



Reporte Final de Estadía

Paulina Jiménez Meneses

**Implementación de Técnicas
Bromatológicas en el laboratorio de ensayo
de alimentos.**

Av. Universidad No. 350, Carretera Federal Cuitláhuac - La Tinaja
Congregación Dos Caminos, C.P. 94910. Cuitláhuac, Veracruz
Tel. 01 (278) 73 2 20 50
www.utcv.edu.mx

Programa Educativo de Ingeniería en Procesos Bioalimentarios.

Proyecto de estadía para obtener el título de
Ingeniero en Proceso Bioalimentarios.

Proyecto de estadía a realizarse en el laboratorio de ensayo de alimentos de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

Nombre del Proyecto: Implementación de técnicas bromatológicas en el laboratorio de ensayo de alimentos.

Nombre del asesor Industrial: MC. Olivia Rodríguez Alcalá

Nombre del asesor Académico: MC. Gregorio Zárate Castillo

Presenta: Paulina Jiménez Meneses

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por permitirme llegar hacer lo que soy, por guiarme en mi camino y darme las fuerzas para levantarme en cada caída durante este recorrido de mi vida.

A MIS PADRES

Que son mi ejemplo de vida y siempre creyeron en mí, porque se mantuvieron conmigo durante este viaje, por darme sus consejos, su amor y sobre todo su confianza, por ser unos excelentes padres, y siempre darnos todo. Gracias por que todo lo que soy se lo debo a ustedes.

A MIS PROFESORES

Por su tiempo y dedicación en cada una de sus clases impartidas, han sido y serán parte fundamental para mi formación, gracias por todo el conocimiento transmitido durante estos años.

A MIS AMIGOS

Gracias por estar siempre en las buenas y en las malas, por tantas experiencias compartidas pero sobre todo por permanecer que al final eso es lo más importante.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES	2
1.1.1 Misión Institucional.....	2
1.1.2 Valores Institucionales	3
1.1.3 Política de Calidad	3
1.1.4 Objetivos	4
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.3 OBJETIVOS	6
1.3.1 Objetivo General	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	6
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 FIBRA DIETÉTICA.....	8
2.2 ÁCIDOS GRASOS	8
2.3 MÉTODO GERBER.....	9
3. METODOLOGÍA	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
5. CONCLUSIÓN	16
6. RECOMENDACIONES	16
7. BIBLIOGRAFÍA	17
8. ANEXOS	18
8.1 DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA POR EL MÉTODO GRAVIMÉTRICO ENZIMÁTICO	18
8.2 PLANTILLA EXCEL PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS.	28
8.3 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS	31
8.4 CUANTIFICACIÓN DE GRASA EN LECHE POR EL MÉTODO GERBER.....	46



Índice de Figuras

Figura 1 Metodología para la elaboración de los procedimientos11

RESUMEN

En estos últimos años los consumidores se han interesado enormemente en conocer el contenido energético y calórico que le proporciona la ingesta de los alimentos. Es por esto que diversas entidades y asociaciones que regulan la industria alimentaria se han visto en la necesidad de modificar año con año la declaración de estos nutrientes.

La última actualización que se le realizó a la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 pide la declaración de las grasas clasificándolas en grasa saturada, insaturada y poliinsaturada así como el contenido de fibra dietética.

El presente trabajo realizado en el laboratorio de ensayo de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz consistió en la búsqueda y el contacto con diversos proveedores para la adquisición del equipo y de los insumos necesarios así como en la elaboración de procedimientos para implementar las técnicas de perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases, cuantificación de fibra dietética por método gravimétrico enzimático y el conteo de grasa en leche bronca y pasteurizada por el método Gerber.

Con la ampliación del catálogo de técnicas bromatológicas se logra satisfacer las necesidades del sector productivo de la región y de los alrededores del estado de Veracruz para cumplir con los requerimientos necesarios y que los productos alimenticios que elaboran salgan al mercado sin ningún inconveniente.

ABSTRACT

In recent years, consumers have been hugely interested in knowing the energy and caloric content of food. That is why various entities and associations that regulate the food industry have been forced to modify the declaration of these nutrients year after year.

The latest update to NOM-051-SCFI / SSA1-2010 calls for the declaration of fats classifying them in saturated, unsaturated and polyunsaturated fat as well as dietary fiber content

The present work carried out in the test laboratory of the Technological University of the Center of Veracruz consisted in the search and contact with several suppliers for the acquisition of equipment and the necessary inputs as well as in the elaboration of the procedures to implement the techniques of Fatty acid profile by gas chromatography, quantification of dietary fiber by enzymatic gravimetric method and the count of Fat in cold milk and pasteurized by the Gerber method.

With the expansion of the catalog of bromatological techniques it is possible to satisfy the needs of the productive sector of the region and the environs of the state of Veracruz to fulfill the necessary requirements and that the food products that they make come out to the market without any inconvenience.

1. INTRODUCCIÓN

Los seres humanos necesitan, además del agua que es vital, una ingestión de alimentos variada y equilibrada. La razón es que no existe un único alimento que proporcione todos los nutrientes para mantener la vida y la salud. El consumo regular de un conjunto de alimentos (dieta) debe proporcionar las cantidades adecuadas de proteínas, lípidos, glúcidos, vitaminas y minerales. La base de una buena nutrición reside en el equilibrio, la variedad y la moderación de nuestra alimentación. Pero la alimentación moderna urbana es muy a menudo desequilibrada, desestructurada y se suele juntar con una vida cada vez más sedentaria.

Por esta razón, se ha modificado y se ha decidido incluir nuevos requisitos que se declaren dentro de la tabla nutrimental que nos permitan tener en cuenta la cantidad de fibra dietaría o el perfil de ácidos grasos para poder diferenciar entre los ácidos grasos saturados e insaturados para citar un ejemplo de los nuevos requisitos de la tabla nutrimental.

Es por esto que el laboratorio de ensayo de alimentos ha decidido implementar estas nuevas técnicas, con el propósito de poder ofrecer a las industrias estos análisis para poder cumplir con la normativa en vigor y con esto poder seguir dentro del mercado.

Este proyecto tiene como finalidad la actualización y la implementación de técnicas de análisis de alimentos del laboratorio de ensayo de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, con el fin de implementar en el laboratorio pruebas analíticas de mayor relevancia en el medio de la industria alimenticia, que además contarán con un tiempo razonable en la obtención de resultados los cuales serán confiables gracias a que se realizará una curva de calibración en los equipos utilizados para cada técnica con el propósito de ofrecer resultados veraces.

1.1 ANTECEDENTES

La Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz “UTCV” es un organismo público descentralizado del gobierno del Estado de Veracruz, con personalidad jurídica y patrimonio propio integrada al Sistema Nacional de Universidades Tecnológicas, adoptando el modelo pedagógico y los sistemas educativos que señale el Consejo Nacional de Universidades Tecnológicas y la Secretaría de Educación y Cultura, así como por lo establecido en el decreto publicado el 9 de noviembre de 2004 en la gaceta oficial del Estado, decreto por el cual se crea la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

La “UTCV”, se encuentra ubicada en el municipio de Cuitláhuac, en la región centro del Estado de Veracruz, e inicia sus trabajos el 3 de enero de 2005, con cuatro Programas Educativos: Comercialización, Mantenimiento Industrial, Tecnología de Alimentos, Tecnologías de la Información y Comunicación, e Informática Administrativa.

La “UTCV”, está comprometida con la EDUCACIÓN DE CALIDAD y LA MEJORA CONTINUA, por lo que, uno de sus objetivos estratégicos es certificar todos los procesos que intervienen en el quehacer diario, con base en el modelo ISO 9001:2000, entre ellos, el proceso educativo, el de gestión y el de educación continua; además, visualiza acreditar cada uno de sus programas educativos con talleres y laboratorios reconocidos nacional e internacionalmente.

1.1.1 Misión Institucional

Contribuir a la formación de profesionales responsables, comprometidos y creativos, con una sólida preparación científico-tecnológica, cultural y valorar, con vinculación nacional e internacional y una imagen institucional sólida.

Con base en un enfoque educativo centrado en el aprendizaje, con profesores vinculados al sector productivo, con planes y programas de estudio pertinentes al entorno, garantizar el aseguramiento de la calidad de los procesos: educativo, de educación continua y de gestión, mediante la certificación, la acreditación y la mejora continua.

Con el propósito de que los egresados coadyuven a la competitividad de las empresas y su capacidad de respuesta al cambio, para fortalecer la calidad de vida de la sociedad bajo parámetros de excelencia académica y la promoción de valores.

1.1.2 Valores Institucionales

- **Lealtad:** Es el sentimiento de apego, fidelidad y respeto; con el que se demuestra el alto sentido de compromiso a la institución y a sus compañeros.
- **Honestidad:** Respeto a la normatividad establecida en la Institución, dentro y fuera de ella.
- **Responsabilidad:** Cumplimiento de las actividades encomendadas, es decir, cumplir el deber, en tiempo, forma y con la calidad deseada.
- **Trabajo en equipo:** Es colaborar con un fin común, el compromiso es compartido para la consecución de metas institucionales y la solución de problemas con equilibrio, basados en un clima de confianza y respeto mutuo.
- **Igualdad:** Es la buena práctica institucional por un trato idéntico, sin que medien diferencias entre todos los que conformamos la comunidad universitaria ya que tenemos los mismos derechos y las mismas oportunidades.
- **Cuidado del medio ambiente:** Respeto institucional hacia el entorno en apego a las normas establecidas para cuidar, proteger y preservar el medio ambiente.

La estructura y operación del Sistema de Gestión del Laboratorio se lleva a cabo con base en los requisitos y directrices de:

- NMX-EC- 17025-IMNC- 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración
- ISO 19011:2002 Directrices para la auditoria de los sistemas de gestión de la calidad y/o ambiental
- MANUAL DE BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO
- METODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO Guía de laboratorio para validación de métodos y tópicos relacionados

1.1.3 Política de Calidad

Satisfacer los requisitos de los empresarios y alumnos que reciben nuestros servicios de análisis fisicoquímicos y microbiológicos a través del cumplimiento y mantenimiento de las Buenas Practicas de Laboratorio (BPL) aplicando procedimientos y métodos analíticos (normalizados) con base en la NMX-EC- 17025-IMNC-2006 y asegurando la mejora

continua del sistema técnico y administrativo que garanticen la confiabilidad de los resultados analíticos.

1.1.4 Objetivos

- Incrementar la satisfacción de los clientes internos y sector agroindustrial alimentario.
- Desarrollar continuamente la competencia del personal técnico y administrativo de los métodos de ensayo.
- Asegurar la calidad de los proveedores.
- Asegurar la calidad y validez de los datos de ensayo.
- Mejorar continuamente la eficacia y desempeño del sistema de gestión de laboratorios.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El laboratorio de ensayos de alimentos de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz (UTCV) ofrece servicios a empresas de alimentos dentro de dichos se encuentran los análisis fisicoquímicos, nutrimentales, microbiológicos y bromatológicos.

Dentro del rubro de los análisis bromatológicos se encuentra la determinación de fibra dietética, perfil de ácidos grasos y la cuantificación de grasa en leche cruda y pasteurizada por el método Gerber las cuales el laboratorio no realiza pero que actualmente las industrias están solicitando debido a las actualizaciones que ha sufrido los requerimientos de la tabla nutrimental.

Dichos análisis se rigen bajo ciertas normas; el análisis de fibra dietética se realiza bajo la Norma Oficial Mexicana NOM – 086 – SSA1 – 1994, Bienes y Servicios. Alimentos y Bebidas no Alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales, el análisis de perfil de ácidos grasos se realiza bajo la norma oficial AOAC 996.6. Y la cuantificación de grasa en leche bronca y pasteurizada se realiza bajo la norma oficial AOAC 2000.18.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Elaborar y verificar los procedimientos de los análisis de fibra dietética, perfil de ácidos grasos y método Gerber para el laboratorio de ensayo de alimentos de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz durante el período enero – abril 2017.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Recopilar la información bibliográfica sobre las normas a aplicar.
- Cotizar con proveedores para la adquisición de materiales y reactivos necesarios para realizar los análisis.
- Estructurar la información recopilada en procedimientos y reportes estandarizados de los ensayos.

2. MARCO TEÓRICO

La seguridad alimentaria es la existencia de condiciones que posibilitan a los seres humanos tener acceso físico, económico y de manera socialmente aceptable a una dieta segura, nutritiva y acorde con sus preferencias culturales, que les permita satisfacer sus necesidades alimentarias y vivir de una manera productiva y saludable.

Cumbre Mundial sobre la Alimentación, 1996

Existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana.

Comité de Seguridad Alimentaria Mundial FAO

El objetivo de la legislación bromatológica es que en todo momento haya alimentos genuinos y sanos, libres de alteraciones, de adulteraciones y de falsificaciones.

La legislación bromatológica se encarga de vigilar para evitar cualquier maniobra que dificulte o impida el cumplimiento de todas las exigencias. Así como contar con inspección sanitaria y laboratorios de control atendidos por personal idóneo y honesto. Al difundir el conocimiento bromatológico se logra que la población sepa cómo debe alimentarse, y exigir en los que elaboran alimentos productos de buena calidad y buenos para su salud.

Lograr que la población de un país se alimente adecuadamente y pueda disfrutar de salud: primer requisito para el bienestar de los pueblos.

Por este motivo y ya que los análisis bromatológicos juegan un papel importante en las industrias alimentarias así como para los consumidores el laboratorio de ensayo de alimentos de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz busca ampliar su catálogo de análisis que ofertan, agregando el análisis de fibra dietética, perfil de ácidos grasos y cuantificación de grasa por método Gerber.

2.1 FIBRA DIETÉTICA

La fibra dietética es la parte no digerible de los alimentos, en general es de origen vegetal. Constituye un importante elemento en la higiene interior del organismo con múltiples beneficios para la salud si se consume adecuadamente ya que a inicios de los 1970's burkitt y trowel postularon que la prevalencia de la enfermedad del corazón y ciertos tipos de cáncer en las sociedades occidentales se relacionaban con un consumo inadecuado de fibra dietética.

Hay dos métodos para la determinación de fibra dietética

- Gravimétricos
- Químicos

El método que se llevara a cabo en el laboratorio de ensayo de alimentos de la UTCV es el gravimétrico que consiste en solubilizar los carbohidratos, lípidos y proteínas selectivamente mediante agentes químicos y/o enzimas.

Los materiales no digeribles se colectan, posteriormente, mediante filtración y el residuo de fibra se determina gravimétricamente.

2.2 ÁCIDOS GRASOS

Las grasas y aceites comestibles están formados por triglicéridos, compuestos de una molécula de glicerol enlazada a tres moléculas de ácidos grasos que pueden variar dentro de cada triglicérido o entre varios de ellos. Estos ácidos grasos están constituidos por una cadena larga de hidrocarburo con un grupo carboxilo (-COO-) al extremo, y esta cadena larga puede contener enlaces dobles (insaturados) entre carbonos (Badui, 2006) . El número de carbonos por ácido graso es par en la mayoría de los casos y salvo pocas excepciones los enlaces dobles son cis, es decir, la cadena continúa hacia el mismo lado en los dos carbonos del doble enlace. La nomenclatura omega-x designa el carbono del primer enlace doble a partir del extremo contrario al grupo carboxilo.

Por su relación con la incidencia de enfermedades cardiovasculares, el estudio del perfil de los ácidos grasos en las principales grasas de cada alimento es de gran importancia. La

identificación y clasificación de estas grasas depende estrictamente de su composición en ácidos grasos.

El método por el que se pretende obtener el perfil de ácidos grasos en los alimentos es mediante cromatografía de gases ya que es una técnica de separación. Y por su gran versatilidad y fácil manejo, su uso se ha difundido en diversos campos de la investigación científica y en la industria, es una herramienta fundamental para determinar la calidad de materias primas y productos lanzados al mercado.

Debido a la complejidad de la estructura de los ácidos grasos y a la dificultad de determinar exactamente la composición de una grasa mediante los análisis tradicionales, la cromatografía de gases se ha convertido en una herramienta indispensable para establecer el perfil de ácidos grasos. La cromatografía de gases es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, la cual es un tubo empacado con algún polímero líquido (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2010).

2.3 MÉTODO GERBER

El método Gerber consiste en separar la grasa dentro de un recipiente medidor, llamado butirómetro, de dimensiones estandarizadas. El objetivo de este método es medir el volumen e indicarlo en un tanto por ciento en masa.

El butirómetro debe estar completamente limpio y sobre todo libre de restos de grasa. Un volumen determinado de muestra es tratado en un butirómetro con ácido sulfúrico y alcohol amílico.

La grasa se encuentra en la leche en forma de pequeños glóbulos rodeados por una capa protectora, la membrana de los glóbulos de grasa está compuesta por fosfolípidos, proteínas de envoltura de los glóbulos de grasa y agua de hidratación (Belitz & Grosch, 1988).

La envoltura de los glóbulos de grasa evita la coalescencia de los mismos y estabiliza el estado emulsionado. Los glóbulos grasos forman una emulsión permanente con el líquido lácteo.

La separación completa de la grasa precisa la destrucción de esta envoltura protectora. Este proceso se lleva a cabo por medio del ácido sulfúrico Gerber (ácido sulfúrico concentrado, de entre el 90 y el 91 % de masa y densidad (20°C) $1.818 + 0.003 \text{ g/ mL}$). El ácido sulfúrico oxida e hidroliza los componentes orgánicos de la envoltura protectora de los glóbulos de grasa, las fracciones de las albúminas de leche y la lactosa. Por otra parte, la adición de alcohol amílico (2-metilbutanol) facilita la separación de la grasa y, al final, resulta una línea divisoria clara entre la grasa y la solución ácida. Mediante centrifugación la grasa es separada en el vástago graduado del butirómetro, donde se lee directamente el contenido en grasa expresado en gramos/100 g de muestra.

3. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del proyecto se propuso la realización de tres etapas, las cuales contienen tareas y actividades que permitían secuencialmente ir cumpliendo los objetivos específicos y finalmente la culminación del proyecto. Las etapas en las que se divide el proyecto son:

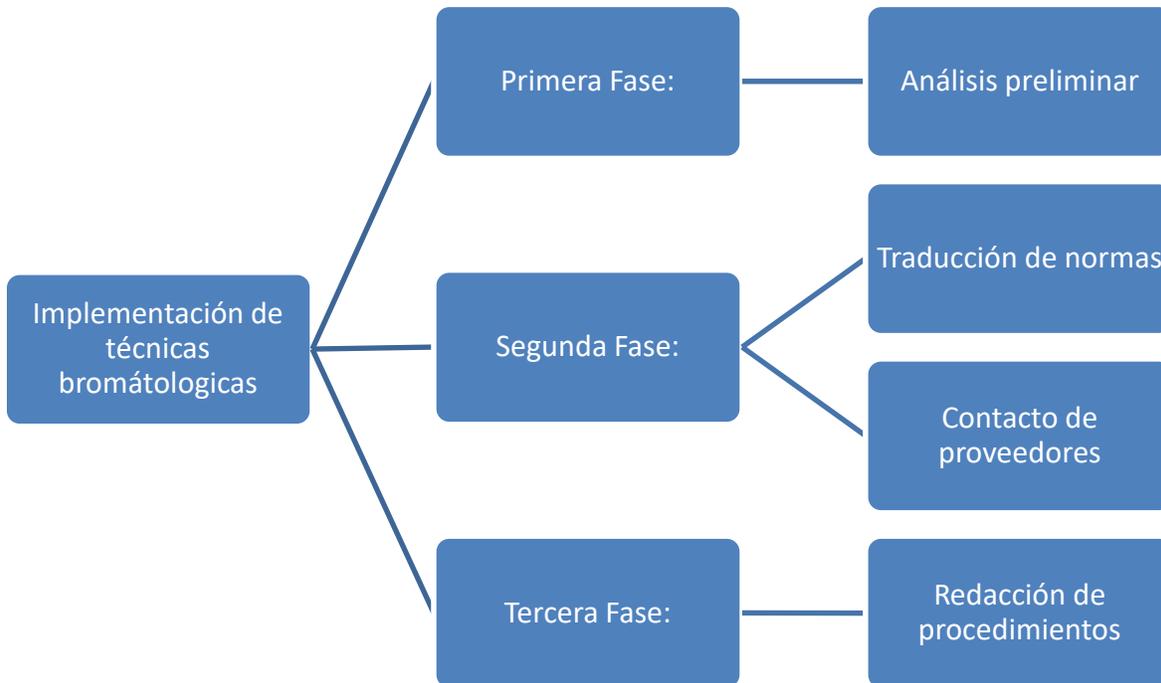


Figura 1. Metodología para la elaboración de los procedimientos

- **Primera fase: Análisis preliminar.**

Para desarrollar esta etapa se propuso hacer una consulta bibliográfica de manuales existentes, bibliografía asociada, normas técnicas mexicanas e internacionales, legislación sobre alimentos en México y otros documentos. La revisión consistió en: Determinar las normas que utilizaríamos para obtener resultados más verídicos y que aseguren una calidad en los alimentos que se van a analizar, la disponibilidad de recursos, equipos y reactivos para su ejecución.

- **Segunda fase: Traducción de normas y Contacto de proveedores.**

Para llevar a cabo esta etapa y ya que se contaban con las normas que se iban a trabajar se procedió a la traducción de las normas para el Método Gerber y para la determinación del perfil de ácidos grasos; ya que para estas determinaciones nos enfocamos en normas oficiales internacionales de la AOAC.

Al mismo tiempo que se realizaba la traducción de las normas se verificaban los materiales, los reactivos y los equipos para comenzar a realizar el contacto con los proveedores y obtener las cotizaciones necesarias para la adquisición de los equipos para llevar a cabo las determinaciones como lo indica la normativa.

Se realizó el contacto con proveedores de Sigma Aldrich® para la cotización de un kit de enzimas para la determinación de fibra dietaría, como también con la empresa Comsurlab S.A de C.V los reactivos faltantes para poder correr dicha técnica.

Para la determinación del perfil de ácidos grasos se cotizó el reactivo trifluoruro de Boro con el Grupo Comsurlab S.A de C.V y también con la empresa S.T puros y equipos con el objetivo de obtener un margen de precio. El kit de esteres metílicos de ácidos grasos se cotizó con el grupo Comsurlab y solo se consultó dicho proveedor ya que hasta el momento fue el único que cuenta con dicho kit y este es de suma importancia ya que la norma pide adquirirlo con el propósito de correr un blanco de reactivo y obtener los tiempos de retención de cada uno y saber identificarlos.

Así mismo se cotizó la columna con Perkin Elmer® y con la empresa S.T Puros y Equipos con las especificaciones que menciona la norma AOAC 996.06 así como los insumos necesarios; viales, jeringas, etc.

- **Tercera Fase: Redacción de procedimientos.**

En esta última fase y ya con la traducción que se realizó en la etapa anterior, se comenzó la redacción de dichos procedimientos.

En el procedimiento se redactó el objetivo que se tiene al llevar a cabo dichas técnicas en el laboratorio de ensayo de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.

Así mismo se describe el alcance que tienen los procedimientos antes mencionados y el impacto que estos tienen, en el fundamento se describen los puntos más importantes en los que consisten cada una de las técnicas.

Después viene un apartado de definiciones, en donde se colocan las palabras clave de la técnica y que así esta sea más entendible. A continuación se prosigue a enlistar los reactivos, el material de laboratorio así como el equipo a utilizar describiendo los parámetros y las condiciones que estos requieren como lo indica la norma.

Se prosigue con un apartado donde se describe paso a paso la preparación de las soluciones que serán utilizadas durante la técnica, y después de este apartado continúa la descripción del procedimiento o metodología y este apartado es uno de los más importantes ya que en este se describe detalladamente como realizar la técnica para que sea entendible y no haya dudas al momento de llevarla a cabo.

Y por último se mencionan los cálculos y las fórmulas utilizadas para la obtención del resultado final.

El control de calidad junto con la metodología como ya se mencionó anteriormente son de suma importancia al momento de redactar un procedimiento, dichos parámetros son evaluados y establecidos por el personal de laboratorio ya que estos determinan los criterios para determinar que el análisis se realizó de manera correcta.

Entre los parámetros de control de calidad que se pueden aplicar se encuentra el análisis de un blanco de reactivos, realizar un duplicado de cada muestra a evaluar, utilizar material volumétrico clase A así como verificar si dicho material puede ser calibrado para obtener una medición más exacta, y otro parámetro de control de calidad es que todos los reactivos que utilicemos cuenten con su certificado de análisis.

En el apartado de ANEXOS se adjunta un ejemplo de un procedimiento, así como una plantilla de Microsoft Excel[®] para que pueda observarse el formato que se utiliza.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Derivado de la búsqueda bibliográfica en la cual se tomaron en cuenta las normas mexicanas e internacionales aplicables a las técnicas a implementar y con la finalidad de elegir la técnica con mayor alcance en los productos alimenticios a evaluar, se obtuvieron 3 diferentes procedimientos los cuales son: fibra dietética, perfil de ácidos grasos y cuantificación de grasa en leche por método Gerber. Se sugiere que los métodos antes mencionados se lleven a cabo mediante técnicas especializadas, ya que esto garantiza una mayor veracidad al momento de reportar los resultados de dicho análisis.

El perfil de ácidos de acuerdo al método oficial AOAC 996.06 permite el recuento de los ácidos grasos que se encuentran en el alimento problema y reportarlos, dichos ácidos grasos se clasifican en: grasa total saturada, grasa total insaturada y grasa poliinsaturada. Además se enlistan los esteres metílicos pertenecientes a cada grupo de clasificación de los ácidos grasos enlistándolos por su nombre común y la cantidad reportada en gramos de presencia en el alimento.

La cromatografía de gases es la técnica analítica que permite la separación y posible identificación de la materia grasa presente en la muestra problema. Ya que la elución se produce por el flujo de la fase móvil que se lleva a cabo por un gas inerte, y a diferencia con la cromatografía líquida, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Los componentes que se pretenden estudiar son volátiles o semivolátiles y son térmicamente estables a altas temperaturas; por esta razón se emplea la cromatografía de gases. Gracias a esta técnica especializada se puede reportar información más específica para cumplir con los nuevos requerimientos que las normas mexicanas piden que se reporte al momento de realizar el análisis nutrimental que se muestra en el empaque del producto terminado.

Con respecto al método gravimétrico enzimático para la determinación de fibra dietética basado en la NOM-086-SSA1-1994 apéndice normativo C, esta determinación consiste en digerir las proteínas e hidratos de carbono con enzimas y el remanente se adjudica a la fibra dietética previo descuento del contenido de cenizas y proteínas remanentes. Esta técnica con la ayuda de las enzimas permite la digestión para remover la proteína y el

almidón que actúan como una capa protectora del alimento y no permiten la fácil cuantificación de la fibra presente en el alimento.

Para determinar el método que se utilizaría para redactar el procedimiento de determinación de grasa en leche por método Gerber se evaluó la NMX-F-387-1982 y el método oficial AOAC 2000.18 eligiendo como método base el método oficial de la AOAC ya que es una técnica reciente en comparación con la norma mexicana.

El método Gerber se basa en la digestión parcial de los componentes de los distintos productos lácteos. Se emplea alcohol isoamílico para ayudar a disminuir la tensión en la interfase entre la grasa y la mezcla en reacción, lo que facilita el ascenso de los glóbulos pequeños de grasa por centrifugación. El alcohol isoamílico reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en dicho ácido.

5. CONCLUSIÓN

A partir de la recolección bibliográfica, normas oficiales mexicanas así como métodos oficiales internacionales y otros documentos como artículos referenciados se conoció la importancia y enfoque para los análisis y el impacto que estos tienen en la industria alimentaria ya que las nuevas normativas para el reporte del aporte nutricional han ido cambiando conforme los años y esto se debe al interés del consumidor por saber la concentración de nutrientes que contienen los alimentos que consume diariamente o con mayor frecuencia.

Es por esto que el laboratorio de análisis de ensayos de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz se vio en la necesidad de ampliar su catálogo de oferta de análisis químicos y bromatológicos ya que en los últimos meses aumentó la demanda de dichos análisis por parte de la industria alimentaria de la región y alrededores.

6. RECOMENDACIONES

Aplicando los procedimientos se recomienda realizar pruebas de ensayo de aptitud para posteriormente acreditar las técnicas a una entidad acreditadora.

7. BIBLIOGRAFÍA

AOAC Official Method 996.06 Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods.

AOAC Official Method 2000.18 Fat Content of Raw and Pasteurized Whole Milk (Gerber method by Weight [Method I])

Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (págs. 245-282). México: Pearson Educación.

Belitz, H., & Grosch, W. (1988). *Química de los alimentos* (Segunda ed.) (págs. 175-210). España: Acribia, S.A.

Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Apéndice normativo C.

Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2010). *Química Analítica* (Séptima ed.) (págs. 666-683). México: Mc Graw Hill.

8. ANEXOS

8.1 DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA POR EL MÉTODO GRAVIMÉTRICO ENZIMÁTICO

1. Objetivo

Establecer un procedimiento para la determinación de fibra dietética en alimentos, para los laboratorios de ensayos de la UTCV.

2. Alcance

Aplica a los análisis de fibra dietética en alimentos, realizados en la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, basados en la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994. Apéndice normativo C.

3. Fundamento

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

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

4. Definiciones

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

Lignina: Sustancia natural que forma parte de la pared celular de muchas células vegetales, a las cuales proporciona dureza y resistencia.

Polisacáridos: Polímeros cuyos constituyentes (sus monómeros) son monosacáridos, los cuales se unen repetitivamente mediante enlaces glucosídicos. Los principales polisacáridos son celulosa y almidón.

Enzima: Proteína soluble producida por las células del organismo, que favorecen y regulan las reacciones químicas en los seres vivos.

Muestra: Es el número total de unidades de producto provenientes de un lote y que representan las características y condiciones del mismo.

Blanco de muestra: Son matrices que no contienen el analito de interés. Son difíciles de obtener pero son necesarios para estimar las interferencias que pudieran encontrarse durante el análisis de las muestras de prueba.

Blanco de reactivos: Reactivos usados durante el proceso analítico (incluyendo los solventes usados en la extracción o disolución) los cuales son analizados para garantizar que la medición no es influenciada por los materiales utilizados durante el análisis.

5. Materiales, equipos y reactivos

Todos los reactivos mencionados a continuación deben ser grado analítico. Cuando se indique agua, esta debe entenderse por agua destilada o des ionizada.

5.1 Materiales

- Vasos de precipitado altos de 400 a 600 mL
- Crisol con porosidad N°2 o equivalente
- Tamiz de 0.3-0.5 mm
- Probetas de 25 y 100 mL calibradas y/o verificadas
- Pipetas volumétricas de 10 mL calibradas y/o verificadas
- Espátulas
- Vasos de precipitados de 100 y 50 mL
- Puntillas para micro pipeta
- Bureta de 25 ó 50 mL
- Agitador magnético
- Varilla de vidrio
- Tubos de ensaye
- Termómetro calibrado y/o verificado
- Pinzas para crisol
- Piseta

5.2 Equipos

- Balanza Analítica con sensibilidad de 0.1 mg calibrada y verificada
- Baños de agua (1) ebullición (2) temperatura constante con agitador magnético
- Bomba para generar vacío

- Horno de vacío y verificado
- Mufla calibrada
- Desecador
- Potenciómetro calibrado
- Micro pipeta calibrada y verificada para contener volúmenes de 1 y 0.1 mL
- Estufa de aire caracterizada y verificada
- Parrilla eléctrica con agitación.
- Cronómetro

5.3 Reactivos

Todos los reactivos deberán contar con su certificado de análisis.

- Etanol al 95% v/v grado técnico
- Etanol al 78%
- Acetona G.R
- Éter de petróleo
- Buffer de fosfatos 0.08 M pH 6.0
- Buffer de fosfatos pH 4.0
- Solución de α -amilasa termoestable
- Proteasa
- Amiloglucosidasa
- Solución de hidróxido de sodio 0.275N
- Solución hidróxido de sodio 0.1N
- Solución ácido clorhídrico (HCl) 0.325M
- Celite C-211 lavada con ácido
- Solución ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N
- Almidón de trigo o de maíz
- Caseinato de sodio o de calcio
- Hidróxido de Sodio
- Yodo

6. Preparación de reactivos

Prepara los siguientes reactivos de acuerdo a los requerimientos de análisis y registra en el FOLAB

6.1 Etanol al 78%

En un matraz de vidrio de 1000 mL mezclar 800 mL de etanol al 95% (v/v) y 200 mL de agua destilada.

6.2 Buffer de fosfatos 0.08M pH 6.0

Pesar 1.400g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) o 1.753g dihidratado.

Pesar 9.68g de fosfato monobásico monohidratado de sodio ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) o 10.94g dihidratado. Disolver ambos compuestos en aproximadamente 700 mL de agua y aforar a un litro. Verificar pH con un potenciómetro.

6.3 Solución de hidróxido de sodio 0.275N

Pesar 11g de NaOH y disolver en aproximadamente 700 mL de agua en un matraz aforado de un litro. Llevar a volumen con agua.

6.4 Ácido clorhídrico 1M

En matraz aforado de 1 L agregar aproximadamente 200 mL de agua, agregar 79.15 mL de HCl y llevar al aforo.

6.5 Solución de ácido clorhídrico 0.325M

Diluir 325 mL de HCl 1M en 1L de agua.

6.6 Solución de ácido Sulfúrico 1N

En un matraz aforado de 1L agregar aproximadamente 200 mL de agua, agregar 28.65 mL de H_2SO_4 y llevar al aforo.

6.7 Solución de Hidróxido de sodio 0.1N

Pesar 4g de NaOH y en un matraz aforado de 1L mezclar con aproximadamente 200 mL de agua destilada hasta disolver y llevar al aforo.

6.8 Solución de Yodo al 0.02N

Pesar 0.5076g de Yodo y mezclar con aproximadamente 25 mL de agua en un matraz aforado de 100 mL y completar al aforo.

7. Preparación del crisol para calcinar (tamaño de poro No. 2 o equivalente)

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

Adicionar aproximadamente 0.5g de celite al crisol secado al aire. Secar a 130°C hasta peso constante (>1h). Enfriar, pesar y almacenar en el desecador, hasta ser usado.

8. Procedimiento

8.1 Pureza enzimática

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

8.1.1 α -amilasa.

- En un vaso de 50 mL, poner en suspensión 1g de almidón de trigo o de maíz en 15 mL de agua destilada.
- Colocar el vaso en un baño de agua en ebullición y agitar continuamente la suspensión mediante una varilla de vidrio, hasta que se obtenga una solución viscosa.
- Añadir 100 μ L de suspensión de α -amilasa y poner en marcha el cronómetro. Agitar. Al cabo de 10 segundos la solución debe volverse fluida. Después de 2 minutos, verter, mediante una pipeta, 1 mL de esta solución en un tubo de ensayo que contenga 1 mL de H₂SO₄ 1N.
- Enfriar a temperatura ambiente y añadir unas gotas de solución de yodo 0.02N. No debe formarse coloración azul, violeta ni roja. En caso contrario repetir la prueba con 150 μ L de α -amilasa. **Si persiste la coloración reemplazar la enzima.**

8.1.2 Proteasa.

- En un vaso de 100 mL, poner en suspensión 1g de caseinato de sodio (o de calcio) en 60 mL de agua destilada. Introducir un agitador magnético. Colocar el vaso en un baño de agua a 60°C con agitación.
- Ajustar el pH a 7.5 añadiendo solución de NaOH 0.1N. Añadir 5 mg de proteasa y poner en marcha el cronómetro. Mediante una bureta añadir continuamente solución de NaOH 0.1N para mantener el pH a 7.5.
- Después de 10 minutos el número de mililitros de NaOH 0.1N añadidos debe ser igual o superior a 6. En caso contrario repetir la prueba con 10

mg de proteasa. Si el número de mililitros de NaOH 0.1N sigue siendo inferior a 6, reemplazar la enzima.

8.1.3 Amiloglucosidasa.

- En un vaso de 50 mL poner en suspensión 1g de almidón soluble en 15 mL de buffer de fosfato de pH 4.0. Introducir un agitador magnético y llevar a ebullición sobre una placa magnética con calefacción.
- Luego colocar el vaso en un baño de agua a 60°C con agitador. Cuando se alcance la temperatura, añadir 300 µL de suspensión de amiloglucosidasa y poner en marcha el cronómetro.
- Después de 15 minutos, verter mediante una pipeta 1 mL de esta solución en un tubo de ensayo que contenga 1 mL de H₂SO₄ 1N. Enfriar a temperatura ambiente y añadir unas gotas de yodo 0.02N. La coloración de la solución debe situarse entre el rojo/pardo y el naranja/amarillo. Si persiste la coloración azul, reemplazar la enzima.

8.2 Preparación de la muestra

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

Determinar la fibra dietética total en una muestra seca.

Homogeneizar la muestra y secar toda la noche en horno con vacío a 70°C. Enfriar en el desecador y una porción de muestra seca, molerla y pasarla a través de una malla de 0.3-0.5mm.

8.3 Desengrasado

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

- Pesar 10g de muestra (con una aproximación de 1 mg) en un vaso de 100 mL tarado previamente.
- Añadir 25 mL de éter de petróleo y agitar durante 15 minutos mediante un agitador magnético. Reposar 1 minuto y decantar la capa sobrenadante clarificada. Repetir la extracción dos veces más con éter de petróleo.
- Colocar el vaso en la estufa y secar el producto desengrasado bajo vacío a 70°C durante la noche.

- Enfriar a temperatura ambiente y pesar el vaso.
- Anotar la pérdida de peso debido a la remoción y haga las correcciones apropiadas al % final de fibra dietética encontrada en la determinación.
- Almacenar la muestra molida y seca en el desecador hasta llevar a cabo su análisis.

8.4 Determinación

- 8.4.1 Correr un blanco en forma paralela con las muestras para medir cualquier contribución desde el reactivo al residuo. Pesar por duplicado, con una aproximación de 0.1 mg, muestras de 1g dentro de vasos de precipitados largos de 400 mL. Los pesos de las muestras no deben diferir más de 20 mg. Adicionar 50 mL de buffer de fosfatos a cada vaso. Verificar el pH y ajustar si es necesario a pH 6.0 ± 0.2 .
- 8.4.2 Gelatinización del almidón. Adicionar 0.1 mL de solución α -amilasa. Cubrir el vaso con una hoja delgada de aluminio y colocarla en baño de ebullición por 15 minutos, agitar ligeramente cada 5 minutos. Incrementar el tiempo de incubación cuando el número de vasos en el baño no permita que el contenido de los vasos alcance una temperatura interna de 95-100°C. Usar termómetro para indicar si en 15 minutos se alcanzaron los 95-100°C. Un total de 30 minutos en el baño de agua pueden ser suficientes.
- 8.4.3 Hidrólisis de las proteínas. Enfriar las soluciones a temperatura ambiente. Ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 por adición de 10 mL de solución NaOH 0.275 N. Adicionar 5 mg de proteasa. (Es preferible preparar una solución de enzima a una concentración de 50 mg/ mL de buffer de fosfatos y tomar con una pipeta 0.1 mL de esta para adicionar a cada muestra antes del uso).
- 8.4.4 Hidrolisis del almidón. Cubrir el vaso con una hoja delgada de aluminio o incubar 30 minutos a 60°C con agitación continua. Enfriar y adicionar 10 mL de la solución de HCl 0.325 M. Verificar el pH y adicionar gotas del ácido si es necesario. El pH final debe ser de 4.0 a 4.6. Adicionar 0.3 mL de amiloglucosidasa. Cubrir con una hoja delgada de aluminio e incubar 30 minutos a 60°C con agitación continua.
- 8.4.5 Precipitación de la fibra. Retirar los vasos del baño de agua y añadir enseguida a cada uno de ellos 280 mL de etanol al 95% precalentado a 60°C (medir el volumen antes del calentamiento). Dejar que se forme el precipitado a temperatura ambiente durante 60 minutos.
- 8.4.6 Pesar, con una aproximación de 0.1 mg, dos crisoles secados con celite, después humedecer y distribuir la cama de celite en el crisol usando una corriente de etanol al 78% desde una piseta. Aplicar succión para jalar la celite sobre un fragmento de vidrio liso como una capa uniforme. Mantener la succión y transferir cuantitativamente el precipitado de la digestión enzimática al crisol. Lavar el

residuo sucesivamente con tres porciones de 20 mL de etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 95% y dos porciones de 10 mL de acetona. En algunas muestras puede formarse una goma atrapando el líquido, si es así, romper la capa de la superficie con espátula para mejorar la filtración. El tiempo de filtración y lavado puede variar desde 1 a 6 horas, promediando media hora por muestra. Tiempos prologados de filtración puede ser evitados por succión cuidadosa intermitente durante toda la filtración.

- 8.4.7 Secar el crisol conteniendo el residuo, toda la noche, en un horno con vacío a 70°C, en horno de aire a 105°C o en una estufa a 102±2°C. Enfriar en el desecador y pesarlos con una aproximación de 0.1 mg. Sustraer el peso del crisol y del celite para determinar el peso del residuo. Analizar el residuo de una de las muestras del duplicado para proteína, usando N₂ x 6.25 como factor de conversión, excepto en los casos donde el contenido de N₂ se conoce.
- 8.4.8 Incinerar el segundo residuo por 5 horas a 525°C. Enfriar en el desecador y pesar con una aproximación de 0.1 mg. Sustraer el peso del crisol y celite para determinar las cenizas.

Ensayo de blanco.

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

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

9. Cálculos

Los cálculos para determinar la fibra dietética deberán seguirse de la siguiente manera

9.1 Determinación del blanco

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

Donde:

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

PB y AB= pesos (mg) de proteína y cenizas respectivamente. Determinar residuos de los blancos.

9.2 Calcular la fibra dietética total (TDF) como sigue:

$$\% \text{ de TDF} = \frac{\text{peso del residuo} - P - A - B}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

Donde:

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

P y A= pesos (mg) de proteína y ceniza respectivamente, en los residuos de las muestras.

B= peso del blanco.

Peso de la muestra= promedio de peso (mg) de las dos muestras tomadas para proteínas y cenizas.

10. Control de calidad

Se tomarán como control de calidad las siguientes condiciones:

Verificar las enzimas empleadas en el procedimiento, máximo cada 6 meses o cada vez que se cambie el lote de las mismas, para asegurar la ausencia de actividad enzimática indeseable y/o asegurar que no se han degradado.

Analizar un blanco de reactivos en forma alterna con la muestra.

Realizar por duplicado cada muestra. En caso de que el lote tenga diferentes matrices, realizar al menos un duplicado por matriz.

Cuando se trata de la misma matriz, se puede realizar la muestra duplicada por cada lote.

Para la repetibilidad se debe considerar lo siguiente:

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

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

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

11. Reporte de resultados

Se deberán documentar cada una de las etapas del ensayo en el formato FOLAB__.

Se deberá reportar como % de TDF (fibra dietética total) por cada 100g.

Realizar los cálculos correspondientes al sistema internacional de unidades (SI).

12. Elaboración de informe de ensayo

Elabora el informe de ensayo utilizando el FOLAB03, llenando adecuadamente cada uno de los datos correspondientes a la muestra.

13. Bibliografía

Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994. Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Apéndice normativo C. Determinación de fibra dietética.

Dosal, María A.; Villanueva, Marcos. 2008. Introducción a la metrología química.

Matos, Alfredo; Chambilla, Elmer. 2010. Importancia de la fibra dietaria, sus componentes funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria.

14. Anexos

Anexo 1

Tabla 1. Materiales a correr para asegurar la actividad enzimática.

Muestra testigo	Actividad ensayada	Peso muestra (g)	% Recuperación
Pectina cítrica	Pectinasa	0.1	95-100
Etractana (goma lárice)	Hemicelulasa	0.1	95-100
Almidón de trigo	Amilasa	1.0	0-1
Almidón de maíz	Amilasa	1.0	0-2
Caseína	Proteasa	0.3	0-2
-Glucan (goma de cebada)-	Glucanasa	0.1	95-100

8.2 PLANTILLA EXCEL PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS.

	DETERMINACIÓN DE FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS.				CÓDIGO-REV.	FOLAB_
	Basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994				RESPONSABLE DE LA EFICACIA (CÓDIGO)	DAC02
					No. PROCESO	2

ANALISTA:		INTERVALO DE TRABAJO DEL ANALISTA:	
FOLIO:		INTERVALO DE TRABAJO DEL MÉTODO:	
MUESTRA:		INCERTIDUMBRE:	
GRAMOS DE MUESTRA EMPLEADOS:		UNIDADES:	% de TDF (fibra dietética total) g/100g
FECHA:			

MATERIALES:	CÓDIGO:	MATERIALES:	CÓDIGO:
Bureta de 25 ó 50 mL	□	Probeta de 25 ó 100 mL	□
Termómetro	□	Pipeta de 10 mL	□

OTROS MATERIALES:	OTROS MATERIALES:	EQUIPOS:	CÓDIGO:
Vasos de precipitado de 100 y 50mL	Agitador de vidrio	Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg	□
Vasos de precipitado altos de 400 y 600mL	Agitador magnético	Baño termoregulador	□
Puntillas para micropipeta	Piseta	Bomba para generar vacío	□
Tamiz de 0.3-0.5 mm	Tubos de ensaye	Horno de vacío caracterizado	□
Espátulas		mufla caracterizada	□
Pinzas para crisol		Potenciómetro calibrado	□
Crisol con porosidad N° 2 o equivalente		micropipeta calibrada	□
Desecador		estufa de aire caracterizada	□
		Parrilla eléctrica	□
		Cronómetro	□

Reactivos empleados:	Peso/Vol. O unidades de pH	Unidades (g/mL)	Lote	Marca	Criterios a considerar	Observaciones del analista
Agua destilada	(pH del agua destilada)					
Etanol al 95%v/v grado técnico					Mezclar 800mL de etanol al 95% (v/v) y 200mL de agua destilada para una concentración al 78%	
Acetona grado reactivo						

Éter de petróleo					
Buffer de fosfatos 0.08M pH 6.0					Disolver 1,400 g de fosfato dibásico de sodio anhidro (Na ₂ HPO ₄) (o 1,753 g dihidratado) y 9,68 g de fosfato monobásico monohidratado de sodio (Na ₂ H ₂ PO ₄) (o 10,94 g dihidratado) en 700 ml de H ₂ O. Llevar a 1 L con agua. Checar el pH con un potenciómetro.
Buffer de fosfatos (___M) pH 4.0					
Solución de a-amilasa termoestable					
Proteasa					
Amiloglucosidasa					
Hidróxido de sodio					NaOH 0.275N: 11g NaOH en 700mL de agua en un matraz de 1L y llevar a volumen
					NaOH 0.1N: diluir 0.0025g en 1L de agua
Ácido clorhídrico					HCl 0.325M: 325 ml de HCl 1 M a 1 litro con agua
Ácido sulfúrico					Solución H ₂ SO ₄ 1N: En un matraz aforado de 1L diluir 28.65mL de H ₂ SO ₄ con 200mL de agua y llevar al aforo.
Celite C-211 lavada con ácido					
Almidón					
yodo					Solución 0.02N mezclar 0.5076g de Yodo 25mL de agua en un matraz aforado de 100ml y completar al aforo.
Caseinato de sodio					

CONTROL DE CALIDAD - CRITERIO DE ACEPTACIÓN

PUREZA ENZIMÁTICA

a-amilasa (100µL)	Proteasa (5g)	Amiloglucosidasa (0.3mL)
Coloración azul, violeta o roja	mL NaOH 0.1N utilizados	Coloración rojo/pardo o naranja/amarillo
*En caso positivo, repetir la prueba con 150 µl de amilasa, si persiste la coloración reemplazar la enzima	*En caso de ser menos de 6mL repetir la prueba con 10g de proteasa, si persiste el consumo reemplazar la enzima	*En caso de coloración azul persistente, reemplazar la enzima
Aceptado <input type="text"/> Rechazado <input type="text"/>	Aceptado <input type="text"/> Rechazado <input type="text"/>	Aceptado <input type="text"/> Rechazado <input type="text"/>

**** En caso de rechazar la enzima, se deberá adquirir nuevamente.**

Repetibilidad: La diferencia entre dos resultados individuales obtenidos con la misma muestra para ensayo, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo, no debe exceder:
 0,80 g/100 g de producto si la fibra es < 25% 1,20 g/100 g de producto si la fibra es > 25%

CÁLCULOS-RESULTADOS

Para determinar el blanco utilizado en la fórmula de fibra dietética se realizan los siguientes cálculos:

Identificación de la muestra	Peso en mg del residuo	Peso en mg de proteína	Peso en mg de cenizas	Blanco (mg)
BLANCO A				#j DIV/0!
BLANCO B				
Promedio	#j DIV/0!			

Para calcular el %FDT se realiza la siguiente fórmula

Código de la muestra	Peso en mg de la muestra	Peso en mg del residuo	Peso en mg de proteína	Peso en mg de cenizas	% de fibra dietética	g/100g
					#j DIV/0!	#####
Promedio	#i DIV/0!	#j DIV/0!				

Código de la muestra	Peso en mg de la muestra	Peso en mg del residuo	Peso en mg de proteína	Peso en mg de cenizas	% de fibra dietética	g/100g
					#j DIV/0!	#####
Promedio	#i DIV/0!	#j DIV/0!				
Promedio	#i DIV/0!					
DS	#j DIV/0!					
CV	#j DIV/0!					

Determinación del blanco
B = blanco mg = peso residuo - PB - AB
 Donde :
 peso del residuo = promedio de los pesos de residuos (mg) para las determinaciones del blanco duplicado
 PB y AB = pesos (mg) de proteína y cenizas respectivamente. Determinar residuos en el primero y segundo residuos.
Fibra dietética total (TDF)
% de TDF = [peso del residuo - P - A - B/ peso de la muestra] x 100
 donde:
 peso del residuo = promedio de los pesos (mg) para el duplicado de muestras determinadas.
 P y A = pesos (mg) de proteína y ceniza respectivamente en el primero y segundo residuos de las muestras.
 peso de la muestra = promedio de peso (mg) de las 2 muestras tomadas.
 B=blanco indicado anteriormente

REPORTE DE RESULTADOS

Reportar como _____ % Fibra dietética y _____ g/100 g

8.3 DETERMINACIÓN DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

1. OBJETIVO

Establecer un procedimiento para la determinación del perfil de ácidos grasos en alimentos, para los laboratorios de ensayos de la UTCV.

2. ALCANCE

Aplica a los análisis de ácidos grasos (grasa total, saturada, insaturada y poliinsaturada) en alimentos, realizados en la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, basados en el método oficial AOAC 996.06.

3. FUNDAMENTO

La grasa y los ácidos grasos se extraen de los alimentos mediante métodos hidrolíticos (hidrólisis ácida para la mayoría de los productos, hidrólisis alcalina para los productos lácteos y una combinación de ambas para el queso).

Se añade ácido pirogálico para minimizar la degradación oxidativa de los ácidos grasos durante el análisis.

El triglicérido, triundecanoato, es utilizado como estándar interno.

La grasa se extrae en éter, luego se metila a ésteres metílicos de ácidos grasos usando como reactivo trifluoruro de boro en metanol.

Los ésteres metílicos de ácidos grasos se miden cuantitativamente por cromatografía capilar de gases contra el estándar interno C_{11:0} (triundecanoato de glicerilo).

La grasa total es igual a la suma de ácidos grasos individuales expresados como equivalentes de triglicéridos.

Las grasas saturadas y monoinsaturadas se calculan como la suma de los ácidos grasos respectivos.

La grasa monoinsaturada incluye sólo la forma cis.

4. DEFINICIONES

- **Ácido Graso:** Es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo (son ácidos orgánicos de cadena larga).
- **Grasa saturada:** Son ácidos grasos no enoicos, que se encuentran presentes en los lípidos, raramente libres, y casi siempre esterificando al glicerol (eventualmente a otros alcoholes). Son generalmente de cadena lineal y tienen un número par de átomos de carbono.
- **Grasa insaturada:** Son las que ayudan a bajar el colesterol en la sangre, siempre que se utilizan en lugar de las grasas saturadas. Sin embargo, las grasas insaturadas tienen muchas calorías, de tal manera que es necesario limitar su consumo.

Existen dos tipos de grasas insaturadas:

- Grasas monoinsaturadas: los ejemplos abarcan el aceite de oliva y el aceite de canola. Olivas, colza, frutos secos (pistachos, almendras, avellanas, nueces de macadamia, anacardos, nueces de pecán), cacahuetes, aguacates y sus aceites.
- Grasas poliinsaturadas: los ejemplos abarcan los aceites de pescado, azafrán, girasol, maíz y soja. A su vez, las grasas poliinsaturadas se subdividen en distintas clases, donde destacan por sus propiedades dos subtipos: las grasas omega 6 y omega 3.
- **Cromatografía de gases:** Técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte.

5. Materiales, equipos y reactivos

5.1 Materiales

Matraz Mojonnier

Tapón p/ampolla Mojonnier

Perlas de ebullición

Cestas aluminio/plástico

Tubo de dispersión de gas (25mm, porosidad “A”)

Viales 11 mL

Tapas para viales con poli vinyl

Septo de teflón

Probetas de 100 mL calibradas y/o verificadas
Pipetas volumétricas de

5.2 Equipo

Cromatografo de gas
Columna capilar (SP2660 100m X 0.25 mm con 0.20 μ m de película)
Centrifuga de canasta
Tina de agua con agitador
Tina de vapor
Tina baño maría
Agitador de acción de muñeca para la centrifuga de canasta
Centrifuga motorizada Mojonnier
Agitador Vortex

5.3 Reactivos

Todos los reactivos deberán contar con su certificado

Ácido Pirogálico
Ácido Clorhídrico
Hidróxido de amonio
Éter di etílico (pureza apropiada para la extracción de grasa)
Éter de petróleo
Etanol
Tolueno
Cloroformo
Sulfato de sodio
Reactivo de Trifluoruro de Boro
Éter di etílico (mezcla de éter de petróleo)
Solución estándar interna de triglicérido

6. Preparación de reactivos

Prepara los siguientes reactivos de acuerdo a los requerimientos de análisis y registra en el FOLAB_

Ácido Clorhídrico
Para elaborar HCL a 8.3M, añadir 250 mL de HCL a 12M en 110 mL de agua. Agitar perfectamente, almacenar a temperatura ambiente.

Trifluoruro de Boro

7% Trifluoruro de Boro (W/W) en metanol, realizar a partir de la solución comercial disponible de Trifluoruro de Boro al 14%.

Solución estándar interna de triglicéridos (C_{11:0} Triundecanoato)

Pesar 2.50 g de Triundecanoato C_{11:0} y agregarlos a un matraz volumétrico de 500 mL. Agregar 400 mL de CHCl₃ y mezclar hasta disolver. Diluir al volumen con cloroformo. Invertir al menos 10 veces el frasco homogeneizando toda la muestra. El estándar interno de triglicérido es estable hasta 1 mes almacenado en refrigeración (2-8°C)

Soluciones estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos.

1) Solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Mezcla referenciada que contenga series de ésteres metílicos, incluyendo C_{18:1} cis y trans. Para preparar la mezcla de solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos, romper la parte superior del vial de vidrio, abrir y transferir cuidadosamente el contenido en un vial de vidrio de 3 drams. Lavar el vial original con hexano y transferir el contenido al vial de vidrio de 3 drams. Diluir con aproximadamente 3 mL de hexano.

2) Solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos C_{11:0}

C_{11:0} – éster metílico undecanoico en hexano. Utilizar sólo en la preparación de la solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos individuales.

Para preparar la solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos C_{11:0} undecanoico, abrir el vial de vidrio y transferir cuidadosamente el contenido a un matraz volumétrico de 50 mL. Diluir a volumen con hexano. La solución es estable hasta 1 semana almacenada a 0°C.

3) Soluciones estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos individuales.

Soluciones estándar de cada uno de los siguientes ésteres metílicos de ácidos grasos:

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE TRIVIAL
C _{4:0} – éster metílico tetraoico	BUTIRÍCO
C _{6:0} – éster metílico hexanoico	CAPROICO
C _{8:0} – éster metílico octanoico	CAPRÍLICO
C _{10:0} – éster metílico decanoico	CÁPRICO
C _{12:0} – éster metílico dodecanoico	LÁURICO
C _{13:0} – éster metílico tridecanoico	-
C _{14:0} – éster metílico tetradecanoico	MIRÍSTICO

C _{14:1} – éster metílico tetradeca-9-enoico	-
C _{15:0} – éster metílico pentadecanoico	ÁCIDO PENTADECANOICO
C _{15:1} – éster metílico pentadeca-10-enoico	-
C _{16:0} – éster metílico hexadecanoico	PALMITICO
C _{16:1} – éster metílico hexadeca-9-enoico	PALMITOLEICO
C _{17:0} – éster metílico heptadecanoico	-
C _{17:1} – éster metílico heptadeca-10-enoico	-
C _{18:0} – éster metílico octadecanoico	ESTEARICO
C _{18:1} – éster metílico Octadeca-9-enoico	OLEICO
C _{18:2} – éster metílico Octadeca-9:12-dienoico	LINOLEICO
C _{18:3} – éster metílico Octadeca-9:12:15-trienoico	LINOLÉNICO
C _{20:0} – éster metílico eicosanoico	ARAQUÍDICO
C _{20:1} – éster metílico 8-eicosanoico	-
C _{20:2} – éster metílico 11,14-eicosadienoico	-
C _{20:3} – éster metílico 11,14,17-eicosatrienoico	-
C _{22:0} – éster metílico docosanoico	BEHÉNICO

Preparar individualmente las soluciones estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos como se describe a continuación:

Abrir la parte superior del vial de vidrio y transferir cuidadosamente el contenido a un vial de 3 drams. Lavar el vial original con hexano para asegurar la transferencia completa y agregar el hexano al vial de 3 drams. Agregar 1 mL de solución estándar de ácido undecanoico C_{11:0}, diluir el volumen total con 3 mL de hexano. Las soluciones estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos individuales son estables hasta 1 semana cuando se almacenan en refrigeración (2-8°C).

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Alimentos excluyendo productos lácteos y queso.

- Pesar con precisión y homogeneizar una porción de muestra (que contenga de 100-200 mg de grasa). Colocarlo dentro de la ampolla Mojonnier, hasta el fondo.

- Añadir 100 mg de ácido pirogálico y 2 mL de la solución estándar interna de triglicérido junto con 4 perlas de ebullición al frasco.
- Añadir 2 mL de etanol y mezclar bien hasta que toda la porción del tubo genere una solución.
- Añadir 10 mL de HCL al 8.3 M y mezclar bien.
- Llevar el tubo a baño maría de 70 a 80°C con constante agitación, mantenerlo durante 40 minutos.
- Mezclar perfectamente utilizando un agitador vortex cada 10 minutos para incorporar las partículas adheridas a las paredes del frasco.
- Después de la digestión retirar el tubo del baño de agua y enfriarlo a temperatura ambiente (20-25°C).
- Añadir suficiente etanol para llenar el depósito inferior del frasco y mezclar suavemente.

7.2 Productos lácteos

- Pesar con precisión y homogeneizar una porción de la muestra que contenga 100-200 mg de grasa, colocarlo dentro del frasco Mojonnier lo más lejos posible.
- Añadir 100 mg de ácido pirogálico y 2 mL de solución estándar interna de triglicérido junto con 4 perlas de ebullición.
- Añadir 2 mL de etanol y agitar perfectamente hasta que la mezcla genere una solución.
- Añadir 4 mL de agua y mezclar bien.
- Añadir 2 mL de NH₄OH y mezclar bien.
- Introducir el frasco Mojonnier en un baño de agua de 70-80°C a una velocidad de agitación moderada. Mantenerlo así durante 10 minutos.
- Mezclar perfectamente utilizando un agitador vortex cada 5 minutos para incorporar las partículas adheridas en las paredes del frasco.
- Después de la digestión retirar el tubo del baño de agua y agregarle 3 gotas de fenolftaleína.
- Mantener la solución básica (rosa) con la adición de hidróxido de amonio.
- Añadir suficiente etanol hasta llenar el frasco y mezclar suavemente.

7.3 Queso

- Pesar con precisión y homogeneizar una porción de la muestra que contenga 100-200 mg de grasa, colocarlo dentro del frasco Mojonnier lo más lejos posible.

- Añadir 100 mg de ácido pirogálico y 2 mL de solución interna de triglicérido junto con 4 perlas de ebullición.
- Agregar 2 mL de etanol y agitar perfectamente hasta que la mezcla genere una solución.
- Agregar 4 mL de agua y mezclar perfectamente.
- Agregar 2 mL de NH₄OH y mezclar perfectamente.
- Colocar los frascos dentro de un baño de agua a 70-80°C con una velocidad de agitación moderada, durante 20 minutos.
- Mezclar perfectamente utilizando un agitador Vortex cada 10 minutos para incorporar las partículas adheridas en la pared del frasco.
- Agregar 10 mL de HCl 12 M y llevar el frasco a baño de vapor durante 20 minutos.
- Mezclar el contenido del frasco cada 10 minutos con ayuda de un agitador Vortex.
- Retirar el frasco del baño de vapor y dejar enfriar a temperatura ambiente (20-25°C).
- Añadir suficiente etanol hasta llenar al frasco y mezclar suavemente.

Agregar 25 mL de éter di etílico a los frascos Mojonnier A, B o C. Tapar los frascos y colocarlos en la canasta de la centrifuga.

Colocar la canasta en el agitador de acción de muñeca, asegurando el matraz con la tubería de goma. Agitar el frasco durante 5 minutos. Enjuagar el tapón del matraz con una mezcla de éter di etílico y éter de petróleo.

Agregar 25 mL de éter de petróleo en los frascos y agitar durante 5 minutos.

Centrifugar los frascos en la canasta durante 5 min a 600 x g. (Nota: Si la centrifuga no está disponible, permitir que el contenido se estabilice por lo menos 1 hora hasta que la capa superior esté despejada).

Enjuagar el tapón del matraz con una mezcla de éter di etílico y éter de petróleo.

Decantar la capa de éter (capa superior) en un vaso de 150 mL y enjuagar cuidadosamente el labio del matraz con una mezcla de éter di etílico y éter de petróleo.

Evaporar lentamente el éter en el baño de vapor, utilizando corriente de nitrógeno para ayudar a la evaporación

El residuo que queda en el vaso contiene grasa extraída

8. METILACIÓN

Disolver el residuo del extracto de grasa en 2-3 mL de cloroformo y 2-3 mL de éter di etílico. Transferir la mezcla a un vial de 3 drams, para después evaporar hasta secar en un baño de vapor de nitrógeno a 40°C.

Agregar 2 mL de reactivo trifluoruro de boro al 7% y 1 mL de tolueno.
Sellar el vial con una tapa de rosca que contenga un septum de teflón.
Calentar el vial en una estufa 45 minutos a 100°C.

Agitar cuidadosamente el vial cada 10 minutos. (Nota: La evaporación del líquido en los viales indica un mal sellado; si esto ocurre, descartar la solución y repetir por completo el procedimiento.

Dejar enfriar el vial a temperatura ambiente (20-25°C). Agregar 5 mL de H₂O, 1 mL de hexano y 1 gr de Na₂SO₄. Tapar el vial y agitar 1 minuto.

Dejar que las capas se separen y luego cuidadosamente transferir la capa superior a otro vial que contenga 1 gramo de Na₂SO₄. (Nota: La capa superior contiene esteres metílicos de ácidos grasos incluyendo la solución estándar interna de triglicéridos).

Inyectar los esteres metílicos de ácidos grasos en la columna del Cromatografo de gases o transferirlos a un vial automático para el análisis de cromatografía.

9. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Los tiempos de retención relativos (vs los esteres metílicos de ácidos grasos de la solución interna de triglicérido) y los factores de respuesta de los esteres metílicos de ácidos grasos individuales pueden ser obtenidos por análisis de cromatografía de gases de la solución interna de esteres metílicos de ácidos grasos individuales y la solución estándar de la mezcla de los esteres metílicos de ácidos grasos.

Inyectar 2 µL de cada solución estándar de esteres metílicos de ácidos grasos individuales y 2 µL de la mezcla de la solución estándar de esteres metílicos de ácidos grasos.

Utilizar una solución estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos mezclados para optimizar la respuesta cromatográfica antes de inyectar cualquier solución de prueba.

Después de optimizar todas las condiciones cromatográficas, inyectar soluciones de prueba del apartado de METILACIÓN.

10. CÁLCULOS

La grasa total es la suma de los ácidos grasos de todas las fuentes, expresadas como triglicéridos. Expresar los ácidos grasos medidos como triglicéridos requiere de un equivalente matemático que consiste en condensar cada ácido graso con glicerol.

Por cada 3 moléculas de ácidos grasos, 1 molécula de glicerol es requerida. Esencialmente, se añaden 2 grupos metileno y 1 grupo metino a cada 3 ácidos grasos.

Para calcular el tiempo de retención para cada éster metílico de ácidos grasos en soluciones estándar de ésteres metílicos de ácidos grasos individuales, se debe restar el tiempo de retención del pico de C_{11:0} del tiempo de retención del pico de cualquier otro ácido graso.

Se utilizan estos tiempos de retención para identificar ésteres metílicos de ácidos grasos en una solución patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos mixtos.

Se recomienda utilizar soluciones adicionales de éster metílico de ácidos grasos (del mismo proveedor) cuando sea necesario para la verificación completa de la identidad del éster metílico de ácidos grasos.

- a) Calcular la respuesta del factor (R_i) para cada ácido graso como se indica: C_{11:0}

$$R_i = \frac{P_{si}}{P_{sc11:0}} \times \frac{W_{c11:0}}{W_i}$$

Donde:

P_{si} = Área de pico de ácido graso individual en solución estándar de ésteres metílicos de Ácidos grasos mixtos.

$P_{sc11:0}$ = Área de pico del ácido graso C_{11:0} en la solución patrón de éster metílico de ácidos

Grasos mixtos.

$W_{c11:0}$ = Peso del patrón interno en la solución patrón de ésteres metílicos de ácidos Grasos mixtos

W_i = Peso de éster metílico de ácido graso individual en solución patrón de ésteres Metílicos de ácidos grasos mixtos.

(Nota: Los picos de identidad conocidos con los tiempos de retención relativos conocidos se enumeran en la tabla 996.06D. Cuando se observan picos de identidad desconocida durante el recorrido cromatográfico, se intenta identificar tales picos usando espectrometría de masa (MS), espectrometría por infrarrojo (FTIR), etc.

Picos de identidad desconocida no deben ser considerados en la suma de cuantificación en el test de la muestra).

- b) Calcular la cantidad de triglicéridos individuales en la muestra de ensayo de la siguiente manera:

$$Wfamei = \frac{Pti \times Wtc11:0 \times 1.0067}{Ptc11:0 \times Ri}$$

$$WTGi = WFAMEi \times fTGi$$

Donde:

Pti = Área del pico del ácido graso *i* en la porción de prueba.

Wt_{C11:0} = Peso del estándar interno C_{11:0} añadido a la porción de prueba.

1.0067 = Conversión de patrón interno de triglicérido a éster metílico de ácido graso.

Pt_{C11:0} = Área del pico de la porción del estándar interno de triglicérido C_{11:0}

f_{TGi} = Factor de conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos a triglicéridos para Ácidos grasos individuales. (Ir a tabla 996.06E)

Nota: Si el procedimiento se sigue exactamente, Wt_{C11:0} debe ser 0.010g

- c) Calcular la cantidad de grasa total en la muestra de ensayo (suma de todos los ácidos grasos, expresada como triglicéridos [incluidas las formas *cis* y *trans* de ácidos monoinsaturados]) de la siguiente manera:

$$Grasa\ Total, \% = \frac{\sum W D t g}{W_{test\ portion}}$$

Donde:

W_{test sample} = Peso de la porción de prueba (gramos)

- d) Calcular el peso para cada ácido graso (Wi) de la siguiente manera:

$$Wi = Wfamei \times fFAi$$

Donde:

fFAi = Factores de conversión para la conversión de ésteres metílicos de ácidos grasos en sus correspondientes ácidos grasos. (Ver tabla 996.06E)

- e) Calcule el porcentaje de grasa saturada en la muestra de ensayo (p/p, expresada como ácidos grasos saturados, suma de C_{4:0}, C_{6:0}, C_{8:0}, etc.) como se muestra a continuación:

$$Grasa\ saturada, \% = \left(\frac{\sum saturated\ P_i}{P\ test\ portion} \right) \times 100\%$$

- f) Calcular la cantidad de grasa monoinsaturada en la muestra de ensayo (p / p; expresada como la suma de la única forma cis de ácidos grasos mono insaturados [C_{16:1}, C_{17:1}, C_{18:1 cis}, C_{20:1}, etc.]) como se muestra a continuación:

$$\text{Grasa mono insaturada, \%} = \left(\sum \text{mono insaturada } P_i / P_{\text{test portion}} \right) \times 100$$

$$\text{Grasa poli insaturada, \%} = \left(\sum \text{poli insaturada } P_i / P_{\text{test portion}} \right) \times 100$$

Nota: Las muestras de ensayo que contienen grasa hidrogenada producirán cromatogramas complicados debido al gran número de isómeros formados durante el proceso de hidrogenación. Una indicación general de la hidrogenación es la presencia del pico del C_{18:1 trans}.

Para los cromatogramas de grasa hidrogenada, usar las siguientes pautas para calcular las áreas de los picos de los ésteres metílicos de ácidos grasos: Los picos trans eluyen antes de cis, por lo tanto, incluyen todos los picos entre C_{18:1 cis} y C_{18:2 cis, cis, cis} en el cálculo del área del pico de C_{18:2}.

Algunas veces el pico C_{18:1 trans} consiste en una amplia serie de picos (debido a los isómeros posicionales de la hidrogenación); incluyen todos estos en el área de pico *trans* C_{18:1}.

11. CONTROL DE CALIDAD

Se tomarán como control de calidad las siguientes condiciones:

Verificar los estándares de ésteres metílicos de ácidos grasos en el procedimiento, máximo cada 12 meses o cada vez que se cambie el lote de los mismos, para asegurar que no se han degradado.

Analizar un blanco de reactivos en forma alterna con la muestra.

Realizar por duplicado cada muestra. En caso de que el lote tenga diferentes matrices, realizar al menos un duplicado por matriz.

Cuando se trata de la misma matriz, se puede realizar la muestra duplicada por cada lote.

Para la repetibilidad se debe considerar lo siguiente:

Si el procedimiento se siguió de forma exacta y correcta el valor de $W_{t_{C11:0}}$ debe ser de 0.010 g.

12. REPORTE DE RESULTADOS

Se deberán documentar cada una de las etapas del ensayo en el formato FOLAB.

Se deberá reportar como % de cada uno de los esteres metílicos de ácidos grasos presentes en la muestra a analizar por cada 100g.

Así como se debe adjuntar una tabla en la que se clasifique el contenido en gramos de Grasa total, grasa saturada, grasa monoinsaturada y grasa poliinsaturada.

Y una tabla en la que se especifique el nombre común del ácido graso clasificado en el tipo de grasa que corresponde y se reporta en gr por cada 100g de muestra.

13. ELABORACIÓN DE INFORME DE ENSAYO

Elabora el informe de ensayo utilizando el FOLAB03, llenando adecuadamente cada uno de los datos correspondientes a la muestra.

14. BIBLIOGRAFÍA

Método Oficial AOAC 996.06 Grasa (Total, Saturada e Insaturada) en alimentos. Extracción hidrolítica por el método de Cromatografía de gases.

Badui, S. 4 edición. 2006. Química de los alimentos. México: Pearson Educación.

Skoog, D; West, D; Holler, J; Crouch, S. 7 edición. 2001. Química analítica. México. Mc Graw Hill

15. ANEXOS

Anexo A

Tabla 1. Tiempo de retención de los ácidos grasos y de los esteres metílicos.

Ácido Graso	Tiempo de retención,min	Tiempos de retención relativos
4:0 Ácido Butírico	10.49	0.46
6:0 Ácido Caproico	12.36	0.54
8:0 Ácido Caprílico	15.69	0.68
10:0 Ácido Cáprico	20.39	0.89
11:0 Ácido Undecanoico	22.99	1.00
12:0 Ácido Laurico	25.58	1.11
13:0 Ácido Tridecanoico	28.15	1.22
14:0 Ácido Mirístico	30.65	1.33
14:1 Ácido Miristoleico	32.63	1.42
14:1 Ácido <i>trans</i> Miristelaídico	32.01	1.39
15:0 Ácido pentadecanoico	33.04	1.44
15:1 Pentadecenoico	34.98	1.52
16:0 Ácido Palmitico	35.41	1.54
16:1 <i>trans</i> Palmitáídico	36.39	1.58
16:1 Ácido Palmitoleico	36.88	1.60
17:0 Ácido Margárico	37.54	1.63
17:1 Ácido Margaroleico	38.92	1.69
18:0 Ácido Esteárico	39.78	1.73
18:1 Ácido 6-petroselénico <i>trans</i>	40.50	1.76
18:1 Ácido Elaídico <i>trans</i>	40.61	1.77
18:1 Ácido 11-vaccenico <i>trans</i>	40.72	1.77
18:1 Ácido Petroselénico	40.90	1.78
18:1 Ácido Oleico	40.99	1.78
18:1 Ácido Vaccenico	41.18	1.79
18:1 Ácido Octadecanoico	41.54	1.81
18:2 Ácido Linolelaídico <i>trans</i>	41.69	1.81
18:2 Ácido 9-Linolelaídico <i>trans</i>	42.11	1.83
18:2 Ácido 12-Linolelaídico <i>trans</i>	42.53	1.85
18:2 Ácido Linoleico	42.87	1.86
20:0 Ácido Araquídico	43.75	1.90
18:3 Ácido g-linoleico	44.25	1.92
20:1 Ácido Eicosanoico <i>cis5</i>	44.42	1.93
20:1 Ácido Eicosanoico <i>tans11</i>	44.45	1.93
20:1 Ácido Eicosanoico <i>cis8</i>	44.67	1.94
20:1 Ácido Eicosanoico <i>cis11</i>	44.82	1.95
20:1 Ácido Eicosanoico <i>cis13</i>	44.99	1.96
18:3 Ácido linoleico	45.02	1.96

18:2 Ácido linoleico conjugado	45.35	1.97
18:2 Ácido linoleico conjugado	45.40	1.97
21:0 Ácido Heneicosanoico	45.69	1.99
18:2 Ácido linoleico conjugado	46.18	2.01
18:4 Ácido Octadecartraenoico	46.39	2.02
20:2 Ácido Eicosadienoico	46.65	2.03
22:0 Ácido Behénico	47.46	2.06
20:3 Ácido g-Eicosatrienoico	47.94	2.09
22:1 Ácido Cetoleico	48.27	2.10
22:1 Ácido Erucico	48.50	2.11
20:3 Ácido Eicosatrienoico	48.68	2.12
20:4 Ácido Araquidónico	48.94	2.13
23:0 Ácido Tricosanoico	49.22	2.14
22:2 Ácido Docosadienoico	50.17	2.18
24:0 Ácido Lignocerico	50.79	2.21
20:5 Ácido Eicosapentaenoico	50.96	2.22
24:1 Ácido Nervónico	51.92	2.26
22:3 Ácido Docosatrienoico	51.98	2.26
22:4 Ácido Docosatetraenoico	52.28	2.27
22:5 Ácido Docosapentaenoico	54.75	2.38
22:6 Ácido Docosahexaenoico	55.82	2.43

Anexo B

Tabla 2. Factores (f_{TG}) para conversión de esteres metílicos de ácidos grasos

Ácido Graso	F_{Ai}^a	Tri/FAME (F_{Tgi}^b)
4:0 Ácido Butírico	0.8627	0.9868
6:0 Ácido Caproico	0.8923	0.9897
8:0 Ácido Caprílico	0.9114	0.9915
10:0 Ácido Cáprico	0.9247	0.9928
11:0 Ácido Undecanoico	0.9300	0.9933
12:0 Ácido Laúrico	0.9346	0.9937
13:0 Ácido Tridecanoico	0.9386	0.9941
14:0 Ácido Mirístico	0.9421	0.9945
14:1 Ácido tetradecenoico	0.9417	0.9944
15:0 Ácido Pentadecanoico	0.9453	0.9948
15:1 Ácido Pentadecenoico	0.9449	0.9947
16:0 Ácido Palmítico	0.9481	0.9950
16:1 Ácido Hexadecenoico	0.9477	0.9950
17:0 Ácido Margárico	0.9507	0.9953
17:1 Ácido Margaroleico	0.9503	0.9952
18:0 Ácido Estearico	0.9530	0.9955
18:1 Ácido Octadecenoico	0.9527	0.9955
18:2 Ácido Octadecedeico	0.9524	0.9954
18:3 Ácido Linolenico	0.9520	0.9954
18:4 Ácido Octadecartraenoico	0.9517	0.9954
20:0 Ácido Araquídico	0.9570	0.9959
20:1 Ácido Eicosénico	0.9568	0.9959
20:2 Ácido Eicosadienoico	0.9565	0.9958
20:3 Ácido Eicosatrienoico	0.9562	0.9958
20:4 Ácido Araquídico	0.9560	0.9958

20:5 Ácido Eicosapentaenoico	0.9557	0.9958
21:0 Ácido Heneicosanoico	0.9588	0.9961
22:0 Ácido Behenico	0.9604	0.9962
22:1 Ácido Docosaenoico	0.9602	0.9962
22:2 Ácido Docosadienoico	0.9600	0.9962
22:3 Ácido Docosatrienoico	0.9598	0.9961
22:4 Ácido Docosatetraenoico	0.9595	0.9961
22:5 Ácido Docosapentaenoico	0.9593	0.9961
22:6 Ácido Docosahexaenoico	0.9590	0.9961
23:0 Ácido Tricosanoico	0.9620	0.9964
24:0 Ácido Lignocerico	0.9963	0.9965
24:1 Ácido Nervonico	0.9632	0.9965

8.4 CUANTIFICACIÓN DE GRASA EN LECHE POR EL MÉTODO GERBER

1. Objetivo

Establecer un procedimiento para la cuantificación del contenido de grasa en leche entera bronca y pasteurizada, utilizando una centrifuga Gerber, para los laboratorios de ensayos de la UTCV.

2. Alcance

Aplica a los análisis de grasa butírica en alimentos, realizados en la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, basados en el método oficial AOAC 2000.18.

3. Fundamento

La leche se pesa en el butirómetro Gerber que contiene ácido sulfúrico. Se añade alcohol isoamílico y se mezcla vigorosamente el contenido del butirómetro para disolver la cuajada y liberar la grasa. La grasa se aísla por centrifugación y cuantificación en la porción graduada del butirómetro Gerber.

4. Definiciones

Leche Cruda: Es aquella que proviene de las vacas, ovejas o cabras y que no ha pasado por el proceso de pasteurización para matar las bacterias dañinas. Puede contener bacterias peligrosas como Salmonella, E. coli y Listeria, que son las responsables de causar numerosas enfermedades transmitidas por los alimentos.

Leche Pasteurizada: Leche que ha sido tratada con calor para destruir las bacterias patógena.

Butirómetro: Instrumento para determinar la riqueza de grasa que contiene la leche.

Método Gerber: Prueba química primaria e histórica para determinar el contenido de grasa de la leche y otras sustancias. Es un método volumétrico y constituye el principal ensayo en Europa y en gran parte del mundo para el control de rutina de leche y sus derivados.

5. Materiales, Equipo y Reactivos

Todos los reactivos mencionados a continuación deben ser grado analítico. Cuando se indique agua, esta debe entenderse por agua destilada o des ionizada.

5.1 Materiales

- Probeta graduada Clase A
- Bureta volumétrica Clase A
- Vaso de precipitados
- Butirómetro
- Tapón para butirómetro

5.2 Equipo

- Butirómetro estándar Gerber de leche con tapón y llave
- Bastidor de soporte de butirómetro
- Dispensadores
- Centrífuga
- Baño de agua para los butirómetros de prueba
- Baño de agua para el templado de las muestras de leche antes del pesaje
- Balanza analítica
- Pesos de calibración
- Luz para leer

5.3 Reactivos

- Ácido Sulfúrico
- Alcohol Isoamílico

6. DETERMINACIÓN

6.1 Preparación de la muestra

Coloque la muestra de prueba de leche en un baño de H₂O mantenido a $39 \pm 1^\circ\text{C}$. El nivel de H₂O debe ser igual o superior al nivel de leche. Mezcle la leche 10X por inversión. Si la línea de grasa permanece en la superficie interior del recipiente, haga correr el H₂O caliente (ca $50\text{-}60^\circ\text{C}$) sobre la superficie exterior durante 15-20s. Mezclar bien por inversión y peso inmediatamente. No permita que la leche permanezca en el baño H₂O más de 15 minutos después de alcanzar los 38°C .

6.2 Pruebas

Agregar 10 ± 0.2 mL de H_2SO_4 a $15-21^\circ\text{C}$ al butirómetro. Tarar el butirómetro con H_2SO_4 en la balanza analítica. Pesar 11.13 ± 0.03 g de muestra de prueba de leche templada, dentro del butirómetro, ir agregando lentamente la leche al principio para evitar la carbonización y la reacción violenta con el ácido. Agregar 1 ± 0.05 mL de alcohol al butirómetro que contenga la muestra. Insertar el seguro al tapón usando una llave de mano. Usando guantes aislados, agarre el butirómetro en el cuello graduado con el extremo tapado. Sin permitir que la pequeña bombilla se vacíe, agite hasta que desaparezcan todos los restos de cuajada. Mantener el butirómetro por el extremo tapado y el cuello graduado, invierta por lo menos 4 veces para mezclar el ácido que queda en el bulbo pequeño y el cuello graduado con el contenido del bulbo grande.

Coloque los butirómetros en la centrífuga, la pequeña bombilla apuntando hacia arriba y contrabalance. Centrifugar durante 4 minutos después de alcanzar la velocidad adecuada. Transferir el butirómetro al baño de H_2O manteniéndolo a $60-63^\circ\text{C}$ y sumergir dejando sólo un bulbo pequeño expuesto. Dejar que la columna de grasa se equilibre durante ± 5 min.

Retire un butirómetro del baño de agua y séquelo

Aplice una presión suave para bloquear el tapón para traer la línea inferior de la columna de grasa hacia arriba para que coincida con la marca de graduación de porcentaje entero más cercana

Lea rápidamente la escala en la parte inferior del menisco superior al 0,05% más cercano.

7. Repetir el análisis

Repita el análisis si la columna de grasa es de color turbia u oscura, o si hay material blanco o negro en la parte inferior de la columna de grasa.

Las columnas grasas aceptables son de color amarillo pálido a fuerte y son uniformes en todo sin partículas claras u oscuras.

8. Cálculos

Calcular % (p/p) el contenido de grasa en leche de la forma siguiente:

$$\text{Grasa, \%} = \frac{\text{lectura en el menisco superior}}{\text{lectura en el menisco inferior}}$$

9. Control de calidad

Se tomarán como control de calidad las siguientes condiciones:

Analizar un blanco de reactivos en forma alterna con la muestra.

Realizar por duplicado cada muestra. En caso de que el lote tenga diferentes matrices, realizar al menos un duplicado por matriz.

Cuando se trata de la misma matriz, se puede realizar la muestra duplicada por cada lote.

10. Reporte de resultados

Se deberán documentar cada una de las etapas del ensayo en el formato FOLAB.

Se deberá reportar como % de TDF (fibra dietética total) por cada 100g.

Realizar los cálculos correspondientes al sistema internacional de unidades (SI).

11. Elaboración de informe de ensayo

Elabora el informe de ensayo utilizando el FOLAB03, llenando adecuadamente cada uno de los datos correspondientes a la muestra.

12. Bibliografía

Método Oficial AOAC 2000.18 Contenido de grasa de la leche entera cruda y pasteurizada; método Gerber por peso.

13. Anexos

Anexo A

Tabla 1. Velocidad de centrifugación

Radio efectivo, mm	Revoluciones por minuto \pm 70rpm
240	1140
250	1120
260	1100
270	1080
300	1020