



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE INGENIERIA**



**GUÍA DE PRÁCTICAS**  
**PERIODO ACADÉMICO: 2024-1S**

**VERSIÓN: 1**

**Páginas 6**

<b>CARRERA:</b> AGROINDUSTRIA		<b>DOCENTE:</b> ANA MEJÍA LÓPEZ		<b>SEMESTRE: TERCERO</b> <b>PARALELO: A</b>	
<b>NOMBRE DE LA ASIGNATURA:</b> ANALISIS DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES		<b>CÓDIGO DE LA ASIGNATURA:</b> AGP230131		<b>LABORATORIO A UTILIZAR:</b> <b>CONTROL DE CALIDAD</b>	
<b>Práctica N°:</b> 2	<b>Tema:</b> Métodos de absorción molecular Uv-visible-parte 1		<b>Duración</b> 8 HORAS	<b>N° Grupos</b> 6	<b>N° estudiantes (por Grupo)</b> 4 grupos de 5 y 2 grupos de 4

**Objetivos de la práctica:**

- ✓ Aplicar los métodos de absorción molecular Uv-visible en las determinaciones de Nitritos, fosfatos, Hierro y cafeína en diferentes muestras

**Equipos, Materiales, Insumos:**

Espectrofotómetros, materiales de vidrio según procedimiento, muestras de alimentos

**Procedimiento**

**1. Construcción de la curva:**

Se preparan soluciones estándar de concentraciones conocidas del analito que se quiere medir.  
Se mide la señal del instrumento (absorbancia) para cada una de las soluciones estándar.  
Se grafica la señal del instrumento frente a la concentración de las soluciones estándar.  
Se evalúa si la relación entre la señal y la concentración es lineal. Si es lineal, se puede ajustar una ecuación de regresión lineal a los datos.

**2. Determinación de la concentración desconocida:**

Para una muestra desconocida, se mide la señal del instrumento y se utiliza la ecuación de la curva de calibración para determinar la concentración del analito.

**PROTOCOLOS**

**DETERMINACION DE NITRITOS DE EMBUTIDOS**

La determinación de nitritos en embutidos se realiza comúnmente mediante espectrofotometría UV-Visible, utilizando el método de Griess. Este método se basa en la reacción de los nitritos con el reactivo de Griess (ácido sulfanílico y alfa-naftilamina), generando un colorante azoico que se mide espectrofotométricamente.

**REACTIVOS**

**Solución Carrez I.** Disuelva 3,60 g de hexacianoferrato de potasio (II)  $\{K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O\}$  en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente.

**Solución Carrez II.** Disuelva 7,20 g de sulfato de cinc  $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$  (Sigma cat. no. Z-4750) en 100 mL de agua destilada. Guárdelo a temperatura ambiente

**PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRÓN.** Preparas soluciones de 0.25, 0.50 , 0.7 y 1ppm de nitrito sódico. Transferir 10 ml de cada una de estas soluciones a un tubo de ensayo y añadir 10 ml del reactivo colorimétrico y proceder a su valoración colorimétrica a 520 nm, llevando absorbancias frente a concentraciones expresadas en ppm de nitrito sódico. proceder a su lectura a 520 nm, llevando absorbancias frente a concentraciones expresadas en ppm de nitrito sódico.

#### **PREPARACION DE LA MUESTRA - DESPROTEINIZACIÓN**

- Pesar en un erlenmeyer con precisión de 0,1 mg, 5 g de muestra triturada, y añadir 50 mL de agua a 70°C,
- Calentar el Erlenmeyer durante 2 h en baño María a 80° C ± 2° (15 minutos en baño maría a ebullición) y agitar varias veces y posteriormente se enfría hasta temperatura ambiente.
- Añádale sucesivamente 1 mL del Reactivo I y 1 mL del Reactivo II , mezclando bien después de cada adición. Espere 30 minutos a temperatura ambiente y transfiera el contenido cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL. Enrase con agua destilada PA..
- Mezcle bien el contenido y filtre a través de un papel de filtro

#### **MEDIDA DEL CONTENIDO DE NITRITOS:**

Tomar con pipeta volumétrica una alícuota de 10 mL y ponerla en vaso. - Añadir el reactivo colorimétrico, mezclar y dejar reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, al abrigo de la luz solar directa. - Montar un blanco utilizando para ello 10 mL de agua libre de nitritos y tratar igual que la muestra. - A partir de 20 minutos, pero dentro de las 4 horas, medir la densidad óptica de la solución, con una longitud de onda aproximada de 520 nm. Si la solución coloreada obtenida a partir de la muestra es superior a la de la solución patrón más concentrada, disminuir la cantidad de filtrado tomado con la pipeta.

**Nota.** Si la muestra no está clara Del extracto obtenido, tomar 25 ml y añadir 1 g aproximadamente, de carbón activo agitar dejar en contacto por 3 minutos y filtrar, con el filtrado transparente seguir el procedimiento de la medida.

#### **DETERMINACION DE FOSFATOS EN EMBUTIDOS**

**Principio:** Transformación en ácido pirofosfórico, posterior hidrólisis del mismo y medida de la intensidad de color producido al añadirle el reactivo molibdato - vanadato, por espectroscopía de absorción en el visible. Este método se basa en la producción de un color amarillo naranja estable, debido al complejo vanadio molibdifosfórico ( $H_3PO_4 \cdot VO_3 \cdot 11MoO_3 \cdot n H_2O$ ) que se forma al tratar una solución ácida de ortofosfatos con un reactivo ácido que contiene ácido molíbdico y ácido vanádico.

#### **Reactivos**

**Solución de molibdato amónico:** 20 g de molibdato amónico tetrahidrato P.A. en 200 ml de agua desionizada caliente. Solución de metavanadato amónico: 1 g de metavanadato amónico P.A. en 300 ml de agua desionizada caliente, enfriar y añadir 140 ml de ácido nítrico concentrado PA.

**Solución de metamolibdovanadato:** verter lentamente y agitando la solución de molibdato amónico sobre la solución de metavanadato amónico. Enrasar a 1 litro con Agua desionizada.

**Ácido nítrico concentrado PA.**

**Ácido sulfúrico concentrado PA.**

**$KH_2PO_4$  calidad P.A.** al menos (desechado previamente unas 2h a 150°C y almacenado en desecador), para preparar la curva patrón.

**Preparación de la curva patrón:** disolver con precisión de 1 mg, 0,4 g de fosfato monopotásico o dihidrógenofosfato de potasio o fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ), previamente seco. Añadir 0,2 ml de ácido sulfúrico y diluir a 100 ml. Esta solución contiene aproximadamente 1 mg/ml (A). preparar diluciones de: 0.2, 0.40, 0.60, 0.80, 1 mg/ml, A continuación, tomamos 5 ml de cada patrón y añadimos 10 ml del reactivo colorimétrico y lo llevamos a 50 ml. Medir frente a un blanco a los 30 minutos, a una longitud de onda de 420 nm

**Preparación de la muestra:** Tomar una muestra de 2 a 2,5 g de carne triturada y homogeneizada en una cápsula o crisol de porcelana. Humedecerla con unos mililitros de solución de  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  y evaporar. Llevar a cenizas a una temperatura de 550 °C a 600 °C hasta cenizas blancas. Recoger las cenizas añadiendo a la cápsula 2 ml de nítrico concentrado y 6 ml de clorhídrico concentrado. Calentar en placa calefactora con agitación durante al menos 10 min y verter con mucho cuidado a través de embudo con filtro en un matraz aforado de 50 ml. Aforar con agua destilada.

Para medir el fósforo, tomar 5 ml de la solución final y proceder como en la curva patrón, añadiendo el reactivo colorimétrica y llevando a 50 ml con agua destilada. Leer en espectrofotómetro a 420 nm tras 30 minutos de reposo.

### **Determinación de hierro** (método AOAC 944.02).

Para la determinación del hierro es utilizado el método de la orto-fenantrolina (Association of Official Analytical Chemistry (AOAC)). La orto-fenantrolina reacciona con el  $\text{Fe}^{2+}$ , originando un complejo de color rojo característico (ferroína) que absorbe notablemente en las regiones del espectro visible de 510nm. El  $\text{Fe}^{3+}$  no presenta absorción a esa longitud de onda y debe ser reducido a  $\text{Fe}^{2+}$  mediante un agente reductor apropiado, como la hidroxilamina. La reducción cuantitativa de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  ocurre en pocos minutos en un medio ácido (pH 3-4), de acuerdo con la siguiente ecuación:  $4\text{Fe}^{3+} + 2\text{NH}_2\text{OH} \rightarrow 4\text{Fe}^{2+} + \text{N}_2\text{O} + 4\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$

Después de la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , se da la formación de un complejo con la adición de orto-fenantrolina. En un medio ácido la orto-fenantrolina se encuentra en su forma protonada como ion 1,10-fenantrolin ( $\text{Fe}_n\text{H}^+$ ). La reacción puede ser descrita por la siguiente ecuación:  $\text{Fe}^{2+} + 3\text{Fe}_n\text{H}^+ \rightarrow \text{Fe}(\text{Fe}_n)_3^{3+} + 3\text{H}^+$

#### **Preparación de reactivos y estándar.**

**Solución estándar de hierro** de 10,0 mg/L: Pesar 0,0176 g de sulfato de hierro(II) y amonio,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en un vaso de 100 mL, disolverlo con unos 50 mL de agua y transferirlo a una fiola de 250 mL, Adicionar 0,7 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cc y aforar con agua la fiola.

**Solución de cloruro de hidroxilamina:** Disolver 10,0 g de hidroxilamina en 100 mL de agua.

**Solución de 1,10-fenantrolina al 0,1%:** Pesar 1,10-fenantrolina en un vaso de 100,0 mL, adicionar 10 mL de etanol y completar con agua en una fiola de 100 mL. Guardarlo en un recipiente de plástico.

**Solución de acetato de sodio:** Disolver 15 g de acetato de sodio con 100 mL de agua.

**Soluciones estándar diluidas de Fe(II):** Preparar soluciones desde 02 a 1 ppm adicionar + 0,2ml Hidroxilamina 1 ml Acetato desodio 10% y 1 ml de 1,10-fenantrolina y completar con agua a 10 ml Luego se deja en reposo las soluciones en un espacio oscuro por unos 15 minutos para el desarrollo completo del color. Las soluciones están listas para medir su absorbancia u obtener la curva de calibración respectiva

**Preparación de la muestra de alimento:** En una cápsula de porcelana pesar de 5 a 6 la muestra Secarlo en una estufa a 105 °C. Luego en una mufla, calcinarlo a 550 °C. Frío el contenido disolverlo con 1.0 mL de HCl 6M, diluirlo con unos 5 mL de agua y se transfiere a un tubo de ensayo de 10.0 mL donde se afora con agua. De esta solución depositar 0.10 mL en un tubo de ensayo de 10.0 mL y agregar los reactivos considerados en la curva de calibracion y aforar con agua la fiola

### **HIERRO POR EL MÉTODO DE KSCN**

**La solución que contiene iones  $\text{Fe}^{3+}$  (ferricos, se añaden iones tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ), para formar un complejo de color rojo sangre:**

#### **Materiales Necesarios**

Espectrofotómetro UV-Vis

Celdas de cuarzo

Muestras de galletas y harina

Ácido clorhídrico (HCl) concentrado (37%)

Solución de tiocianato de potasio (KSCN) al 10%

Solución estándar de hierro (III) (1000 mg/L)

#### **Soluciones de Calibración:**

Diluir la solución madre de hierro (III) para preparar una serie de soluciones estándar con concentraciones conocidas (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L).

#### **Preparación de la Muestra**

1. Homogenización: Homogeneizar la muestra de galletas o harina en una bolsa plástica.

2. Obtener ceniza agregar 5 ml HCl 2M y traspasar a un matraz aforado de 100 ml,

3. Añadir 5 mL de solución de tiocianato de potasio al 10% a la solución filtrada para formar el complejo hierro-tiocianato, que tiene una alta absorptividad molar en el rango visible. El complejo hierro-tiocianato produce un color rojo intenso.

Medición de Absorbancia Longitud de Onda: complejo hierro-tiocianato (**generalmente alrededor de 480 nm**).

- Sulfato de amonio férrico  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$
- Soluciones estándar de: 2, 4, 6, 8 y  $10 \times 10^{-5}\text{M}$
- Solución de tiocianato de amonio (1 M)
- Ácido sulfúrico (1M)

#### Preparación de soluciones estándar de $\text{Fe}^{3+}$ :

Nota: La disolución de la sal de Fe utilizada puede tardar varios días, por lo que debe realizarse esta preparación con bastante antelación al resto del experimento. Pese aproximadamente 3,0 g de sulfato férrico de amonio Utilice un mortero para moler la sal hasta obtener un polvo fino. Pese con precisión 0,241 g del polvo en un vaso de precipitados de 50 mL y añada 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deje el polvo en remojo en el ácido durante la noche. Al día siguiente, vierta con cuidado la mezcla de ácido y polvo en un matraz aforado de 50 mL, enjuagando el vaso de precipitados con agua varias veces y, a continuación, enrase con agua destilada. Deje reposar esta solución durante varios días hasta que el polvo de sulfato de amonio férrico se haya disuelto por completo. Si es posible, inserte un agitador magnético y agite la solución para acelerar el proceso de disolución.

Con una pipeta, transfiera 10 mL de solución de iones férricos a un matraz aforado de 100 mL y enrase con agua destilada. Esto da como resultado una solución con  $[\text{Fe}^{3+}] = 0,001\text{M}$ . Para preparar una solución estándar de  $2 \times 10^{-5}\text{M}$ , pipetea 1 mL de la solución de 0,001 M en un matraz aforado de 50 mL, añada 1 mL de ácido sulfúrico  $1\text{ mol L}^{-1}$  y enrase con agua destilada. Repita este procedimiento, pipeteando 2, 3, 4 y 5 mL de solución de  $\text{Fe}^{3+}$  de 0,001 M, uno tras otro, para obtener soluciones de 4, 6, 8 y  $10 \times 10^{-5}\text{M}$ , respectivamente

#### Preparación de la muestra de alimento para el análisis:

1. Pese con precisión unos pocos gramos (normalmente se requieren de 2 a 5 g, dependiendo del contenido de hierro de la muestra) de su muestra de alimento en un crisol.
2. Caliente el crisol sobre un mechero Bunsen hasta que la muestra se reduzca completamente a cenizas
3. Cuando la muestra y el crisol se hayan enfriado, utilice una varilla agitadora para triturar las cenizas hasta obtener un polvo fino. Utilice una probeta graduada para añadir 10 ml de ácido clorhídrico (1 M) y remueva durante 5 minutos, asegurándose de que toda la ceniza esté absorbida.
4. Añada 5 ml de agua destilada y filtre la solución en un matraz Erlenmeyer de 100 ml para eliminar la ceniza. Esta solución filtrada se utilizará para el análisis colorimétrico.

#### Análisis colorimétrico:

1. Mida con precisión 10 mL de la solución de muestra en un tubo de ensayo limpio y seco. Nota: Esto se realiza con mayor precisión con una pipeta de 10 mL; sin embargo, es posible hacerlo con suficiente precisión (y con menos complicaciones) con una probeta graduada limpia de 10 mL si se mide con cuidado.
2. A continuación, mida 10 mL de cada solución estándar de Fe y coloque en tubos o vasos separados en orden creciente de concentración, comenzando con el estándar de  $2 \times 10^{-5}\text{M}$ . Es recomendable enjuagar primero la pipeta o probeta graduada con unos pocos mL del estándar de  $2 \times 10^{-5}\text{M}$ .
3. Con una probeta graduada de 10 mL, mida 10 mL de solución de tiocianato de amonio de 1M en cada uno de seis recipientes pequeños y limpios
4. Lo más rápido posible, vierta 10 mL de solución de tiocianato (las porciones medidas anteriormente) en cada una de las soluciones de hierro.
5. Mezcle las soluciones removiendo. En los próximos minutos, aparecerá un color rojo estable.
6. Deje que el color rojo se desarrolle durante 15 minutos. Luego,

#### **EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROSCOPÍA ULTRAVIOLETA DE LA CAFEÍNA OBTENIDA DE MATERIAS VEGETALES.**

**El método de extracción se basa en la distinta solubilidad de los diferentes componentes del café con respecto a la cafeína. Así son poco solubles en agua las proteínas, la celulosa, ésteres de glicerina y ácidos carboxílicos, mientras que son bastante solubles en agua caliente la cafeína, los taninos, glucosa y el ácido clorogénico. Los taninos y el ácido clorogénico precipitan en presencia de acetato de plomo. Finalmente, la cafeína es soluble en cloroformo (triclorometano) y la glucosa no. En esta práctica se aislará la cafeína bien del café, té, mate, etc., se purificará, bien**

por disolución o sublimación. Se realizará su espectro UV asignando bandas y elucidando su estructura molecular. Se pesará y calculará el porcentaje respecto a muestra tomada.

### **EXTRACCIÓN DE CAFÉINA A PARTIR DE CAFÉ.**

Someter a reflujo calentando suavemente por 20 minutos 25 g de café molido y 100 ml de agua destilada o desionizada. Con la disolución en caliente filtrar a vacío empleando un embudo Büchner de tamaño grande. Desechar el residuo sólido, pasar el filtrado a un matraz Erlenmeyer de 250 ml y añadir 25 ml de disolución acuosa al 10% (w/v) de acetato de plomo. Calentar y agitar durante unos 15 minutos para que precipiten los correspondientes acetatos. Filtrar de nuevo a vacío y en caliente, una vez enfriado el líquido filtrado pasarlo a un embudo de decantación de 250 ml. Se realiza una primera extracción con 25 ml de cloroformo, sin agitar bruscamente (porque puede formarse una emulsión que tardaría mucho en destruirse), pero si suavemente. Dejar reposar hasta que se separen las dos fases y recoger la inferior en un Erlenmeyer de 100 ml que se tapa. Repetir la operación de extracción de igual manera y juntar las dos disoluciones de cloroformo, se desecha la fase acuosa. Introducir de nuevo la fracción clorofórmica en un embudo de decantación y añadir 20 ml de disolución acuosa de NaOH al 5 %, agitar suavemente y retirar de nuevo la fase clorofórmica. Realizar luego un lavado en el embudo de decantación con 10 ml de agua destilada. Se obtendrá finalmente una disolución de cloroformo en cafeína, a menudo de aspecto turbio. Para desecar la disolución clorofórmica, añadir una pequeña porción de sulfato de sodio anhidro o cloruro de calcio anhidro y agitar hasta que se observe total transparencia. Eliminar el desecante por filtración a través de un filtro de pliegues, poner en Erlenmeyer de 100 ml y tapar. Evaporar el cloroformo en rotavapor, pesar y guardar el residuo de cafeína bruta. Preparar una disolución acuosa en las concentraciones indicadas en el espectro adjunto y realizar un registro en la zona ultravioleta frente a un blanco de agua y con cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Para purificar por recristalización tomar una parte de la cafeína obtenida y disolver en la menor cantidad posible de tolueno en caliente, filtrar en caliente a través filtro de pliegues. En el filtrado añadir éter de petróleo gota a gota hasta observar turbidez y enfriar, filtra de nuevo y realizar otro espectro de una disolución acuosa de los cristales obtenidos. Comparar los dos espectros. Si se desea se puede medir el punto de fusión de la cafeína, su valor debe estar comprendido entre 236 °C y 238 °C.

### **Preparación de Soluciones Estándar:**

Solución madre de cafeína: Disolver una cantidad conocida de cafeína pura en agua destilada para preparar una solución madre (por ejemplo, 100 mg/L).

Soluciones de calibración: Diluir la solución madre para preparar una serie de soluciones estándar con concentraciones conocidas (por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L).

Curva de calibración A partir de la solución madre se realizan diluciones de 0, 4, 8, 16, 24, 32, 42 ppm, se transfieren 1,5 mL de cada solución a la cubeta de cuarzo y se realiza las lecturas correspondientes a una longitud de onda de 273 nm.

### **Preparación de la Muestra:**

Muestra de bebida energética: Tomar una alícuota de la bebida energética y diluirla adecuadamente con agua destilada o solvente adecuado para que la concentración de cafeína esté dentro del rango de las soluciones estándar. 5/25

Se transfiere 25 mL de la bebida energizante a un vaso de precipitados de 250 mL, se agrega 100 mL de agua destilada y se calienta a 30 °C durante 10 minutos, se deja enfriar y luego Al sobrenadante se agrega aproximadamente 0,5 g. de Carbonato de Sodio para la eliminación de acidez presente en la solución, se agita hasta disolución del carbonato y nuevamente se filtra. Filtrada la muestra, se transfiere a un embudo de separación y se agrega 25 mL de Cloroformo de alta pureza, se agita vigorosamente durante unos minutos y se deja reposar hasta la formación de dos fases (Acuosa y Orgánica), posteriormente se separa ambas fases, se agrega a la fase orgánica

Sulfato de sodio anhidro para absorber el agua restante, decantar y llevar la fase orgánica a rotaevaporador, hasta la eliminación del solvente de extracción. Para realizar el cálculo del rendimiento de extracción (m/V) de cafeína obtenida se utiliza la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{mg de extracto seco}}{\text{mL de bebida Energizante}}$$

**Determinación de la concentración de cafeína.** Obteniendo el extracto seco (Polvo blanco fino), se disuelve con agua destilada desionizada y se transfiere a un matraz aforado de 100 mL y luego se afora. Posteriormente se toma 1 mL de la solución anterior y se afora a 25 mL con agua destilada desionizada. Realizar la lectura de la absorbancia, a una longitud de onda de 273 nm.

3. Medición de Absorbancia:

Longitud de onda: Seleccionar la longitud de onda de máxima absorción para la cafeína (generalmente alrededor de 273 nm).

Calibración del espectrofotómetro: Ajustar el espectrofotómetro con agua destilada o solvente adecuado como blanco.

Medición: Medir la absorbancia de las soluciones estándar y de la muestra diluida en la longitud de onda seleccionada.

**4. Curva de Calibración:**

Construcción: Graficar la absorbancia de las soluciones estándar contra sus concentraciones para obtener la curva de calibración.

Ecuación: Determinar la ecuación de la línea de calibración (generalmente una línea recta) que relaciona la absorbancia con la concentración.

**Resultados:**

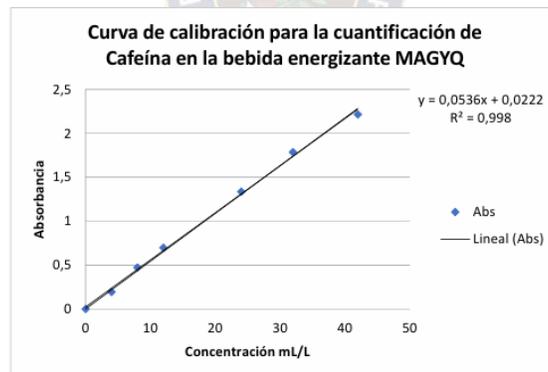
Los resultados se obtienen en mg de fósforo en 50 ml.

Concentración de fósforo (mg/100 g) =  $2 \cdot V \cdot C/P$  Siendo: **V**= volumen del matraz en que se recoge la muestra (ml) **C**= concentración registrada en el espectrofotómetro (mg/50 ml) **P**= peso de la muestra que pusimos en el crisol de porcelana (g)

Para calcular la concentración de fosfatos en la forma P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en mg/100g multiplicamos por 2,29 el resultado anterior.

**Anexos:**

Concentración [ppm]	Promedio Absorbancias
0	0,001
4	0,193
8	0,472
16	0,697
24	1,335
32	1,784
42	2,214



**Referencias bibliográficas:**

todos oficiales de análisis. carne y productos cárnicos. Panreac Química S.A. Disponible en: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Manual-Analisis-de-Alimentos-1.pdf>

**Fecha de Revisión y Aprobación:** 15 de abril del 2025

**Firma Director de Carrera:**.....

**Firma Docente:** .....