y determinar la cantidad de absorción del Apiezon L. Mantener bajo vacío, agitar ocasionalmente hasta casi secar. Transferir la porción a un plato de porcelana para evaporación y secar completamente al horno a una temperatura de 110 a 120°C. Almacenar en frascos de vidrio hasta su uso.

6.4.1.4 Calentar el empaque en el horno durante 15 min a 100°C. Tapar el extremo del detector de la columna silanizada con una fibra de vidrio silanizada de 6 mm y conectar al vacío. Adicionar el empaque caliente a través del embudo conectado a la columna. Finalmente inyectar por el orificio del tapón de la fibra de vidrio silanizada. Acondicionar la columna 24 h a 235°C con flujo de nitrógeno (N<sub>2</sub>).

##### 6.4.2 Determinación de la humedad

Pesar exactamente 5,0 g de muestra en un plato de aluminio previamente tarado, colocarlo en un horno de tipo circular aereado a 100°C, secar toda la noche o durante 3 h a 110°C. Cubrir y mantenerlo fresco en el desecador. Pesar y determinar el contenido de humedad, para ajustarla a la cantidad de agua que ha de adicionarse en 6.4.3

##### 6.4.3 Extracción del lípido.

6.4.3.1 Alimentos (excepto mayonesa, leche en polvo y sólidos de huevo entero). Pesar exactamente una cantidad conocida de muestra conteniendo aproximadamente de 0,5 a 1 g de grasa y transferir cuantitativamente a un homogenizador con 100 ml de metanol anhidro (CH<sub>3</sub>OH). Con base en la determinación de humedad, adicionar suficiente agua (H<sub>2</sub>O) para que el contenido total en la extracción sea de 40 ml. Adicionar 50 ml de cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) y licuar 3 min a velocidad media. (La relación CHCl<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>OH-H<sub>2</sub>O puede ser 50-100-40 en esta fase de

extracción). Adicionalmente agregar 50 ml de  $\text{CHCl}_3$  y licuar durante 0,5 min a velocidad media. Filtrar al vacío dentro de un matraz de succión de 1 l, con filtro Buchner y papel Whatman No. 1, conteniendo 2 g de tierra de diatomáceas. Vaciar el filtrado dentro de un matraz graduado de 500 ml. Re-extraer el precipitado compactado en el papel con aproximadamente 90 ml de  $\text{CHCl}_3$  y filtrar el extracto sin tierra de diatomáceas. Enjuagar el filtro y el sedimento con 2 porciones de 15 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Adicionar estos enjuagues al filtrado original y esperar a que se separen las fases. (Si se desarrolla emulsión, centrifugar el filtrado 5 min a 2500 rpm). Anotar el volumen de la capa de  $\text{CHCl}_3$  inferior. Aspirar la fase acuosa de alcohol (El volumen total de la capa de  $\text{CHCl}_3$  puede ser de 200 ml). Continuar como en 6.4.4.

6.4.3.2 Para huevo entero. Transferir 1 g de muestra bien mezclada a un tubo de extracción (Mojonnier) y lentamente agregar 10 ml de solución de HCl 4:1 en agua lavando hacia abajo para que ninguna partícula de huevo quede adherida a los lados del tubo.

#### 6.4.3.3 Para mayonesa

Pesar de 1,2 a 1,5 g de muestra y transferir cuantitativamente a un homogeneizador con 100,0 ml de metanol anhidro. Adicionar 40 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y 50 ml de  $\text{CHCl}_3$ , licuar 0,5 min a velocidad media. Entonces adicionar 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y agitar nuevamente 0,5 min a velocidad media. Transferir a un separador de 500 ml. Enjuagar el homogeneizador con 3 porciones de 20 ml de  $\text{CHCl}_3$  y adicionar el enjuague al separador. Mezclar de extremo a extremo con movimientos rotatorios. Esperar a que se separen las fases. Vaciar la fase de  $\text{CHCl}_3$  (inferior) dentro de un matraz graduado. Enjuagar la fase acuosa de metanol con 40 ml de  $\text{CHCl}_3$ , adicionar el enjuague al matraz graduado y mezclar. Anotar el volumen de la fase de  $\text{CHCl}_3$ . Proceder como en 6.4.4, usando una alícuota de 150 ml del extracto clorofórmico de lípidos y un vaso de 250 ml.

#### 6.4.3.4 Para leche en polvo descremada

Pesar 25 g de muestra y transferir cuantitativamente a un matraz Erlenmeyer de 300 ml conteniendo 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Agitar para mezclar vigorosamente y refrigerar toda la noche. Para leche reconstituida, en un separador de 1 l adicionar 100 ml del reactivo de alcohol, agitar 1 min. Adicionar 100 ml de éter y agitar 1 min. Adicionar 1 ml de pentano y agitar 1 min. Esperar a que se separen las fases. Decantar la fase acuosa (inferior) dentro de un segundo embudo de separación. Repetir la extracción con 100 ml de éter y 100 ml de pentano, agitar 1 min después de cada adición. Si las fases no se separan, adicionar 40 ml del reactivo de alcohol, mezclar con movimientos rotatorios de extremo a extremo 10 veces, y esperar 5 min. Descargar la fase acuosa. Filtrar los extractos combinados de éter a través de una columna de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) dentro de un vaso de 600 ml. Evaporar hasta aproximadamente 10 ml bajo una corriente suave de  $\text{N}_2$  en baño de agua a  $70^\circ\text{C}$ . Transferir el extracto a un matraz Erlenmeyer de 300 ml con tapa, enjuagando el vaso con pentano. Evaporar hasta sequedad bajo una corriente suave de  $\text{N}_2$  en baño de vapor y proceder como en 6.4.4.2.

### 6.4.4 Saponificación y extracción de la fracción insaponificable.

6.4.4.1 Filtrar una alícuota de 100 ml del extracto  $\text{CHCl}_3$ -lípidos a través de un embudo de vidrio conteniendo un pequeño tapón de fibra de vidrio y aproximadamente 25 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro dentro de un vaso de 150 ml. Enjuagar el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con 15 ml de  $\text{CHCl}_3$  y evaporar el extracto hasta secar bajo una corriente suave de  $\text{N}_2$  en baño de agua a  $90^\circ\text{C}$ , o en baño de vapor. Disolver el residuo en aproximadamente 70 ml de éter de petróleo y filtrar a través de papel Whatman No. 1 conteniendo aproximadamente 20 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con varias porciones de 10 ml de éter de petróleo. Evaporar hasta sequedad bajo una corriente ligera de  $\text{N}_2$  en baño de vapor.

6.4.4.2 Introducir un agitador magnético dentro del matraz y colocarlo en una parrilla de calentamiento con agitación magnética. Con agitación suave, adicionar lentamente 8 ml de

hidróxido de potasio (KOH) concentrado y 40 ml de alcohol reactivo. Unir al condensador, encender la parrilla de calentamiento con agitación magnética y refluja la solución 1 h. Apagar el calentamiento y adicionar 60 ml de alcohol reactivo a través del condensador dentro de la solución saponificadora mientras se agita y enfría. Cuando la muestra se termina de refluja, remover el condensador y agregar 100 ml de benceno en la muestra mientras se agita suavemente. Sacar el agitador, tapar el matraz y agitar vigorosamente por 30 segundos. Verter a un separador de 500 ml sin enjuagar. Adicionar 200 ml de KOH 1N y agitar vigorosamente 10 segundos. Esperar a que se separen las fases y eliminar la fase acuosa (inferior) (puede estar turbia). Verter la fase bencénica dentro de un separador de 250 ml. Lavar la fase de benceno con 40 ml de H<sub>2</sub>O con movimientos rotatorios suaves de extremo a extremo 10 veces. Repetir el lavado con agua 3 veces más. El pH del agua del último lavado debe ser aproximadamente de 7. Colocar la fase bencénica desde la parte superior del separador, filtrando a través de papel Whatman No. 4 conteniendo aproximadamente 15 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro dentro de un matraz Erlenmeyer con tapón. Adicionar aproximadamente 20 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, taparlo y agitar vigorosamente. Esperar 15 min.

6.4.4.3 Adicionar una alícuota de 50 ml dentro de un matraz redondo con tapa de vidrio de 100 ml, y evaporar a sequedad en un evaporador rotatorio a 40°C. Adicionar 3 ml de acetona y otra vez evaporar a sequedad. Disolver el residuo en 3 ml de N,N-dimetilformamida.

6.4.5 Derivación de estándares de colesterol y calibración del cromatógrafo de gases.

6.4.5.1 Transferir 1,0 ml de cada solución estándar de trabajo de colesterol a tubos de centrifuga silanizados de 15 ml. Adicionar 0,2 ml de HMDS y 0,1 ml de TMCS. Tapar los tubos y agitar vigorosamente en un mezclador, o manualmente durante 30 segundos. Mantener la solución sin alteración 15 min. Adicionar 1,0 ml de la solución estándar interna de 5 a - colestano y 10 ml de agua al tubo. Agitar vigorosamente 1 min y centrifugar 2 min.

6.4.5.2 Inyectar por duplicado 3 ml u otro volumen apropiado (usar el mismo volumen para todos los estándares y muestras) de la fase de heptano dentro del cromatógrafo de gases. Ajustar los parámetros del cromatógrafo para dar tiempos de retención de aproximadamente 5 min para el 5 a - colestano y 10 min para colesterol. Determinar el área de cada pico, usando las medidas de altura-amplitud o con integrador digital. Dividir el área del pico de colesterol entre el área del pico del estándar interno para obtener la relación respuesta estándar. Anotar los resultados para las determinaciones duplicadas. Graficar la relación promedio (eje y abscisas) contra la concentración de colesterol (mg/ml) (eje x ordenadas).

La gráfica de relación de respuesta del estándar debe ser graficada en la misma categoría que la relación de respuesta de la muestra.

6.4.6 Derivación y análisis de la muestra.

Transferir 1 ml de la solución de muestra (6.4.3), a un tubo de centrifuga silanizada de 15 ml y proceder como en 6.4.5.1 empezando de la: "Adición de 0,2 ml de HMDS..." Si la respuesta del cromatógrafo va más allá del campo de calibración estandarizado, diluir la solución de muestra y hacer la derivación otra vez.

mg Colesterol/100 g de muestra

= (mg/ml de colesterol en la muestra a partir de la curva estándar X 100)/(g/ml de muestra usada para la derivación)

7 Determinación de fibra dietética

Método gravimétrico-enzimático.

## 7.1 Principio

A muestras duplicadas de alimento deshidratado, extraerle la grasa si contiene más del 10%, gelatinizarlos con una  $\alpha$ -amilasa termoestable, y digerir enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para remover la proteína y el almidón. Precipitación de las fibras por adición de cuatro volúmenes de etanol. El residuo total es filtrado, lavado con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona. Después del secado, se pesa el residuo. Un duplicado es analizado para proteína y otro es incinerado a 525°C, y se determinan las cenizas.

La fibra dietética total es igual al peso del residuo - peso (proteína + Cenizas).

## 7.2 Reactivos y materiales

### 7.2.1 Reactivos

Etanol al 95% v/v grado técnico

Etanol al 78%. - En un matraz de vidrio de 1000 ml, mezclar 800 ml de etanol al 95% (v/v) y 200 ml de agua destilada.

Acetona G.R.

Buffer de fosfatos 0,08 M pH 6,0.- Disolver 1,400 g de fosfato dibásico de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (o 1,753 g dihidratado) y 9,68 g de fosfato monobásico monohidratado de sodio ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) (o 10,94 g dihidratado) en aproximadamente 700 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Llevar a 1 l con agua. Checar el pH con un potenciómetro.

Solución de  $\alpha$ -amilasa termoestable

Proteasa

Amiloglucosidasa

Solución de hidróxido de sodio 0,275 N.-Disolver 11 g de NaOH en aproximadamente 700 ml de agua en un matraz de 1 l. Llevar a volumen con agua.

Solución de ácido clorhídrico(HCl) 0,325 M.- Diluir solución stock de molaridad conocida. Ejemplo: 325 ml de HCl 1 M a 1 litro con agua.

Celite C-211 lavada con ácido

Solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1N

### 7.2.2 Materiales

Vasos de precipitados altos de 400 a 600 ml.

Material común de laboratorio

Crisol para calcinar de porosidad No. 2 o equivalente, tratado de la siguiente manera:

Limpiar cuidadosamente, calentar 1 h a 525°C, dejar remojar y también enjuagar en agua.

Adicionar aproximadamente 0,5 g de celite al crisol secado al aire, y secar a 130°C hasta peso constante (> 1h). Enfriar y almacenar en el desecador hasta ser usado.

### 7.3 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg.

Baños de agua: (1) ebullición, (2) temperatura constante con agitador magnético.

Fuente de vacío

Horno con vacío

Desecador

Mufla

Potenciómetro. Estandarizar con buffers a pH 7 y pH 4.

### 7.4 Procedimiento

#### 7.4.1 Pureza enzimática

Para asegurar la ausencia de actividad enzimática indeseable correr los materiales de la tabla 1 a través del procedimiento entero cada vez que se cambie el lote de enzimas o a un intervalo máximo de 6 meses para asegurar que la enzima no se ha degradado, o bien comprobar la actividad enzimática de la siguiente manera:

7.4.1.1 a - amilasa. En un vaso de 50 ml, poner en suspensión 1 g de almidón de trigo o de maíz en 15 ml de agua destilada. Colocar el vaso en un baño de agua en ebullición y agitar continuamente la suspensión mediante una varilla de vidrio, hasta que se obtenga una solución viscosa. Añadir 100 µl de suspensión de a - amilasa y poner en marcha el cronómetro. Agitar. Al cabo de 10 segundos, la solución debe volverse fluida. Después de 2 min, verter, mediante una pipeta, 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo que contenga 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. Enfriar a temperatura ambiente y añadir unas gotas de solución de yodo 0,02 N. No debe formarse coloración azul, violeta ni roja. En caso contrario repetir la prueba con 150 µl de a-amilasa. Si persiste la coloración reemplazar la enzima.

7.4.1.2 Proteasa. En un vaso de 100 ml, poner en suspensión 1 g de caseinato de sodio (o de calcio) en 60 ml de agua destilada. Introducir un agitador magnético. Colocar el vaso en un baño de agua a 60°C con agitación. Ajustar el pH a 7,5 añadiendo solución de NaOH 0,1 N. Añadir 5 mg de proteasa y poner en marcha el cronómetro. Mediante una bureta añadir continuamente solución de NaOH 0,1 N para mantener el pH a 7,5. Al cabo de 10 min, el No. de ml de NaOH 0,1 N añadidos debe ser igual o superior a 6. En caso contrario, repetir la prueba con 10 mg de proteasa. Si el No. de ml de NaOH 0,1 N sigue siendo inferior a 6, reemplazar la enzima.

7.4.1.3 Amiloglucosidasa. En un vaso de 50 ml poner en suspensión 1 g de almidón soluble en 15 ml de buffer fosfato de pH 4,0. Introducir un agitador magnético y llevar a ebullición sobre una placa magnética con calefacción. Luego colocar el vaso en un baño de agua a 60°C con agitador. Cuando se alcance la temperatura, añadir 300 µl de suspensión de amiloglucosidasa y poner en marcha el cronómetro. Después de 15 min, verter, mediante una pipeta 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo que contenga 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. Enfriar a temperatura ambiente y añadir unas

gotas de solución de yodo 0,02 N. La coloración de la solución debe situarse entre el rojo/pardo y el naranja/amarillo. Si persiste la coloración azul, reemplazar la enzima.

#### TABLA 1

Muestra testigo Actividad Muestra Recuento

peso, g esperado %

Pectina cítrica Pectinasa 0,1 95-100

Extractana (goma lárice) Hemicelulasa 0,1 95-100

Almidón de trigo amilasa 1,0 0-1

Almidón de maíz amilasa 1,0 0-2

Caseína proteasa 0,3 0-2

-glucan (goma de cebada) -glucanasa 0,1 95-100

#### 7.4.2 Preparación de la muestra

Secar, desengrasar o moler el producto sólo si es verdaderamente necesario.

Determinar la fibra dietética total en una muestra seca. Homogeneizar la muestra y secar toda la noche en horno con vacío a 70°C, enfriar en el desecador y una porción de muestra seca, molerla y pasarla a través de una malla de 0,3-0,5 mm.

##### 7.4.2.1 Desengrasado

En principio no es necesario, ya que la grasa se elimina durante las filtraciones y los lavados del residuo con disolventes orgánicos. No obstante si un contenido alto de grasa (> 10%) no permite una molienda apropiada, desengrase como sigue:

En un vaso de 100 ml previamente tarado, pesar 10 g de producto con una aproximación de 1 mg. Añadir 25 ml de éter de petróleo y agitar durante 15 min mediante un agitador magnético. Dejar reposar durante un min, luego decantar la capa sobrenadante clarificada. Repetir la extracción dos veces más con éter de petróleo. Colocar el vaso en una estufa y secar el producto desengrasado bajo vacío a 70°C durante la noche. Enfriar a temperatura ambiente y pesar el vaso.

Anotar la pérdida de peso debida a la remoción y haga las correcciones apropiadas al % final de fibra dietética encontrada en la determinación.

Almacenar la muestra molida y seca en el desecador hasta llevar a cabo su análisis.

#### 7.4.3 Determinación

7.4.3.1 Correr un blanco en forma paralela con las muestras para medir cualquier contribución desde el reactivo al residuo. Pesar por duplicado, con una aproximación de 0,1 mg, muestras de 1 g dentro de vasos de precipitados largos de 400 ml.

7.4.3.2 Los pesos de la muestra no deben diferir más de 20 mg Adicionar 50 ml de buffer de fosfatos a cada vaso. Checar el pH y ajustar si es necesario a  $\text{pH } 6 \pm 0,2$ .

7.4.3.3 Gelatinización del almidón. Adicionar 0,1 ml de solución de  $\alpha$ -amilasa. Cubrir el vaso con una hoja delgada de aluminio y colocarla en baño de ebullición por 15 min. Agitar ligeramente cada 5 min. Incrementar el tiempo de incubación cuando el No. de vasos en el baño no permitan que el contenido de los vasos alcance una temperatura interna de 95 - 100°C. Usar termómetro para indicar si en 15 min se alcanzaron los 95 - 100°C. Un total de 30 min en el baño de agua pueden ser suficientes.

7.4.3.4 Hidrólisis de las proteínas. Enfriar las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar el pH a  $7,5 \pm 0,2$  por adición de 10 ml de solución NaOH 0,275 N. Adicionar 5 mg de proteasa. (Es preferible preparar una solución de enzima a una concentración de 50 mg/ml de buffer de fosfatos y tomar con una pipeta 0,1 ml de ésta para adicionar a cada muestra antes del uso).

7.4.3.5 Hidrólisis del almidón. Cubrir el vaso con una hoja delgada de aluminio o incubar 30 min a 60°C con agitación continua. Enfriar y adicionar 10 ml de la solución de HCl 0,325 M. Medir el pH y adicionar gotas del ácido si es necesario. El pH final debe ser de 4,0 a 4,6. Adicionar 0,3 ml de amiloglucosidasa, cubrir con una hoja delgada de aluminio e incubar 30 min a 60°C con agitación continua.

7.4.3.6 Precipitación de la fibra. Retirar los vasos del baño de agua y añadir enseguida a cada uno de ellos 280 ml de etanol a 95% precalentado a 60°C (medir el volumen antes del calentamiento). Dejar que se forme el precipitado a temperatura ambiente durante 60 min.

7.4.3.7 Pesar, con una aproximación de 0,1 mg, dos crisoles previamente secados con celite, después humedecer y distribuir la cama de celite en el crisol usando una corriente de etanol al 78% desde una piseta. Aplicar succión para jalar la celite sobre un fragmento de vidrio liso como una capa uniforme. Mantener la succión y transferir cuantitativamente el precipitado de la digestión enzimática al crisol. Lavar el residuo sucesivamente con 3 porciones de 20 ml de etanol al 78%, 2 porciones de 10 ml de etanol al 95% y 2 porciones de 10 ml de acetona. En algunas muestras puede formarse una goma atrapando el líquido, si es así, romper la capa de la superficie con espátula para mejorar la filtración. El tiempo de filtración y lavado puede variar desde 0,1 a 6 h, promediando media h por muestra. Tiempos prolongados de filtración pueden ser evitados por succión cuidadosa intermitente durante toda la filtración.

7.4.3.8 Secar el crisol conteniendo el residuo toda la noche en un horno con vacío a 70°C, en horno de aire a 105°C o en una estufa a  $102 \pm 2^\circ\text{C}$ . Enfriar en el desecador y pesarlos con una aproximación de 0,1 mg. Sustraer el peso del crisol y del celite para determinar el peso del residuo. Analizar el residuo de una de las muestras del duplicado para proteína, usando  $\text{N}_2 \times 6,25$  como factor de conversión, excepto en los casos donde el contenido de  $\text{N}_2$  se conoce.

7.4.3.9 Incinerar el segundo residuo a 5 h a 525°C. Enfriar en el desecador y pesar con una aproximación de 0,1 mg. Sustraer el peso del crisol y celite para determinar las cenizas.

Nota: Para evitar que el crisol filtrante se rompa, se debe introducir en el horno ajustado a máximo 150°C y luego aumentar la temperatura a 525°C. Asimismo, después de la incineración, se debe dejar enfriar el crisol primero en el horno hasta 200°C antes de introducirlo en el desecador.

7.4.3.10 Ensayo en blanco

Durante la primera serie de análisis y cada vez que se utiliza un nuevo reactivo, efectuar un ensayo en blanco en las mismas condiciones que la determinación.

#### 7.4.4 Cálculos

Determinación del blanco

$B = \text{blanco mg} = \text{peso residuo} - PB - AB$

donde :

peso del residuo = promedio de los pesos de residuos (mg) para las determinaciones del blanco duplicado

PB y AB = pesos (mg) de proteína y cenizas respectivamente. Determinar residuos en el primero y segundo residuos.

Calcular la fibra dietética total (TDF) como sigue:

$\% \text{ de TDF} = [\text{peso del residuo} - P - A - B / \text{peso de la muestra}] \times 100$

donde:

peso del residuo = promedio de los pesos (mg) para el duplicado de muestras determinadas.

P y A = pesos (mg) de proteína y ceniza respectivamente en el primero y segundo residuos de las muestras.

peso de la muestra = promedio de peso (mg) de las 2 muestras tomadas.

#### 7.4.5 Repetibilidad

La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder:

0,80 g/100 g de producto si la fibra es < 25%

1,20 g/100 g de producto si la fibra es > 25%

### 8 Determinación de sacarina

#### 8.1 Método gravimétrico

##### 8.1.1 Reactivos y materiales

###### 8.1.1.1 Reactivos

Eter etílico

Acido clorhídrico

Reactivo de Nessler: disolver 143 g de NaOH en 950 ml de agua destilada y filtrar a través de asbesto, añadir 50 g de ioduro de mercurio (HgI<sub>2</sub>) al filtrado y diluir con agua a 1 l, mezclar con rotación, dejar sedimentar y utilizar el sobrenadante.

Acetato de plomo neutro al 20%

Acido acético

#### 8.1.1.2 Materiales

Embudo de separación

Material común de laboratorio

Probeta de 25, 50 y 200 ml

Pipetas serológicas de 1, 2, 5 y 10 ml

Matraz volumétrico de 250 y 1000 ml

Papel filtro

Crisoles

Propipetas

#### 8.1.2 Aparatos e instrumentos

Balanza analítica con una sensibilidad de 0,1 mg

Baño de agua caliente y baño de vapor

Parrilla eléctrica

Estufa de secado

#### 8.1.3 Procedimiento

##### 8.1.3.1 Preparación de la muestra

8.1.3.1.1 Jugos de frutas y jarabes. Transferir de 100 a 200 g de muestra a un matraz de 250 ml con poca agua y diluir hasta aproximadamente 200 ml con agua. Adicionar 5 ml de ácido acético y mezclar. Adicionar lentamente un exceso de solución de acetato de plomo neutro al 20%, mezclar cuidadosamente, llevar a volumen con agua, otra vez mezclar y filtrar.

8.1.3.1.2 Preparaciones sólidas o semisólidas. Transferir de 50 a 75 g de la muestra homogénea a un matraz volumétrico de 250 ml que contenga un poco de agua destilada caliente y adicionar bastante agua hirviendo hasta aproximadamente 200 ml, dejar reposar 2 h mezclando ocasionalmente. Adicionar 5 ml de ácido acético, mezclar cuidadosamente, adicionar un ligero exceso de una solución al 20% de acetato de plomo neutro, llevar a volumen con agua fría, mezclar, esperar 20 min. y filtrar.

##### 8.1.3.2 Determinación

8.1.3.2.1 Transferir 150 ml del filtrado (8.1.3.1) a un embudo de separación de vidrio, agregar 15 ml de HCl y extraer con 3 porciones de 80 ml de éter, agitando el embudo 2 min después de cada adición. Lavar los extractos de éter con 5 ml de agua destilada y combinarlos, remover el éter por destilación y transferir el residuo a un crisol con un poco de éter, si las sustancias son difíciles de solubilizar en éter, usar alternamente pequeñas porciones de agua y éter. Evaporar el éter en baño de vapor, adicionar al residuo de 2 a 3 ml de una solución al 10% de carbonato de sodio (o la cantidad necesaria para hacer a la mezcla fuertemente alcalina), agitar en rotación para que toda la sacarina se ponga en contacto con la solución y evaporar a sequedad en baño de vapor. Para secar el residuo añadir 4 g de una mezcla compuesta por partes iguales de carbonato de sodio anhidro y carbonato de potasio anhidro; calentar suavemente primero y después llevar a fusión completa durante 30 min (la fusión puede ser llevada a cabo en un crisol que tenga orificios parcialmente cubiertos por piezas de asbesto tratado, de tal forma que sólo cubra 1/3 del crisol, calentando una pequeña porción del crisol por medio del mechero).

8.1.3.2.2 Enfriar, disolver en agua lo fundido, adicionar alrededor de 5 ml de agua de bromo, acidificar con HCl, filtrar en papel humedecido, lavando el filtro con aproximadamente 200 ml de agua, calentar a ebullición y adicionar lentamente un exceso de solución de cloruro de bario al 10%. Dejar reposar la mezcla durante toda la noche y después filtrar a través de un crisol gooch para colectar el precipitado de sulfato de bario, lavando hasta que se haya liberado todo el cloro presente, secar, calentar a ignición, enfriar y pesar. Para obtener los resultados correctos es necesario corregir el valor en base al azufre presente en la mezcla fundida, para lo cual se hace indispensable correr un blanco al parejo de la determinación de sacarina.

Nota: En algunos casos, es más recomendable utilizar el óxido de sodio en una proporción de 3 a 4 g para el paso de la fusión, en lugar de usar la mezcla de los carbonatos de sodio y potasio; en este caso, el crisol de níquel puede utilizarse, y el punto de fusión puede ser reducido junto con el tiempo a sólo 5 min. Las separaciones de pequeñas cantidades de cloruro de plomo durante las extracciones no interfieren con la exactitud del método.

#### 8.1.4 Cálculos

Sacarina = peso corregido de sulfato de bario x 0,7848

#### 8.2 Sacarina en bebidas no alcohólicas

Añadir 2 ml de HCl a 50 ml de la muestra en un embudo de separación, y extraer con 2 porciones de 50 ml de éter; filtrar los extractos de éter a través de algodón y combinar los lavados del filtrado con aproximadamente 5 ml de agua que contengan una gota de HCl. Separar la capa de éter y evaporar a sequedad en baño de agua, añadir al residuo 5 ml de agua libre de amoníaco y 6 ml de HCl, y evaporar la solución hasta cerca de 1 ml en una parrilla caliente agitando constantemente. Nuevamente agregar 5 ml de agua libre de amoníaco y 6 ml de HCl y evaporar hasta cerca de 1 ml; diluir a 50 ml con agua libre de amoníaco y diluir 2 ml de esta solución a 25 ml con agua libre de amoníaco. Añadir 1 ml de reactivo de Nessler y comparar con solución de cloruro de amonio de la misma manera.

0,2921 g de cloruro de amonio = 1 g de sacarina, forma insoluble (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>S) y 1,317 g para la sal de sodio (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>NNaO<sub>3</sub>S.2H<sub>2</sub>O).

Por conveniencia preparar un estándar de cloruro de amonio equivalente a 200 mg/kg de la forma insoluble de sacarina.

**Fecha de publicación: 26 de junio de 1996**

