

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

EVALUACIÓN DE NOPALES (*Opuntia ficus indica*) COMO FUENTE DE CALCIO

Magro, Sofía – LU: 124625

Ingeniería en Alimentos

Pérez Maurice, María Belén – LU: 133033

Ingeniería en Alimentos

Tutora:

Gozzi, Marta Sofía, UADE

Colaboradora:

Faggi, Gabriela Marta, INTA Chaco

Marzo 06, 2017



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I.....	7
GENERALIDADES.....	7
1.1. Introducción.....	7
1.2. Objetivos	8
1.2.1. Objetivo general	8
1.2.2. Objetivos específicos.....	8
CAPÍTULO II.....	9
MARCO TEÓRICO	9
2.1. El nopal.....	9
2.1.1. Antecedentes	9
2.1.2. Taxonomía.....	10
2.1.3. Características Botánicas.....	12
2.1.3.1. Tallo.....	12
2.1.3.2. Cladodios.....	13
2.1.3.3. Flores	15
2.1.3.4. Frutos.....	16
2.1.3.5. Raíces	17
2.1.4. Requerimientos agroclimáticos	17
2.1.5. Manejo del proceso de cosecha y post cosecha.....	18
2.1.5.1. Cosecha	18
2.1.5.2. Post Cosecha.....	21
2.1.6. Composición química del nopal	22
2.1.7. Propiedades nutricionales y beneficios sobre la salud	23
2.1.8. Usos del nopal	24
2.1.8.1. Aplicaciones en alimentos.....	24
2.1.8.2. Aplicaciones en nutrición animal	27
2.1.8.3. Aplicaciones farmacéuticas	28
2.1.8.4. Aplicaciones industriales.....	29

2.1.8.5. Usos alternativos	30
2.1.8.5.1 Cercos	30
2.1.8.5.2. Adhesivos	30
2.1.8.5.3. Pinturas e impermeabilizantes	31
2.1.8.5.4. Combustible.....	31
2.1.8.5.5. Producto ecológico	31
2.1.8.5.6. Paisajismo y control de contaminación	32
2.1.8.5.7. Materia prima de cosméticos.....	32
2.2. El calcio	33
2.2.1. Función	33
2.2.2. Requerimientos.....	34
2.2.3. Biodisponibilidad	35
2.2.3.1. Absorción	36
2.2.3.1.1. Vitamina D	37
2.2.3.1.2. Fósforo.....	38
2.2.3.2. Excreción.....	39
2.2.3.3. Oxalatos.....	40
2.2.4. Deficiencia.....	42
2.2.5. Fuentes.....	43
2.3. Dietas.....	46
CAPÍTULO III	50
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. Materiales y equipos (ver Anexo I).....	50
3.2. Materia prima	50
3.3. Procesamiento	50
3.3.1. Recepción de materia prima	51
3.3.2. Lavado	53
3.3.3. Desespinado y Corte.....	53
3.3.4. Cocción.....	54
3.3.4.1. Hervido	54
3.3.4.2. Horneado	55
3.3.5. Liofilizado	55
3.3.6. Molienda y tamizado	56

3.3.7. Almacenamiento.....	57
3.4. Determinaciones	58
3.4.1. Determinación de humedad.....	58
3.4.2. Determinación de cenizas.....	58
3.4.3. Determinación de Oxalatos	59
3.4.3.1. Oxalato Total.....	59
3.4.3.2. Oxalato Soluble	60
3.4.3.3. Oxalato Insoluble	61
3.4.4. Determinación de Calcio, Sodio y Potasio.....	61
3.4.5. Determinación de proteínas.....	62
3.4.6. Determinación de grasas	63
3.4.7. Determinación de pH.....	64
3.5. Estadística.....	64
CAPÍTULO IV	65
RESULTADOS Y DISCUSIONES	65
CAPÍTULO V	75
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	86
6. 1. ANEXO I - Materiales, insumos y equipos.....	86
6.1.1. Materiales	86
6.1.2. Insumos	87
6.1.3. Equipos.....	88
6.2. ANEXO II – Metodologías AOAC	89

RESUMEN

El nopal (*Opuntia ficus indica*) es una cactácea característica del norte argentino que presenta numerosos tallos modificados denominados cladodios o nopales. Se los consume de forma local principalmente hervido. Contienen, además de fibra, un alto contenido de calcio. Este mineral es esencial para el cuerpo humano. Una deficiencia en su consumo diario recomendado puede elevar el riesgo de osteoporosis y otras enfermedades (Amalraj y Pius, 2015). Para las personas con dietas vegetarianas o veganas, es importante buscar otros alimentos que puedan aportar calcio. El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de calcio en nopales crudos, hervidos y horneados. Los nopales fueron recepcionados, despinaados, lavados y cortados, horneados o hervidos en agua, escurridos, secados y liofilizados. Se determinó también el contenido de oxalatos totales, solubles y la composición porcentual. Solamente el contenido de oxalatos solubles fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los oxalatos tienen un efecto adverso sobre la asimilación del calcio. La relación oxalato/calcio encontrada fue de 0,63, 0,65 y 0,73 para el nopal crudo, hervido y horneado, respectivamente. Este valor menor a 2 (Noonan y Savage, 1999) indicaría que el calcio de los nopales crudos y hervidos tendría mayor biodisponibilidad y menor efecto contrario de los oxalatos.

ABSTRACT

The stems of the *Opuntia ficus indica* known as “cladodes” or “nopales” are consumed cooked in different ways in the center and north of Argentina. They have high content of fiber and calcium. This mineral is essential for the human body and a lower intake than the Recommended Daily Intake may increase the risk of osteoporosis and other diseases (Amalraj and Pius, 2015). For people with vegetarian or vegan diets, it is important to seek other foods that can provide calcium. The objective of this work was to determine the calcium content in raw, boiled and baked nopals. Once they received, they were washed, the spines were removed, and cut. Then they were baked or boiled in water, drained, dried and lyophilized. Total and soluble content of oxalates, total calcium and the percentage composition was determined. Only the content of soluble oxalates was statistically significant ($p < 0.05$).

Oxalates have an adverse effect on calcium absorption. The oxalate / calcium ratio was found 0.63, 0.65 and 0.73 for raw, boiled and baked nopal, respectively. This value less than 2 (Noonan and Savage, 1999) indicate that calcium from raw and boiled nopals would have greater bioavailability and less opposite effect of oxalates.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. Introducción

La *Opuntia ficus indica* es una cactácea originaria del continente americano, y en Argentina se encuentra generalmente en el norte del país, ya que requiere de climas áridos y semiáridos (Guzmán Loayza y Chávez, 2007). Es una planta arbustiva que no requiere de muchos cuidados. Presenta numerosos tallos modificados denominados cladodios los cuales son de forma ovoide, aplanados, de color verde pálido a oscuro con o sin espinas dependiendo de la variedad (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011). Estos tallos también son conocidos como “pencas”, “paletas” o simplemente “nopales”. Los nopales, junto con los frutos (tunas) se utilizan para el consumo humano. Las formas de elaboración y consumo son muy diversas. En nuestro país el cultivo y el consumo de nopales es meramente local. Se lo consume cocido en ensaladas, rellenos y licuados. Desde el punto de vista nutricional son una excelente fuente de fibra y minerales. Estudios recientes indican que los nopales podrían ser una fuente importante de calcio (Contreras-Padilla, *et al.*, 2011). La importancia del calcio y su ingesta en la salud humana viene dada por su papel en la prevención de la osteoporosis, además de estar involucrado en múltiples funciones corporales como contracción de músculos y coagulación sanguínea; por lo que es vital cubrir el requerimiento diario, cuyo valor varía según edad y sexo de cada individuo.

Por otra parte, existe desde hace tiempo en el mundo y en nuestro país una tendencia hacia dietas vegetarianas y veganas, lo que llevó a considerar la posibilidad de incluir al nopal también como alternativa o suplemento en la alimentación del hombre y en la preparación de productos alimenticios a base de nopales.

En Argentina no hay demasiados estudios realizados en relación con su composición nutricional ni mineral. Es por ello que en el presente trabajo se evaluó al nopal como eventual fuente de calcio para poder ser incorporado en las dietas, teniendo particular importancia en

aquellas donde no se consumen productos lácteos que son considerados como fuentes de este mineral.

El presente trabajo formó parte de proyectos de investigación sobre nopales y su fruto, la tuna, llevados a cabo en UADE, en articulación con la Estación Experimental Agropecuario INTA Las Breñas, Chaco.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- ❖ Evaluar a los nopales crudos, hervidos y horneados como eventual fuente de calcio.

1.2.2. Objetivos específicos

- ❖ Establecer los métodos de cocción según el consumo de nopales en Argentina.
- ❖ Determinar el contenido de calcio en las diferentes muestras.
- ❖ Determinar el contenido de oxalatos totales, solubles e insolubles, como factores de inhibición de la absorción del calcio.
- ❖ Establecer la relación de oxalatos y calcio como factor de biodisponibilidad.
- ❖ Determinar la composición centesimal de las muestras (humedad, cenizas, grasas y proteínas).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. El nopal

2.1.1. Antecedentes

El interés del ser humano por los nopales data de miles de años. Su origen e historia están íntimamente relacionados con las antiguas civilizaciones mesoamericanas, en particular con la cultura azteca. Existen evidencias arqueológicas que permiten afirmar que fueron las poblaciones indígenas asentadas en las zonas semiáridas de Mesoamérica las que iniciaron su cultivo de modo formal (Pimienta, 1990). La evidencia del conocimiento y uso del nopal por los primeros pobladores mexicanos se encuentra en las excavaciones de Tamaulipas y Tehuacan, Puebla, donde se encontraron fosilizadas semillas y cáscaras de tuna, así como fibras de pencas de nopal, de una antigüedad de siete mil años (Flores-Valdez, 2003). Es muy probable que ya en los muestrarios de plantas y animales llevados a España por Cristóbal Colón se incluyeran nopales y otras cactáceas como muestra de la exótica flora del nuevo mundo (Barbera y Pimienta, 1999; Velázquez, 1998). El nopal tunero fue llevado por los colonizadores a Europa y de ahí fue introducido en diferentes partes del mundo; en la actualidad se lo encuentra de forma silvestre y como cultivo en España, Portugal, Italia, Chile, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Israel, Sudáfrica, Argelia y Jordania, entre otros países.

Sin duda los nopales influyeron en el asentamiento de tribus nómadas que concurrían, en la época de la fructificación, a las zonas pobladas por estas plantas y acababan por fijar ahí su residencia (Bravo-Hollins, 2002). Los antiguos relatos hacen mención a la gran variedad de nopales que se encontraban disponibles así como sus usos. Detallan además, la presencia de un insecto que se alimentaba de los nopales y que produce uno de los hasta el día de hoy más preciados pigmentos colorantes: la grana o cochinilla del carmín.

Actualmente el nopal ha adquirido gran importancia debido al uso integral que se puede hacer de él y por el potencial que ofrece en los diversos ámbitos en que se puede aprovechar, como es la industria alimentaria (humana y animal), la medicina, la cosmetología, manejo biotecnológico, conservación del suelo, entre otros. Es por ello que su utilización es una importante alternativa para la protección y el desarrollo de las zonas áridas y semiáridas que abundan en el mundo y que están ligadas generalmente a la marginalidad y a la pobreza de sus habitantes, así como para toda la humanidad.

2.1.2. Taxonomía

Existen casi 300 especies del género *Opuntia* spp. que se conocen mundialmente. Solamente en México se han registrado 104 especies silvestres y sus variedades, de las cuales 60 son especies mexicanas (Candelario Mondragón y Pérez González , 2003).

Tabla I. Taxonomía del nopal.

Nombre Común	"Nopal"
Nombre científico	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Reino	Vegetal
Subreino	<i>Embryophita</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Dialipetalas</i>
Orden	<i>Opintiales</i>
Familia	<i>Cactaceae</i>
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i>
Tribu	<i>Opuntiae</i>
Género	<i>Opuntia</i>
Subgénero	<i>Platyopuntia</i>

Fuente: (Sáenz, 2006)

En la **Tabla I** se presenta la taxonomía del nopal y en la **Figura 1** se pueden observar las partes de la planta.

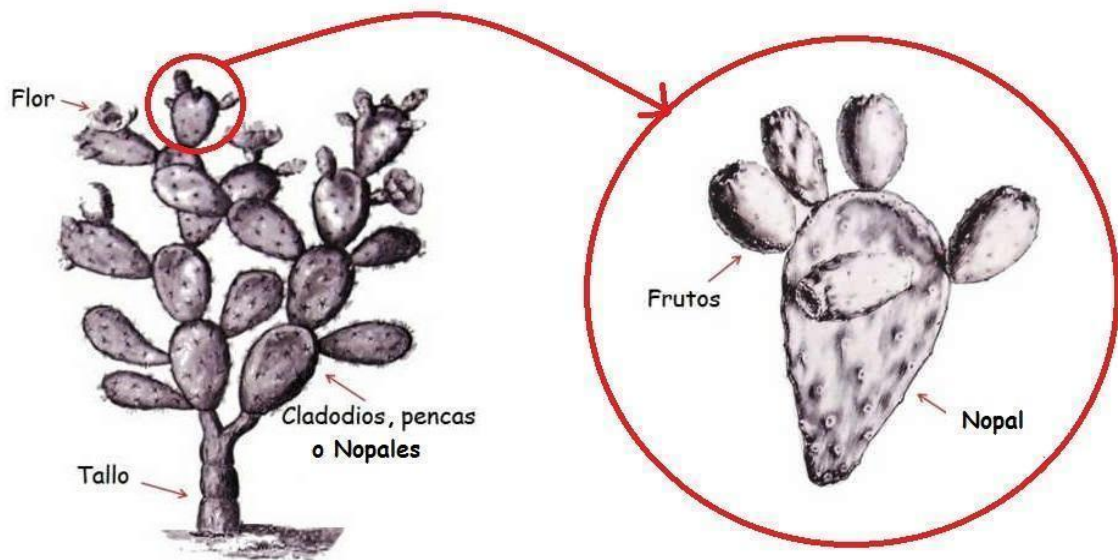


Figura 1. Nombres de las partes de la planta de nopal.

Las características entre las especies son variables. Se diferencian en la forma de los cladodios, la presencia o ausencia de espinas, en el color y tamaño de sus frutos, entre otras características botánicas. La *O. ficus-indica* es la especie más ampliamente cultivada en el mundo. Y sus frutos, por ejemplo, son grandes, dulces y carnosos. Estos pueden dividirse principalmente en cuatro grupos por el color de la cáscara y la pulpa del fruto: cáscara verde-amarilla y pulpa blanca, cáscara amarilla-anaranjada y pulpa naranja, cáscara verde-roja y pulpa roja; y cáscara y pulpa púrpura (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011). Estas características se pueden observar en la **Figura 2**.

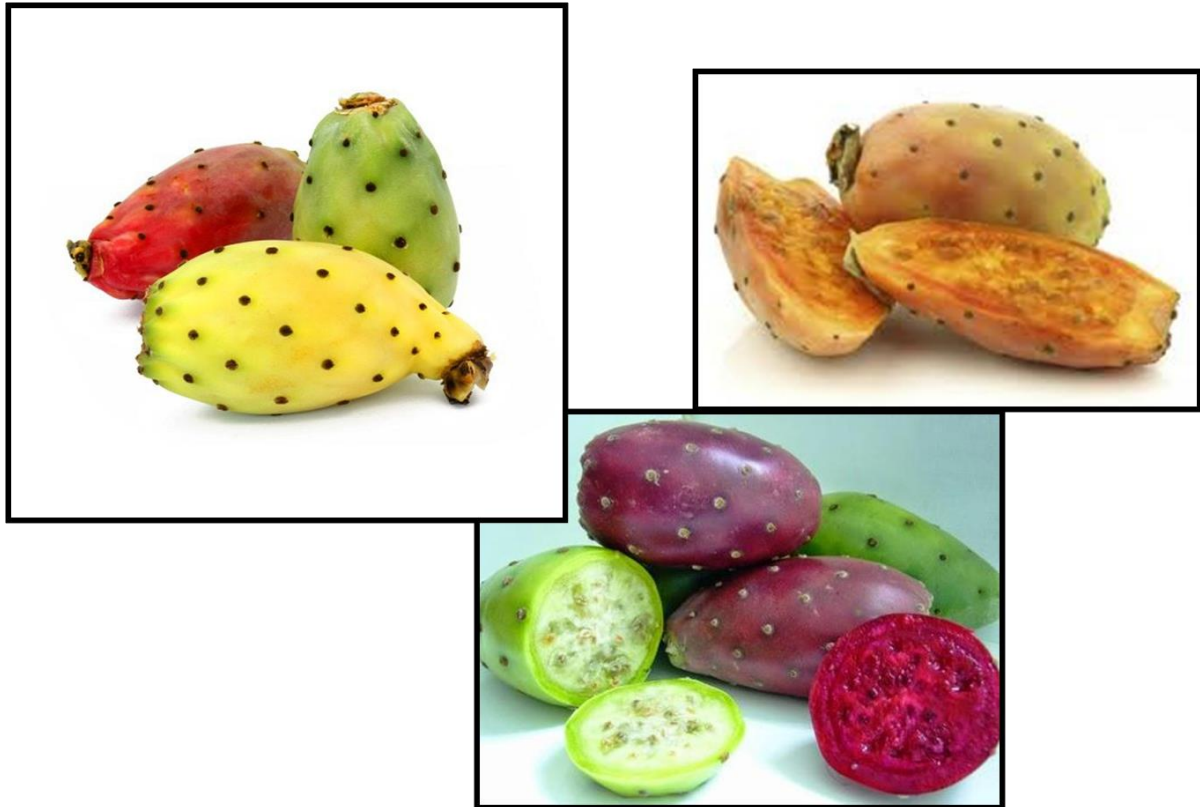


Figura 2. Tipos de frutos de nopal.

2.1.3. Características Botánicas

2.1.3.1. Tallo

La cactácea presenta numerosos tallos modificados, los cladodios o nopales, como se mencionó anteriormente. Son suculentos y articulados de forma ovoide, elíptica u oblonga alcanzando una longitud de 33 - 60 centímetros y 18 - 25 centímetro de ancho (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011).

Los nopales se lignifican con el tiempo y pueden llegar a transformarse en verdaderos tallos leñosos, agrietados, de color ocre blancuzco a grisáceo (Sáenz, 2006). Ver **Figura 3** a continuación.

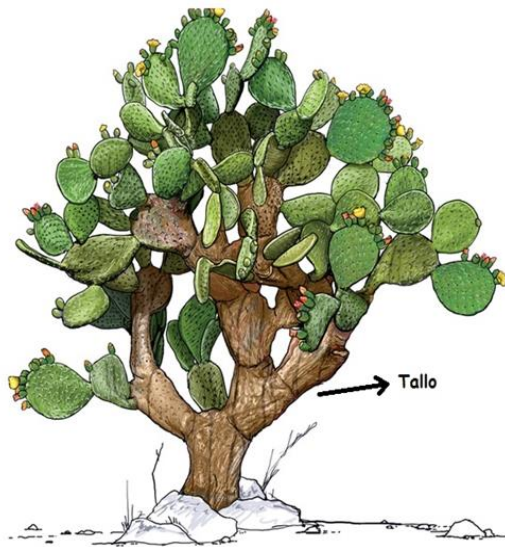


Figura 3. Tallo de la planta de nopal.

2.1.3.2. Cladodios

Los cladodios, denominados en este trabajo como **nopales**, son aplanados, con un espesor de 1,8 - 2,3 centímetros. Sin embargo, cuando miden 10 - 12 centímetros de longitud su grosor es menor, lo que hace que éstos sean más tiernos y puedan ser consumidos como verdura. Su color es verde pálido a oscuro, con o sin espinas dependiendo de la variedad (ver **Figura 4**). Están unidos entre sí formando numerosas ramificaciones posicionándose de tal manera de aprovechar la luminosidad al máximo, por lo que los nopales que crecen en invierno tienen una orientación distinta a los que crecen en verano. Sobre ambas caras del nopal se encuentran las yemas, denominadas aréolas, las cuales según las condiciones ambientales pueden desarrollar nuevos nopales, flores o raíces. En la cavidad de las aréolas se encuentran dos tipos de espinas: unas pequeñas, agrupadas en gran cantidad, y otras grandes que son hojas modificadas (Sáenz, 2006) (ver **Figura 5**). Los nopales más desarrollados tienen entre 52 y 69 aréolas por cada cara, con lo cual se debe tener precaución al momento de la cosecha por los daños que pueden provocar en las personas (lesiones en la piel).



Figura 4. Nopales con y sin espinas.

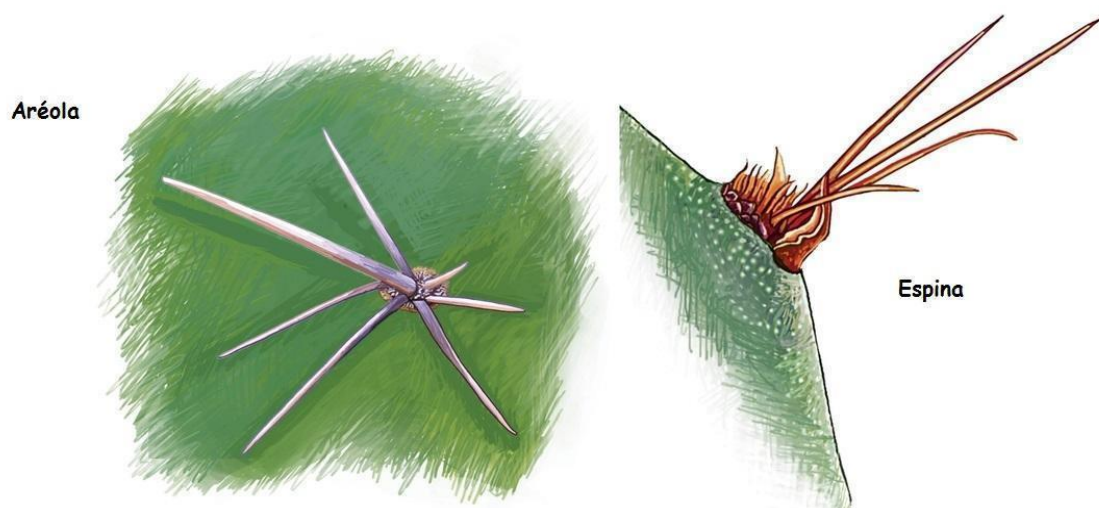


Figura 5. Aréola y espina del nopal.

La epidermis del nopal está cubierta de una gruesa cutícula que lo protege de una amplia variedad de insectos y organismos patógenos, evitando también que la cactácea se deshidrate por las altas temperaturas. Además, al ser de un color blanquecino, permite reflejar gran parte de la radiación evitando el calentamiento excesivo del vegetal. Ésta es una de las razones por las que puede soportar temperaturas de hasta 60 °C (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011).

2.1.3.3. Flores

La flor del nopal es solitaria, hermafrodita, lo que quiere decir que reúne estambre y pistilo en la misma flor; y sésil o sentada, es decir, la flor carece del tallo propio denominado pedicelo o pedúnculo. Se desarrolla normalmente en el borde superior de los nopales. Presentan una longitud de 6 a 7 centímetros y sus pétalos pueden ser de diversos colores: amarillo, anaranjado, rojo, rosa, blanco, entre otros colores (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011) (ver **Figura 6**).



Figura 6. Flores del nopal.

2.1.3.4. Frutos

El fruto es una falsa vaya con ovario ínfero. Esto significa que el receptáculo es cóncavo, alojando al ovario que se suelda con él, y disponiéndose los demás antófilos por encima del ovario. Los antófilos, por definición, son la hoja o pieza floral. Son antófilos los sépalos, los pétalos, los estambres y los carpelos. Se puede observar un ejemplo en la **Figura 7**. Es unilocular, es decir, tiene una sola cavidad; y carnoso, donde la cáscara corresponde a la envoltura del ovario y la pulpa al lóculo desarrollado.

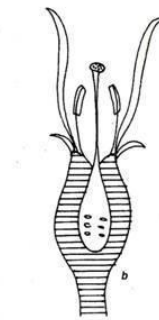


Figura 7. Pieza floral.

La forma y tamaño de los frutos son variables: ovoides, redondos, elípticos y oblongos, con los extremos aplanados, cóncavos o convexos. También los colores son muy diversos, como se mencionó en el ítem **2.1.2**: cáscaras de color rojo, anaranjados, púrpuras, amarillos y verdes, generalmente con pulpas de los mismos colores (ver **Figura 8**). La epidermis de los frutos es parecida a la de los nopales, con aréolas y espinas. El grosor de la cáscara varía según la variedad, al igual que la cantidad de pulpa. Además presenta pequeñas semillas que se consumen junto con la pulpa (CEZA, Centro de Estudios de Zonas Áridas, 2011).

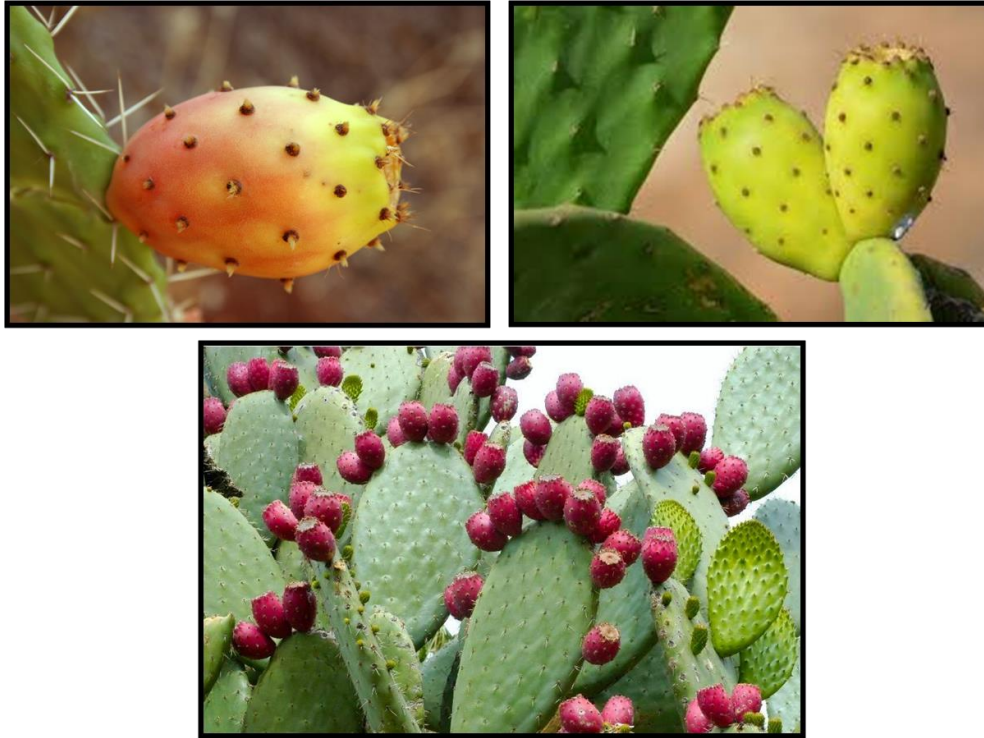


Figura 8. Frutos del nopal.

2.1.3.5. Raíces

Las raíces de los nopales son muy extensas y superficiales. Es un sistema densamente ramificado, rico en raíces finas absorbentes debido a las escasas precipitaciones en la zona en la que se desarrollan. Alcanzan una profundidad cercana a los 80 centímetros, pero se extiende horizontalmente por varios metros (Sudzuki *et al.*, 1993; Sudzuki, 1999; Sáenz, 2006). Si bien su longitud está relacionada con las condiciones hídricas, el manejo cultural en cuanto al riego y la fertilización también influyen en su dimensión.

2.1.4. Requerimientos agroclimáticos

La *Opuntia ficus indica* es un cactus que se adapta a climas extremos y a diferentes factores ambientales determinados por las características del suelo y sus condiciones físicas, químicas y biológicas. El nopal se encuentra en un amplio rango de altitud desde el nivel del

mar hasta 2675 msnm, siendo la ideal entre 800 y 1800 msnm. El rango de temperatura para el crecimiento del nopal es de 6 a 36 °C y la temperatura media anual óptima es de 16 a 28 °C. Sin embargo, dependiendo de la especie y la variedad, se reporta que tiene cierta tolerancia a las heladas (Valdez *et al.*, 2001), soportando temperaturas de - 11 °C (*Opuntia leucotricha* y *Opuntia robusta*).

El nopal se adapta a una amplia variedad de texturas y profundidades de suelo, aunque prospera mejor en suelos calcáreos profundos (al menos 30 cm) con buen drenaje, de textura arenosa a franca, sin problemas de salinidad y con un pH entre 6,8 a 8,2, siendo el óptimo de 7,5.

Es altamente eficiente en el uso del agua. El nopal se adapta a condiciones de precipitación de 200 a 1800 mm, sin embargo cuando la precipitación es muy alta se presentan problemas de enfermedades fungosas y pudriciones bacterianas (De la Rosa y Santana, 1998), el rango de precipitación donde mejor se comporta el nopal es de 200 a 850 mm (López-García *et al.*, 2001; Martínez y Lara, 2003) y la precipitación óptima está alrededor de los 400 mm (Granados y Castañeda, 1996).

2.1.5. Manejo del proceso de cosecha y post cosecha

2.1.5.1. Cosecha

La cosecha de los nopales se realiza en forma completamente manual o auxiliada con cuchillo. Se realiza únicamente con las manos, las que se deben proteger de las espinas con guantes de cuero o de tela gruesa en caso que las haya. La operación en general resulta muy sencilla: en cuanto a la cosecha en forma totalmente manual, el cosechador en una de sus manos sostiene y junta los nopales que va cortando con la otra y luego los deposita en un canasto, lo que generalmente ocurre después de haber recorrido una hilera. Para efectuar el desprendimiento, el cosechador toma al nopal de su parte inferior y le da un giro de más de 90 grados hasta separarlo del nopal madre. Si esta operación no se realiza con el debido cuidado, los tejidos se pueden desgarrar y quedar porciones de nopal en el nopal madre, lo cual

representa un peligro de infección potencial de algunos patógenos (ver **Figura 9**).



Figura 9. Cosecha manual de nopales.

Por otro lado, para la cosecha auxiliada con cuchillo, el cosechador sostiene al nopal con una mano y con la otra realiza el corte con el cuchillo a nivel de la base, logrando así una separación más uniforme y limpia, ya que ni el nopal ni el nopal madre se rasgan ni lesionan (ver **Figura 10**). En este caso los nopales también se van acomodando en canastos (ver **Figura 11**).



Figura 10. Cosecha manual de nopales auxiliada con cuchillo.



Figura 11. Nopales cosechados en canastas.

En general es aconsejable que los nopales ya cortados se protejan inmediatamente del sol, colocándolos bajo cualquier sombra, con lo que se evita su calentamiento, aumentando su

potencial de vida de almacenamiento y de comercialización. En cuanto a la hora del corte, se debe tener presente que el nopal presenta el metabolismo ácido de las crasuláceas, por lo que su acidez varía durante el día y la noche. Rodríguez y Cantwell (1988) encontraron que la acidez del nopal (*O. ficus-indica*) fluctuó desde 0,52 % a las 9 horas hasta 0,1 % a las 15 horas. Habrá que continuar estudiando éste y otros factores de manejo que afectan la calidad, el sabor y el grado de perecibilidad del nopal. El índice de cosecha más empleado para el nopal es el tamaño, el cual se corta cuando presenta una longitud de 14 a 20 cm; se debe tener en cuenta que entre más tiempo se dejen crecer, los nopales se tornan fibrosos, debido a la producción de lignina en los tejidos (como se mencionó en el punto **2.1.3.1**), causando que el producto pierda uno de sus principales atributos de calidad, que es su terneza (condición de fresca).

2.1.5.2. Post Cosecha

Los brotes tiernos del nopal son de alta actividad metabólica y de rápido crecimiento; al cosecharlos se vuelven productos altamente perecederos y presentan un proceso de deterioro acelerado e irreversible que merma su calidad y culmina con la muerte de los mismos. En este deterioro intervienen tanto factores biológicos (respiración, etileno, cambios composicionales de acidez y formación de lignina, lesiones y enfermedades patológicas y fisiológicas) como ambientales (temperatura, humedad relativa, composición atmosférica circundante al producto, etileno exógeno, otros compuestos químicos y la luz); factores que interactúan entre sí provocando efectos que algunas veces resultan desastrosos porque acaban con la calidad del producto en un lapso de tiempo muy corto. Los nopales a temperatura ambiente mantienen una calidad aceptable por no más de tres días (Corrales, 1994). De la producción se perdería cerca del 50 % debido al oscurecimiento enzimático y la pudrición microbiana. Para alargar la vida de almacenamiento se recomienda la inmersión de los nopales durante 5 minutos en una solución de ácido cítrico al 6% y de sulfito de sodio al 0,02% con el propósito de inactivar la enzima polifenoloxidasas. Después son lavados, secados y empacados en bolsas de polietileno. Con este tratamiento se logra una vida de almacenamiento de 14 días a temperatura ambiente (26 °C) y de hasta 32 días a temperatura

de refrigeración (4 °C).

2.1.6. Composición química del nopal

Los nopales están constituidos mayormente por agua, siendo también de interés su contenido mineral y fibra dietaria. La composición química varía dependiendo del estadio de maduración y del ambiente que rodea a la planta. En la **Tabla II** se observan las variaciones de la composición de los nopales de distintas edades.

Flores *et al.* (1995) en un estudio efectuado en 20 variedades de nopal, y analizando tallos (suberificados), nopales maduros (penca anual) y nopales jóvenes (brotes), concluyeron al igual que Pimienta (1990), que el contenido de proteínas es mayor en los brotes; la fibra cruda aumenta con la edad del nopal, llegando a 16,1 por ciento en los tallos suberificados, pero siendo cercana a 8,0 por ciento, en promedio, en los nopales jóvenes este hecho también se observó en un estudio realizado por Tegegne (2002) en Etiopía. El contenido de cenizas no sigue la misma tendencia, ya que en este último trabajo, los brotes presentan un contenido mayor de cenizas que en los tallos y nopales (21,0 por ciento contra 13,2 en nopales de dos años de edad y 14,4 en tallos suberificados), dicha variación podría ser consecuencia de la relación existente entre los compuestos que conforman la ceniza y la relación de éstos con la química del suelo y los complejos fenómenos de la disponibilidad de sus elementos para la planta.

Tabla II. Composición química de los nopales de diferentes edades (Sáenz, 2006)

Edad (años)	Descripción	Proteína	Grasa	Cenizas	Fibra cruda	Extracto no nitrogenado
0,5	Brotes	9,4	1,00	21,0	8,0	60,6
1	Nopal	5,4	1,29	18,2	12,0	63,1
2	Nopal	4,2	1,40	13,2	14,5	66,7
3	Nopal	3,7	1,33	14,2	17,0	63,7
4	Tallos suberificados	2,5	1,67	14,4	17,5	63,9

En otro trabajo, Rodríguez-Félix y Cantwell (1988) indican que la composición química de los nopales frescos es principalmente agua (91 por ciento) y 1,5 por ciento de

proteínas; 0,2 por ciento de lípidos; 4,5 por ciento de hidratos de carbono totales; 1,3 por ciento de cenizas, de la cual el 90 por ciento es calcio; además, contiene 11 mg/100 g de vitamina C y 30 µg/100 g de carotenoides; el contenido de fibra (1,1 por ciento) la hace comparable a la espinaca.

Por otro lado de acuerdo a investigaciones realizadas (Cárdenas *et al.*, 1999 y Vargas-Rodríguez *et al.*, 2015) indicaron que el mucílago que contienen los cladodios de *O. ficus-indica* es un arabinogalactano ramificado, que presenta una fracción sin carga (55%), compuesta por residuos de arabinosa (42,5%), galactosa (29%), glucosa (2,5%) y xilosa (26%).

2.1.7. Propiedades nutricionales y beneficios sobre la salud

Las principales razones por las cuales se promueve el consumo de los nopales estriban en sus cualidades nutricionales y medicinales. Se considera a la *Opuntia ficus indica* como un alimento que tiene alto valor nutricional, principalmente por su contenido en minerales, proteínas, fibra dietaria y fitoquímicos (Feungang *et al.*, 2006; Bensadón *et al.*, 2010). Forman, por ejemplo, parte de la dieta común del pueblo mexicano y están siendo ampliamente consumidos en el sur de Estados Unidos por la población mexicana allí residente.

Como se mencionó anteriormente, el nopal es una fuente rica en fibras, componentes resistentes a las enzimas digestivas. Según su solubilidad en agua, la fibra se clasifica en soluble e insoluble; la primera la conforman mucílago, gomas, pectinas y hemicelulosas, y la insoluble es principalmente celulosa, lignina y una gran fracción de hemicelulosa (Atalah y Pak, 1997). Su contenido de fibra dietaria es comparable al de varias frutas y hortalizas, entre ellas la espinaca, la alcachofa, la acelga, la berenjena, el brócoli, el rábano y otras. Entre las frutas, es similar al mango, el melón, al damasco y a la uva (Sáenz, 2006).

Estas fibras son responsables de muchos de los beneficios del nopal para la salud (Sáenz, 2006, Uebelhack *et al.*, 2014). Las diferentes fracciones de fibra tienen efectos fisiológicos distintos: la fibra soluble se asocia con la reducción de los niveles de glucosa y de

colesterol y la estabilización del vaciamiento gástrico, y la fibra insoluble con la capacidad de retención de agua (aumento del peso de las heces), el intercambio iónico, la absorción de ácidos biliares, minerales, vitaminas y otros y su interacción con la flora microbiana (Sáenz, 2006).

El nopal también es buena fuente de vitaminas A, B1, B2, B3, C y minerales. Entre éstos últimos son de importancia el calcio y el potasio (93 y 166 mg/ 100 g, respectivamente), y tienen bajo contenido de sodio (2 mg/100 g) lo que es una ventaja para la salud humana.

En años recientes, debido al alto contenido de calcio que posee el nopal se le ha considerado como una fuente alterna de este mineral, el cual puede ayudar a reducir y prevenir la pérdida de la densidad mineral ósea de acuerdo con lo estudiado por Rodríguez-García *et al.* (2007). McConn y Nakata (2004) en un estudio efectuado en nopales señalan, sin embargo, que el calcio presente no estaría disponible para la utilización por el cuerpo humano, ya que se encuentra bajo forma de cristales de oxalato de calcio. Contiene, además, cantidades moderadas de carotenoides (30 µg/100 g) y de vitamina C (11 mg/ 100 g) (Rodríguez-Félix y Cantwell, 1988).

2.1.8. Usos del nopal

El nopal es una planta que tiene un alto potencial agro tecnológico, tanto como cultivo alimenticio o como elemento base para productos derivados que se utilizan en la industria alimenticia (humana y animal), la farmacología, la medicina y la industria agropecuaria, por mencionar algunos (Aguilar *et al.*, 2008).

2.1.8.1. Aplicaciones en alimentos

Los nopales tiernos de la *Opuntia* pueden consumirse directamente como verdura en fresco, procesado en salmuera y/o escabeche, preparados con salsas y ajíes para rotiserías, hoteles, restaurantes, etc. También pueden utilizarse en la preparación de yogurt, sopas, salsas, ensaladas, jugos concentrados.

A nivel industria alimentaria, tomando en cuenta el grado de madurez del nopal, se pueden desarrollar aplicaciones como aditivos naturales a partir del mucílago del nopal, ya que se obtienen espesantes, reemplazantes de grasas, estabilizadores de emulsiones, películas comestibles y recubrimientos para alargar la vida de almacenamiento y mejorar la calidad de alimentos frescos, congelados y procesados (Aguirre-Cárdenas *et al.*, 2011).

Debido a la corta vida de anaquel del nopal fresco se han desarrollado también algunas estrategias de preservación de los componentes del mismo, siendo el de mayor aplicación el nopal deshidratado en polvo (Contreras- Padilla *et al.*, 2012). El producto se prepara después de la selección, cortado, deshidratación y molienda de los nopales, resultando un polvo fino de color verde claro, bajo en humedad y listo para su consumo, con una mayor vida en anaquel. Así se facilita su manejo y conservación las propiedades funcionales de interés.



Figura 12. Harina de nopal.



Figura 13. Alimentos procesados a base de nopal.



Figura 14. Recetas con nopal.

2.1.8.2. Aplicaciones en nutrición animal

El uso de *Opuntia* spp. como forraje de ganado se ha extendido en países como México, Brasil, Túnez, Sudáfrica, Algeria, Marruecos, Líbano entre otros. Se estima que hay alrededor de 900.000 hectáreas cultivadas.

Este uso de la planta se debe a su eficacia al convertir el agua en materia seca, es decir, en energía digerible para el ganado.

La mayor parte de los estudios aplicados a forraje se han realizado con *O. ficus-indica*, donde se reportan productividades de hasta 50 toneladas anuales de materia seca por hectárea (Torres-Ponce *et al.*, 2015).

En la producción de forraje se considera el uso total de cladodios, por lo que es importante tener capacidad para producir gran cantidad de ellos, con la posibilidad de recuperación por la poda. Estas características están determinadas principalmente por el genotipo de la planta. Dado que la producción de forraje involucra el uso total o parcial de la estructura vegetativa, la capacidad de producir nuevos cladodios y de recuperarse rápidamente después de la poda, son características de mayor importancia en los programas de mejoramiento.

Las proporciones de los nutrientes en base seca, cambian con las especies, el cultivo, condiciones ambientales, suelo y técnicas de cultivo, entre otras variables. Los rangos de materia seca se encuentran entre 10-14 %, la proteína bruta entre 2,5 a 9,4 %; la fibra entre 8 a 17,5 %, los carbohidratos totales entre 75-87 %, de carbohidratos no fibrosos entre 50-61 % y materia mineral entre 6-18 % (Cavalcante *et al.*, 2007). Cabe resaltar que el contenido de agua oscila entre 84 a 93 % (López-García *et al.*, 2001), por lo que el consumo del alimento en fresco puede aportar hasta 35 % de la demanda de agua del ganado bovino en condiciones que no sean de sequía extrema. En nuestro país, en el INTA Las Breñas de Chaco, se están llevando a cabo trabajos para evaluar el consumo de agua en cabras utilizando las pencas del nopal en época invernal (Faggi y Petkoff Bankoff, 2012).

Por otro lado, el nopal presenta otros compuestos químicos que pueden ser benéficos en la salud de los animales alimentados con el mismo. Entre ellas se encuentran las pectinas. El nopal es rico en sustancias pécticas las cuales presentan un efecto hipocolesterolémico

(Ben- Salem *et al.*, 1996).

Para alimentación animal, los nopales presentan altos contenidos de carbohidratos solubles, calcio y beta-caroteno, a pesar de eso se considera como una fuente de alimento que no se encuentra balanceada por lo que debe de enriquecerse, sobre todo para la preparación de concentrados (Oliveira, 2001; Araujo *et al.*, 2005). La proteína cruda oscila entre los 25-60 g/kg de materia seca. Aunque es posible encontrar contenidos mayores en el material con espinas. La fertilización basada en la aplicación de compuestos nitrogenados puede ser una alternativa para aumentar el contenido de proteína cruda. González (1989) reportó que el contenido de proteína cruda en el cactus fertilizado fue cerca del doble. Sin embargo, el contenido de proteína en el alimento es un factor clave para la digestión de los rumiantes. Parte del nitrógeno consumido se transforma en amonio en el rumen, que es utilizado por la microbiota para producir proteínas microbianas. Del mismo modo, es importante también la absorción de proteínas de calidad en la dieta, de tal forma que sea posible que los aminoácidos se absorban en el intestino delgado y el animal tenga un mayor rendimiento (Oliveria, 2001). Por lo tanto es necesario encontrar formas de enriquecer el alimento en proteína de calidad.

2.1.8.3. Aplicaciones farmacéuticas

El incremento en la incidencia de enfermedades crónicas como la diabetes es un problema actual. Se han desarrollado y estudiado tratamientos alternativos para ayudar a disminuir los niveles de glucosa en sangre y entre estos tratamientos se puede mencionar el uso de plantas medicinales con efecto hipoglucemiante. El nopal se utiliza para el control de la glucosa, ya que tiene un alto contenido de fibra soluble y pectinas, que pueden afectar favorablemente la absorción de glucosa a nivel intestinal, por lo cual se la considera hipoglucemiante. Un estudio realizado a pacientes diabéticos y vendedores herbolarios de México, confirmaron que la planta *Opuntia* spp, es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente. Se utilizan los cladodios jóvenes a los cuales se les ha retirado las espinas; éstos son posteriormente lavados y cortados, para finalmente licuarlos con agua y consumirlos antes del desayuno. El resultado es una disminución de los niveles de glucosa postprandial (Andrade- Cetto y Wiedenfeld, 2011).

En años recientes se comenzó a comercializar la fibra deshidratada de nopal para complementar los tratamientos en trastornos digestivos. La pulpa deshidratada del nopal constituye un material fibroso, cuya función medicinal se basa, como cualquier otra fibra natural, en favorecer el proceso digestivo, reduciendo el riesgo de problemas gastrointestinales y ayudando en los tratamientos contra la obesidad. Adicionalmente, la fibra disminuye el nivel de lipoproteínas de baja densidad, y disminuye el colesterol en la sangre al interferir en la absorción de grasas que realizan los intestinos (Bensadón *et al.*, 2010).

Los nopales también son utilizados en la medicina naturista como cataplasmas para golpes, contusiones, hinchazones, quemaduras, analgésico, diurético, descongestionante y antiespasmódico.



Figura 15. Cápsulas de nopal.

2.1.8.4. Aplicaciones industriales

En la industria, es usado como anticorrosivo. En Marruecos, Hammouch *et al.* (2004) informan que la utilización de un extracto acuoso obtenido de los cladodios demostró ser exitoso para evitar la corrosión del hierro. Por su parte Torres-Acosta *et al.* (2005) en estudios preliminares, encontraron que la adición de mucílago de cladodios al concreto evitaba la corrosión de barras acero inmersas en el mismo. Torres-Acosta *et al.* (2004) también

analizaron la adición de mezclas de nopal y Aloe vera en el concreto, como un modo de aumentar las propiedades anticorrosivas al entrar en contacto con el acero.

2.1.8.5. Usos alternativos

2.1.8.5.1 Cercos

Las especies espinosas de tuna se utilizan como cercos para limitar huertos familiares.



Figura 16. Cerco de Opuntia Ficus Indica en El Salvador.

2.1.8.5.2. Adhesivos

En México hay una larga historia del uso del mucílago del nopal en combinación con cal $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, que tradicionalmente se usaba de modo similar al yeso en paredes de adobe y ladrillo. Cárdenas *et al.* (1999) han señalado que desde hace muchos siglos se agrega jugo de nopal como adhesivo orgánico a la cal. En un estudio hecho por estos autores, se probó la adición de jugo de nopal (extraído de pencas hervidas) a la cal en proporciones diferentes (0,65, 1,0 y 1,95 por ciento); la resistencia de las pastas secas fue evaluada por una prueba penetración-ruptura con un texturómetro. A medida que la concentración de jugo de nopal

umentaba, se produjo una reducción drástica del estrés máximo y de la tasa de deformación, comparando con un testigo sin jugo de nopal. Al aumentar la proporción del jugo de nopal se observó que también aumentaban las propiedades mecánicas debido a la formación de una red homogénea en la que el mucílago de nopal interpenetraba en el hidróxido de calcio sin modificación de la estructura confiriendo una mayor resistencia a la compresión. Además Torres-Acosta *et al.* (2004) en otro estudio afirman que la adición de mucílago de nopal a mezclas de cementos refuerza la durabilidad de estos materiales.

Hernández y Serrano (2003), en un estudio sobre adición de mucílago de nopal liofilizado a morteros ampliamente usados en la construcción, observaron que la adición de 0,5 g de mucílago liofilizado mejoraba las características mecánicas de la mezcla, con una mejor resistencia a la compresión que los controles sin mucílago de nopal.

2.1.8.5.3. Pinturas e impermeabilizantes

A partir del mucílago de la tuna se fabrican pinturas impermeabilizantes, que pueden ser aplicados en cualquier construcción con tierra, cemento u otros materiales, para protegerla. La protección de la construcción se da contra el frío, la humedad del ambiente, del agua, de los insectos y otros.

2.1.8.5.4. Combustible

El tronco y las pencas secas pueden utilizar como combustible en zonas desérticas. Las paletas de los nopales tienen una gran cantidad de lignina, son leñosas, y se pueden usar como leña, en zonas donde no hay electricidad ni petróleo ni energía comercial.

2.1.8.5.5. Producto ecológico

La siembra de grandes superficies de nopales permitiría la recuperación y regeneración del suelo, la preservación de biodiversidad de zonas desérticas y semidesérticas,

en donde habitan víboras, zorrillos, conejos, liebres y una gran diversidad de aves, como halcones, águilas, búhos, entre otros.

Es una alternativa para contrarrestar cambios climáticos globales y desertificación. Otros beneficios provenientes de *Opuntia* son la conservación del suelo y el agua, así como la protección de la fauna local en zonas áridas y semiáridas

Debido a que crece en tierras severamente degradadas, su uso es importante en áreas donde muy pocos cultivos pueden adaptarse.

2.1.8.5.6. Paisajismo y control de contaminación

El cultivo del nopal frena la desertificación e impide la erosión del suelo, pero además consume CO₂ por las noches en grandes cantidades, por lo que disminuye significativamente la contaminación del aire. Por ello debe recomendarse la plantación de esta especie en los parques y jardines de las ciudades.

En un estudio efectuado en Cuba, López (2000), comparó la capacidad clarificante del mucílago, con otros agentes tradicionales como el sulfato de aluminio [Al₂(SO₄)₃]. El autor informó que el mucílago de *Opuntia ficus-indica* y de *O. stricta var. dillenii* tienen una conducta similar al sulfato de aluminio para clarificar agua. Las dosis mejores eran cerca de 0,8 ml/l en agua con turbidez media y alta. Algunos de los parámetros utilizados en la comparación para determinar el poder del clarificante fueron turbidez (NTU) y el índice de Willcombs que refleja la calidad del proceso de coagulación-floculación. El mucílago también redujo la demanda química de oxígeno (DQO) y removió metales pesados (Fe, Al, Mn) y coliformes fecales. Después del tratamiento, el agua no presentó ningún olor desagradable

2.1.8.5.7. Materia prima de cosméticos

La industria cosmética es una industria muy competitiva y compleja. Las grandes variedades de productos que fabrica también utilizan el nopal como materia prima. Entre dichos productos se encuentran jabones, champúes, cremas de diversos tipos, lociones, gel

para el cabello, gel reductor, mascarilla estimulante y limpiadora, entre otros.

Las empresas elaboradoras de productos cosméticos a base de nopal se encuentran mayoritariamente en México.



Figura 17. Productos cosméticos a base de nopal.

2.2. El calcio

2.2.1. Función

El calcio es el catión más abundante del organismo. En el organismo humano el contenido total de calcio es de 20-25 g/kg de tejido magro, es decir un total de aproximadamente 1-1,2 kg. Casi todo ese calcio se halla formando parte del esqueleto (99%), mientras que el resto se distribuye entre los músculos (0,3%) y otros tejidos (0,7%). En el líquido extracelular se encuentra el 0,01%. El calcio en sangre circula de tres formas:

- 1) libre (calcio iónico): 45-48%;
- 2) unido a proteínas: 40-45%;
- 3) en forma de sales (citrato y fosfato de calcio): 7-12%.

El calcio, por ser un nutriente que desempeña diversos papeles biológicos, es esencial para procesos tales como: transmisión de impulsos nerviosos, vasodilatación, reacciones enzimáticas y de diversas hormonas, contracción muscular, adherencia de la célula y permeabilidad de las membranas, mitosis, coagulación de la sangre, secreción glandular y estructura del esqueleto, entre otros (ver **Figura 18**) (Miller y Anderson, 1999, Cashman, 2002). Actúa también como segundo mensajero en procesos transmembrana citoplasmática (Guéguen y Pointillart, 2000).



Figura 18. Funciones del calcio.

2.2.2. Requerimientos

Las recomendaciones de ingesta de calcio y vitamina D (vitamina necesaria para asimilar el calcio) han sido revisadas y modificadas en el año 2010 por el Instituto de Medicina de Estados Unidos (IOM). Dicha revisión concluyó que el calcio y la vitamina D son críticos para la salud ósea. Las recomendaciones actuales de calcio son superiores a las establecidas en el documento anterior del año 1997 para algunos grupos poblacionales. La mayor preocupación actual en relación con las recomendaciones de calcio es cómo lograr una ingesta adecuada. Las recomendaciones de ingesta diaria de calcio pueden observarse en la **Tabla III**.

Hacia finales del siglo XX se ha podido determinar a través de estudios de densitometría ósea el contenido total corporal de calcio y reconocer que la máxima densidad mineral del hueso se alcanza entre los 20 y 30 años. De ese modo, cobró importancia el concepto de que una ingesta adecuada de calcio durante el crecimiento permite asegurar el desarrollo del potencial genético hacia la tercera década de la vida, que se traduce en una reducción del riesgo de osteoporosis y fracturas en la adultez.

Tabla III. Recomendaciones de ingesta diaria de Calcio.

Grupos de Edad	IDR (mg)
Niños de 0 a 6 meses	210
Niños de 7 a 12 meses	270
Niños de 1 a 4 meses	500
Niños de 4 a 8 meses	800
Niños de 9 a 18 meses	1300
Adultos de 19 a 50 años	1000
Adultos de 51 a 70 años	1200
Adultos mayores de 70 años	1200
Embarazo y lactancia < 18	1300 – 1000
Embarazo 19 a 50 años	1000

Fuente: Bourgues H, *et al.* (2005)

2.2.3. Biodisponibilidad

No todo el calcio que llega al intestino se absorbe. Como regla general, puede decirse que la absorción de calcio es inversamente proporcional a la ingesta. El ser humano absorbe entre el 20 - 30% del calcio de los alimentos. La absorción aumenta cuando el calcio es soluble y disminuye cuando éste se une a otras sustancias o forma sales

insolubles (Weaver *et al.* 2006).

Según el alimento, la absorción del calcio es diferente. En vegetales tales como la espinaca y algunas legumbres, la presencia de oxalatos y fitatos reducen la absorción de calcio secuestrándolo para formar complejos que no son asimilables en el intestino. En cambio, el calcio que se obtiene de los vegetales de la familia de las coles (*Brassica oleracea*) es más asimilable debido a la ausencia de oxalatos.

La absorción del calcio en los lácteos es elevada y se debe a la importancia de los componentes de la leche, dentro de los que se incluye la lactosa, las grasas lácteas y las proteínas, ya que todos ellos contribuyen a mejorar la absorción de calcio facilitando su solubilidad.

Otros componentes de los alimentos también influyen en el balance del calcio, como por ejemplo, altas ingestas de sodio aumentan la excreción urinaria de calcio, efecto parcialmente reversible por el agregado de potasio (Sellmeyer *et al.* 2008).

A continuación, en el ítem **2.2.3.1.**, se hablará de los factores que favorecen la disponibilidad del calcio.

2.2.3.1. Absorción

La ingesta de calcio es la única vía a través de la cual los humanos obtienen este catión y varía con el género, la edad y el estado metabólico. La absorción de calcio en el intestino es favorecida por factores como la vitamina D, el fósforo, niveles elevados de estrógenos y en el embarazo, mientras que factores como la ingesta de fibra, proteínas (cuando se sobrepasa la Ingesta Diaria Recomendada), oxalatos y fitatos, se asocian con una disminución en la absorción intestinal de calcio. La captación de calcio depende de su solubilidad en la pared del intestino y de la capacidad de absorción intestinal. A su vez, ésta depende tanto de factores endógenos, como la secreción de ácido gástrico, como de factores exógenos, tales como la vitamina D (ver ítem **2.2.3.1.1.**) y el fósforo (ver ítem **2.2.3.1.2.**), siendo la vitamina D uno de los factores claves para este proceso.

La absorción de calcio en el tracto gastrointestinal ocurre a través de dos mecanismos principales, en particular un mecanismo transcelular (activo, dependiente de vitamina D,

saturable) y el mecanismo paracelular (pasivo, independiente de vitamina D y no saturable). Mientras la absorción transcelular ocurre principalmente en el duodeno, la paracelular ocurre a lo largo de todo el intestino. La contribución relativa de ambos mecanismos está determinada por la concentración de calcio libre disponible para ser absorbido. La absorción del tipo transcelular ocurre cuando la ingesta de calcio es baja y la paracelular cuando el calcio adquirido en la dieta es mayor. (Emkey y Emkey, 2012)

En la **Figura 19** se puede observar cómo es absorbido el calcio a través del epitelio intestinal por medio de los dos mecanismos de transporte mencionados anteriormente. El primero, transcelular, activo, controlado metabólicamente por la vitamina D y el segundo, paracelular, pasivo, a través de las uniones herméticas entre las células e impulsado tan sólo por el gradiente electroquímico de Ca^{2+} .

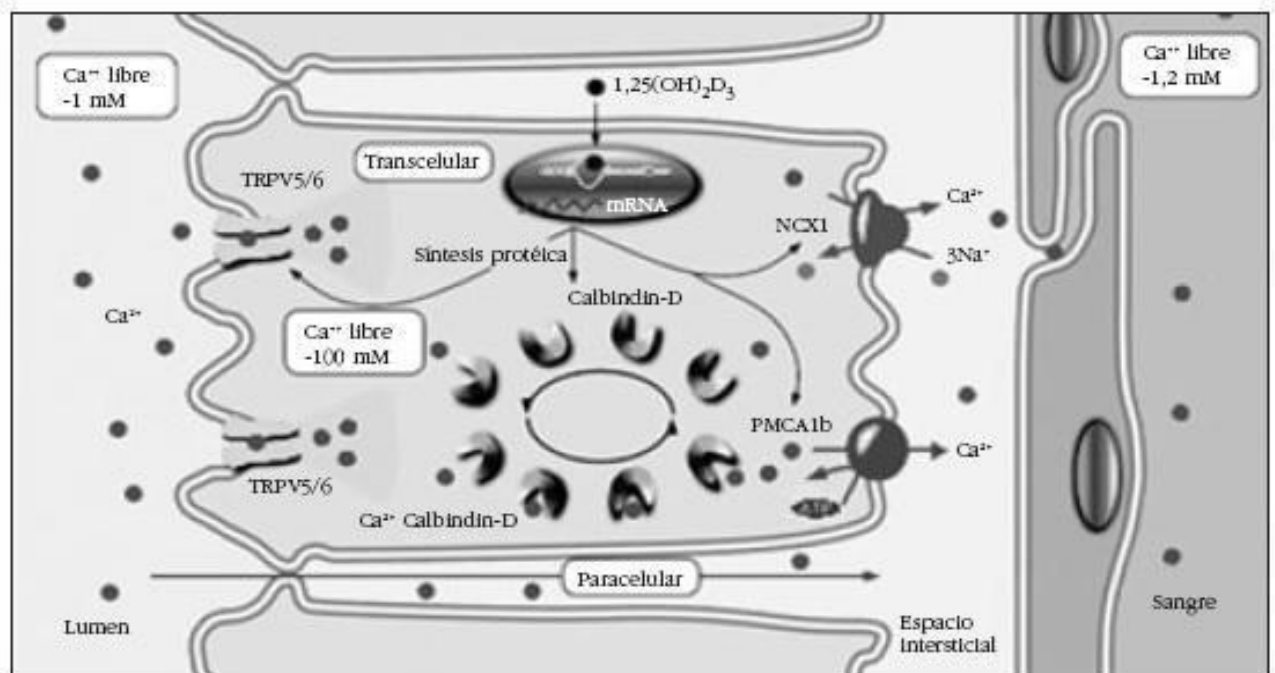


Figura 19. Mecanismo de absorción del calcio.

2.2.3.1.1. Vitamina D

La vitamina D se sintetiza en el organismo por la exposición al sol en más de un 90 %

y algo menos de un 10 % mediante dieta normal o con suplementos. Ésta contribuye de manera fundamental a la absorción intestinal del calcio (Quesada Gómez y Sosa Henríquez, 2010) y existe en dos formas: D₃, es producida en la piel cuando está en exposición a la radiación ultravioleta, y D₂, que es obtenida solamente de los nutrientes (Acikgoz, *et al.*, 2013). Los requerimientos se estiman en 800-100 UI (Unidad Internacional). Su metabolismo puede observarse en la **Figura 20**.

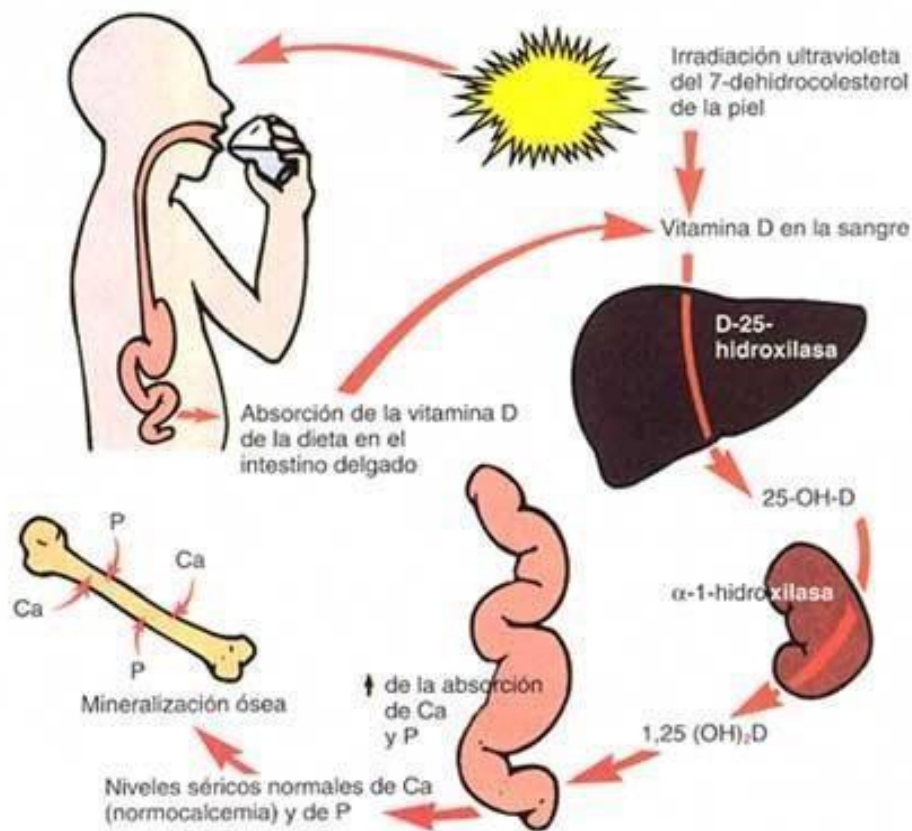


Figura 20. Metabolismo normal de la vitamina D.

2.2.3.1.2. Fósforo

El fósforo, junto con el calcio, constituye la base de los huesos y existe una estrecha coordinación en la regulación de ambos minerales. El fósforo es habitualmente abundante en la dieta y su absorción en el intestino en general no tiene limitaciones; a diferencia del calcio

que se encuentra mucho más limitado (Peacock, 2010). Este ión cumple funciones como regulación de enzimas, integridad funcional de las células y procesos orgánicos, interviene en el aporte de oxígeno a los tejidos, buffer en orina y plasma e interviene en procesos de almacenamiento de energía. Dada la participación del fósforo en tantos procesos biológicos, niveles bajos en la sangre o bien pérdidas del mineral pueden causar enfermedades serias, aunque la deficiencia es poco común dado que está ampliamente disponible en la dieta. La concentración de fósforo en la sangre está determinada por un equilibrio entre la absorción del fósforo de la dieta en el intestino, el almacenamiento en los huesos, y la eliminación a través de la orina. La regulación más importante de los niveles de fósforo en la sangre ocurre a nivel renal (eliminación por la orina), controlada por la hormona paratiroidea (PTH) (Cifuentes, 2011). Cuando la coordinación en la regulación del calcio y fósforo se ve alterada, puede haber consecuencias importantes para la salud.

2.2.3.2. Excreción

La mayor excreción de todos los minerales es por las heces, donde se encuentran todos los minerales no absorbidos (fracción alimentaria). Como se mencionó en el ítem **2.2.3.** no se absorbe el 100 % del calcio ingerido; en condiciones normales se absorbe el 20 – 30% de la ingesta. Al calcio no absorbido, se le suma el calcio secretado por los jugos digestivos que va hacia el tracto gastrointestinal para constituir lo que se conoce como excreción fecal. Por otra parte, el calcio restante es filtrado por el riñón, en el cual se reabsorbe el 90% (ver **Figura 21**).

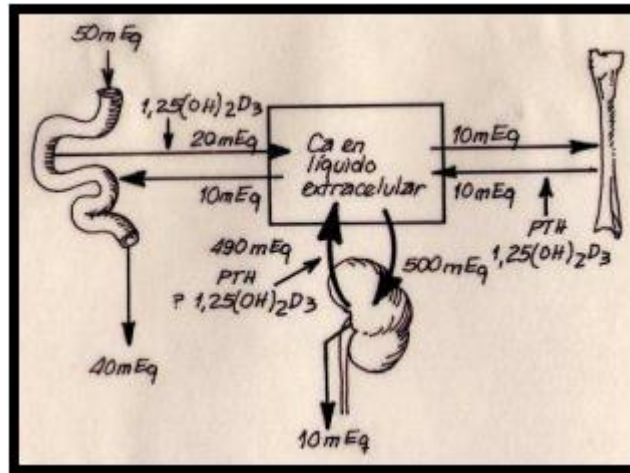


Figura 21. Balance de Calcio.

La excreción urinaria del calcio es el resultado de la cantidad filtrada y la cantidad reabsorbida. La capacidad renal para eliminar calcio es limitada, por lo que en condiciones de reabsorción ósea incrementada o mayor absorción intestinal puede sobrepasarse esta función y originarse hipercalcemia; de manera similar, en la hipocalcemia, la capacidad de disminuir la excreción de calcio se encuentra más limitada.

2.2.3.3. Oxalatos

Como se mencionó antes (ítem 2.1.7.) los oxalatos se encuentran en el tejido de numerosos vegetales e influyen en la absorción del calcio. Son producto del metabolismo natural de las plantas el cual genera como producto final ácido oxálico y sus sales (ver **Figura 22**). Por este motivo, es de especial interés conocer su contenido ya que al ingerir ciertos vegetales estos pueden provocar efectos adversos en la salud.

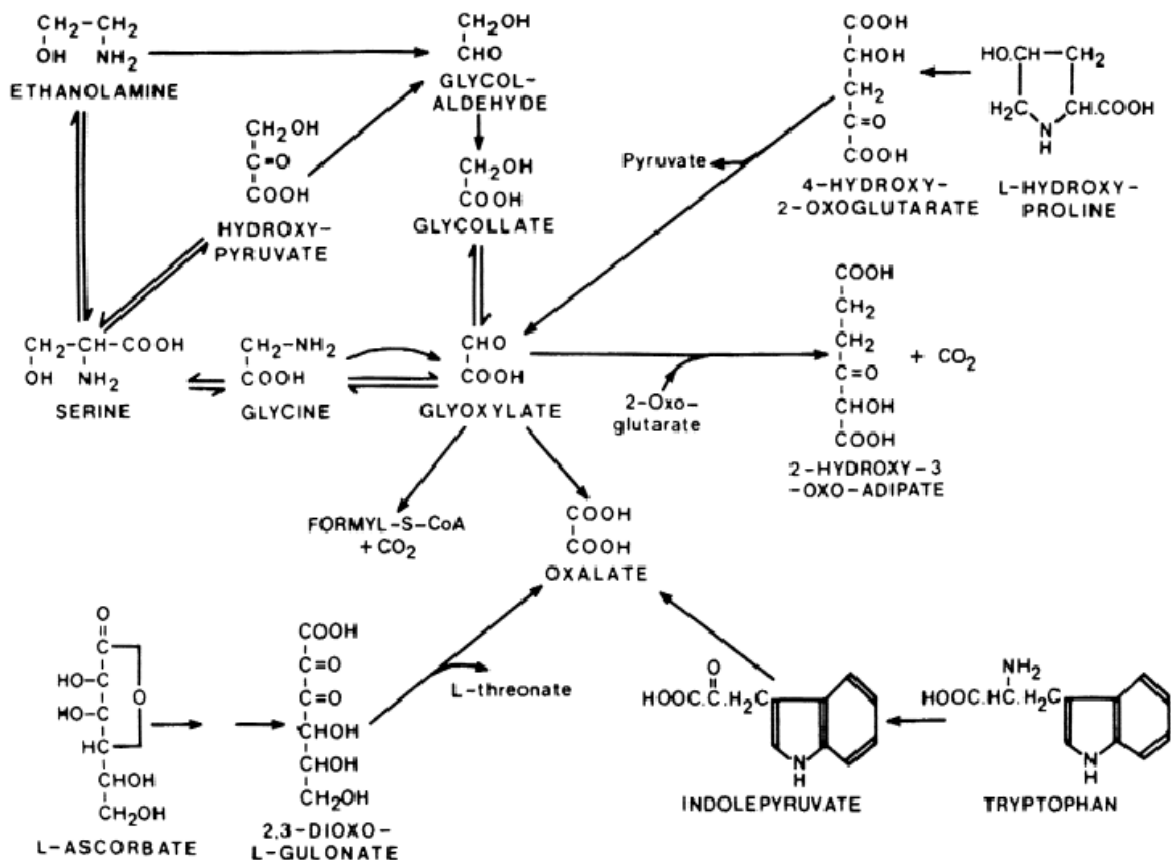


Figura 22. Biosíntesis de oxalatos en plantas.

El oxalato de calcio (insoluble) es el producto de la combinación del oxalato con el calcio. Esta combinación se produce en el lumen, haciendo al calcio no disponible para su absorción, siendo además excretado en las heces. En humanos, el oxalato libre o soluble es absorbido por difusión pasiva en el colon (Noonan y Savage, 1999). Este oxalato soluble es el de mayor importancia ya que, como se mencionó anteriormente, se encuentra libre para combinarse con otros minerales haciéndolos no biodisponibles. El consumo de ácido oxálico en exceso puede favorecer a la formación de piedras en el tracto urinario cuando este es excretado por orina. Los vegetarianos que consumen gran cantidad de vegetales poseen una mayor ingesta de oxalatos, lo cual puede reducir la disponibilidad del calcio. Esto puede incrementar el riesgo, por ejemplo en mujeres, las cuales requieren una mayor cantidad de calcio en su dieta, ya que podría contribuir a desarrollar osteoporosis especialmente después de la menopausia. Las dietas con baja ingesta de calcio y elevada en oxalatos no son

recomendables, pero si es un consumo ocasional no representa ningún problema en particular.

Para reducir el contenido de oxalatos en los vegetales se han estudiado diferentes tipos de cocción, siendo el más conveniente el hervido ya que se solubilizan los solutos en el agua de cocción y tienden a difundir a ella (Savage *et al*, 2000). De esta manera se produce una disminución en la cantidad de oxalato soluble, el principal responsable que al combinarse con los minerales como el calcio, hierro y fósforo los transforma en no disponibles para su absorción.

2.2.4. Deficiencia

La deficiencia de calcio, es decir, la disminución del calcio iónico, presenta síntomas anormales de hiperexcitabilidad nerviosa y muscular como síntomas predominantes, pudiendo causar alteraciones del ritmo cardíaco hasta insuficiencia cardíaca y arritmias ventriculares. Otros síntomas incluyen retraso mental y demencia en hipocalcemia crónicas, alteraciones dérmicas como dermatitis, eccema, psoriasis o alopecias. Entre las causas principales de hipocalcemia se encuentran:

- Déficit de absorción o exceso de eliminación de calcio;
- Insuficiencia paratiroidea;
- Pseudohipoparatiroidismo;
- Hipomagnesemia;
- Deficiencia de vitamina D nutricional, por mala absorción, por hepatopatías, por fármacos que facilitan su degradación (fenobarbital, alcohol o difenilhidantoína), síndrome nefrótico o raquitismo dependiente de vitamina D;
- Hipoproteinemia;
- Insuficiencia renal;
- Pancreatitis;
- Administración endovenosa de fosfatos, citratos y otros agentes que disminuyen la fracción del calcio iónico.

2.2.5. Fuentes

El calcio es uno de los minerales que presenta los mayores requerimientos de todos los micronutrientes y el que menos se aprovecha de la dieta. Entre las fuentes dietarias de calcio se encuentran la leche y los productos lácteos, como yogures y quesos, que constituyen la fuente por excelencia de este mineral, seguidos por los frutos secos, hojas verdes y algunas legumbres.

Los lácteos y sus derivados son alimentos ricos en calcio y fósforo, y es ésta en realidad la principal fuente de calcio. La absorción de calcio en las leches es bastante uniforme. Los lácteos fortificados con vitamina D a su vez favorecen la absorción de calcio y su ingestión mejora la calidad de la dieta en general.

Como se mencionó en el ítem **2.2.3.1.**, la absorción de calcio es reducida considerablemente por oxalatos (espinaca, acelga) y en menor medida por fitatos (cereales integrales, frutos secos). Las verduras de hojas verdes con bajo contenido de oxalatos (brócoli, coles, repollo) y jugos de frutas fortificados con citrato malato de calcio son buenas fuentes de calcio altamente biodisponible: 50% - 60% para las verduras bajas en oxalato, 40% - 50% para los jugos, mientras que el tofu, la leche de vaca y la “leche” de soja fortificada con carbonato de calcio tienen una buena biodisponibilidad del calcio (30% del 35%), el calcio en las semillas de sésamo, almendras y porotos secos tiene alrededor de un 25% de biodisponibilidad (Craig, 2010). De cualquier manera, la relación entre la ingesta de calcio y la densidad mineral ósea (DMO) está actualmente en revisión. Un análisis reciente encontró que la correlación entre la ingesta de calcio (o su origen animal o vegetal) y la DMO no es significativa (Ho-Pham *et al.*, 2009). La DMO es el más firme y consistente predictor de fractura osteoporótica (Ho-Pham *et al.*, 2009).

Tabla IV. Fuentes de calcio suplementario.

Carbonato de Calcio	Es la forma más común y económica. Contiene 40% de Ca ⁺⁺ (200 mg de Ca ⁺⁺ en 500 mg), es bien absorbida y tolerada en la mayoría de las personas con la comida. Los antiácidos interfieren en su absorción. Al tener mayor concentración de Ca ⁺⁺ se requieren menor número de tabletas o comprimidos.
Citrato de Calcio	Contiene 21% de Ca ⁺⁺ , (105 mg de Ca en 500 mg) tiene biodisponibilidad similar al carbonato. Es mejor que el carbonato en pacientes con aclorhidria o tratados con antiácidos o inhibidores de bomba. Puede ser ingerido con o sin las comidas.
Lactato de Calcio	Contiene 13% de Ca ⁺⁺ (65 mg de Ca ⁺⁺ en 500 mg)
Gluconato de Calcio	Contiene 9% de Ca ⁺⁺ (45 mg de Ca ⁺⁺ en 500 mg)

Los alimentos fortificados y los suplementos de calcio (ver **Tabla IV**) son una opción que debe utilizarse para las personas que no logran alcanzar las recomendaciones con los alimentos habituales. Los productos disponibles actualmente contienen carbonato de calcio y aportan 300 a 600 mg de calcio elemental por comprimido; algunos de ellos también contienen vitamina D.

En la **Tabla V** se puede observar el contenido aproximado de calcio en las porciones de algunos alimentos comunes, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Tabla V. Contenido de Calcio aproximado en las porciones de algunos alimentos comunes.

Alimento	Tamaño de la porción	Calcio (mg)
Leche de vaca	244 ml	246
Leche parcialmente descremada (1%)	244 ml	264
Leche descremada	245 ml	223
Yogurt descremado frutal	170 ml	258
Yogurt frizado de vainilla	72 ml	103
Queso	28 gr	202
Queso pasteurizado procesado	21 gr	144
Ricota	124 gr	337
Salmón con hueso	85 gr	203
Brócoli cocinado	156 gr	62
Brócoli crudo	71 gr	35
Tomate en lata	255 gr	87
Espinaca cocida	90 gr	120
Espinaca cruda	90 gr	120
Batata	160 mg	44
Naranja	1 mediana	50
Jugo de naranja fortificado con calcio	240 ml	300
Cereales de desayuno fortificados	30 gr	100
Avena cocida fortificada preparada con agua	117 gr	65
Leche de soja fortificada	240 ml	200-500

Tabla VII. Fuentes de calcio disponible en Argentina (Rovirosa et al., 2012)

Alimento	Cantidad por habitante por año (Kg/año)	Aporte de Calcio (mg/día)	% del total del Calcio
Leche	76,3	251	39,6
Quesos	11,6	159	25,1
Vegetales	109,8	71	11,1
Carnes y huevos	119,9	54	8,6
Frutas	78,4	50	7,9
Cereales, legumbres y derivados	113,2	36	5,6
Otros	117,7	13	2,0
Total calcio (mg/hab/día)		634	
Calcio de leche y quesos		410	65
Calcio no lácteo		224	35

2.3. Dietas

Los seres humanos tenemos una alimentación omnívora, esto es, tenemos la capacidad de consumir la mayor parte de los alimentos que encontramos en la naturaleza. Sin embargo, muchos individuos eligen algún tipo de alimentación en particular como es el caso de los que optan por el vegetarianismo.

Podemos dividir a los tipos más frecuentes de vegetarianos en los siguientes grupos:

- Vegano: es quien sigue una dieta exclusivamente basada en alimentos de origen vegetal, sin excepciones de ningún tipo. Tampoco consumen huevos ni lácteos. Como curiosidad, este término no figura en el diccionario de la Real

Academia Española como vinculado al vegetarianismo.

- Ovo-vegetariano: incluye huevos.
- Lacto-vegetariano: incluye lácteos y sus derivados (leche, queso, yogur).
- Lacto-ovo-vegetariano: incluye huevos, lácteos y sus derivados.
- Semi-vegetariano: consume menos carne que el común de las personas y suelen autodenominarse vegetarianos, aunque estrictamente no lo serían. Por ejemplo los pesco-vegetarianos incluyen el consumo de pescados y excluyen el consumo del resto de las carnes.

Otros subtipos menos habituales que pueden encontrarse en la población son:

- Crudívoro: el crudívoro no cocina los alimentos que consume de manera tal que come sólo alimentos crudos: frutas, verduras, nueces, semillas, legumbres, cereales, brotes, etc. (Li, 2011)
- Frugívoro o Frutariano: se alimenta exclusivamente de frutos, generalmente crudos y de época: fruta, frutos secos, semillas y otros componentes que pueden ser recogidos sin dañar la planta
- Flexitariano: también son denominados “vegetarianos flexibles”. Son aquellos que en su vida cotidiana no consumen carnes pero sí lo hacen cuando una situación social les requiere consumir un producto de origen animal.

Algunos vegetarianos pueden elegir evitar también alimentos que pueden utilizar ingredientes de origen animal como por ejemplo la gelatina que se obtiene habitualmente a partir de la piel de animales, huesos y tejido conectivo, y algunos azúcares derivados de la caña de azúcar que se blanquean mediante un proceso que requiere huesos de animales (Li, 2011) o alimentos elaborados con grasa animal como algunos panificados o frituras.

Los nutrientes potencialmente preocupantes en la alimentación de los vegetarianos incluyen a la vitamina B12, ácidos grasos omega 3, hierro, calcio, vitamina D, zinc y en menor medida las proteínas y el yodo.

No está del todo claro si los beneficios para la salud de una alimentación vegetariana

son atribuibles a: la ausencia de carne en la dieta, el aumento en el consumo de un alimento en particular, el patrón de alimentos que se consumen en la dieta vegetariana u otros componentes del estilo de vida saludable a menudo asociado con el vegetarianismo. Las dietas vegetarianas restrictivas y mal planificadas pueden ser insuficientes en términos de provisión de nutrientes e incluso pueden ser perjudiciales para la salud a largo plazo.

La ingesta de calcio de los lacto-vegetarianos es similar o incluso puede ser mayor que la de los no-vegetarianos, mientras que la ingesta de los veganos tiende a ser menor que los dos grupos y puede caer por debajo de la ingesta recomendada (Craig, 2010 y Tipton y Witard, 2007). En Argentina no disponemos de datos epidemiológicos que diferencien claramente a estos 3 grupos poblacionales, pero dado que el consumo de calcio en general es netamente inferior a la recomendación, es probable que los vegetarianos presenten ingestas bajas también.

Estudios sugieren que no hay diferencias entre omnívoros y lacto-ovo-vegetarianos en la densidad mineral ósea (DMO), por lo que el riesgo de fracturas óseas es similar para ambos grupos. (Craig, 2009). Aunque existe muy poca información respecto a la salud ósea de los veganos, algunos estudios sugieren que la densidad ósea es menor respecto a los no vegetarianos (Craig, 2010). En un estudio realizado por el European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition–Oxford (EPIC-Oxford) el 30% mayor de riesgo de fractura ósea en veganos parece estar asociado con una menor ingesta de calcio. No se observó ninguna diferencia entre las tasas de fractura de los veganos que consumen 525 mg de calcio / día respecto a los omnívoros. Mientras que el consumo de calcio y vitamina D de los veganos sea adecuado, su salud ósea probablemente no será un problema. Sin embargo, se necesitan más estudios para proporcionar conclusiones más definitivas sobre la salud ósea en veganos (Craig, 2009)

La DMO se ve afectada por múltiples factores ambientales y genéticos. Por lo tanto, no es realista esperar que cualquier modificación aislada, incluida la dieta, puede dar lugar a un cambio significativo en ella. La complejidad y la posible interacción entre el calcio de la dieta y las proteínas hacen que sea difícil atribuir el modesto efecto del vegetarianismo sobre la densidad ósea a cualquiera de estos factores dietéticos aisladamente. Sin embargo, la proteína podría ejercer un efecto nocivo sobre la densidad ósea cuando el calcio ingerido es

bajo (Ho-Pham *et al.*, 2009).

Para mantener una alimentación equilibrada es necesario que las personas vegetarianas tengan conocimiento de los alimentos que pueden aportar los requerimientos diarios de calcio en la dieta. Se sugieren tres porciones diarias de alimentos ricos en calcio (Marsh *et al.*, 2009). Una porción es equivalente a:

- 250 ml de leche o bebida de soja enriquecida con calcio (con al menos 100 mg calcio cada 100 ml)
- 40 gr. de queso;
- 200 gr. de yogur o yogur de soja enriquecido con calcio;
- 150 gr. de queso de soja (tofu) con calcio;
- 1,5 tazas de verduras de hoja verde oscuro;
- 1 taza de almendras;
- 5 higos secos;
- 3 cucharadas de pasta de sésamo sin pelar.

Los veganos pueden cubrir de forma más sencilla sus necesidades de calcio si ingieren alimentos fortificados o suplementos de este mineral (Craig, 2009). Para no incrementar la excreción urinaria del calcio se sugiere limitar el consumo de sal y el consumo de té, café, bebidas gaseosas y energizantes.

Por todo lo expuesto arriba, es de interés buscar fuentes alternativas de calcio, para ser incorporadas en diferentes dietas de acuerdo a las preferencias de cada persona.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Antes de describir detalladamente los procesos y determinaciones que se llevaron a cabo con las muestras provenientes del Chaco, es importante destacar que durante dos meses previos al trabajo con dichas muestras, se utilizó un nopal silvestre de la localidad de Pontevedra, La Matanza, Prov. de Buenos Aires, para poner a punto las técnicas de liofilizado, contenidos de oxalatos y calcio.

3.1. Materiales y equipos (ver Anexo I)

3.2. Materia prima

Los nopales a analizar se enviaron por encomienda desde la provincia de Chaco, Las Breñas, hasta la provincia de Buenos Aires, Capital Federal. Se realizaron dos envíos: uno el 15 de Junio de 2015 y el otro el 02 de Septiembre de 2015. Debido a que el primero resultó insuficiente para llevar a cabo todas las determinaciones necesarias para realizar el presente trabajo de investigación, se solicitó más materia prima.

3.3. Procesamiento

En la **Figura 23** se presenta un diagrama de flujo del desarrollo experimental.

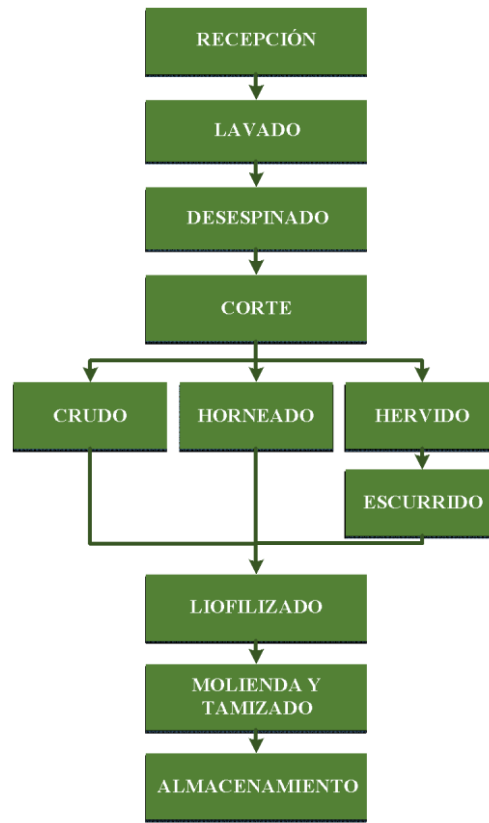


Figura 23. Diagrama de flujo.

A continuación se detalla cada una de las etapas descritas en la figura anterior.

3.3.1. Recepción de materia prima

Se recibieron los nopales en caja y envueltos en papel madera para conservarlos y evitar que se dañaran durante el traslado. Se los pesó y midió para conocer sus características morfológicas. Luego se procedió como se indica a continuación.



Figura 24. Recepción del primer envío.



Figura 25. Recepción del segundo envío.



Figura 26. Medición y selección de Nopales.

3.3.2. Lavado

A fin de conservar los nopales en óptimas condiciones y extender su vida útil, fueron sumergidos en solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 20 minutos (Contreras-Padilla *et al.*, 2011), utilizándola como solución desinfectante. Luego se enjuagaron, escurrieron y secaron para ser almacenados en heladera hasta su utilización.



Figura 27. Lavado y escurrido.

3.3.3. Desespinado y Corte

Los nopales se dividieron en grupo eligiéndose al azar. Previo a su procesamiento se quitaron con cuchillo las aréolas con las espinas. Los nopales utilizados como control (nopal crudo) fueron posteriormente cortados en cuadrados de 1 cm x 1 cm y colocados directamente en placas de Petri de vidrio para ser liofilizados. Para las muestras hervidas y horneadas se explica el proceso en el ítem siguiente.



Figura 28. Desespinado y corte.

3.3.4. Cocción

Al existir diversos tipos de cocción, se investigó previamente cuáles son las formas más comunes de consumir nopales tanto en Argentina como en el mundo. En base a ello, se definieron los métodos de cocción, ubicándose en primer lugar el hervido y en segundo, el horneado.

3.3.4.1. Hervido

Los nopales fueron cortados en cuadraditos de 1 x 1 cm. Luego se utilizó una proporción 1:1, nopal-agua, para hervir los nopales en una olla durante 20 minutos (Ramírez-Moreno *et al.*, 2011). Al finalizar se los escurrió y se los dejó enfriar, apartando y reservando el agua de cocción en botellas de plástico. Se armaron paquetes del tamaño de una placa de Petri, de 1 cm de espesor y se las congeló en el ultrafreezer a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el proceso de liofilización.



Figura 29. Hervido y escurrido.

3.3.4.2. Horneado

Los nopales se hornearon enteros en un horno a 180 °C durante 10 minutos. Se los horneó 5 minutos de cada lado. Luego se cortaron en cuadrados de 1 cm por 1 cm y se los dispuso en una placa de Petri para congelar en el ultrafreezer y liofilizar.

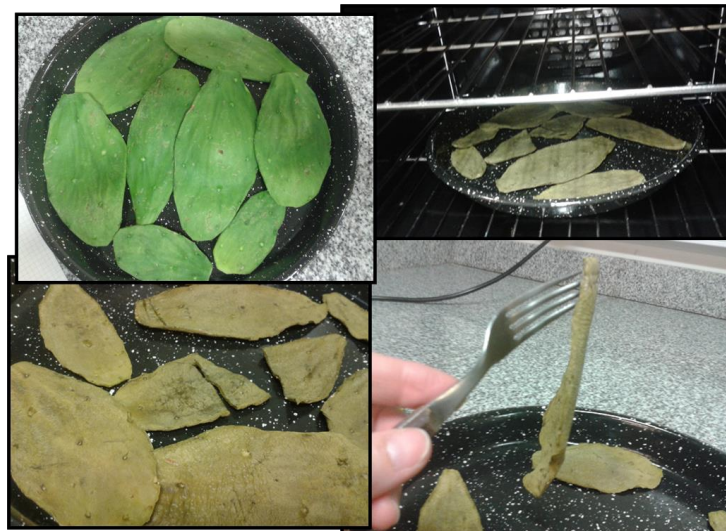


Figura 30. Nopal horneado.

3.3.5. Liofilizado

Las muestras de nopal hervido, horneado y nopal crudo (como control) fueron

liofilizadas para preservar sus características.

Se utilizó un liofilizador de un estante (Rificor LI-E300-CTR). Cada liofilización llevó un tiempo aproximado de 48 hs, llegando a una temperatura de $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el condensador y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura de estante.

Debido a que este proceso requirió mucho tiempo, se diseñó un estante más para agilizar el proceso. En total, liofilizar todas las muestras, demoró alrededor de 2 meses.



Figura 31. Liofilización de las muestras.



Figura 32. Nopal crudo, hervido y horneado liofilizados.

3.3.6. Molienda y tamizado

Se utilizó un molinillo de café para triturar las muestras de nopal liofilizado y se las pasó por un tamiz (mesh N° 25) para obtener una muestra homogénea y representativa.



Figura 33. Molienda del nopal crudo.



Figura 34. Nopal crudo tamizado.



Figura 35. Nopal hervido y horneado tamizados.

3.3.7. Almacenamiento

Las muestras molidas se conservaron en frascos de vidrio color caramelo a una temperatura de almacenamiento entre 2 – 8 °C.



Figura 36. Almacenamiento del nopal crudo.

3.4. Determinaciones

3.4.1. Determinación de humedad

Se calculó a partir de los pesos de las muestras antes y después de liofilizadas. Los resultados se expresaron en porcentaje en base húmeda.

3.4.2. Determinación de cenizas

Se pesaron alrededor de 2 gramos de la muestra de nopal molido a analizar en un crisol previamente colocado en mufla a 550 °C y tarado. Las muestras se calcinaron hasta materia carbonosa y luego se llevaron hasta cenizas blancas y peso constante en mufla. Una vez finalizado el proceso se dejaron enfriar en desecador, se pesaron y se calcularon los contenidos de cenizas (Método Oficial AOAC 923.03, ver **Anexo II**). Los resultados se expresaron en porcentaje en base húmeda.



Figura 37. Cenizas del nopal horneado.

3.4.3. Determinación de Oxalatos

Se elaboró el protocolo de análisis de esta determinación de acuerdo a lo realizado por Amalraj y Pius, 2015.

3.4.3.1. Oxalato Total

Esta experiencia se llevó a cabo a lo largo de tres días. Las muestras se pesaron y se procesaron según la bibliografía citada. Se realizaron las titulaciones con KMnO_4 valorado en agitador magnético con calentamiento a $60\text{ }^\circ\text{C}$ hasta coloración rosada para determinar el oxalato. El contenido de oxalato total se expresó en % (mg/g) en base húmeda y seca.

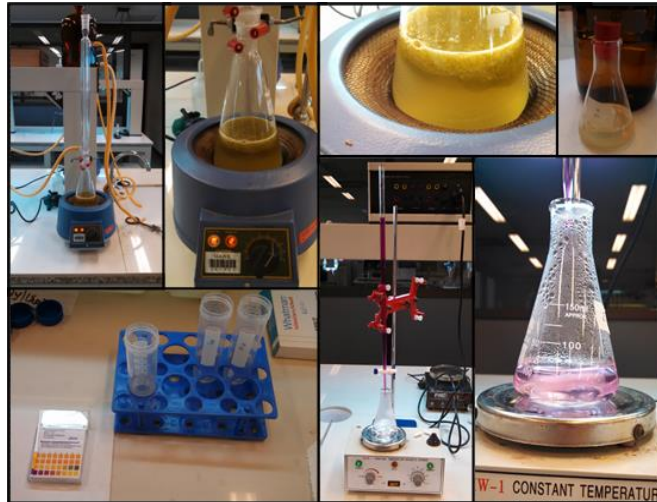


Figura 38. Oxalato total del nopal crudo.

3.4.3.2. Oxalato Soluble

Al igual que para la determinación de oxalatos totales, ésta experiencia se llevó a cabo a lo largo de tres días y siguiendo el mismo procedimiento, con la excepción de que no se empleó HCl para la digestión de las muestras sino que se utilizó sólo agua destilada. Además, se realizó la determinación de oxalato soluble en el agua de cocción de los nopales hervidos, mencionada en el punto 3.4.1, considerando esta muestra como “filtrada” para continuar con la metodología. El contenido de oxalato soluble se expresó en % (mg/g) en base húmeda y seca.

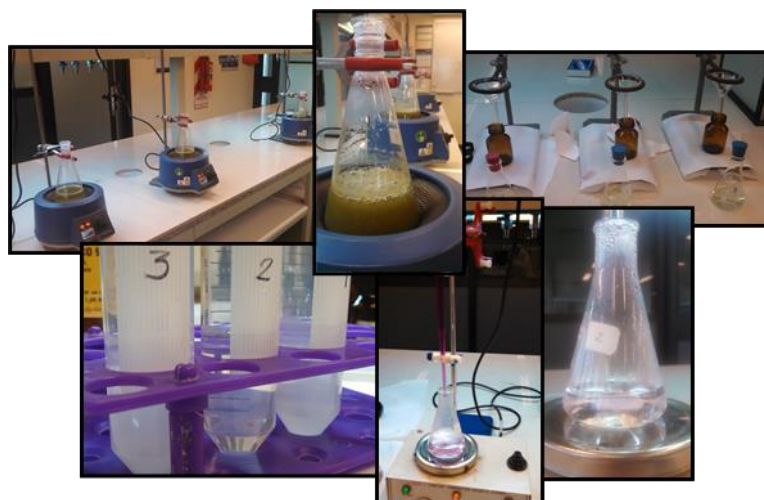


Figura 39. Determinación de oxalatos solubles en nopal crudo.

3.4.3.3. Oxalato Insoluble

Se realizaron los cálculos para obtener el contenido de oxalato insoluble presente en todas las muestras, siendo éstos la diferencia entre el contenido de oxalato total y soluble.

$$\text{Oxalato insoluble} = \text{Oxalato total} - \text{Oxalato soluble}$$

El contenido de oxalato insoluble se expresó en % (mg/100g) en base húmeda y seca.

3.4.4. Determinación de Calcio, Sodio y Potasio

Se utilizó el procedimiento de la AOAC 985.35 (ver **Anexo II**) para la determinación de estos tres minerales por absorción atómica. Se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AA100. Se utilizaron datos bibliográficos para realizar los cálculos para definir la curva del estándar, con un posterior ajuste de las concentraciones según el mineral a determinar. Para el calcio se la curva estuvo comprendida entre 0,5 a 2,5 ppm, obteniendo un R^2 de la curva de 1,0000. En el caso del sodio el R^2 fue también de 1,0000 para concentraciones entre 0,5 y 0,15 ppm. En el caso del potasio la curva estuvo comprendida entre 1,5 y 5,5 ppm con un R^2 de 0,9998.



Figura 40. Espectro de absorción atómica Perkin Elmer AA1000.

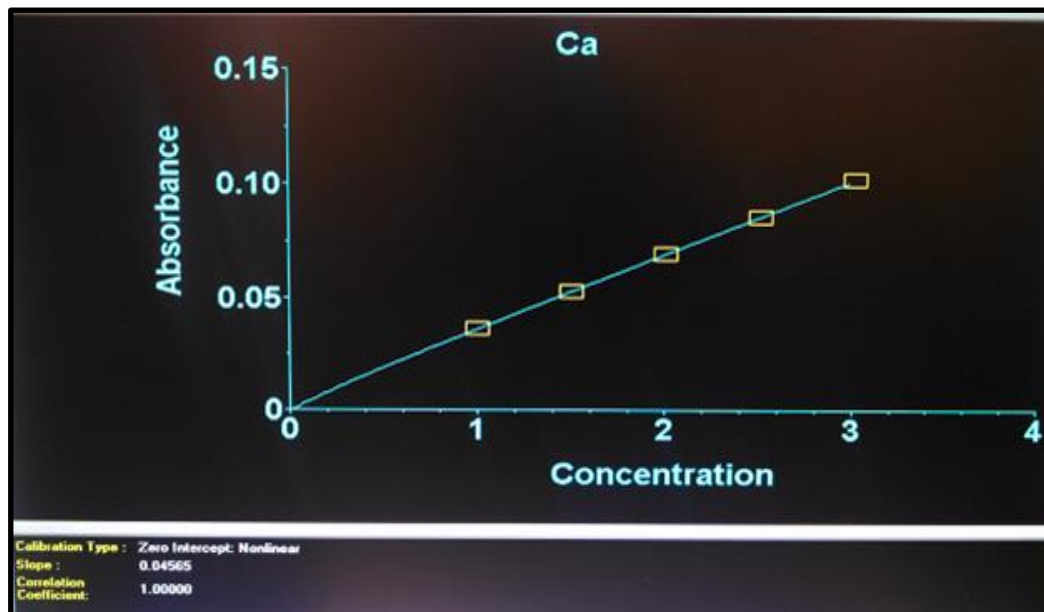


Figura 41. Curva de calibración del calcio con R².

3.4.5. Determinación de proteínas

Las determinaciones se llevaron a cabo en un equipo Kjeldhal marca Buchi.

Se pesó 1 gramo de muestra de nopal molido con el catalizador y se los colocó dentro de un tubo. Se agregó ácido sulfúrico concentrado y se hizo una digestión hasta obtener un color claro y translúcido. Se esperó a que se enfriara y se realizó la etapa de destilación. El destilado de color azul verdoso fue recogido en un erlenmeyer con ácido bórico y unas gotas de rojo de metilo. Una vez finalizado se tituló con ácido clorhídrico valorado hasta obtener color anaranjado. Finalmente se realizaron los cálculos necesarios según la ecuación:

$$\%N = ([V_{HCL} \times N_{HCL}] \times 0,014 \times 100) / \text{peso muestra}$$

El % de proteína se calculó como %N x 6,25, expresándose el resultado final como porcentaje en base húmeda.



Figura 42. Determinación de proteínas en nopal crudo y hervido.

3.4.6. Determinación de grasas

Se utilizó un equipo Soxhlet automático, marca Velp-Scientifica. Se pesaron 3 gramos de las muestras en los cartuchos previamente tarados. Se tararon además los vasos con pedacitos de material poroso. Los cartuchos con muestra se ubicaron en el equipo Soxhlet y se colocaron 60 ml de éter de petróleo en cada vaso. Luego se dio inicio al equipo para comenzar el proceso de extracción. Una vez finalizado se llevaron los vasos a estufa a una temperatura de 105 °C. Se dejaron enfriar en desecador y se pesaron para realizar los cálculos del extracto etéreo del nopal. (AOAC 2000 Método N° 920.39, ver **Anexo II**). Los resultados se expresaron como porcentaje en base húmeda.



Figura 43. Determinación de grasas en nopal crudo.

3.4.7. Determinación de pH

El pH se midió con un potenciómetro calibrado pesándose 3g de muestra triturada más 20 ml de agua destilada (Dionello *et al.*, 2009).

3.5. Estadística

Los análisis se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados fueron expresados como promedios y error estándar (ES) de las tres determinaciones. El análisis estadístico ANOVA y el test de Tukey se llevaron a cabo utilizando el Programa InfoStat, versión 2007p. (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Las correlaciones lineales entre los datos obtenidos fueron calculadas utilizando la opción estadística de coeficiente de correlación del software Microsoft Office Excel (2003).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para el estudio de las muestras de nopales de la especie *Opuntia ficus-indica* se requirieron dos envíos provenientes de la provincia del Chaco, Argentina, para poder cumplimentar todas las experiencias. El peso y las características morfológicas de los nopales se muestran en la **Tabla VII**. En ella se puede observar que el primer envío de nopales fue de menor cantidad ($n = 16$) que el segundo envío ($n = 25$). Sin embargo, el peso total enviado la primera vez fue mayor que el del segundo. Esto se debe a que las dimensiones de los nopales de la *Opuntia ficus-indica* del primer envío fue de alrededor de 22 cm de largo por 11 cm de ancho, mientras que por otra parte, las dimensiones de los nopales del segundo envío, más pequeños, lo hicieron alrededor de 14 cm de largo por 6 cm de ancho. Mediante un análisis de los datos se llegó a la conclusión que ambos envíos presentaron diferencias significativas en cuanto al tamaño y peso de los nopales ($p < 0,05$).

Tabla VII. Características morfológicas de nopales frescos de la *Opuntia ficus-indica*.

	<i>Opuntia ficus-indica</i>	
	Primer envío ($n = 16$)	Segundo envío ($n = 25$)
Peso (g)	2180	754
Longitud* (cm)	$22,18 \pm 4,02^a$	$14,25 \pm 5,28^b$
Ancho* (cm)	$11,5 \pm 1,92^a$	$6,74 \pm 2,17^b$

* Los valores presentados corresponden a promedio \pm DE. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Si bien los nopales proceden del mismo lugar de origen, no se puede asegurar que la muestra fuera tomada de la misma manera en las dos ocasiones, ya que la toma de las muestras fue hecha por un tercero en el Chaco. A su vez, estos nopales fueron cosechados en distintos períodos tal como se menciona en el ítem **3.2**. Con lo cual se puede inferir que, de junio a septiembre, los nopales fueron brotando, siendo la mayoría de estos brotes más jóvenes y tiernos los seleccionados para el segundo envío (época cercana a la primavera) a

diferencia de los nopales del primer envío (invierno).

Se ha observado que las características morfológicas de los nopales varían de especie a especie e incluso se encuentran diferencias dentro de una misma especie. Según Pérez Méndez *et al.* (2015), se observaron grandes diferencias entre las especies *O. dillenii* y *O. ficus indica*, siendo la primera más pequeña y de menor peso, a pesar de haberse cosechados los nopales en la misma época y en plantas de la misma edad (6 – 8 meses). A su vez, Chahdoura *et al.* (2015), estudió otros nopales de las especies *O. microdasys* y *O. macrorhiza*, que fueron cosechados entre los meses de junio y julio presentando también características muy diferentes. Las diferencias encontradas podrían estar asociadas a las condiciones climáticas de las zonas de cultivo, las características del suelo y otros factores agroclimáticos.

Las muestras de nopales de la especie *Opuntia ficus-indica* se dividieron en tres grupos. De acuerdo a lo visto en el ítem 3.4., la preparación de los nopales se realizó en función de cómo son consumidos en Argentina. Es por ello que se estudiaron muestras en crudo, hervido y horneado. Para los procesos de cocción se calcularon los rendimientos, al igual que para la liofilización y molienda, que se llevaron a cabo con el fin de preservar las muestras en las mejores condiciones posibles. En la **Tabla VIII**, se puede observar que el rendimiento del proceso de cocción del nopal horneado es un 7,50 % menor al del hervido. Con lo cual se puede inferir que al hornear el nopal, se pierde peso por evaporación del agua, uno de los principales componentes del nopal.

Tabla VIII. Rendimientos porcentuales de los procesos de cocción, liofilización y molienda.

Nopal	Proceso		
	Cocción	Liofilización	Molienda
Crudo	-	6,60	96,60
Hervido	77,50	6,14	94,20
Horneado	70,00	10,47	87,85

Por este mismo motivo se observa, en el proceso de liofilización, que el nopal horneado es el que mayor rendimiento presentó ya que contenía menor cantidad de agua al

iniciar el proceso. Sin embargo, se ha observado durante el proceso de molienda que el molido del nopal horneado era más fino y más volátil que los dos anteriores. Por esta razón la molienda del nopal horneado es el que presenta menor rendimiento.

En la tabla que se puede observar a continuación, se presentan los resultados de la composición porcentual y contenido de algunos minerales de los nopales.

Tabla IX. Composición porcentual y contenido de calcio, potasio y sodio del nopal crudo, hervido y horneado.

	Nopal		
	Crudo	Hervido	Horneado
Humedad*	93,5 ± 1,2 ^a	93,8 ± 0,4 ^a	89,5 ± 1,7 ^b
Sólidos totales*	6,5 ± 1,2 ^a	6,2 ± 0,4 ^a	10,5 ± 1,7 ^b
Cenizas*	25,3 ± 0,05 ^a	20,4 ± 0,3 ^b	21,7 ± 0,06 ^c
Proteínas*	8,4 ± 0,06 ^a	11,4 ± 0,03 ^b	13,6 ± 0,1 ^c
Grasas*	1,4 ± 0,03 ^a	1,0 ± 0,01 ^b	1,1 ± 0,01 ^c
pH	4,34	4,21	4,02
Na**	108,8 ± 21,0 ^a	96,9 ± 12,4 ^a	95,3 ± 7,2 ^b
K**	8201 ± 1055 ^a	6005 ± 628 ^b	6846 ± 402 ^c
Ca**	3217 ± 12 ^a	3133 ± 69 ^b	1497 ± 26 ^c

Los resultados son promedios ± DE (n=3). Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas (p < 0,05)

*g/100 g base seca

** mg/100 g base seca

Analizando los datos obtenidos en la investigación de la composición química de los nopales en sus diferentes formas (crudo, hervido y horneado), con respecto al contenido de humedad, se ve que es muy similar entre el nopal crudo y el hervido, que comparado con la humedad obtenida en el nopal horneado. Este último sufrió una disminución que se podría deber al proceso de cocción en sí mismo, ya que en el horneado hay una evaporación de humedad. Al comparar estos valores con respecto a otros de distintos trabajos de investigación (Guzmán y Chávez, 2007; Vargas Rodríguez *et al.*, 2015) se puede decir que nuestra muestra analizada proveniente del Chaco se encuentra dentro del rango de porcentaje de humedad característica de estas plantas.

Con respecto al contenido de sólidos totales, se puede observar que ocurre lo mismo que con el contenido de humedad. Los valores obtenidos en el nopal crudo y hervido son muy similares entre sí, con diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto del nopal horneado. Esta diferencia puede ser deberse a que el nopal crudo y hervido fueron de la misma partida y en cambio el nopal utilizado para horneado fue de una partida distinta, o bien al tipo de cocción ya que al perder humedad hace que la fracción de sólidos sea mayor.

Observando los valores obtenidos para el contenido de cenizas, se puede apreciar cierta diferencia entre sí, ya que como dice el trabajo de Guzmán y Chávez (2007), dicha variación podría ser consecuencia de la relación existente entre los compuestos que conforman la ceniza y la relación de éstos con la química del suelo y los complejos fenómenos de la disponibilidad de sus elementos para cada planta en particular, sumado a que el porcentaje de ceniza está influenciado por la edad del nopal.

Respecto del contenido de grasas se observan valores bajos, pero existe una diferencia significativa entre las tres muestras. Al igual que como ocurre con el contenido de humedad, el porcentaje de materia grasa se encuentra dentro de los valores característicos de la especie (Pimienta, 1990). En el pH, si bien hay una variación, los valores están alrededor de 4. En el nopal hervido su valor un poco más bajo que el crudo podría deberse a la solubilización de solutos; en el caso del nopal horneado, su valor más bajo que los anteriores podría ser causado por la diferencia de las muestras en los envíos realizados.

Analizando el contenido promedio de sodio, se observa que es más alto cuando el nopal está crudo que cuando sufrió alguno de los dos procesos de cocción, aún así el

contenido del nopal crudo y hervido no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí respecto del nopal horneado. Con respecto al potasio se puede ver el mismo efecto que ocurrió con el sodio, se obtiene una mayor cantidad promedio en el nopal crudo con respecto a cuando el nopal sufrió algún tipo de cocción. Aún así, el contenido en las tres muestras fue diferente significativamente.

Respecto del calcio, los contenidos fueron estadísticamente diferentes entre las tres muestras. El análisis de estos resultados se profundizará más adelante.

Este análisis de la composición química del nopal proveniente de INTA Las Breñas pone en evidencia el grado de influencia que tiene la composición del suelo y las condiciones edáficas sobre la cantidad de cada uno de los componentes del nopal, ya que como observó Rodríguez-García *et al.* 2007 en su investigación, no sólo influyen los factores anteriores, sino que además influye el grado de maduración de la planta, siempre respetando el rango de porcentaje característico de los compuestos para la *Opuntia ficus indica*.

Tabla X. Contenido de calcio y oxalato total y soluble de nopales crudos, hervidos y horneado.

	Nopal		
	Crudo	Hervido	Horneado
Calcio Total *	209,12 ± 1,05 ^a (3217 ± 12)	194,22 ± 4,28 ^b (3133 ± 69)	157,15 ± 2,70 (1497 ± 26)
Oxalato total *	296,23 ± 2,31 ^a (4557 ± 36)	284,77 ± 21,54 ^a (4593 ± 35)	260,39 ± 15,37 (2480 ± 15)
Oxalato Soluble *	32,21 ± 2,37 ^a (496 ± 36)	17,80 ± 1,23 ^b (287 ± 20)	7,63 ± 1,32 (73 ± 13)
Relación Oxalato total/ Calcio total **	0,63	0,65	0,73

* mg/100 g base húmeda - Los valores son promedios ± DE (n = 3)

** Relación entre miliequivalentes

Valores entre paréntesis corresponden a contenidos en base seca

Letras diferentes en las mismas filas indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05)

En la **Tabla X** se pueden observar los valores del calcio y oxalato contenido en las muestras. Cabe recordar que las muestras de nopal crudo y hervido se llevaron a cabo con

nopales del primer envío y las muestras del horneado con las del segundo envío. Como se indicó en el ítem **3.2.** las características de los nopales entre los dos envíos fueron diferentes pudiendo haber diferencias en su composición, por lo que las comparaciones estadísticas (en este caso donde se trata de analizar la biodisponibilidad del calcio) se llevaron a cabo entre las muestras de nopal crudo y el hervido solamente.

Se puede observar que el contenido promedio de calcio total, oxalato total y soluble fue mayor en el nopal crudo. Asimismo, para cada muestra, el contenido de oxalato soluble fue menor que el contenido de oxalato total. Estas mismas observaciones se pueden encontrar en otros trabajos publicados como el de Akhtar *et al.* (2011), donde se analizaron varios vegetales crudos y hervidos encontrándose estas diferencias. Brogren y Savage (2003) encontraron estos mismos resultados para la espinaca congelada. En el caso del nopal crudo, los oxalatos solubles representan un 10,9 % del oxalato total, para el hervido 6,2 % y para el horneado 2,9 %. Estos valores son menores que los reportados en el trabajo de Ramírez-Moreno *et al.* (2011), donde las diferencias entre el contenido de oxalato total y soluble para nopales cultivados en México estuvieron entre un 23 – 29 %. Esto podría deberse a las diferencias agroclimáticas de los cultivos y características de los suelos, que hacen que la composición de los nopales sea diferente. Además puede observarse que la diferencia entre el oxalato total y el soluble se debería al contenido de oxalato insoluble, siendo estos valores de 264,02 mg/100 g para el crudo, 266,97 mg/100 g para hervido y 252,76 mg/100 g para el horneado, expresados en base húmeda. Estas mismas diferencias fueron analizadas en los trabajos de Amalraj y Pius (2015), Ramírez-Moreno *et al.* (2011), Catherwood *et al.* (2007) y Gosh y Savage (2013).

En relación con los oxalatos, si comparamos las muestras de nopal crudo con las de nopal hervido, solamente existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) en el contenido de oxalato soluble. Esto podría deberse a que durante el hervido las sustancias solubles tienden a difundir a través del tejido y solubilizarse en el medio de cocción. Lo mismo sucedió en el trabajo de Peñuela Teruel (1994) donde se estudió la influencia de los procesos de cocción en el contenido de nitritos y nitratos en espinaca. Este efecto también fue observado en el trabajo de Ramírez-Moreno *et al.* (2011) y en el de Akhtar *et al.* (2011). Además, se ha observado que el hervido tiene un marcado efecto sobre la composición química de vegetales,

produciendo una pérdida general de compuestos fitoquímicos y de la capacidad antioxidante total (Mazzeo *et al.*, 2011). En el ítem **2.2.3.3.** se describió que el oxalato libre o soluble se absorbe por difusión pasiva en el intestino delgado y que sería el responsable de combinarse con el calcio del organismo, o de otros alimentos consumidos al mismo tiempo, haciéndolo no biodisponible (Noonan y Savage, 1999). Sucede lo mismo con el hierro y el magnesio, contribuyendo además a la formación de piedras en los riñones (Gosh y Savage, 2013). Para Ramírez-Moreno *et al.* (2011), los procesos de cocción aplicados no causaron cambios significativos en la cantidad de oxalato total en el nopal crudo a pesar de que hubo una pequeña disminución en comparación con el hervido. Esto podría explicarse de acuerdo a los estudios que muestran que la cocción en agua es más efectiva en cuanto a disminuir el oxalato soluble que el oxalato insoluble en distintas variedades de vegetales (Savage *et al.*, 2000). En base a ello se podría deducir que el consumo de nopal hervido sería más beneficioso (por su menor contenido de oxalato soluble) que el nopal crudo, debido a que este último posee mayor proporción de oxalatos solubles que pueden combinarse con el calcio haciéndolo no disponible.

Por otra parte, también se puede observar que el contenido de calcio total del nopal hervido es un 7,1 % menor que el del nopal crudo, presentando una diferencia significativa ($p > 0,05$). Pingle y Pawar (2016) estudiaron los efectos del calor sobre el calcio en diferentes muestras de leche observando que el contenido de calcio se redujo un 10 – 14 % al hervir leche no procesada por 10 minutos a 100 °C. Esto está asociado a que el calcio soluble en la muestra de leche se ioniza y se combina con los fosfatos causando la precipitación de fosfato de calcio como consecuencia del calentamiento provocando una disminución del calcio total. Las vitaminas y los minerales también se ven afectados por este proceso. Teniendo esto en consideración, dicha disminución de calcio en los nopales hervidos podría deberse a que durante el calentamiento provocado en el proceso de cocción el calcio se haya ionizado difundiendo al agua de cocción.

El trabajo de Akhtar *et al.* (2011) realizado en Pakistán, expone valores en base húmeda de oxalato total, soluble e insoluble en diferentes vegetales crudos y hervidos. En cuanto a los crudos se puede observar que la espinaca es el vegetal con más cantidad de oxalatos totales, solubles e insolubles (978 mg/100 g, 543 mg/100 g y 435 mg/100 g,

respectivamente), seguido por el poroto de soja (497 mg/100 g, 155 mg/100 g y 134 mg/100 g). En cambio la zanahoria, es uno de los vegetales analizados por los autores con menor contenido de estos tres elementos, con valores de 49 mg/100 g, 28 mg/100 g y 21 mg/100 g. En Nueva Zelanda Savage *et al.* (2000) también realizó estos análisis en varios vegetales y si bien los valores encontrados en la espinaca difieren de los de Akhtar *et al.* (2011), sigue siendo el vegetal que mayor contenido de oxalatos posee. Además, expuso valores similares para la zanahoria analizando también el brócoli, obteniendo 16,1 mg/100 g, 11,6 mg/100 g y 4,5 mg/100 g para el oxalato total, soluble e insoluble, para este último vegetal. Estos valores son menores que los de la zanahoria encontrados por Akhtar *et al.* (2011). Todos estos vegetales arrojaron una disminución de oxalatos totales de 46,9 – 54,9 % y solubles de 50,0 – 66 % después de hervidos por el motivo descripto anteriormente. Los valores obtenidos de oxalato total para el nopal crudo fue de 296,23 mg/100 g y para el hervido 284,77 mg/100 g, representando una disminución del 3,9 %. Para el oxalato soluble se obtuvo un valor de 32,21 mg/100 g para el nopal crudo y 17,80 mg/100 g para el hervido, representando una disminución del 44,7 %. En cuanto al oxalato insoluble no hubo disminución del mismo sino que se produjo un incremento de 1,1 %. Esto mismo se observó en el trabajo de Savage *et al.* (2000), donde el oxalato insoluble en la chirivía (una hortaliza que se la emplea como raíz, similar a la zanahoria), y la espinaca *Spinacia oleracea* aumentaron un 20 % y 0,8 % respectivamente después de hervidos.

Como se mencionó en el ítem **2.2.2.**, los requerimientos diarios de calcio se estiman entre 1000 y 1200 mg. Con lo cual, tomando 1100 mg como promedio de la IDR consumir, por ejemplo, 100 g de nopal hervido representaría un 17,6 % de la IDR, cuando otros alimentos, como la “leche fluida entera ultrapasteurizada extra calcio natural” de La Serenísima que posee 140 mg de calcio por cada 100 ml, representaría un 12,7 % de la IDR. Por otra parte, el queso en feta “Danbo” de La Serenísima posee 255 mg de calcio por porción (30 g). En este caso serían 850 mg de calcio por cada 100 g de queso feta, lo que representa 77,3 % de la IDR. Considerando estos valores, el nopal podría ser una alternativa más para las personas que llevan un estilo de vida vegetariano o vegano para que puedan cumplir con la IDR.

En la **Tabla X** se pueden observar los valores de la relación entre los mEq

Oxalato/mEq Calcio. De acuerdo al trabajo de Noonan y Savage (1999), mencionado anteriormente en el ítem 2.2.3.3., se puede clasificar a los alimentos en tres grupos principales según la disponibilidad del calcio presente en ellos (**Tabla XI**). En esta tabla se puede observar, por ejemplo, que alimentos como la espinaca y la remolacha, a pesar de tener alto contenido en calcio, su relación con el oxalato es de 4,27 y 5,09 respectivamente, ubicándolos dentro del grupo 1 de la tabla por tener una relación mayor a dos.

Tabla XI. Grupos de alimentos de acuerdo a su contenido de la relación Oxalato/Calcio (mEq) extraído del trabajo de Noonan y Savage (1999).

Table 1. Oxalate (mg/100g, fresh weight (FW)), calcium (mg/100g FW) and oxalate/calcium (mEq) ratio of some common foods. These foods have been divided into three main groups on the basis of their oxalate/calcium ratio. Group 1, > 2.0; Group 2, 1.0–2.0; Group 3, < 1.0.^{3,21,44}

Foodstuff	Oxalate (mg/100g FW)		Calcium (mg/100g FW)		Oxalate/Ca (mEq)
	Range	Mean	Range	Mean	
Group 1					
Rhubarb (<i>Rheum rhaponticum</i>)					
Victoria, forced, stewed	260		12-4		9-32
raw	275-1336	805	40-50	45	7-95
Common sorrel (<i>Rumex acetosa</i>)	270-730	500	35-45	40	5-56
Red beetroot (<i>Beta vulgaris</i>)	121-450	275	121-450	275	5-09
Garden sorrel (<i>Rumex patientia</i>)	300-700	500	40-50	45	4-94
Pig spinach (<i>Chenopodium</i> spp.)	1100		99		4-94
Purslane (<i>Portulaca oleracea</i>)	910-1679	1294	13-236	125	4-60
Spinach (<i>Spinacia oleracea</i>)	320-1260	970	80-122	101	4-27
Garden orach (<i>Atriplex hortensis</i>)	300-1500	900	100		4-00
NZ spinach (<i>Tetragonia expansa</i>)	890		100		3-96
Coffee (<i>Coffea arabica</i>)	50-150	100	10-15	12	3-70
Cashew (<i>Anacardium occidentale</i>)	231		41		2-50
Cocoa (<i>Theobroma cacao</i>)	500-900	700	100-150	125	2-49
Beet leaves (<i>Beta vulgaris</i> var. cicla)	300-920	610	100-120	110	2-46
Rhubarb (<i>Rheum rhaponticum</i>)					
Crimson, end of season, stewed	460		91-5		2-23
Group 2					
Potato (<i>Solanum tuberosom</i>)	20-141	80	10-34	22	1-62
Amaranth (<i>Amaranthus polygonoides</i>)	1586		595		1-18
Tea (<i>Thea chinensis</i>)	300-2000	1150	400-500	450	1-14
Amaranth (<i>Amaranthus tricolor</i>)	1087		453		1-07
Rhubarb (<i>Rheum rhaponticum</i>)					
Victoria, end of season, stewed	620		266		1-04
Group 3					
Apple (<i>Malus</i> spp.)	0-30	15	5-15	10	0-67
Blackcurrant (<i>Ribes nigrum</i>)	2-90	50	19-50	35	0-63
Tomato (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	5-35	20	10-20	15	0-58
Parsley (<i>Petroselinum sativum</i>)	140-200	170	180-290	235	0-32
Cabbage (<i>Brassica oleracea</i>)	0-125	60	200-300	250	0-11
Lettuce (<i>Lactuca sativa</i>)	5-20	12	73-90	81	0-07

Esto significa que no contienen calcio utilizable y poseen un exceso de oxalatos que puede combinarse con el calcio del organismo o de otros alimentos ingeridos al mismo tiempo. Analizando el caso de las tres muestras de nopales (crudo, hervido y horneado), sus

valores estarían dentro del grupo 3 donde dicha relación es menor a 1. Esto significa que en los nopales no se reduciría la disponibilidad del calcio en relación a otras fuentes de este mismo mineral. Las muestras de nopales serían similares, por ejemplo, a la manzana o el casis (grosella negra) por tener una relación de 0,67 y 0,63 respectivamente.

Por otro lado en el trabajo de Ramírez-Moreno *et al.* (2011) sobre nopales, concluyen que también la variedad Milpa Alta, cruda y cocida, son biodisponibles.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se pudo llevar a cabo la investigación sobre nopales en forma cruda, hervida y horneada, con el objetivo de evaluarlos como eventual fuente de calcio. Estos tipos de cocción fueron establecidos en relación a cómo son consumidos en Argentina. Se realizaron análisis por triplicado para obtener valores representativos de los nopales provenientes del Chaco, Las Breñas. Como fue mencionado en el trabajo se recibieron dos envíos diferentes, con lo cual esto llevó a tener diferencias en los resultados a la hora de sacar conclusiones, como se puede observar en los valores obtenidos en cuanto al contenido de calcio, siendo de 3217 ± 12 , 3133 ± 69 y 1947 ± 26 mg Ca/100 g en b.s. para el nopal crudo, hervido y horneado, respectivamente. Asimismo, se habló de la importancia de los oxalatos y sobre todo la del oxalato soluble el cual es el principal responsable de que, combinado a ciertos minerales, en este caso al calcio, los hace no disponibles para su absorción. Por este motivo se decidió llevar a cabo este análisis, donde se obtuvo 4593 ± 35 mg/100 g (b.s.) de oxalato total para el nopal hervido, de los cuales 287 ± 20 mg/100 g (b.s.) son solubles. Lo mismo se realizó con el nopal crudo obteniendo 4557 ± 36 mg/100 g (b.s.) de oxalato total y 496 ± 36 mg/100 g (b.s.) de oxalatos solubles. En el horneado se realizaron las mismas determinaciones pero en este caso en particular, al emplear un envío diferente, no se puede considerar que fuera la misma muestra a fines comparativos. Sin embargo, sí se pudo comparar el crudo y el hervido, observándose que hubo una disminución del 57,9 % en el oxalatos soluble del hervido con respecto al crudo debido a que los solutos tienden a difundir hacia el medio de cocción, en este caso el agua. Esto hace suponer que comer nopal hervido sería mucho más beneficioso para la salud que nopal crudo. En cuanto a los oxalatos insolubles se debe rescatar que es el resultado de la diferencia entre los oxalatos totales menos el soluble. Sin embargo, su ingesta no es de mayor importancia ya que este no tiene posibilidad de combinarse con ningún mineral dentro del organismo ni de otros alimentos que se consuman al mismo tiempo.

Una vez determinados el calcio y el oxalato, se estableció una relación entre ellos para evaluar si efectivamente el calcio podía estar en forma disponible para el organismo. Siguiendo los lineamientos del trabajo de Noonan y Savage (1999), los cuales dividieron en tres grupos diferentes los alimentos en función de la relación en mEq oxalato/mEq calcio, se efectuaron los cálculos correspondientes obteniendo resultados positivos, ubicando a los nopales del Chaco en el grupo junto a otros vegetales en los cuales el calcio se encontraría biodisponible para su absorción. Lo mismo sucedió al comparar la relación llevada a cabo con los nopales de Chaco con otros trabajos. Esto nos llevaría a deducir que el calcio presente en los nopales de Chaco, las Breñas, podría ser eventualmente fuente de calcio.

Por otra parte, también se pudo analizar otros aspectos en cuanto a la composición de los nopales, ya que en Argentina no hay muchos estudios relacionados con estas cactáceas con el objetivo de aportar datos que puedan ser de utilidad a investigaciones posteriores.

A partir de los datos obtenidos en este trabajo, se necesitaría realizar estudios futuros, in vivo o con algún ensayo que simule la digestión gastrointestinal, para analizar la verdadera biodisponibilidad del calcio presente en nopales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C. N., Rodríguez, H. R., Saucedo, P. S. y Jasso, C. D. 2008. Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología. Editorial Path Design Saltillo, Coahuila, México. 579 p.
- Aguirre-Cárdenas, M., García-Delgado, P., González-González, R., Jofre-Garfias, A. L., Legorreta-Siañez, A.V. y Buenrostro-Zagal, J. F. 2011. Desarrollo y evaluación de una película comestible obtenida del mucílago del nopal (*Opuntia ficus indica*) utilizada para reducir la tasa de respiración de nopal verdura. En: VIII Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Lima, Perú 23 al 26 de octubre. 1-5. pp.
- Akhtar, M. S., Israr, B., Bhatti, N. and Ali, A. 2011. Effect of cooking on soluble and insoluble oxalate contents in selected Pakistani vegetables and beans. *International Journal of Food Properties*, 14:241–249. ISSN: 1094-2912.
- Amalraj, A. y Pius, A. 2015. Bioavailability of calcium and its absorption inhibitors in raw and cooked green leafy vegetables commonly consumed in India – An in vitro study. *Tamil Nadu, India. Food Chemistry* 170. 430-436.
- Andrade-Ceto, A. y Wiedenfeld, H. H. 2011. Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. *Journal of Ethnopharmacology*. 133:940-943.
- AOAC International (Association of Oficial Analytical Chemistry).2000.
- Araújo, L. F., Nuñez A., Perazzo A., de Sousa, L. y Honorato da Silva, F. L. 2005. Protein enrichment of cactus pear (*Opuntia ficus - indica* Mill.) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48:161-168.
- Atalah, E. y Pak, N. 1997. Aumente el consumo de verduras, frutas y legumbres. Guías de alimentación para la población chilena. Castillo, C., Uauy, R. and Atalah, E. (Eds.). Santiago, Chile. 164 p.
- Acikgoz, A., Gunay, T. y Ucku, R. 2013. Vitamin D requirements supplementation during pregnancy. *12 (5): 597-608*.

- Barbera, G. y Pimienta Barrios, E. 1999. Agroecología, cultivo y usos del nopal. Roma. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, producción y protección vegetal, 132.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G. y Goñi I. 2010. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods Human Nutrition* 65: 210-216.
- Ben Salem, H., Nefzaoui, A., Abdouli, H. y Orskov, E. 1996. The effect of increasing level of spineless cactus (*Opuntia ficus-indica* var-*intermis*) on intake and digestion by sheep given straw based diet. *Animal Science Journal* 62:293-299.
- Bourges, H., Casanueva, E., Rosado, J. L. 2005. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana. Bases fisiológicas. I. Vitaminas y nutrimentos inorgánicos. Ciudad de México (México): Editorial Médica Panamericana
- Bravo-Hollins, H. 2002. Pencas de antaño. El Nopal. *Artes de México* 59: 8-15.
- Brogren, M. y Savage, G. P. 2003. Bioavailability of soluble oxalate from spinach eaten with and without milk products. *Asia Pacific Journal Clinic Nutrition*: 12 (2): 219-224.
- Candelario Mondragón, J. y Pérez González, S. 2003. El nopal (*Opuntia* spp.) como forraje. Roma. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Protección y Protección Vegetal, 169. ISSN 1014-1227.
- Cárdenas, A., Valderrama, J. R., Hernández, G. y Goycoolea, F. M. 1999. Biopolímeros de alto valor de plantas nativas del desierto: riqueza sustentable desaprovechada. En *Memorias del Simposio Internacional sobre Utilización y Aprovechamiento de la Flora Silvestre de Zonas Áridas*. La Serena, Chile.
- Cashman, K. D. 2002. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *British Journal Nutrition* 87 (Suppl 2):169-177
- Castro Marcelo, J. J., Paredes Rodríguez, C. y Muñoz Alva, D. 2009. El cultivo de tuna, *Opuntia ficus indica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad. 18p.
- Catherwood, D. J., Savage, G. P., Manson, S. M., Scheffer, J. J. y Douglas, J. A.

2007. Oxalate content of cormels of Japanese taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) and the effect of cooking. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 147 – 151.
- Cavalcante, F. S. y Carvalho, C. L. 2007. Palma forrageira (*Opuntia Ficus-Indica* Mill.) como alternativa na alimentação se ruminantes *Revista Electrónica de Veterinaria* 8(5):1-11.
- CEZA (Centro de Estudios de Zonas Áridas). 2001. TUNA (*Opuntia ficus-indica*), Disponible en: <http://www.provar.uchile.cl/doc/TUNA%202011.pdf> [Consulta: el 27/08/16].
- Cifuentes, M. 2011. Fisiología del metabolismo de calcio y fósforo. *Revista de la industria de alimentos y del packaging*. N°70.
- Chahdoura, H., Morales, P., Barreira, J. C. M., Barrosa, L., Fernández-Ruiz, V., Ferreira, I. y Achourb, L. 2015. Dietary fiber, mineral elements profile and macronutrients composition in different edible parts of *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff and *Opuntia macrorhiza* (Engelm.). *LWT– Food science Technology*, 64: 446-451.
- Contreras-Padilla, M., Gutiérrez- Cortez, E., Valderrama- Bravo, M. C., Rojas-Molina, I., Espinosa- Arbeláez, D. G., Suárez- Vargas, R. y Rodríguez- García, M. E. 2012. Effects of drying process on the physicochemical properties of nopal cladodes at different maturity stages. *Plant Food Human Nutrition*, 67:44-49.
- Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Urbiola, M., Hernández-Quevedo, G., del real, A., Rivera-Muñoz, E. y Rodríguez-García, M. 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. redonda) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 38–43.
- Corrales, J. 1994. Calidad y normas de los frutos. A. Villegas M. y otros, eds. Memoria de la reunión: Frutales nativos e introducidos con demanda nacional e internacional. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México: 223-234.
- Craig, W.J. 2009. Health effects of vegan diets. *American Journal of Clinical*

- Nutrition, 89(5):1627S-1633S.)
- Craig W.J.2010. Nutrition Concerns and Health Effects of Vegetarian Diets. Nutrition in Clinical Practice, 25 (6): 613-20
- De la Rosa, H. P. y Santana A. 1998. El Nopal: usos, manejo agronómico y costos de producción. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. pp. 129-145.
- Dionello, R.G., Berbert, P.A., Molina, M.A.B., Pereira, R.C., Viana, AP. y Carlesso, VO. 2009. Osmotic dehydration of sliced pineapple of two cultivars in inverted sugar Nyrup. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 13: 596 –605
- Emkey, R. D y Emkey, G. R. 2012. Calcium metabolism and correcting calcium deficiencies. Endocrinology Metabolism Clinics of North America, (41): 527-556.
- Faggi, G. M. y Petkoff Bankoff, J. E. 2012. Evaluación del consumo de agua en cabras con utilización de pencas de tuna en periodo invernal en el sudoeste chaqueño. Disponible en <http://inta.gob.ar/documentos/evaluacion-del-consumo-de-agua-en-cabras-con-utilizacion-de-pencas-de-tuna-en-periodo-invernal-en-el-sudoeste-chaqueno-1>. [Consulta: 08/02/2017].
- Feugang, J. M., Konarski, P., Zou, D., Stintzing, F. C. y Zou, C . 2006. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. Frontiers in Bioscience, 11:2574-2589.
- Flores, H. A., Murillo, S. M., Borrego, E. F. y Rodríguez, O. J. L. 1995. Variación de la composición química en estratos de la planta de 20 variedades de nopal. E. Pimienta-Barrios, C. Neri-Luna, A. Munoz U. & F. Huerta M. (comp.). Memorias del 6º Congreso Nacional y 4º Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Jalisco, México.
- Flores-Valdez, C. 2003. Importancia del nopal. Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1ª Ed. Universidad Autónoma Chapingo, CUESTAAM. México, p. 1-18.
- Gonzalez, C. 1989. Potential of fertilization to improve nutritive value of prickly pear

- cactus (*Opuntia lindheimeri* Engelm.). *Journal of Arid Environment*, 22:323-331.
- Gosh, S. y Savage, G. P. 2013. Oxalate content of Indian spinach dishes cooked in a wok. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30: 125 – 129.
- Granados, S.D. y Castañeda, A. D. 1996. El nopal: historia, fisiología, genética e importancia. E. Trillas – UACH. México, D.F. p 227.
- Gueguen, L. y Pointillart, A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 19: 119S-136S.
- Guzmán Loayza, D. y Chávez, J. 2007. Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73: 41-45.
- Hammouch, H., Srhiri, A., Ajjaji, N. y Binghamouch, L. 2004. Inhibition of iron corrosion using *Opuntia* extract. Resúmenes. 3er Congreso Nacional de la Tuna, Ben Guerir, Marruecos.
- Hernández, J. B. y Serrano, G. R. 2003. Uso del nopal en la industria de la construcción. p. 286-289. In: Memorias. IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, Zacatecas. México.
- Ho-Pham, L.T., Nguyen, N.D., Nguyen, T.V. 2009. Effect of vegetarian diets on bone mineral density: a Bayesian metaanalysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(4):943-50.)
- Li D. 2011. Chemistry behind Vegetarianism. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 59(3):777-84.
- López, E. 2000. Utilización de productos naturales en la clarificación de aguas para consumo humano. Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería Química. ISPJAE. Universidad de la Habana. La Habana.
- López-García, J.J., Rodríguez, F.M., y Rodríguez, G.A. 2001. Production and use of *Opuntia* as forage in northern México. Mondragón J. C. y Pérez G. (Eds.) *Cactus (Opuntia spp.) as forage* FAO Plant Production and Protection Paper 169. Rome. Italy.

- Martínez, B. O. U. y G. J. Lara G. 2003. Potencial productivo de áreas de temporal en el estado de Coahuila una propuesta de conversión productiva. Publicación Especial No. 1. Campo Experimental Saltillo - INIFAP, Saltillo, Coahuila. México.
- Marsh, K., Reid, M., Zeuschmer, C. y Saunders, A. 2009. "Meeting Nutritional needs on vegetarian diet". Australian Family Physician vol.38 N° 8, pag. 600-602.
- Mazzeo, T., N'Dri, D., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V. y Pellegrini, N. 2011. Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. Food Chemistry, 128: 627–633.
- McConn, M., Nakata, A. 2004. Oxalate reduces calcium availability in the pads of prickly pear cactus through formation of calcium oxalate crystals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1371-1374.
- Miller, G. D. y Anderson, J. J. B. 1999. The role of calcium prevention of chronic diseases. Journal of the American College of Nutrition, 18 (Suppl):371S-372S
- Noonan, S. C. y Savage, G. P. 1999. Oxalate content of foods and its effect on humans. Asia Pacific Journal Clinic Nutrition, 8 (1): 64 - 74.
- Noonan, S.C. y Savage, G.P. 1999. Oxalate content of foods and its effect on humans. Asia Pacific Journal Clinics Nutrition; 8 (1): 64 - 74.
- Oliveira M. A. 2001. Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and *Opuntia ficus indica*. Química Nova. 24:307-310.
- Peacock M. 2010. Calcium metabolism in health and disease. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 5 Suppl 1:S23-30.
- Peñuela Teruel, M. J. 1994. Influencia de los procesos de cocción y conservación sobre el contenido de nitratos y nitritos. Tesis doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.
- Pérez Méndez, L., Flores, F.T., Martín, J. D., Rodríguez, E. M. y Díaz Romero, C. 2015. Physicochemical characterization of cactus pads from *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus indica*. Food Chemistry, 188: 393-398.

- Pimienta, E. 1990. El nopal tunero. Universidad de Guadalajara, México. 246 pp
- Pingle, S. A. y Pawar, V. R. 2016. Effect of heat on calcium from different milk samples from Sangamner Taluka, Maharashtra. International Science Journal. Volume - 3 Issue-1 (2016) ISSN: 2348-604X(p), 2348-6058(e).
- Quesada Gómez, J.M. y Sosa Henríquez, M. 2010. Nutrición y Osteoporosis. Revista de Osteoporosis y metabolismo mineral, 3-4:165-182
- Ramírez-Moreno, E., Díez Márquez, C., Sánchez-Mata, M. C. y Goñi, I. 2011. In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). LTW Food Science and Technology, 44: 1611-1615.
- Rodríguez-Félix, A., y Cantwell, M. 1988. Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). Plant Foods for Human Nutrition, 38: 83-93.
- Rodríguez-García, M. E., De Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M. A, Palacios-Fonseca, A. J, Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L. C., Del Real, A., Zepeda, T. A. y Muñoz-Torres C. 2007. Physicochemical characterization of nopal (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum powders as a function of the maturation. Plant Foods Human Nutrition, 62 (3):107-112.
- Rovirosa, A., Zapata, M. E. y Flax Marco, F. 2012. El papel del Calcio y la vitamina D en la salud ósea y mas allá. Del balance nutricional a la ingesta en el hogar. Ingesta de calcio: situación en la Argentina. p. 55-79.
- Sáenz, C. 2006. Utilización agroindustrial de nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Producción y Protección vegetal, 162. Roma. ISSN 1020-4334.
- Savage, G. P., Vanhanen, L., Mason, L. S. and Ross, A. B. 2000. Effect of Cooking on the Soluble and Insoluble Oxalate Content of Some New Zealand Foods. Journal of Food Composition and Analysis, 13: 201-206.
- Sellmeyer, D.E., Schloetter, M. y Sebastian, A. 2008. Potassium citrate prevents increased urine calcium excretion and bone resorption induced by a high sodium chloride diet. Journal of Clinical Endocrinology Metabolism, (87): 2008-12.

- Sudzuki, F. 1999. Anatomía y morfología. pp. 29-36. Barbera, G., Inglese, P. y Pimienta, E., eds. Agroecológica, cultivo y usos del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Producción y Protección Vegetal, 132. Roma.
- Sudzuki, F., Muñoz, C. y Berger, H. 1993. El cultivo de la tuna (Cactus Pear). Departamento de Reproducción Agrícola. Universidad de Chile.
- Tegegne, F. 2002. Fodder potencial of *Opuntia ficus-indica*. Acta Horticulturae. 581: 343-345.
- Tipton, K.D. y Witard, O.C. 2007. Protein requirements and recommendations for athletes: Relevance of ivory tower arguments for practical recommendations. Clinics in Sports Medicine, 26:17-36
- Torres Acosta, A. A., Martínez, M. y Celis, C. 2004. Cement-based mortar improvement from nopal and Aloe vera additions. 4º Foro de Investigación UDEM: Universidad de Monterrey, Monterrey, Nuevo León, México.
- Torres-Acosta, A. A., Martínez-Madrid, M., Loveday, D. C. y Silsbee, M. R. 2005. Nopal and Aloe vera additions in concrete: electrochemical behavior of the reinforcing steel. Paper No. 05269. 60th Annual Conference and Exposition CORROSION/2005, NACE International, Houston, Texas. Estados Unidos de América.
- Torres-Ponce, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. L. y Nevárez-Moorillón, G.V. 2015. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.6 Núm.5 p. 1129-1142
- Uebelhack, R., Busch, R., Alt, F., Beah, Z-M. y Chong, P-W. 2014. Effects of Cactus Fiber on the Excretion of Dietary Fat in Healthy Subjects: A Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Clinical Investigation. Current Therapeutic Research, 76:39- 44
- Valdez, C. R. D., Blanco, M., Gallegos, V., Salinas G. y Vázquez A. 2001. Freezing tolerance of *Opuntia* spp. Journal of the Professional Association for Cactus Development, 4: 111-115.
- Vargas-Rodríguez, L., Arroyo Figueroa, G., Herrera Méndez, C. H., Pérez Nieto, A.,

García Vieyra, M. I. y Rodríguez Núñez, J. R. 2015. Propiedades físicas del mucílago de nopal. Acta Universitaria, 26(NE-1), 8-11. doi: 10.15174/au.2016.839

Velázquez, E. 1998. El nopal y su historia. Editorial Clío, Libros y Videos, México.
96 p

Weaver, C. M., Heaney, R., Shils, M.E., Shike, M., Ross, A.C., Cabellero, B. y Cousins, R.J. 2006. Modern Nutrition in Health and Disease, 10th Edition. Lippincott Williams & Wilkins .

ANEXOS

6. 1. ANEXO I - Materiales, insumos y equipos

6.1.1. Materiales

- Bowl plástico
- Bureta de 50 ml
- Buzos magnéticos
- Cacerola
- Condensador
- Crisoles
- Cuchillo
- Embudos chico y mediano
- Erlenmeyer 250 ml
- Erlenmeyer con boca esmerilada de 250 ml
- Escurridera
- Frascos de vidrio color caramelo
- Material poroso
- Matraces de 500, 250, 100 y 25 ml
- Mechero
- Micropipeta de 100-1000 y 5000 μ l
- Papel de filtro
- Pipetas de 10, 5, 2 y 1 ml
- Pipetas doble aforo de 50, 20 y 5 ml
- Placa de Petri de vidrio de 150 ml
- Plato
- Probeta de 250, 100 y 50 ml
- Tamiz de mesh N° 25

- Thimbles (cápsulas de extracción)
- Tips
- Tubos de centrífuga Falcon de 50 ml
- Varilla de vidrio
- Vasos de precipitados de 250 y 100 ml
- Vessels

6.1.2. Insumos

- Acetato de sodio
 - Ácido acético glacial
 - Ácido bórico 2%
 - Ácido clorhídrico 0,1 N titulado
 - Ácido clorhídrico concentrado
 - Ácido fosfórico concentrado
 - Ácido nítrico p.a.
 - Ácido sulfúrico concentrado
 - Agua destilada
 - Catalizador sulfato de potasio + sulfato cúprico (99 + 1)
 - Cloruro de calcio
 - Cloruro de lantano
 - Estándar de calcio de 1000 mg/l en HNO₃ 2%
 - Éter de petróleo 40-60 °C.
 - Fenolftaleína
 - Hidróxido de amonio concentrado
 - Hidróxido de sodio al 40 %
 - Oxalato de sodio
 - Permanganato de potasio
 - Rojo de metilo enmascarado
 - Tungstato de sodio (Na₂WO₄·H₂O)
-

6.1.3. Equipos

- Agitador magnético
- Balanza analítica
- Destilador K-355 “Buchi”
- Digestor K-424 “Buchi”
- Espectro de Absorción Atómica Perkin Elmer A Analyst 100
- Horno Pauna
- Liofilizador L-I-E300-CRT “RIFICOR”
- Molinillo de café
- Mufla a 550 °C
- Potenciómetro TPXI “Altronix”
- Soxhlet “Velp Scientifica”
- Ultrafreezer a -60 °C

6.2. ANEXO II – Metodologías AOAC

VEGETABLE PRODUCTS, PROCESSED
Chapter 42, p. 8

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2000)

50–250 mg NaCl to 250 mL beaker. If test sample is prepared by (c), transfer weighed aliquot containing 50–250 mg NaCl to tared 250 mL beaker. Proceed as in D, beginning "...dilute to ca 50 mL with H₂O..."

$$\text{NaCl, \%} = F \times \text{mL } 0.0856\text{M AgNO}_3 / 10$$

where F = dilution factor = 100/mL aliquot titrated if test sample is prepared by (a) or (b) or 50/g aliquot titrated if prepared by (c).

(c) *General case*.—Accurately weigh approximately test sample weight stated. (If % NaCl \geq 5%, weigh <5 g sample rather than diluting to 100 mL, if more convenient.) Use ca 0.1M AgNO₃ solution, accurately standardized as in D, without adjusting its specific molarity, and titrate as in D.

$$\text{NaCl, \%} = \frac{\text{mL AgNO}_3 \times \text{M AgNO}_3 \times 0.05844 \times 100}{\text{g test sample}}$$

If test sample is overtitrated, add NaCl standard solution, and complete titration. Correct for volume of standard solution added.

References: *JAOAC* 54, 471 (1971); 57, 1209 (1974).

CAS-7647-14-5 (sodium chloride)

42.1.16

AOAC Official Method 925.52 Sugars in Canned Vegetables First Action 1925 Final Action

A. Reducing Sugars Before Inversion

Weigh 20 g test sample into 200 mL volumetric flask, dilute with ca 100 mL H₂O, clarify with slight excess of neutral Pb(CH₃COO)₂ solution, 925.46B(d) (see 44.1.07), dilute to volume, and filter. Remove excess Pb with anhydrous Na₂SO₄ or with dry sodium or potassium oxalate. Filter, and determine reducing sugars as in 906.03 * B (see 44.1.16). Express result as % invert sugar.

B. Reducing Sugars After Inversion

Transfer 50 mL filtrate, A, to 100 mL volumetric flask, add 5 mL HCl, and let stand overnight, as in 925.48(c) (see 44.1.09). Nearly neutralize with NaOH solution, cool, dilute to volume, and determine reducing sugars in aliquot as in 906.03 * B (see 44.1.16). Express result as % invert sugar.

C. Sacrose

See 930.36 (see 44.1.13).

42.1.17

AOAC Official Method 925.53 Acids (Total) in Canned Vegetables First Action 1925 Final Action

Proceed as in 942.15A or B (see 37.1.37), using 5 g test portion. Express result as mL 1M alkali required to neutralize 100 g test sample.

© 2000 AOAC INTERNATIONAL

42.1.18

AOAC Official Method 974.24 Oxalic Acid in Canned Vegetables Calcium Oxalate Precipitation Method First Action 1974 Final Action 1975

A. Reagents

(a) *Indicator paper*.—Short-range Alkacid (No. 2, pH 3.5–5.5, Fisher Scientific Co., or equivalent).

(b) *Potassium permanganate solutions*.—(1) Approximately 0.1M.—Prepare and standardize as in 940.35 (see A-1.10). (2) Approximately 0.1M.—Dilute 100 mL 0.1M to 1 L. Prepare fresh before use.

(c) *Acetate buffer solution*.—pH 4.5. Dissolve 2.5 g anhydrous CaCl₂ in 50 mL CH₃COOH (1 + 1) and add to solution of 13 g NaCH₃COO · 3H₂O diluted to 50 mL.

(d) *Wash liquid*.—Dilute 12.5 mL CH₃COOH to 250 mL with H₂O. Add powdered calcium oxalate, shake, and let stand. Repeat addition and shaking to saturation. Cool to 4°C and store in refrigerator. Just before use, filter amount needed. Keep cold during filtration and use.

(e) *Tungstophosphoric acid reagent*.—Dissolve 1.1 g Na₂WO₄ · 2H₂O in mixture of 4 mL H₃PO₄ and 50 mL H₂O, and dilute to 100 mL with H₂O.

(f) *Lanthanum solution*.—5%. Wet 5.9 g La₂O₃ with H₂O, then slowly add 25 mL HCl to dissolve, and dilute to 100 mL with H₂O.

(g) *Calcium standard solutions*.—(1) 1 mg/mL.—Sturry 2.0% CaCO₃ (primary standard grade) in 1 L volumetric flask with 300 mL H₂O. Carefully add 10 mL HCl. After CO₂ is completely leached, dilute to volume with H₂O. (2) 0.05 mg/mL.—Dilute 5.0% solution (1) to 100 mL with H₂O.

B. Apparatus

Atomic absorption spectrophotometer.—Perkin-Elmer Model 303, or equivalent double beam instrument. Typical operating parameters for this apparatus are given in Table 974.24. Operator may be familiar with optimum settings for apparatus and use only as guide.

C. Preparation of Sample

Determine net weight of contents of can. Transfer quantity to high-speed blender, rinsing can with 100 mL H₂O added in bucket or pipet. Homogenize 1.5 min and cool to room temperature.

Accurately weigh ca 35 g test slurry into 800 mL beaker. Add H₂O to bring total weight to ca 300 g; then add 55 mL 6M HCl.

Table 974.24 Operating parameters for oxalic acid determination

Wavelength, nm	422.7
Slit width, nm	1-setting 4
Hollow Zn-Ca cathode lamp, ma	15–20
Air, aspirating	9.0 (scale direct)
Acetylene fuel	9.5 (scale direct)
Flame	reducing
Height, burner to light path, in.	ca 0.5
Sample uptake, mL/min	5
Optimum concentration range, µg/mL	0–16

drop caprylic alcohol, and boil 15 min. Cool, transfer quantitatively to 500 mL volumetric flask, dilute to volume with H₂O, mix, let stand overnight. Mix, and filter through fast quantitative paper, discarding first 100 mL filtrate.

D. Precipitation of Oxalic Acid

Pipet 25 mL filtrate into 50 mL Erlenmeyer, add 5.0 mL metaphosphoric acid reagent, mix, and let stand 25 h. Filter through Whatman No. 30 quantitative paper, or equivalent. Pipet 1 mL filtrate into 50 mL conical centrifuge tube and add NH₄OH dropwise to pH 4–4.5, using indicator paper, (a). Add 5 mL buffer solution, (c), and stir with glass rod. Rinse rod into centrifuge tube with small stream of H₂O and let stand overnight.

Centrifuge ≥15 min at 1700 rpm to compact precipitate. Decant supernate with one smooth continuous inversion of centrifuge tube. Hold tube upside down and let remaining supernate drip completely into clean filter paper. Do not disturb calcium oxalate precipitate. Wash precipitate by completely breaking it into fine suspension with jet stream of 20 mL filtered cold wash liquid, (d). Repeat centrifuging and decanting steps, taking care that precipitate is drained completely. Discard paper. Add 5 mL H₂SO₄ (1 + 9) to precipitate, heated with permanganate titration or AA determination.

E. Determination by Permanganate Titration

Heat sample and blank (5 mL H₂SO₄ (1 + 9) in 50 mL centrifuge tube) prepared solutions in boiling H₂O bath. Treat hot solution with 0.002M KMnO₄ until first pink persists 30 s.

$$\text{mg Oxalic acid/100 g product} = \frac{0.002M \text{ KMnO}_4 \times 1350 \times \text{net weight} \times 100 \text{ g}}{\text{weight slurry taken} \times \text{net weight}}$$

where 1350 = 0.45 (mg anhydrous oxalic acid equivalent to 1 mL 0.002M KMnO₄) × [(30/20) × (500/25) (dilution factors)] × 100 (to convert to 100 g product).

F. Determination by Atomic Absorption

Quantitatively transfer entire contents of centrifuge tube to 10 mL volumetric flask with H₂SO₄ (1 + 9) and dilute to volume with same solution (solution I). Pipet 2 mL solution I into 50 mL volumetric flask containing 10.0 mL La solution, (D). Dilute to volume with H₂O (solution II). Transfer 15.0 mL solution II to 25 mL volumetric flask containing 2 mL La solution. Dilute to volume with H₂O.

Pipet 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, and 12.0 mL CaCO₃ solution, (E)(2), into separate 50 mL volumetric flasks. Pipet 10 mL La solution into each and dilute to volume with H₂O.

Set instrument to previously established optimum conditions or according to manufacturer's instructions. Determine A of sample and standard solutions, taking 22 standard readings before and after sample readings. Flush burner with H₂O and check 0 point between readings. Correct for reagent blank reading, if significant, and determine Ca concentration from standard curve obtained by plotting A against µg Ca/mL.

$$\text{mg Oxalic acid/100 g product} = \frac{(\mu\text{g Ca/mL}) \times 2807.5 \times \text{net weight} \times 100 \text{ g}}{\text{weight slurry taken} \times \text{net weight}}$$

where 2807.5 = 2.246/1000 (to convert µg Ca to mg oxalic acid) × [25 × (50/15) × (10/2) × (30/20) × (500/25) (dilution factors)] × 100 (to convert to 100 g product).

Reference: JAOAC 56, 164, 1030(1973).

CAS-844-62-7 (oxalic acid)

42.1.19

AOAC Official Method 945.99 Lactic Acid in Canned Vegetables Spectrophotometric Method First Action 1945 Final Action

Weigh 50 g ground and mixed test sample into tared centrifuge bottle and add 100 mL H₂O. Make acid to Congo red paper with 0.5M H₂SO₄. Adjust weight of contents of bottle to 200 g by addition of H₂O, shake vigorously, and centrifuge. Decant supernate and weigh 100 g into 100–110 mL volumetric flask. Dilute to 110 mL mark with H₂O, shake, and pipet 50 mL into continuous extractor (Figure 932.08 [see 33.2.07]). Add 0.5 mL H₂SO₄ (1 + 1) and 2 mL 20% Na₂WO₄·2H₂O solution, and proceed as in 937.05 (see 33.2.08).

If laboratory sample contains CH₃COOH added in course of manufacture (e.g., catsup), transfer extracted material, after evaporation of ether, to beaker, add ca. 50 mL H₂O, and evaporate to 20 mL. Again add 50 mL H₂O and evaporate to 20 mL. Neutralize with saturated Ba(OH)₂ solution and proceed as in 937.05E (see 33.2.08).

CAS-50-21-5 (lactic acid)

42.1.20

AOAC Official Method 926.09+ Field Corn in Canned Mixtures of Field and Sweet Corn First Action 1928 Final Action Surplus 1965

See 38.01.6, 10th Ed.

Subchapter 2 DRIED VEGETABLES

42.2.01

AOAC Official Method 967.19 Water in Dried Vegetables First Action 1967 Final Action 1969

(Dry all glassware in oven.)

A. Preparation of Sample

Grind laboratory sample to pass No. 30 sieve and store in tightly sealed container.

Near-Infrared Spectrophotometric Method

Caution: See Appendix B, safety notes on dimethylformamide.

B. Apparatus

Spectrophotometer.—Near-IR recording instrument.

32. Cereal Foods

Ralph H. Lane, *Chapter Editor*
University of Alabama

Subchapter 1 WHEAT FLOUR

32.1.01

AOAC Official Method 925.08 Sampling of Flour

First Action 1925
Final Action

Sample number of sacks equivalent to square root of number in lot, but ≥ 10 , i.e., 10 from ≤ 100 ; 15 from 225; 20 from 400 sacks, etc.

Select sacks to be sampled according to their exposure in ratio of 4 from most exposed, 3 from next less exposed, 2 from next, and 1 from least exposed portion of lot.

From each sack to be sampled, draw core from one center of top diagonally to center of sack by means of cylindrical, pointed, polished metal trim, $\frac{1}{2}$ in. (13 mm) diameter, with slit $\frac{1}{2}$ in. circumference. Draw second core from other top corner to $\frac{1}{2}$ distance to center of sack.

Deliver the 2 cores at once to clean, dry, air-tight container that is closed open for few min near lot of flour to be sampled, and seal immediately. Use separate container for each sack sampled. Use one of following containers: (1) pt (500 mL) fruit jar provided with rubber gasket; (2) rubber or plastic pouch that can be tied or sealed to exclude moisture or air; (3) tin can or box with moisture- and air-tight lission top.

Before opening laboratory sample for analysis, alternate invert and roll each container 225 times to sure homogeneous mixture. Avoid extreme temperatures and humidity when opening container for analysis. Keep laboratory tightly sealed at all other times.

Reference: *AOAC* 8, 424, 664(1925); 9, 39, 88, 423(1926).

32.1.02

AOAC Official Method 925.09 Solids (Total) and Moisture in Flour

Vacuum Oven Method
First Action 1925
Final Action

(Not applicable to flour mixes containing NaHCO_3 as ingredient.)

A. Apparatus

(a) *Moist dish*.—Diameter ca 55 mm, height ca 15 mm, with inverted slip-in cover fitting tightly on inside.

(b) *Air-tight desiccator*.—Reignited CaO is satisfactory drying agent.

(c) *Moisture oven*.—Connect with pump capable of maintaining partial vacuum in oven with pressure equivalent to ≤ 25 mm Hg (3.3 kPa) and provided with thermometer passing into oven in such way that bulb is near samples. Connect H_2SO_4 gas-drying bottle with vent to admit dry air when releasing vacuum.

B. Determination

Accurately weigh ca 2 g well-mixed test portion in covered dish previously dried at $98\text{--}100^\circ\text{C}$, cooled in desiccator, and weighed soon after reaching room temperature. Loosen cover (do not remove) and heat at $98\text{--}100^\circ\text{C}$ to constant weight (ca 5 h) in partial vacuum having pressure equivalent to ≤ 25 mm Hg (3.3 kPa). Admit dry air into oven to bring to atmospheric pressure. Immediately tighten cover on dish, transfer to desiccator, and weigh soon after reaching room temperature. Report flour residue as total solids and loss in weight as moisture (indirect method).

References: *AOAC* 8, 665(1925); 9, 39, 88(1926); 34, 278(1951).

32.1.03

AOAC Official Method 925.10 Solids (Total) and Moisture in Flour

Air Oven Method
First Action 1925
Final Action

[Results closely approximate those obtained by 925.09B (see 32.1.02).]

In cooled and weighed dish (provided with cover), 925.09A(a) (see 32.1.02), previously heated to $130 \pm 3^\circ\text{C}$, accurately weigh ca 2 g well-mixed test portion. Uncover test portion, and dry dish, cover, and contents 1 h in oven provided with opening for ventilation and maintained at $130 \pm 3^\circ\text{C}$. (1 h drying period begins when oven temperature is actually 130°C .) Cover dish while still in oven, transfer to desiccator, and weigh soon after reaching room temperature. Report flour residue as total solids and loss in weight as moisture (indirect method).

References: *AOAC* 8, 665(1925); 9, 40(1926).

32.1.04

AOAC Official Method 938.03 Extract (Cold-Water Soluble) of Flour

First Action 1938
Final Action

Weigh 20 g test portion into 500 mL Erlenmeyer and gradually add 200 mL H_2O at ca 0°C . Shake vigorously after ca 50 mL H_2O is added and continue shaking while adding remaining H_2O . Let mixture stand 40 min at 0°C , shaking occasionally. Filter rapidly, returning filtrate to filter until clear. Pipet 20 mL clear filtrate into weighed dish, evaporate to dryness on steam bath, and dry in vacuum oven at ca 100°C for 30 min periods to constant weight.

References: *AOAC* 21, 406(1938); 22, 76, 548(1939).

Nuts and Nut Products

Leon Prosky, Chapter Editor
Prosky Associates

AOAC Official Method 971.25 Volume of Packaged Nuts First Action 1971 Final Action 1973

Apparatus
Graduated cylinders.—(1) For less than 500 mL nuts.—Use graduated cylinder with ca 4.7 cm id. (2) For 500 mL or greater volume.—Use 1 L cylinder with ca 5.7 cm id.
Balance.—Accurate to 0.25 g.

Procedure
Fill funnel with minimum opening of 3.8 cm diameter (subfunnel may be shaped from smooth cardboard).

Procedure
Disintegrate and pour nuts loosely into vertical graduate (do not fill with funnel). Without shaking, estimate location of horizontal line representing average height of product, read volume at that level, and record minimum volume.

Drop nuts 5 cm and drop vertically onto level, firm, resilient surface (at ramp). Repeat total of 5 times and observe volume as the nuts fall in successive 5-drop increments until nuts have so much volume decrease $\leq 2\%$ in last 5-drop increment. Read volume above and record as "maximum volume." Arithmetical mean of "maximum" and "minimum" volume = mean volume.

Reference: AOAC 84, 584(1971).

AOAC Official Method 950.47 Preservation of Nut Sample Procedure First Action 1950

Store laboratory sample in air-tight container at 5–10°C. Store in glass containers only.

AOAC Official Method 935.52 Nuts and Nut Products Preparation of Sample Procedure First Action 1935

Whole shells—Remove meats from shells, and separate all almonds from meats. Skin or spermoderm should be included in total of nuts, including peanuts and coconuts unless specifically excluded by description. Prepare separated meats as in (b).

Crushed nuts, shelled coconuts, or small pieces—Grind (a) size through Enterprise No. 5 food chopper, equipped with serrated blade and plate with holes ca 3 mm diameter. (Other type of food choppers, grinders, or comminuting devices that give such homogeneous paste without loss of oil may be used.) Mix sample well and store in air-tight glass container.

(c) **Nut butters and pastes**—Transfer test sample to container of convenient size and shape, warming semi-solid products, and mix carefully with stiff-blade spatula or knife. (Electric mixers or stirrers may be used instead if test sample is of consistency to give uniform mixture.) Store test sample in air-tight glass container.

40.1.04 AOAC Official Method 925.40 Moisture in Nuts and Nut Products First Action 1925

(Not applicable to high sugar products or products containing glycerol or propylene glycol.)

Dry test sample representing ca 2 g dry material to constant weight (ca 5 h) at 95–100°C under pressure ≤ 100 mm Hg (13.3 kPa). Report loss in weight as moisture.

Reference: AOAC 8, 295(1925); 31, 521(1948); 32, 527(1949); 33, 753(1950); 34, 357(1951); 37, 845(1954).

40.1.05 AOAC Official Method 948.22 Fat (Crude) in Nuts and Nut Products Gravimetric Methods First Action 1948

(a) **Direct method**—If large amounts of soluble carbohydrates interfere with complete extraction of fat, extract with H_2O before making determinations. Extract ca 2 g test sample 16 h in Soxhlet-type extractor with ether, dried as follows: Wash commercial ether with 2 or 3 portions H_2O , add solid NaOH or KOH, and let stand until most H_2O is abstracted from ether. Decant into dry bottle, add small pieces of carefully cleaned metallic Na, and let stand until H_2 evolution ceases. Keep ether thus dehydrated, over metallic Na in loosely stoppered bottles. Evaporate ether, dry residue 30 min at 95–100°C, cool in desiccator, and weigh; continue this alternate drying and weighing at 30 min intervals to constant weight (1–1.5 h is usually required).

(b) **Indirect method**—Proceed as in 925.40 (see 40.1.04); then extract dried substance 16 h as in (a), and dry as in (a). Report loss in weight as ether extract.

Reference: AOAC 3-1, 521(1948); 33, 753(1950); 34, 357(1951); 37, 845(1954).

40.1.06 AOAC Official Method 950.48 Protein (Crude) in Nuts and Nut Products Improved Kjeldahl Method First Action 1950

Determine N as in 955.04C (see 2.4.03), and multiply result by 5.46 for peanuts and Brazil nuts, 5.18 for almonds, and 5.30 for other

45.4.02

AOAC Official Method 983.23
Fat in Foods
Chloroform-Methanol Extraction Method
First Action 1983
Final Action 1984

(Method is applicable to composite foods and foods for which methods of analysis for fat or lipids are not specified. Method is for lipids, not for fats [triglycerides and other ether-soluble materials].)

A. Apparatus and Reagents

(a) *Blending assembly*.—Semi-micro, stainless steel blending assembly for Waring blender (Scientific Products Co., Cat. No. SK395-1, or equivalent).

(b) *Enzyme solution*.—1% Clarase 40 000 in 0.5M sodium acetate solution. Suspend 10 g Clarase 40 000 (Miles Laboratories, Inc. 1127 Myrtle St, PO Box 70, Elkhart, IN 46514, USA) in 200 mL 0.5M sodium acetate solution in 1 L volumetric flask, dilute to volume with 0.5M sodium acetate solution, and mix thoroughly. (Stable at least 7 days when stored at 4°C.)

B. Determination

Accurately weigh ca 5 g well-mixed test portion (3 g if >10% fat) into 50 mL digestion tube, add enough enzyme solution so that total H₂O content (enzyme solution added plus original moisture in test portion) is 32 mL. Shake gently until test portion is thoroughly mixed with enzyme solution and place tube in 45–50°C H₂O bath 1 h. Mix thoroughly and quantitatively transfer digest to blending assembly with 80.0 mL methanol and 40.0 mL CHCl₃.

Cover and blend 2 min at high speed. Remove cover, add 40.0 mL CHCl₃, cover, and blend 30 s. Remove cover, add 40 mL H₂O, cover, and blend additional 30 s.

Transfer extract to 250 mL polypropylene centrifuge bottle and centrifuge 10 min at ca 2000 rpm (when rotor diameter is 11.5 in.) to clarify bottom CHCl₃ layer. Pipet 20.0 mL CHCl₃ extract into tared 100 mL beaker. (Care should be taken to prevent transferring aqueous phase.) Evaporate to dryness on steam bath in fume hood. Dry fat residue in 101°C oven to constant weight (ca 30 min), cool in desiccator to constant weight (ca 30 min), and weigh. Calculate % fat = (g residue/g test portion) × 4 × 100.

(Note: Ratio of CHCl₃-methanol-H₂O is critical for quantitative extraction of fat. This may necessitate determination of moisture content of product to optimize amount of H₂O [as enzyme solution] in initial extraction step. Reference source such as USDA Agriculture Handbook No. 8, *Composition of Foods*, or USDA Agriculture Handbook No. 456, *Nutritive Value of American Foods*, is adequate for this purpose. Also use as guide to pre-estimate fat content so that proper test portion weight can be chosen for analysis.)

Reference: JAOAC 66, 927 (1983).

45.4.03

AOAC Official Method 975.44
Lysine (Available) in Nutritional Supplements
Automated Method
First Action 1976
Final Action 1976

A. Principle

1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB) reacts with free α -amino groups in proteins, forming DNFB- α -amino lysine which is stable to

acid hydrolysis. Test portion is acid hydrolyzed and unavailable lysine is determined with amino acid analyzer; total lysine is determined on untreated test portion. Available lysine, which was bound by DNFB, is determined by difference.

B. Reagents

(Use deionized H₂O throughout.)

(a) *Sodium citrate buffer*.—pH 2.20 ± 0.03. Dissolve 19.6 g sodium citrate-2H₂O in H₂O, add 16.5 mL HCl, 5.0 mL diiodoglycerol (IG), 1.0 g Brij-35 dissolved in H₂O by heating, and 0.1 mL *n*-caprylic acid, and dilute to 1 L. Filter before using.

(b) *Sodium citrate buffer*.—pH 5.28 ± 0.02. Dissolve 137.26 g sodium citrate-2H₂O in H₂O, add 26.0 mL HCl, 4.0 g Brij-35 dissolved in H₂O by heating, and 0.4 mL *n*-caprylic acid, and dilute to 4 L. Filter before using.

(c) *Sodium citrate buffer with 2% *n*-propanol*.—pH 5.28 ± 0.02. Prepare as in (b), but add 80 mL *n*-propanol before dilution to 4 L.

(d) *Sodium acetate buffer*.—4M, pH 5.51 ± 0.03. Add 1088 g NaCH₃COO-3H₂O to 800 mL H₂O. Stir while heating on steam or H₂O bath until solution is complete and cool to room temperature. Add 200 mL CH₃COOH and stir. Add H₂O to final volume of 2 L, adjust pH, if necessary (1 g NaOH/2 L causes change of 0.02 pH), and filter before using.

(e) *Regeneration reagent*.—Prepare 0.2M NaOH containing 1 g Brij-35/L.

(f) *Methylhydrin reagent*.—Prepare and introduce into reservoir in absence of O₂. Bubble slow stream of N₂ through solution while mixing and stirring to displace any air. Use magnetic stirrer with seamless Teflon bar, 0.5 × 3 in. Add 3 L filtered peroxide-free Methyl Cellulose (colorless solution must be produced when 3 mL is mixed with 3 mL 4% KI solution) to 1 L filtered 4M CH₃COONa buffer solution, and stir magnetically 15 min while bubbling N₂ through solution at ca 1 cu ft/h. Add 80 g methylhydrin (Caution: Weigh in hood) and stir magnetically with N₂ bubbling until methylhydrin is completely dissolved (usually 6–10 min). Weigh exactly 1.600 g SnCl₂·2H₂O and add to solution, rinsing with Methyl Cellulose to final volume. Reagent turns deep ruby red as SnCl₂ dissolves but color fades after ca 2 h to yellow-green when fresh and yellow-brown later. Continue stirring with N₂ bubbling until SnCl₂ dissolves completely (ca 3–8 min).

C. Preparation of Protein Hydrolysate

Grind test sample in Wiley mill with No. 20 screen and mix well. Weigh 0.1–1.0 g test portion into No. 50 crucible (1.3 mL). (Calculate test portion weight to give final concentration of 0.72–0.88 mg protein/mL after dilution with 100 mL sodium citrate buffer, pH 2.2.)

$$\frac{\text{Test portion to use, mg}}{\text{final concentration desired (mg/mL)} \times 100 \text{ (mL)}} = \frac{\% \text{ protein in sample}}{100}$$

Do not use >1 g.

Place test portion or test portion and crucible in 500 mL boiling flask and add 4–5 glass beads. Add 10 mL freshly prepared 10% NaHCO₃ solution (w/v), 10 mL alcohol, and 0.4 mL dinitrofluorobenzene (DNFB). Stopper flask and shake mechanically >3 h. Carefully acidify with 6M HCl (ca 2 mL). Evaporate to oily dryness at 40°C in vacuum rotary evaporator. Release vacuum very slowly to avoid disturbing residue. Add 50–75 mL anhydrous

NUTS AND NUT PRODUCTS
Chapter 49, p. 2

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS

tree nuts and coconut. (It may be desirable to defat with petroleum ether.)

References: *JAOAC* 33, 733(1950); 34, 357(1951); 37, 645(1954); 58, 316(1975).

40.1.07
AOAC Official Method 935.53
Fiber (Crude) in Nuts and Nut Products
First Action 1955

See 962.09E (see 4.6.01).

40.1.08
AOAC Official Method 950.49
Ash of Nuts and Nut Products
Gravimetric Method
First Action 1959

A. Method I

Heat test sample of appropriate weight for product being examined (usually 5–10 g) in 50–100 mL Petri dish at 100°C until H₂O is expelled; add a few drops pure olive oil and heat slowly over flame or under infrared lamp until swelling stops. Place dish in furnace at ca 525°C and leave until white ash is obtained. Moisten ash with H₂O, dry on steam bath and then on hot plate, and re-ash at 525°C to consistent weight.

B. Method II

Carbonize test sample of appropriate weight for product being examined (usually 5–10 g) in 50–100 mL Petri dish at ca 525°C and treat charred mass with hot H₂O to dissolve soluble salts. (In case of low-purity products, addition of a few drops of olive oil, as in A, may be desirable). Filter through ashless paper, ignite paper and residue to white ash, add filtrate of soluble salts, evaporate to dryness, and ignite at ca 525°C to consistent weight.

References: *JAOAC* 33, 753(1950); 34, 357(1951).

40.1.09
AOAC Official Method 950.50
Sugars (Reducing) in Nuts and Nut Products
Munson-Walker Method
First Action 1959
Final Action

Prepare test sample as in 1st and 2nd paragraphs of 920.40E* (see 4.7.03). Proceed as in 906.03B* (see 44.1.16), using 25 mL aliquot (representing 2 g sample). Express results as glucose or invert sugar.

References: *JAOAC* 33, 753(1950); 34, 357(1951).

40.1.10
AOAC Official Method 950.51
Sucrose in Nuts and Nut Products
First Action 1959
Final Action

See 920.40E* (see 4.7.03).

40.1.11
AOAC Official Method 950.52
Sodium Chloride in Nuts and Nut Products
Titrimetric Method
First Action 1959
Final Action

To 2 g prepared test sample, 935.53 (see 40.1.03), in R 601 and thoroughly incorporate 10 mL 10% Ca(CH₃COO)₂ (w/v). For nut butters and pastes, dispense test sample in 100 mL tone before adding Ca(CH₃COO)₂ and remove excess fat temperature with air current. Dry on steam bath, and ash at lowest visible red heat (550°C). (Complete ashing is necessary.)

Dissolve ash in 25 mL HNO₃ (1 + 3), add known volume AgNO₃, more than enough to precipitate all Cl, heat to dry, add 5 mL ferric indicator, (to cold saturated Cl-free FeNH₄(SO₄)₂ solution add enough colorless NH₄OH to bleach brown solution, treat excess Ag with 0.1M NH₄SCN, 941.180(b) (see 4.1.11), solution turns permanent light brown. Calculate Cl as NaCl, allowing for any Cl in the Ca(CH₃COO)₂ solution.

References: *JAOAC* 33, 753(1950); 34, 357(1951).

CAS-7647-14-5 (sodium chloride)

40.1.12
AOAC Official Method 950.53+
Inorganic Residue (Water-Insoluble)
in Nuts and Nut Products
First Action 1959
Surplus 1970

See 44.032, 11th Ed.

Mycotoxins in Nuts
and Nut Products

See chapter on natural toxins.

40.1.13
AOAC Official Method 935.54
Examination of Peanut Butter
Procedure
First Action 1935

Make microscopic examination to detect addition of adulterated off-grade material not identifiable chemically.

40.1.14
AOAC Official Method 954.08
Starch in Peanut Butter
First Action 1964

Weigh 4–5 g wet sample by difference into 250 mL conical flask and extract twice with 50 mL portions petroleum ether, 5 min each time. Wash down sides of bottle with petroleum ether, centrifuge, and pour off solvent, disregarding opalescence in bottle to drive off remaining solvent, transfer residue to mortar and grind. Return fine powder to bottle with aid of 100 mL 1% solution (w/v). Shake bottle 15 min, wash down sides with 20 mL solution, centrifuge well, and pour off supernatant, dispense opalescence. Repeat washing twice.

E. Analytical System

Test sample is withdrawn and diluted with air-segmented stream of H₂O in double mixer, resampled, and mixed with acetate buffer. *o*-Phenanthroline reagent is added and, after mixing in double mixer, solution is debubbled and passed through 15 mm flowcell, where *A* is measured at 502 nm.

F. Start-Up and Shut-Down Operations

Place all lines in respective solutions and pump until steady baseline is obtained (ca 15 min). To shut down system, place all lines in H₂O and pump 10 min. Remove lines from H₂O reservoir and pump system dry. If irregular bubble pattern occurs during test sample run, pump solution containing 10 drops wetting solution/L H₂O through system ca 5 min before finally flushing with H₂O for shut-down.

G. Determination

Fill system cups in following order: 3 cups standard solution, 5 cups test sample solution, 1 cup standard solution, 5 cups test sample solution, etc., ending with 3 cups standard solution. (First 2 cups of standard solution are used to equilibrate system, but are not included in calculation.) Start sampler. After last cup has been sampled, let system operate until steady baseline is obtained. Draw tangent to initial and final baselines. Subtract baseline to determine net *A* and *A'* for each test sample and standard peak, respectively. Discard values for first 2 and last standard peaks and calculate average standard *A'*.

$$\text{Fe in portion taken, mg} = (AA') \times C' \times D$$

where *C* = concentration of standard in mg/mL and *D* = dilution factor.

Reference: *JAOC* 61, 958 (1978).

CAS-7720-28-7 (ferrous sulfate)

18.4.20

AOAC Official Method 983.27
Mercury in Mercury-Containing Drugs
Atomic Absorption Spectrophotometric Method
First Action 1983
Final Action 1985

A. Principle

Samples are digested in H₂O-HCl-HNO₃, and Hg is determined by AAS using air-C₂H₂ flame or flameless technique (low Hg levels).

B. Apparatus

Rinse all glassware before use with HNO₃ (1 + 1) followed by H₂O. For low Hg levels, decontaminate boiling flasks before use as follows: Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1), place on steam bath 20 min, and rinse with H₂O.

(a) Atomic absorption spectrophotometer.—Equipped with air-C₂H₂ flame, or equipped with Hg hollow cathode lamp and gas flow-through cell (Figure 986.15B [see 9.1.01]), 25 (id) × 115 mm with quartz windows cemented in place. Operating conditions: wavelength 253.7 nm, slit width 160 μm, lamp current 3 mA, and sensitivity scale 2.5.

(b) Diaphragm pump.—Neprene Dyna-Pump, or equivalent. Coat diaphragm and internal parts of pump with acrylic-type plastic spray. Use 1/8 gage Teflon tubing for all connections.

(c) Gas inlet adapter.—2440 standard taper.

(d) Digestion flask.—250 mL flat-bottom boiling flask with 2440 standard taper joint.

C. Reagents

(a) Reducing solution.—Mix 50 mL H₂SO₄ with ca 20 mL H₂O. Cool to room temperature and dissolve 15 g NaCl, 2 g hydroxylamine sulfate, and 25 g SnCl₂ in solution. Dilute to 500 mL.

(b) Diluting solution.—To 1 L volumetric flask containing 300–500 mL H₂O, add 58 mL HNO₃ and 67 mL H₂SO₄. Dilute volume with H₂O.

(c) Magnesium perchlorate.—Drying agent placed in the flask (Figure 986.15B [see 9.1.01]). Replace as needed [warning: Mg(ClO₄)₂ is explosive when in contact with organic substances].

(d) Mercury stock solution.—1000 μg/mL. Dissolve 0.1344 g HgCl₂ in 100.0 mL H₂O.

(e) Digestion solution.—H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1) from immediately before use.

(f) K₂Cr₂O₇ solution.—5%, aseptics.

D. Test Sample Preparation

(a) Ointments.—Mix laboratory sample thoroughly and accurately weigh portion containing ca 5 mg Hg into 50 mL beaker. Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1). Cover with watch glass and heat on steam bath 30 min. Cool to room temperature, swirl beaker to agitate fat, and decant solution and three 10 mL H₂O into 50 mL volumetric flask. Add 2 mL 5% K₂Cr₂O₇ dilute solution, and mix. Prepare reagent blank, beginning "Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃..."

(b) Tinctures.—Pipet aliquot containing ca 5 mg Hg into 50 mL volumetric flask. Place on steam bath, and evaporate almost to dryness in current of air. Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1), and heat on steam bath 30 min. Blow air into flask 2–3 min, while mixing contents, to expel N₂ oxides. Cool to room temperature, add 30 mL H₂O and 2 mL K₂Cr₂O₇ solution, dilute to volume with H₂O, and mix. Prepare reagent blank, beginning "Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃..."

(c) Injectables.—Pipet aliquot containing ca 5 mg Hg into 50 mL volumetric flask, add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1), and proceed as in (b), beginning "...and heat on steam bath..."

(d) Preservatives and solutions (or laboratory samples containing low levels of Hg).—Pipet duplicate aliquots containing 0.5 μg Hg (0.1 mL Eppendorf pipet, or equivalent diluting laboratory sample if necessary), into separate decontaminated 25 mL boiling flasks, add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1) to each flask, and heat on steam bath 30 min. Cool to room temperature, add 95 mL diluting solution, (b). Prepare 2 reagent blanks, beginning "Add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃..."

E. Standard Preparation

(a) 0 and 100 μg Hg/mL standard solutions (for sensitivity and *c*).—Pipet 0 and 5 mL, 1000 μg/mL Hg stock solution into 100 mL volumetric flasks, add 5 mL H₂O-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1), 2 mL H₂O, and 2 mL K₂Cr₂O₇ solution, dilute to volume with H₂O, and mix.

(b) 0.5 μg Hg standard solution (for test sample *A*).—Dilute 1000 μg/mL Hg stock solution to 5 μg/mL. Pipet duplicate aliquots of this solution (Eppendorf pipet or equivalent) into separate decontaminated 250 mL boiling flasks. (d) Add 1 mL

10-HCl-HNO₃ (4 + 3 + 1), and heat on steam bath 30 min. Cool to room temperature, add 95 mL diluting solution, (b), and mix.

C. Determination

(a) *Test samples a, b, and c.*—Operate atomic absorption spectrophotometer with air-C₂H₂ flame according to manufacturer's specifications. Zero instrument with 0 µg/mL Hg standard stock, and measure *A* of 100 µg/mL Hg standard solution, blank stock, and sample solutions, using 4× scale expansion.

(b) *Test sample d.*—Adjust output of pump to ca 2 L air/min by rotating speed of pump with variable transformer. Connect apparatus as in Figure 986.15B (see 9, 11.01), except for gas inlet adapter. With pump working and spectrophotometer zeroed, add 20 mL reducing solution to diluted aliquot. Immediately connect gas inlet adapter and aerate ca 5 min. (Adjust aeration time to obtain maximum *A*.) Record *A*, disconnect pressure on "out" side of pump, and see vent on filter flask to flush system. Analyze in following sequence: reagent blank, 0.5 µg Hg standard solution, test sample solution, and 0.5 µg/mL standard solution.

d. Calculations

(a) *Flame AAS.*—

$$\text{mg Hg/g or mL} = (A - A_0) \times C^2/A' \times W \times 20$$

(b) *Flameless AAS.*—

$$\text{mg Hg/g or mL} = (A - A_0)/(A' - A_0) \times (C/V) \times F \times 3/1000$$

where *A*, *A*₀, and *A*' = absorbance of test sample, blank, and standard solution, respectively; *C*' = concentration of standard solution (µg/mL, flame AAS; µg, flameless AAS); *W* = weight (g) or volume (mL) of laboratory sample taken; *V* = volume test sample (mL) added to 250 mL boiling flask; *F* = dilution factor if test sample was dried.

Reference: JAOAC 66, 1203 (1983).

23-7439-97-6 (mercury)

18421

AOAC Official Method 957.19
Mercury in Drugs
Gravimetric Method
First Action 1957
Final Action 1965

Applicable to Hg in phenylmercuric chloride, Hg₂, nitroarsenol, bismuth, and calomel tablets.)

4. Reagents

(a) *Strychnine sulfate solution.*—Approximately 0.01M; 1 g/500 mL.

(b) *Volmer's reagent.*—Dissolve 10 g KI in H₂O and dilute to 10 mL. Saturate with HgI₂ (ca 14 g) and filter.

4. Apparatus

(a) *Digestion flask.*—Acetylation or round-bottom, 100 mL, fitted with H₂O-cooled straight-tube condenser with standard taper joint.

(b) *Gooch crucibles.*—Fitted with 21 mm filter paper disks, covered with thin layer of short fiber, glass wool and dried at 105°C. Use to filter and weigh precipitate of strychnine-HgI₂.

G. Preparation of Test Samples

Accurately weigh (avoid use of metal containers) or measure laboratory sample containing 20–100 µg Hg (optimal: ca 50 µg) and treat as follows:

(a) *Solutions of organic overoxidants.*—Transfer laboratory sample to beaker and evaporate just to dryness with low heat (50–70°C) and air current. Dissolve residue in ca 5 mL 10% NaOH solution and transfer to digestion flask. Rinse beaker with four 3–4 mL portions H₂O and add rinsings to digestion flask. Add excess liquid Br₂ to solution and connect flask to condenser. Boil 4–5 min and add 3 mL HCl through top of condenser. Continue to heat solution until Br₂ collects in condenser tube. Remove heat and cool until Br₂ returns to solution in digestion flask.

Alternately heat and cool until Br₂ has almost completely dissipated. (After 3 intervals of heating, flow of H₂O through condenser may be discontinued to aid in removing Br₂.) Let flask cool, and rinse inside of condenser with ca 5 mL H₂O. Disconnect flask and rinse tip of condenser with small stream of H₂O from wash bottle. Filter through 9 cm paper into 150 mL beaker, and rinse flask and filter with four 5 mL portions H₂O.

(b) *Distillate.*—Transfer laboratory sample to digestion flask and add 5 mL HCl (1 + 3) followed by 5 mL saturated Br₂-H₂O. Add small pieces of porcelain, SiC, or few glass beads to prevent bumping. Connect flask to condenser. Heat with mantle maintaining slow and continuous boiling ca 10 min, and then cool to room temperature. Disconnect flask and decant aqueous portion through 9 cm paper into 150 mL beaker. Take precautions to retain all content base in flask. Rinse neck of flask into filter with few drops of H₂O from wash bottle. Add 1 mL HCl (1 + 3), 1 mL saturated Br₂-H₂O, and 8 mL H₂O to flask and reflux. Again cool contents of flask and decant aqueous phase through filter.

Repeat refluxing and decanting with two 10 mL portions H₂O and finally rinse condenser tube into flask with ca 5 mL H₂O. Disconnect flask, rinse condenser tip, and decant rinsings through filter. Rinse filter with 2 small portions H₂O from wash bottle.

Test for complete removal of Hg by adding 5 mL H₂O and 2 drops HCl (1 + 3) to digestion flask and refluxing as before. Pass this solution through original filter into 50 mL beaker. To filtrate add 1 drop 10% KI solution (w/v) and 1 drop strychnine sulfate solution. No turbidity should be produced. If extraction is incomplete, repeat refluxings with H₂O until all Hg is removed. Reserve all test solutions showing presence of Hg to add to sample portion after precipitation of Hg.

(c) *Calomel tablets.*—Determine average weight/tablet. Grind to fine powder and transfer accurately weighed portion to digestion flask. Add 10 mL saturated Br₂-H₂O and 5 mL HCl (1 + 3). Connect flask to reflux condenser and gently boil contents until most of Br₂ vapors collect in condenser. Discontinue heating until Br₂ returns to solution in flask. Repeat alternate heating and cooling until Br₂ vapors are dissipated. Cool flask and contents to room temperature and rinse condenser tube with ca 10 mL H₂O. Disconnect flask and rinse condenser tip into flask. Filter solution through Gooch into 150 mL beaker. Rinse flask with three 5 mL portions H₂O and pass rinsings through crucible, and finally rinse crucible with fine stream of H₂O.

(d) *Tablets containing purgative drugs.*—If tablets contain purgative drugs, add 10 mL alcohol to weighed laboratory sample in flask. Heat on steam bath with gentle agitation until alcohol begins to boil. Remove flask, cool under tap, and filter supernate through Gooch fitted with glass fiber filter. Retain as much of insoluble residue in flask as possible. Rinse flask and contents with three 10 mL portions alcohol and two 5 mL portions H₂O, and decant through

With self-rising flour, the 9.5 mL 2M $\text{Na}_2\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ solution, A(g), may be reduced to 4.0 mL. To determine exact amount of buffer solution, A(h), needed to adjust each digest to most desirable pH range, mix 10 mL aliquot of test solution with measured amount of buffer solution, dilute with H_2O to 25 mL, and determine pH either potentiometrically or colorimetrically.

For colorimetric determination, add 5 drops bromosphthal blue indicator (grind 0.1 g powder with 1.5 mL 0.1M NaOH and dilute to 25 mL with H_2O) to solution and compare color with that of equal volume of pH 3.5 buffer solution, A(h), also treated with 5 drops indicator. Although color develops in range pH 2-9, avoid pH <3.0 and preferably work at pH 3.5-4.5. With cereal products, 9.5 mL buffer solution, A(h), is satisfactory. With test portions high in Fe, aliquot of 5 mL, instead of 10 mL, may be used with 4.8 mL buffer solution, A(h).

Conduct digestion so as to avoid contamination with Fe and determine blank. After correction for blank, calculate as mg P₂O₅ (453.6 g).

References: JAOAC 27, 86, 396(1944); 28, 77(1945).
J. AOAC Int. 75, 384(1994).

CAS -7439-89-6 (iron)

32.1.10

AOAC Official Method 944.03 Calcium in Flour

Titrimetric Method
First Action 1944
Final Action

(Applicable to enriched, enriched self-rising, and phosphated flours.)

Ash 10 g flour or air-dried bread as in 923.03 (see 32.1.05), and proceed as in 944.02(a) (see 32.1.09) through "Rinse watch glass with H_2O . . .", then filter into 400 mL beaker, or transfer 50 mL solution from Fe determination to 400 mL beaker. Dilute to ca 150 mL.

Add 8-10 drops bromo-cresol green indicator, 941.17A (see A.1.05), and enough 20% CH_3COONa solution (w/v) to change pH to 4.8-5.0 (blue). Cover with watch glass and heat to bp. Precipitate Ca slowly by adding 3% oxalic acid solution (w/v), 1 drop every 3-5 s, until pH is 4.4-4.6 (optimum for calcium oxalate precipitation) as indicated by distinct green shade. (Avoid excess of oxalic acid indicated by yellow tints, showing undesirable displacement of pH.) Boil 1-2 min and let mixture settle until clear or overnight. Filter supernate through quantitative paper, Gooch, or fine fritted glass filter, and wash beaker and precipitate with ca 50 mL NH_4OH (1 + 50) in small portions, using wash bottle delivering very small stream. Break point of filter and wash filter or crucible with mixture of 125 mL H_2O and 5 mL H_2SO_4 at 80-90°C. Titrate at 70-90°C with 0.01M KMnO_4 until slight pink is obtained, add filter paper, and continue titration if necessary. Correct for blank and calculate Ca as mg/lb (453.6 g).

1 mL 0.01M KMnO_4 = 1 mg Ca

References: JAOAC 27, 402(1944); 28, 77(1945).

CAS-7440-70-2 (calcium)

32.1.11

AOAC Official Method 948.09 Phosphorus in Flour First Action 1948 Final Action

A. Reagent

(a) Magnesium nitrate solution.—Dissolve 8 g MgO in HCl (1 + 1), avoiding excess acid; add little MgO in excess, boil from excess MgO , Fe_2O_3 , etc., and dilute to 100 mL.

(b) Molybdate solution.—Dissolve 100 g MoO_3 in water 144 mL NH_4OH and 271 mL H_2O . Cool, and slowly pour into stirring constantly, into cool mixture of 489 mL HNO_3 and 118 H_2O . Keep final mixture in warm place several days or until you heated to 40°C deposits no yellow precipitate. Decant solution any sediment and keep in glass-stoppered vessels.

B. Determination

(a) Transfer 1.00 g test portion to ca 140 mL porcelain role, add 3 mL $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ solution, and mix well, using metal rod. Clean rod with small piece filter paper and place in case. Dry in oven at 100°C ca 2 h, transfer to cold furnace, and ignite 550°C to white or gray ash (6-8 h). Cool, cover with watch glass, take up with 10 mL HCl (1 + 4), and add 5 mL HCl. Rinse glass and evaporate to dryness on steam bath. Add 5 mL H_2SO_4 , 50 mL H_2O , heat 15 min on steam bath, filter into 100 mL volumetric flask, cool, and dilute to volume. Pipet 50 mL into 35 Erlenmeyer, neutralize to litmus paper with NH_4OH , mix faintly acid with HNO_3 , dilute to 75-100 mL, add ca 15 g NH_4Cl and add 20-25 mL acidified molybdate solution for P_2O_5 ca <5%; 30-35 mL for 5-20%; and enough acidified molybdate solution to ensure complete precipitation for >20%. Shake mechanically 30 min at room temperature; decant at once to filter and wash precipitate twice by decanting with 25-30 mL H_2O , agitating thoroughly and allowing to settle. Transfer precipitate to filter and wash with cold H_2O until filtrate testings of filter yields pink color on adding phenolphthalein. 1 drop of the standard alkali. Transfer precipitate to 100 mL beaker or precipitating vessel, dissolve precipitate in small amount of the standard alkali, add few drops of phenolphthalein, add with standard acid. Report as percent P. Or—

(b) Transfer 3.00 g test portion to 35 mL porcelain evaporating dish, mix well with 0.5 g Na_2CO_3 , and ignite at 550°C to gray ash. Take up with watch glass, take up with 2 mL HCl (1 + 4), and add 5 mL HCl. Evaporate to dryness, add 5 mL HCl and 10 mL H_2O , heat 10 min on steam bath, filter into 100 mL volumetric flask, cool, and dilute to volume. Pipet 10 mL aliquot into 300 mL Erlenmeyer and proceed as beginning . . . neutralize to litmus paper with NH_4OH . . .

Report results as percent P.

Reference: JAOAC 31, 269(1948).

CAS-7723-14-0 (phosphorus)

Nutrients (Minor) in Fertilizer

Atomic Absorption Spectrophotometric Method
First Action 1985
Final Action 1989
AOAC-AAAC Method

See 965.09 (see 2.6.01).