

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**DETERMINACION DE LA CALIDAD DE GRASA Y β -CAROTENO EN LOS
PRODUCTOS DENOMINADOS “MANTEQUILLA” EXPENDIDOS EN LA
CIUDAD DE AREQUIPA**

Tesis presentado por los Bachilleres:

Vilca Vera, José Edgar

Paredes Vilca, Evelin Gabriela

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime Dante

Arequipa – Perú

2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, mi hermana y mis abuelos por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos

José

A dios por guiarme, protegerme y por permitirme llegar hasta este momento de mi formación profesional.

A mis padres Lina y Efraín por brindarme su apoyo incondicional, su amor, sus consejos y por haberme enseñado a no rendirme ante nada y siempre perseverar.

A mis hermanas por su apoyo que me brindaron día tras día.

Evelin

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, por ser el lugar de desarrollo de esta tesis, en especial al Dr. Ricardo Alonso Abril Ramírez, Ing. Rodrigo Ramos y Q.f. Tiffany Trujillo por su paciencia y enseñanzas

A nuestro asesor, PhD. Jaime Cárdenas García, por su paciencia, entrega, confianza y asesoramiento en la realización de esta tesis.

A todos nuestros docentes, por sus enseñanzas.

A la escuela de Farmacia y Bioquímica de la universidad Católica de Santa María.

Evelin & José

RESUMEN

La mantequilla, es un producto lácteo, derivado exclusivamente de la leche y/o de productos obtenidos de la leche de vaca, principalmente de tipo emulsión de agua en aceite y su control de calidad está regulado en cada país.

Es importante realizar investigaciones alusivas al control de calidad de alimentos ya que cada vez se obtiene menos información y constantemente son más los productos que salen al mercado y presentan una amplia variedad de calidades, consistencias y productos con valor añadido. Recientemente algunos productos lácteos en el Perú han demostrado estar adulterados, por lo que se evidencia una deficiencia en su proceso de control de calidad.

Es por eso que en esta investigación se evaluó la calidad de mantequillas realizando pruebas fisicoquímicas de calidad que se encuentran en la Norma Técnica Peruana NTP 202.024:2005, la cual es nombrada “LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MANTEQUILLA REQUISITOS”, presenta requerimientos físico químicos, como materia grasa, humedad, sólidos no grasos, acidez e índice de peróxido, las cuales son pruebas útiles pero no evidencian el grado de adulteración que podrían llegar a tener las mantequillas en base a sus aditivos y presencia de grasa vegetal como se vio en polémicas nacionales en otros productos lácteos.

Las muestras fueron evaluadas bajo los criterios de la Norma Técnica Peruana, y en adición a estos métodos se usó la determinación de β -caroteno por HPLC, índice de yodo y una determinación de ácidos grasos por cromatografía de gases.

De estos métodos, se determinó β -caroteno debido a que demuestra que tan natural es el producto y si se ve afectado por la adición de otros compuestos, este método por la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) necesitó ser validado. Para la validación se evaluó los parámetros de: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, se trabajó con una gráfica de calibración en un rango de 3 a 12 ppm con soluciones de β -caroteno, dando como resultados lo siguiente: un factor de correlación r de 0.9998, un porcentaje de linealidad de 99.9 %, además de un límite de detección (LD) de 1.2291 ppm y un límite de cuantificación (LQ) de 4.0970 ppm, un C.V% de 1.1482 para la precisión

intermedia, un C.V% de 1.0255 para la repetibilidad, y un porcentaje de recuperación de 90.87%, estando los resultados dentro de lo aceptado por la ISO 17025.

Se analizaron en total ocho muestras de mantequilla provenientes de mercados, supermercados y tiendas de la ciudad de Arequipa. Se determinó la concentración de β -caroteno por HPLC obteniendo la ausencia de este compuesto en una muestra lo que demuestra un mal almacenamiento del producto o que el animal del cual procedió la leche fue alimentado a base de granos lo cual produce una alteración en su coloración por la falta de pastura en su dieta siendo así necesario el uso de aditivos para así obtener un producto amarillo al que nosotros los consumidores estamos acostumbrados a comprar para los distintos usos de este producto.

Por otro lado las pruebas relacionadas a la determinación de las grasas, nos sirven para saber la presencia y proporción adecuada de ácidos grasos que componen las mantequillas, así observando en tres muestras la presencia de un elevado porcentaje de ácidos grasos- en su composición identificándolos como ácido pentadecanoico (muestra A), linolenico (muestra A-F), linoleico (muestra D-F) y eicosadienoico (muestra B). Dando un elevado valor para el índice de yodo y un alto porcentaje de grasas insaturadas presentes en estos productos que no deberían tener la denominación de mantequilla.

Palabras claves: Mantequilla β -caroteno, validación, Cromatografía líquida de Alta Resolución, Cromatografía de gases, Índice de yodo.

ABSTRACT

Butter is a dairy product, derived exclusively from milk and / or products obtained from cow's milk, mainly of the water-in-oil emulsion type and its quality control is regulated in each country.

It is important to carry out research related to the quality control of food since less and less information is obtained and there are constantly more products that come onto the market and present a wide variety of qualities, consistencies and products with added value. Recently, some dairy products in Peru have been shown to be adulterated, which shows a deficiency in their quality control process.

That is why in this research the quality of butter was evaluated by performing physicochemical quality tests found in the Peruvian Technical Standard NTP 202.024: 2005, which is named "MILK AND DAIRY PRODUCTS. BUTTER REQUIREMENTS", presents physical-chemical requirements, such as fat, moisture, non-fatty solids, acidity and peroxide index, which are useful tests but do not show the degree of adulteration that butters could have based on their additives and presence of vegetable fat, as seen in national controversies in other dairy products.

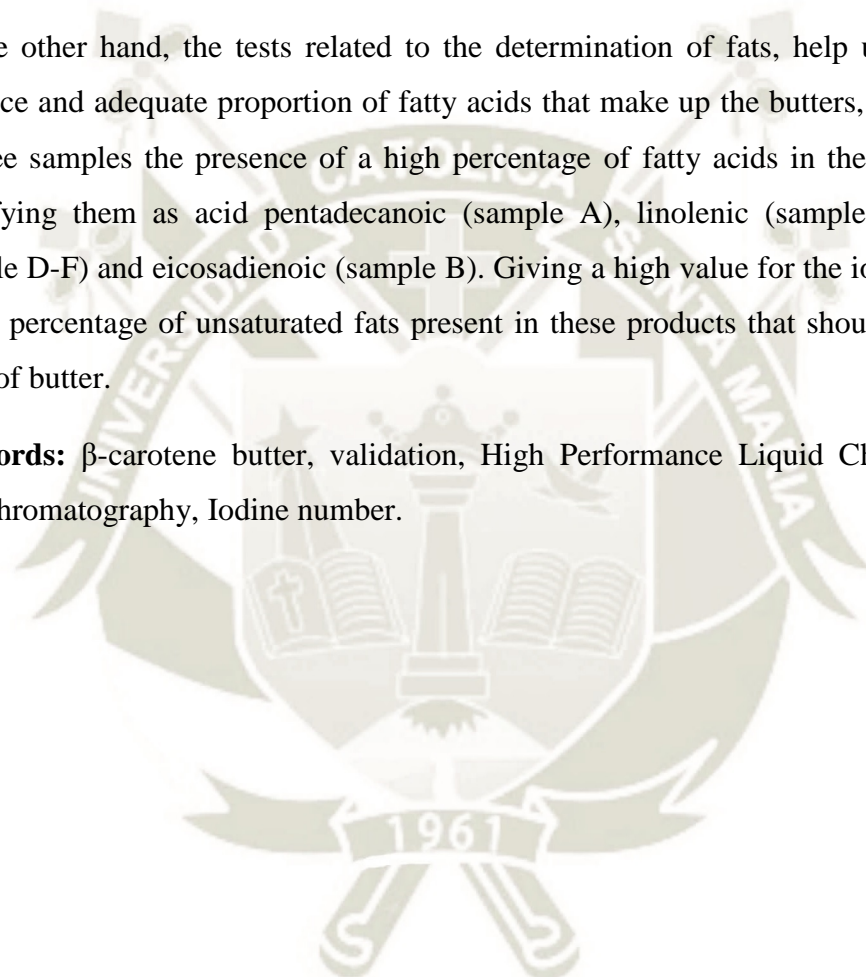
The samples were evaluated under the criteria of the Peruvian Technical Standard, and in addition to these methods, the determination of β -carotene by high performance liquid chromatography (HPLC), iodine number and a determination of fatty acids by gas chromatography were used.

Of these methods, β -carotene was determined because it shows how natural the product is and if it is affected by the addition of other compounds, this method by high performance liquid chromatography (HPLC) needed to be validated. For the validation the parameters of: linearity, sensitivity, precision and accuracy were evaluated, a calibration graph was used in a range of 3 to 12 ppm with β -carotene solutions, giving the following results: a correlation factor r of 0.9998, a percentage of linearity of 99, 9%, plus a Limit of Detection (LOD) of 1.2291 ppm and a Limit of Quantitation (LQ) of 4.0970 ppm, a CV% of 1.1482 for intermediate precision, a CV% of 1.0255 for repeatability, and a percentage of 90.87% recovery, the results being within what is accepted by ISO 17025.

A total of eight butter samples from markets, supermarkets and stores in the city of Arequipa were analyzed. The concentration of β -carotene was determined by HPLC, obtaining the absence of this compound in 2 samples, which shows poor storage of the product or that the animal from which the milk came was fed grains, which produces an alteration in its color. Due to the lack of pasture in their diet, thus making it necessary to use additives in order to obtain a yellow product that we consumers are used to buying for the different uses of this product.

On the other hand, the tests related to the determination of fats, help us to know the presence and adequate proportion of fatty acids that make up the butters, thus observing in three samples the presence of a high percentage of fatty acids in their composition, identifying them as acid pentadecanoic (sample A), linolenic (sample A-F), linoleic (sample D-F) and eicosadienoic (sample B). Giving a high value for the iodine value and a high percentage of unsaturated fats present in these products that should not have the name of butter.

Keywords: β -carotene butter, validation, High Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography, Iodine number.



INTRODUCCIÓN

La mantequilla es un alimento tradicional que se elabora desde hace siglos a partir de la grasa de leche o nata que se bate hasta obtener el producto, debe tener un color amarillento y uniforme y un sabor agradable, además de una textura suave que favorezca que se funda fácilmente en la boca (1).

En general, la mantequilla contiene alrededor de 80% de grasa láctea; el resto de su peso es agua, proteínas, lactosa, minerales y ácido láctico. A pesar de lo que pueda sugerirse, el elevado porcentaje graso no significa que se trate de un alimento que se deba descartar totalmente de la dieta diaria porque es una buena fuente de lípidos y colesterol y además contiene vitaminas A y D (1,2).

La composición de la mantequilla no es estable, varía por una serie de factores; entre ellos, las diferentes razas entre animales, alimentación, estado del animal etc. Los alimentos que consumen influyen de manera notable sobre la composición química y caracteres físicos de la mantequilla, lo mismo podemos decir con las razas y la edad del animal (3).

Hoy en día el proceso para preparar la mantequilla consta de varias etapas, comienza con la alimentación de las vacas las cuales comen pastura y flores que contiene β -caroteno lo cual le proporciona la tonalidad amarilla típica. Cuando las vacas no llevan una alimentación que contiene flores y pastura ricas en β -caroteno a menudo se le provee una alimentación a base de granos, este tipo de alimentación genera que los productos obtenidos de la vaca, tanto los derivados lácteos y su carne tenga un valor nutricional reducido a diferencia de las vacas alimentadas con pasturas (4,5).

Otro punto importante a investigar en la mantequilla es su tipo de grasa contenida ya que recientemente se ha presentado reportes de organismos regulatorios en distintas partes del mundo en el cual se alerta que las denominaciones empleadas en el etiquetado de ciertos productos lácteos no responderían a su verdadera naturaleza, según el Codex Alimentarius, puesto que estos nuevos componentes añadidos no son parte de los constituyentes del mismo, modificando su composición, presentando información engañosa en relación al contenido (6,7).

Por lo cual los objetivos de esta investigación es la evaluación y comparación de diferentes mantequillas expandidas en la ciudad de Arequipa, analizándolas previamente con los ensayos que la NTP 202.024:2005 requiere como son: porcentaje de grasa, índice

de peróxido, acidez, sólidos no grasos y humedad. Agregando a estos, nuevos ensayos como determinación de índice de yodo, grasas totales por cromatografía de gases (GC) y la cantidad de β -caroteno por el método HPLC. Usando métodos de la NTP, AOAC y un método validado para analizar β -caroteno por HPLC.



HIPÓTESIS

Dado que la mantequilla es un producto perecible y de fácil adulteración es probable que algunas mantequillas expandidas en la ciudad de Arequipa estén alteradas y/o adulteradas.



OBJETIVOS

Objetivo general

Examinar y comparar la calidad fisicoquímica de las mantequillas comercializadas en la ciudad de Arequipa mediante evaluaciones fisicoquímicas.

Objetivos específicos

1. Examinar y comparar las mantequillas comercializadas en la ciudad de Arequipa bajo los parámetros fisicoquímicos de la NTP 202.024:2005.
2. Determinar los valores de índice de yodo en mantequillas expandidas en Arequipa con métodos cuantitativos.
3. Analizar la presencia y determinar el contenido ácidos grasos en mantequillas de diferentes zonas de Arequipa por cromatografía de gases.
4. Validar un método para la cuantificación de β -caroteno en mantequillas de diferentes zonas de Arequipa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
5. Cuantificar β -caroteno en mantequillas de diferentes zonas de Arequipa por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

INDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN.....	ix
HIPÓTESIS	xi
OBJETIVOS.....	xii
Objetivo general	xii
Objetivos específicos.....	xii
INDICE.....	xiii
INDICE DE TABLAS.....	xvii
INDICE DE FIGURAS	xix
CAPITULO I MARCO TEORICO	1
1. Mantequilla.....	2
1.1. Definición de mantequilla	2
1.2. Clasificación de la mantequilla	2
1.3. Historia y origen:.....	2
1.4. Valor nutricional de la mantequilla	3
1.5. Elaboración de la mantequilla	4
1.5.1. Nata.....	6
1.5.2. Cristalización de la fase grasa	7
1.5.3. Maduración.....	8
1.5.4. Transferencia de la nata a la batidora	9
1.5.5. Batido y amasado	10
1.5.6. Manipulación y envasado de la mantequilla	15
1.6. Composición De Ácidos Grasos En Mantequilla.....	19
1.7. Defectos de la mantequilla	20
1.7.1. Defectos de olor y sabor	20
1.7.2. Defectos de textura y cuerpo:.....	21
1.7.3. Defectos de aspecto y color	21
1.8. Alteraciones De La Grasa Láctea	22
1.8.1. Oxidación	22
1.8.2. Lipólisis	22
1.9. Mantequilla y margarina diferencias:.....	22

1.10.	Parámetros de calidad fisicoquímica	23
1.10.1.	Norma Técnica Peruana.....	23
2.	Cromatografía de gases	24
2.1.	Descripción general del equipo	24
2.2.	Sistema de inyección de la muestra	25
2.3.	Tipos de inyectores para columnas capilares	25
2.4.	Tipos de inyectores de la muestra	26
2.4.1.	Inyector Split	26
2.4.2.	Inyección splitless	27
2.5.	Tipo de detector	28
2.5.1.	Detector de ionización de llama (FID)	28
2.5.2.	Detector de masas	29
3.	Cromatografía líquida de alta resolución.....	30
3.1.	Instrumentación	30
3.2.	Bombas	31
3.3.	Inyectores.....	32
3.4.	Columna	32
3.5.	Tubos conectores	33
3.6.	Filtros.....	33
3.7.	Medidores de presión	33
3.8.	Termostatos de columna.....	33
3.9.	Detectores	33
4.	Validación.....	35
4.1.	Definición	35
4.2.	Linealidad y rango	35
4.3.	Sensibilidad	36
4.4.	Límite de detección	36
4.5.	Límite de cuantificación	36
4.6.	Precisión	36
4.6.1.	Repetibilidad.....	37
4.6.2.	Precisión intermedia	37
4.6.3.	Reproducibilidad	37
4.7.	Exactitud.....	38
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS		39

1. Lugar de investigación.....	40
2. Materiales	40
2.1. Materiales de laboratorio	40
2.2. Equipos y aparatos.....	40
2.3. Reactivos	41
3. Métodos	41
3.1. Muestra de Estudio	41
3.2. Métodos	42
3.2.1. Acidez.....	42
3.2.2. Índice de peróxido	42
3.2.3. Índice de Yodo:	43
3.2.4. Cromatografía de gases para la determinación de ácidos grasos.....	44
3.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de β -caroteno	46
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
1. Pruebas fisicoquímicas requeridas por la Norma Técnica Peruana.....	56
2. Índice de yodo	57
3. Cuantificación de ácidos grasos en mantequilla por GC.....	58
4. Cromatografía líquida de alta resolución para determinar β -caroteno.	60
4.1. Tiempo de Retención.....	60
4.2. Validación del método analítico	61
4.2.1. Linealidad en la determinación de β -caroteno.....	61
4.2.2. Sensibilidad:	65
4.2.3. Precisión	66
4.2.4. Exactitud.....	68
4.3. Cuantificación de β -caroteno en mantequilla por HPLC.....	70
CONCLUSIONES.....	74
RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	81
ANEXO 1 CORRIDA FAME ESTÁNDAR (LABORATORIO CONTROL DE CALIDAD UCSM)	82
ANEXO 2 DATOS DE CÁLCULOS	85
ANEXO 3 DATOS PARA EL INDICE DE YODO	89

ANEXO 4 CUADRO COMPLEMENTARIO DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES EN MANTEQUILLA.....	91
ANEXO 5 RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE ALIMENTOS, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID PARA LA DETECCIÓN DE BETACAROTENO. ...	94



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición de la mantequilla	3
Tabla 1.2: Modificación de las condiciones de maduración de la nata para producir una mantequilla dura o blanda.....	8
Tabla 1.3: Tipos de mantequillas continuas	11
Tabla 1.4: Desglose típico de los ácidos grasos en la mantequilla.....	19
Tabla 1.5: Requisitos Físico Químico de la Mantequilla	24
Tabla 1.6: Requisitos microbiológicos	24
Tabla 1.7: Diferencias entre repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad	37
Tabla 2.1: Condiciones cromatográficas para la determinación de β -caroteno en mantequilla	46
Tabla 2.2: Concentración de β -caroteno para la gráfica de calibración	48
Tabla 3.1: Resultados obtenidos de pruebas fisicoquímicas requeridas por la NTP de ocho muestras de mantequillas.....	56
Tabla 3.2: Resultados obtenidos en la prueba de índice de yodo en ocho muestras de mantequilla.....	57
Tabla 3.3: Perfil de ácidos grasos en mantequilla en las ocho muestras de mantequilla .	58
Tabla 3.4: Registro del área determinada por HPLC con las determinadas concentraciones de los patrones preparados. Se muestra también las medias de las áreas con la cual se realizó la gráfica de calibración y su desviación estándar.....	63
Tabla 3.5: Análisis estadístico del comportamiento lineal en la gráfica de calibración señal vs concentración de β -caroteno.....	64
Tabla 3.6: ANOVA de regresión lineal para β -caroteno.....	65
Tabla 3.7: Límite de detección y cuantificación del β -caroteno según el método de extracción con acetonitrilo y diclorometano.....	66
Tabla 3.8: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en días diferentes	66
Tabla 3.9: Resultados de Precisión intermedia.....	67
Tabla 3.10: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en lecturas consecutivas.....	67
Tabla 3.11: Resultados de Repetibilidad.....	68
Tabla 3.12: Porcentaje de recuperación de β -caroteno en la muestra a través de la técnica HPLC.....	69

Tabla 3.13: Porcentaje de recuperación esperado en función a la concentración del analito 70

Tabla 3.14: Contenido de β -caroteno por el Método de HPLC..... 71



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Procedimiento de preparación para la mantequilla	5
Figura 1.2: Esquema de una mantquera continúa de tipo batido acelerado. Reproducido con permiso de APV Pasilac Anhydro A/S, Copenhagen, Denmark	12
Figura 1.3: Porcentaje de saturación en mantequilla	23
Figura 1.4: Esquema de un cromatógrafo de gases	25
Figura 1.5: Formato de un inyector	27
Figura 1.6: Descripción de detector FID	29
Figura 1.7: Representación de un espectro de masas	29
Figura 1.8: Componentes básicos del sistema de HPLC	30
Figura 1.9: Esquema de una bomba de HPLC de pistón	31
Figura 1.10: Columna cromatográfica rellena de micropartículas	32
Figura 1.11: Óptica de un detector espectrofotométrico de doble haz	34
Figura 1.12: Representación de la sensibilidad	36
Figura 2.1: Preparación de la gráfica de calibración	48
Figura 3.1: Porcentaje de insaturación y saturación en las ocho muestras de mantequilla.	59
Figura 3.2: Se observa un pico aislado de β -caroteno de 12 ppm	60
Figura 3.3: Gráfica de calibración de los estándares de β -caroteno en el rango de concentración de 3 a 48 ppm.	62
Figura 3.4: Gráfica de calibración de los estándares de β -caroteno en el rango de concentración de 3 a 48 ppm que como se puede observar tiene un comportamiento lineal.	64
Figura 3.5: Cromatograma ampliado de los picos cromatográficos sobrepuestos de un estándar de β -caroteno (12 ppm), una muestra de mantequilla y estándar más muestra utilizados para calcular el porcentaje de recuperación.	69
Figura 3.6: Comparación del contenido de β -caroteno (ppm) en las diferentes muestras de mantequilla.	72



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1. Mantequilla

1.1. Definición de mantequilla

Según el Codex alimentarius se entiende por mantequilla el producto graso derivado exclusivamente de la leche y/o de productos obtenidos de la leche principalmente en tipo de emulsión de agua en aceite (8). Además, debe contener un porcentaje de materia grasa comprendido entre el 80-90%, un 2% como máximo de extracto seco magro y un límite del 16% de agua (9).

1.2. Clasificación de la mantequilla

La variación de composición en la mantequilla se debe a diferencias en las condiciones de producción. La mantequilla se divide en dos categorías principales: mantequilla de nata dulce o fresca y mantequilla de nata ácida o fermentada, la cual se obtiene a partir de una nueva nata que ha sido acidificada por crecimiento bacteriano. Adicionalmente de acuerdo a la Norma Técnica Peruana la mantequilla se clasifica según su contenido de sal: mantequilla con sal y mantequilla sin sal (10).

1.3. Historia y origen:

La mantequilla es un producto elaborado desde la antigüedad y fue una mercancía con la que ya se comercializó internacionalmente en el siglo XIV. En su origen, la mantequilla se obtenía de forma artesanal directamente a partir de la leche, la fabricación industrial comenzó en 1850, cuando la separación por la gravedad de la nata se convirtió en una práctica habitual. Sin embargo, la producción a escala sólo fue posible cuando se desarrollaron los separadores mecánicos, en 1877 (11).

Históricamente, la mantequilla ha sido un producto caro, cuyo precio permaneció relativamente elevado incluso después de su fabricación a escala industrial.

Durante años, se realizaron muchos intentos infructuosos para elaborar un sustituto barato de la mantequilla, hasta que en 1870 el químico francés Mege-Mouries obtuvo la “oleo margarina”, que tenía un gusto y una consistencia parecida a los de la mantequilla. La margarina se fue convirtiendo en un producto conocido y se consideró como un sustituto barato de la mantequilla, cuya calidad se juzgaba en función de la similitud que se conseguía con este producto (12).

Tabla 1.1: Composición de la mantequilla

Componentes	%	Detalle	
Fase Grasa	82	Triglicérido	82%
		Fosfátidos	0.2-1%
		Caroteno	3-9 ppm
		Vitamina A	9-30ppm
		Vitamina D	0.002-0.040ppm
		Vitamina E	8-40ppm
Agua	<16		
Extracto Seco Magro	<2	Lactosa	0.1-0.3%
		Ácido Láctico (fermentada)	0.15%
		Materias Nitrogenadas	0.2-0.8%
		Caseína	0.2-0.6%
		Lactoalbumina	0.1-0.05%
		Trazas de: Proteínas de la membrana	

Fuente: Flores, (2015) (13).

1.4. Valor nutricional de la mantequilla

La composición de la mantequilla varía poco; el valor nutritivo de la mantequilla depende casi enteramente del contenido de grasa y de las vitaminas liposolubles, particularmente caroteno y retinol (14). El color amarillo pálido natural de la mantequilla se debe a su contenido de β -caroteno. Hay que tener en cuenta que el contenido vitamínico de la mantequilla depende tanto de la calidad de la alimentación de las vacas como de la estación del año (15).

La proteína, la lactosa, los minerales y las vitaminas hidrosolubles de la leche están prácticamente ausentes en la mantequilla. La mantequilla como la nata es un alimento muy energético que produce alrededor de 730 Kcal por 100 gramos (16). También es una excelente fuente de vitamina A; unos 14 gramos de mantequilla suministran al niño alrededor de 1/3 de sus necesidades diarias de esta vitamina (17).

La mantequilla es fuente importante de vitaminas liposolubles como la vitamina A, con un contenido 20 veces mayor que la leche con toda su nata y de vitamina E y D. También es fuente de minerales como el yodo. La vitamina A está en mayor o menor cantidad en la mantequilla dependiendo de la alimentación de la vaca y de la estación del año en que se elabore. Por el contrario, debido a su contenido destacado en ácidos grasos saturados, se recomienda su consumo moderado y ocasional (18).

Su consumo puede ser una fuente interesante de grasas para quienes necesiten un mayor aporte energético, como en personas delgadas, deportistas y quienes realizan un trabajo físico intenso (19).

1.5. Elaboración de la mantequilla

En la preparación de la mantequilla se lleva a cabo cuatro procesos básicos:

- i. Concentración de la materia grasa de la leche
- ii. Cristalización de la grasa
- iii. Separación de la fase grasa emulsionada en el agua
- iv. Formación de una emulsión plástica de agua en grasa

Los 4 procesos se realizan secuencialmente, pero en algunos sistemas de fabricación en continuo, siguen un orden diferente. El diagrama siguiente muestra el proceso básico de elaboración (19).

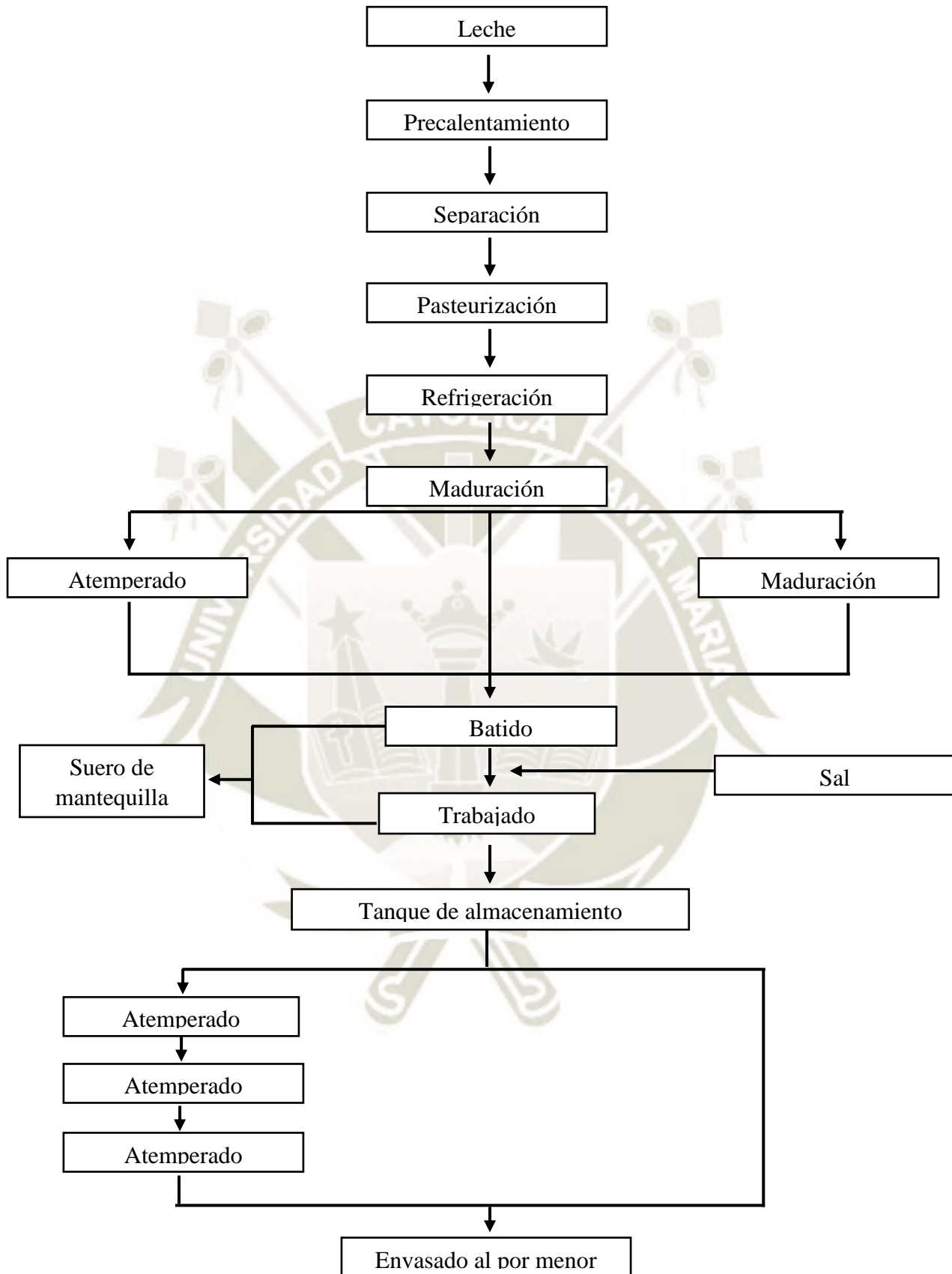


Figura 1.1: Procedimiento de preparación para la mantequilla

Fuente: Varnam y Jane P. Sutherland, (1995) (12).

1.5.1. Nata

La separación de la nata es la concentración de la grasa, pero en algunas fabricaciones continuas se necesita una mayor concentración posteriormente. La grasa es aislada por centrífuga y la nata se suele concentrar hasta un contenido graso del 41%. Se recomienda separadores herméticos para evitar la incorporación de aire. En esta concentración se permite el batido sin un excesivo consumo de energía, disminuye la cantidad y el contenido graso del suero de mantequería y produce una mantequilla con un bajo contenido en humedad, lo que permite la adición de sal en forma de papilla sin sobrepasar el contenido máximo en humedad del 16%. Se emplea una temperatura de separación relativamente alta de 50-55°C para aminorar los problemas posteriores debidos a la acción de las lipasas.

Este tratamiento térmico suministrará a la nata en un intercambiador de calor de placas que está diseñado para producir las mínimas lesiones en los glóbulos grasos. El calentamiento es imprescindible para destruir las formas vegetativas de los microorganismos y tiene otro efecto importante en la mejora de la conservación del producto ya que continúa inactivando las lipasas y, en el caso de los tratamientos térmicos más severos, se forman grupos sulfhidrilos antioxidantes. Sin embargo, estas acciones positivas del calentamiento, pueden resultar parcialmente anuladas por la migración del cobre pro-oxidante desde el suero hacia la fase grasa. La nata se calienta en un rango de temperaturas de 85 a 112 °C siendo el tratamiento más frecuente 85-95°C durante 10-30 segundos. Los calentamientos más severos pueden dar lugar a defectos de calidad debido a la excesiva producción de grupos sulfhidrilo y el consecuente defecto del aroma. En algunos países, especialmente en Nueva Zelanda, se suele aplicar la vacreación (desodorización al vacío), algunas veces en combinación con el tratamiento térmico por inyección directa de vapor. Este procedimiento es también efectivo en la eliminación de aromas anormales, como los derivados de la alimentación, pero tiene un efecto negativo sobre el aroma de la mantequilla elaborada a partir de la nata de buena calidad, ya que se eliminan los volátiles que imparten el aroma deseado. Cuando la vacreación se aplica conjuntamente con el tratamiento por inyección directa de vapor, los efectos

combinados reducen el tamaño de los glóbulos grasos y se producen grandes pérdidas de grasa en el suero de mantequería. Por todo ello, el tratamiento de vacreación no debe utilizarse indiscriminadamente, y es mucho mejor eliminar las causas de origen alimentario que dan lugar a la aparición de aromas extraños que eliminar estos aromas de la nada (12).

1.5.2. **Cristalización de la fase grasa**

La cristalización de la grasa se produce durante el proceso de maduración. Muchas de las propiedades físicas de la mantequilla dependen de esta etapa de fabricación, en la que se determina la relación entre la grasa sólida y la grasa líquida y las formas y tamaños de los cristales de grasa. No obstante, los propios triglicéridos de punto de fusión alto y medio, que son los responsables de las propiedades físicas, están modificados por factores anteriores al control del fabricante de mantequilla como son el tipo de pasto y de alimentación, la raza, la edad y el estado nutricional del ganado.

En la mantequilla y otras grasas amarillas tienen que haber un gran número de pequeños cristales de grasa y para ello, la cristalización debe realizarse enfriando rápidamente de la nata desde una temperatura por encima del punto de fusión final hasta una temperatura por debajo de la de batido, normalmente 3-7°C (12).

La grasa a la temperatura de pasteurización está totalmente líquida y hay que tener en cuenta que el calor latente de cristalización se libera durante el enfriamiento. La temperatura final y el tiempo que esta se mantiene son 2 factores más importantes que la velocidad de refrigeración y, mientras que la nucleación se completa en 60 minutos a uno 5°C, se necesita un mínimo de 4 horas de mantenimiento para el desarrollo de una red extensa de cristales de grasa estable.

La refrigeración rápida da lugar a la formación de cristales impuros (mixtos), compuestos por triglicéridos de puntos de fusión alto y medio, con mucha cantidad de grasa sólida. Esto es favorable en la mantequilla blanda de primavera o verano, ya que facilita el batido y reduce el defecto de "separación de aceite", pero es negativo si la grasa para la fabricación de mantequilla es dura. Estas dificultades pueden reducirse con el atemperado,

que aumenta la cantidad relativa de grasa líquida y mejora la extensibilidad y consistencia de la mantequilla final. El atemperado consiste en un ciclo “frío-calor-frío”, proceso del ciclo Alnarp, originalmente utilizado para facilitar la refrigeración y la manipulación de la nata madurada de alta viscosidad (12).

La nata se calienta desde 6-8°C hasta 14-21°C y a continuación se vuelve a enfriar a 8 °C. La temperatura óptima en cada fase depende del contenido en triglicéridos de la nata y de sus propiedades de fusión y solidificación.

1.5.3. Maduración

La nata se madura por incubación con un cultivo iniciador mixto. La composición de los cultivos varía, pero normalmente incluyen *Lactococcus lactis spp. Lactis* o *L.lactis spp. Cremoris* en combinación con *L.lactis spp. Diacetylactis* y *Leuconostoc mesenteroides spp. Cremoris*. La maduración más simple consiste en la incubación de la nata a 20°C, hasta que se alcanza el valor de pH o se ha producido la cantidad de diacetilo que se desea, momento en el que el crecimiento del estándar se detiene por refrigeración hasta una temperatura por debajo de 10°C y la cristalización comienza durante el verano, cuando la grasa es blanda, se utilizan temperaturas de maduración más bajas que en invierno. El proceso de Alnarp se utiliza mucho actualmente tanto para facilitar el enfriamiento de la nata madura viscosa, como para producir mantequilla con la textura deseada. Este procedimiento puede modificarse para permitir la obtención de una mantequilla dura o blanda (tabla 1.3)

Tabla 1.2: Modificación de las condiciones de maduración de la nata para producir una mantequilla dura o blanda

Mantequilla dura
1. Después de la pasteurización enfriar la nata hasta unos 19 °C , inocular el cultivo e incubara 19°C hasta que el ph descienda a 5.2 .
2. Enfriar a 15 grados °C y mantener durante 2 horas
3. Enfriar hasta la temperatura de batido
Mantequilla blanda
1. Después de la pasteurización enfriar la nata hasta unos 7 °C , inocular el cultivo y mantener a esa temperatura durante 2 a 3 horas
2. Calentar lentamente , con agua a 25°C hasta unos 19 °C e incubar hasta que el pH descienda a 4.9
3. Enfriar a 15 °C y mantener durante 2 horas

4. Enfrían a la temperatura de batido

Fuente: Varnam y Jane P.sutherland, (1995) (12).

Los métodos tradicionales de maduración biológica de la nata presentan una serie de desventajas además de la alta viscosidad de la nata madura. Estos otros inconvenientes están relacionados, en primer lugar, con la posibilidad de alteración ya que al contrario que en la mantequilla de nata dulce, el cobre queda retenido preferentemente en la mantequilla, acortando la vida del producto por oxidación de la grasa. Al mismo tiempo, el contenido en ácidos grasos libres de la mantequilla obtenida a partir de la nata madurada es más alto y la mayor cantidad de grasa soluble da lugar a un riesgo mayor de desarrollo de aromas a rancio o a jabón. El sistema NIZO soluciona los problemas asociados a la maduración biológica convencional de la nata, ya que los microorganismos estárter se cultivan por separado y después se añaden a la nata el cultivo y el ácido láctico.

La maduración física y biológica de la nata se lleva a cabo en tanques verticales equipados con agitadores para garantizar la perfecta mezcla y con dobles camisas para permitir el control de temperatura. Hay una clara tendencia a utilizar tanques más grandes para reducir la variabilidad, un importante factor cuando se utiliza un método continuo de fabricación de mantequilla. Se puede atemperar la nata en el silo, pero si la nata tiene una viscosidad relativamente baja, es más eficaz la utilización de intercambiadores de calor, normalmente de placas.

En los tanques, la nata debe mezclarse muy bien, pero es importante no dañar los glóbulos grasos. La mejor solución para poder cumplir estas dos condiciones opuestas, es la utilización de un agitador de paletas. Es esencial evitar la formación de espuma y el agitador debe desconectarse automáticamente durante las operaciones de llenado y vaciado de los tanques (12).

1.5.4. Transferencia de la nata a la batidora

La transferencia de la nata desde el tanque hasta la batidora y el ajuste de la temperatura de la nata a la necesaria para el batido, son operaciones importantes que a veces no se tienen en cuenta entre los factores que pueden

afectar a la calidad de la mantequilla. La consistencia de la nata es fundamental, especialmente si se utiliza sistemas de fabricación continua y los aspectos a considerar son:

1. La composición química (pH, contenido en grasa)
2. Características físicas (viscosidad , cristalización de la grasa)
3. Temperatura (12).

Para alcanzar la temperatura óptima es conveniente hacer pasar la nata a través de un intercambiador de calor de placas, funcionando a baja presión y con una diferencia de temperatura de solamente 1-2°C entre la nata y el agua caliente para que así sean mínimos los problemas de quemado. En la fabricación discontinua tradicional, la temperatura de batido es independiente del contenido graso de la nata, pero depende de la dureza de la grasa, del pH de la nata y del tamaño y tipo de batidora. No obstante, en general resulta apropiada una temperatura de 5-7°C, aunque la temperatura real utilizada se decide empíricamente eligiendo la que produce las mínimas pérdidas de grasa en el suero. La situación es diferente en una fabricación continua, en donde hay que tener en cuenta el contenido graso de la nata y la dureza de la grasa. Una aproximación a la temperatura ideal de batido puede obtenerse utilizando una fórmula sencilla.

1. Verano $T = (56 - F) / 2$
2. invierno $T = (58 - F) / 2$

En donde T es la temperatura en °C (a los 0.5°C más próximos) y F es el contenido en materia grasa (12).

1.5.5. Batido y amasado

El batido y el amasado son dos etapas consecutivas de la fabricación de mantequilla que están muy relacionadas y durante las cuales la emulsión de grasa en agua rompe, las fases se separan y se forma una emulsión de agua en grasa. Esta operación casi siempre tiene lugar en un único componente del equipo: la batidora en la fabricación tradicional discontinua y la mantequera continúa en las modernas fabricaciones (12).

Las batidoras para la producción comercial eran originalmente de madera y consisten en un cilindro giratorio montado horizontalmente. En la mayor parte de los modelos, las batidoras contenían pares de rodillos para el amasado de la mantequilla. Las batidoras de madera son muy difíciles de limpiar y desinfectar y han sido totalmente reemplazados por las mantequeras de acero inoxidable. Estas batidoras no tienen rodillos, pero para facilitar el amasado son de forma irregular, por ejemplo, cúbica o de cono sencillo o doble con una capacidad de 250-2500 kg. En todas las batidoras discontinuas, se produce la desestabilización de una cantidad de nata a una velocidad relativamente lenta, ya que la fuerza mecánica necesaria para desestabilizar la emulsión se aplica por rotación de la batidora sobre su eje, de forma que la nata asciende al girar las paredes y cae desde la parte superior del tambor hasta la base. Aunque en algunas mantequerías grandes todavía se utilizan batidoras discontinuas, en las instalaciones más modernas se trabaja con mantequeras continuas y el empleo de las primeras se limita a las pequeñas mantequerías en donde no se elabora mantequilla regularmente (12).

Se han desarrollado tres grandes tipos de mantequeras continuas (tabla 1.4) La más utilizada es la de batido acelerado de tipo Fritz (Fig. 1.1), aunque en la antigua Unión Soviética se utilizan batidoras de tipo inversión de fases lo mismo que en otros países de Europa del Este. Hay muchos fabricantes de mantequeras tipo Fritz, y aunque en los distintos modelos hay detalles que pueden ser muy diferentes, los principios básicos de la operación son los mismos en todos los casos.

Tabla 1.3: Tipos de mantequillas continuas

Batido acelerado (tipo Fritz)
Los granos de mantequilla se forman a partir de la nata por batido a gran velocidad. Después de eliminar el suero de mantequería, los granos se amasan hasta obtener la mantequilla.
Inversión de fases
La nata se concentrara hasta aproximadamente el 80% de grasa. A continuación, en la anata concentrada se invierten las fases, pasando de una emulsión de grasa en agua a una emulsión de agua en grasa.

Emulsificación

La nata se concentra y la emulsión se rompe. Se estandarizan las concentraciones de grasa, agua y sal, y seguidamente se realiza la re-emulsificación, refrigeración y amasado.

Fuente: Varnam y Jane P.sutherland, (1995) (12).

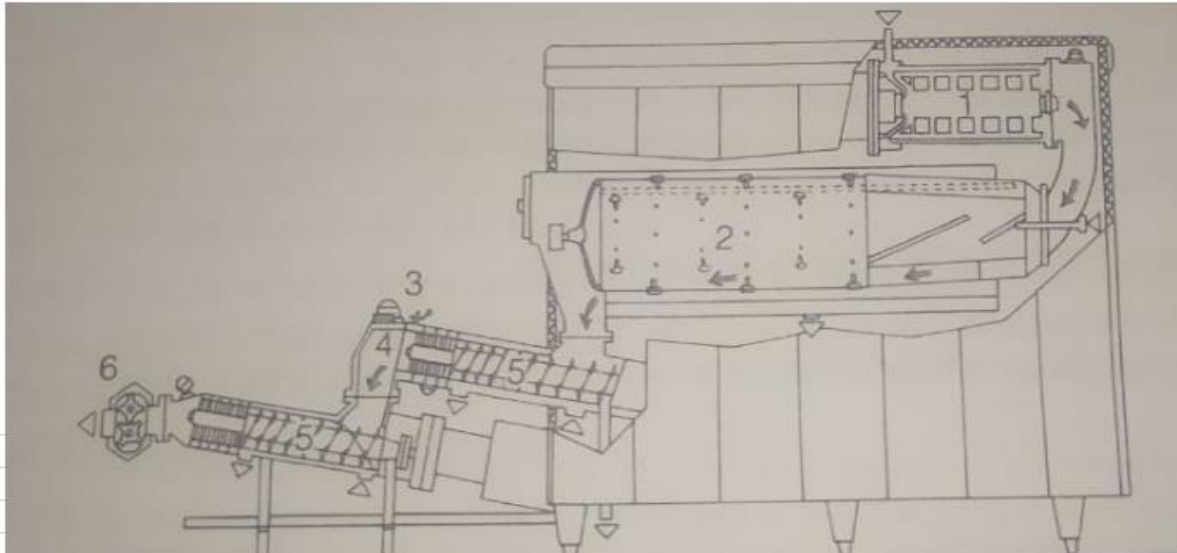


Figura 1.2: Esquema de una mantequera continua de tipo batido acelerado.

Reproducido con permiso de APV Pasilac Anhydro A/S, Copenhagen, Denmark

Claves: 1 Primer cilindro de batido; 2 Sección de separación; 3 Orificio de regulación; 4 cámara de vacío; 5 Secciones de amasado; 6 Bomba de mantequilla

Fuente: Varnam y Jane P.sutherland, (1995) (12).

La fabricación continua de la mantequilla consiste en la desestabilización rápida de pequeñas cantidades de nata. La nata llega a la parte superior de la mantequera, pasando por un tanque intermedio e impulsado por una bomba de desplazamiento positivo. La nata entra en la primera sección de batido que consiste en un cilindro horizontal refrigerado en donde se rompe la emulsión por medio de un agitador giratorio de paletas. Se incorpora aire a la nata y los glóbulos se rompen en un tiempo de 1-2 segundos. La velocidad de batido es excesivamente variable como para permitir el control del tamaño de los granos de mantequilla formados. La velocidad normal es de unas 1.000 rpm; con velocidades más rápidas se obtienen granos de mantequilla más grandes, pero también se puede producir mayor retención de suero y grandes pérdidas de grasa. (12)

La mezcla del suero de mantequería y los granos de mantequilla formados durante el primer batido, pasa a una segunda sección de batido que consiste en un tambor perforado de gran diámetro, que gira a una velocidad variable, de unas 35 rpm. Los granos de mantequilla se compactan y agregan durante el paso a lo largo del tamiz y el suero de mantequería se separa. En algunos modelos, la primera parte del cilindro secundario de batido está provista de paletas de baja velocidad. Una parte del suero de mantequería puede enfriarse y reciclarse hacia el cilindro secundario para mantener los granos de mantequilla a baja temperatura. Antes, también era una práctica habitual el lavado de los granos en esta fase del proceso, pero actualmente el lavado se considera indeseable porque aumenta los riesgos de contaminación microbiana, incrementa el contenido en agua de la mantequilla y causa problemas en la eliminación de agua de lavado. Además, se considera que la mantequilla elaborada sin lavado tiene mejor aroma y sabor.

Los granos de mantequilla pasan desde el cilindro secundario de batido a la sección de amasado, que normalmente está inclinada para facilitar la eliminación del suero de mantequería. En la primera parte de la sección de amasado hay un par de tornillos que girando en sentido contrario, transforman los granos de mantequilla en una masa homogénea, expulsándose más cantidad de suero. Los tornillos empujan la masa hacia adelante y la hacen pasar a través de una serie de placas perforadas que tienen intercaladas paletas mezcladoras giratorias. El grado de amasado puede modificarse utilizando placas con perforaciones de distinto diámetro, aumentando o disminuyendo el número de placas y de paletas mezcladoras o variando el ángulo de algunas de ellas. En esta sección, las fuerzas de cizalla compactan aún más de la masa de granos de mantequilla y rompen la gotitas de suero restantes, que pasan a constituir la fase acuosa de la emulsión grasa; el tamaño ideal de las gotas es de menos de $10\mu\text{m}$. El amasado es una parte muy importante del proceso de fabricación de la mantequilla y es en esta fase donde se determinan el color, la apariencia, la consistencia y la extensibilidad. Un amasado insuficiente produce una mantequilla desmenuzable, mientras que el exceso de amasado da lugar a una mantequilla

cuya consistencia se asemeja a la de la nata espesa. En ambos casos, quedan grandes gotas de agua o humedad libre. (2)

La eliminación del suero de mantequería se completa en la sección de amasado. Este suero, junto con el procedente del escurrido al final de la segunda sección de batido, se acumula en la base de la máquina. El nivel de suero se mantiene constante mediante una válvula de sifón que se puede regular para modificar el grado de drenaje. Los pequeños granos de grasa arrastrados con el suero flotan en su superficie y pueden reincorporarse a la masa pasando a través de la sección de amasado. Algunas veces, la recuperación de la grasa del suero se facilita incorporando un clarificador centrífugo en el interior de la mantequera y haciendo pasar el suero de mantequería sobre un tamiz vibratorio después de extraerlo de la mantequera. Para obtener la máxima recuperación, se han utilizado también desnatadoras centrífugas, pero se producen algunas pérdidas de grasa con el suero.

En la fabricación continua de la mantequilla puede producirse la incorporación de más de un 5% de aire y algunos equipos están provistos de cámaras a baja presión en las que el contenido en aire se reduce hasta menos del 1%. Con este procedimiento se obtiene un producto denso, de fina textura, pero no se ejerce un efecto importante sobre el desarrollo de la rancidez, aunque algunas opiniones defienden que retrasa su aparición. Después del paso por la cámara de baja presión, la mantequilla se vuelve a amasar hasta la completa emulsificación, Las dos secciones de amasado pueden funcionar independientemente, en cuyo caso se puede instalar una cámara de baja presión mayor. Este sistema permite también flexibilidad, pero el número adicional de variables de funcionamiento puede dificultar el control del proceso. (10)

La mantequilla se sala en la batidora o en la mantequera continua, El salado es una fase importante de la elaboración y hay que evitar las pérdidas de sal en el suero de mantequería. Por esta razón, la adición de sal se realiza después del lavado (si lo hay) y la separación de suero. El salado produce un gradiente osmótico entre los gránulos de sal y el suero, que tiende a reunir las gotitas de agua dando lugar a una mayor humedad libre y al defecto de jaspeado. Sin embargo, estos problemas pueden reducirse amasando

correctamente y empleando sal finamente molida. Además, la sal utilizada debe ser de alta pureza y no contener más de 1 mg/l de plomo, 10 mg/l de hierro y 2 mg/l de cobre.

En la elaboración continua de la mantequilla, la sal se añade en la primera sección de amasado utilizando una bomba de desplazamiento positivo. Puede emplearse una salmuera concentrada, pero como la solubilidad del NaCl en el agua es del 26% (p/p), esto solo es práctico cuando se elabora mantequilla con un bajo contenido de sal (<1%). Antes del amasado, la mantequilla debe tener un bajo contenido en agua para permitir la incorporación del agua de la salmuera. En el Reino Unido, es frecuente la fabricación de una mantequilla con una concentración final de sal de 2%, lo que requiere la adición de sal en forma de suspensión saturada conteniendo el 50% de sal. La mantequilla salada, con un 3-4% de sal, se obtiene añadiendo una papilla que contiene hasta el 70% de sal, aunque a esta concentración es probable que aparezcan problemas de calidad debido a la presencia de agua libre (12).

La sal utilizada para preparar la papilla debe ser en forma de granos de 40 μm de diámetro, sin que ninguno sobrepase las 50 μm . El agua tiene que ser potable y puede resultar necesario someterla a un tratamiento complementario como la esterilización por radiación ultravioleta para destruir todas las bacterias psicrótrofas. Hay que preparar la papilla de sal al menos dos horas antes de su uso para conseguir la saturación y asegurar que los cristales que quedan son muy pequeños. Para mantener la homogeneidad es imprescindible agitar durante la utilización.

1.5.6. Manipulación y envasado de la mantequilla

Cuando la mantequilla sale de la batidora, se suele cargar en carritos que se empujan mutuamente hasta el equipo de envasado, Este procedimiento, si se controla adecuadamente, es aceptable en las fabricaciones a pequeña escala, pero no es muy eficaz e implica un gran riesgo de contaminación. Las mantequeras continuas pueden disponerse para descargar directamente en la tolva de recepción del equipo de envasado. Este sistema tiene la ventaja de su simplicidad pero, para garantizar el funcionamiento ininterrumpido de la mantequera, se suele transferir la mantequilla a un tanque intermedio

utilizando una bomba de mantequilla, que consiste en dos rotores engranados que funcionan a velocidad lenta.

Los tanques de mantequilla pueden ser cerrados o abiertos. Los silos cerrados son unos cilindros verticales con una tubería telescópica de alimentos y un pistón, que es accionado por un cilindro de aire para mantener la mantequilla a presión constante. La mantequilla se descarga desde la base del tanque en bombas que la transfieren a la línea de envasado. En el sistema cerrado la contaminación es mínima, pero la capacidad es limitada (unos 900 kg) y no sirve para las grandes mantequerías. Los silos abiertos tienen una capacidad de hasta 10 toneladas y están contruidos con laterales de gran pendiente o verticales, para que descienda la mantequilla. En la base, se instalan grandes tornillos sinfín girando en sentido inverso para descargar la mantequilla en las bombas. En cualquier caso, la manipulación debe de ser muy cuidadosa para no crear altas fuerzas de cizalla que producirán la coalescencia del agua, lo que haría necesario la re-emulsión de la mantequilla antes de vaciar el tanque.

La mantequilla se puede envasar directamente en porciones, que es el procedimiento más económico. Sin embargo, como en muchos países la producción es estacional, habitualmente se realiza un envasado inicial a granel en envases de unos 25 kg de capacidad. Con este tipo de envasado a granel también se puede obtener un producto de mayor calidad que el envasado en porciones, ya que es necesario un remalaxado de la mantequilla, que mejora su plasticidad. Actualmente, es una práctica corriente reamasar toda la mantequilla antes del envasado con el fin de asegurar su buena extensibilidad.

El envasado a granel se realiza en cajas de cartón forrado con pergamino vegetal, lámina de aluminio o distintas películas plásticas, especialmente polietileno. Este último material es barato, prácticamente estéril y libre de cobre y además, el polietileno de grado alimentario es de baja densidad y alta resistencia, por lo que resulta muy adecuado para la mantequilla. El pergamino se utiliza mucho todavía, pero en él pueden crecer mohos si la humedad es alta, por lo que se recomienda la adopción de precauciones especiales, se aconseja que los envases de mantequilla estén forrados con

pergamino seco o tratado por inmersión durante 24 horas en salmuera concentrada con el 0.5% de ácido sórbico.

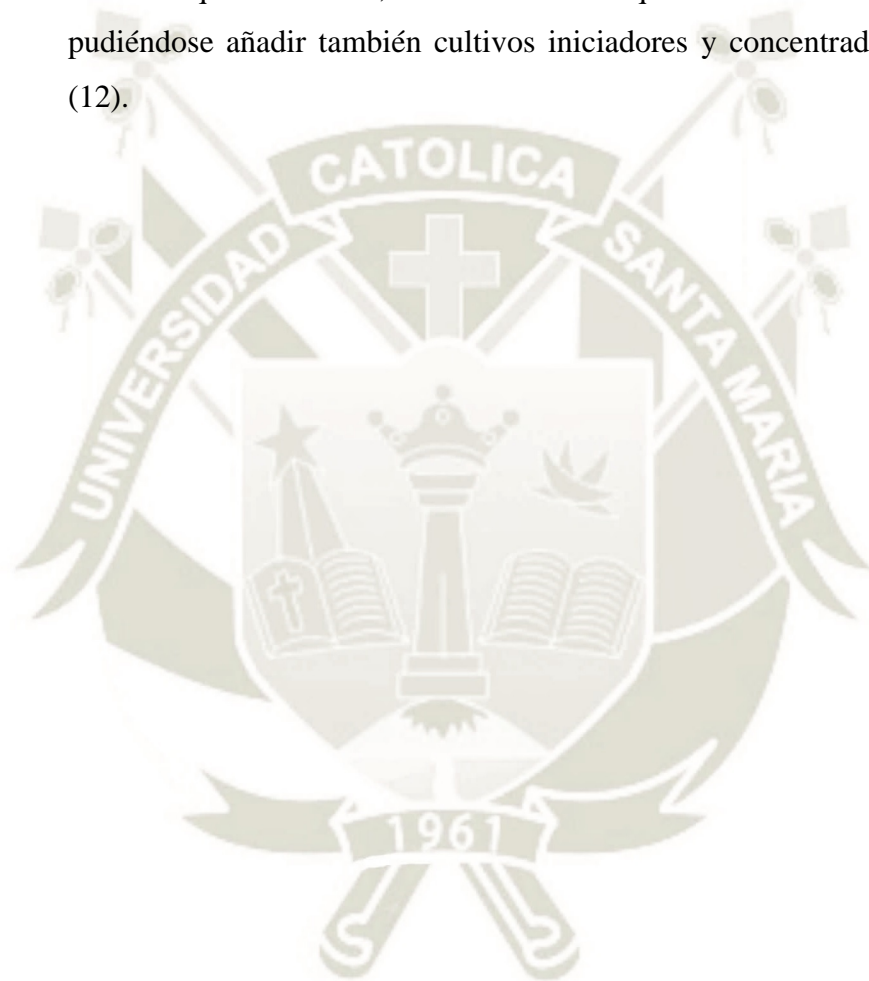
Las pastillas de mantequilla, pesan normalmente 250 g y se suelen envolver en pergamino vegetal o en un laminado de aluminio-pergamino. Los papeles vegetales son aún muy populares en el Reino Unido, pero es un avance permeable que no impide las pérdidas de agua (y por lo tanto de peso) durante el almacenamiento y tiende a engrasarse si la temperatura de almacenamiento es demasiado alta. El pergamino también permite la penetración de la luz ultravioleta lo que acelera la aparición de la rancidez oxidativa, problema que puede evitarse incorporando dióxido de titanio en el pergamino. Los envases laminados son más caros, pero su precio está justificado porque son mucho más efectivos y su aspecto es mejor.

Las películas transparentes proporcionan una apariencia muy buena y a veces se utilizan para la mantequilla de calidad superior, pero la vida de venta del producto es menor debido a la rancidez oxidativa. La rigidez de la mantequilla almacenada en refrigeración y su coste, excluye totalmente la posibilidad de utilizar envases plásticos preformados, tan populares en otras grasas amarillas. Una excepción son los envases individuales, muy empleados en el abastecimiento de colectividades, que están fabricados en cloruro de polivinilo mediante un sistema de formado-llenado-cerrado.

La mantequilla envasada a granel es bastante estable y no sufre cambios importantes durante 6 meses a -10°C . En la Unión Europea, *The Nacional Intervention Board* señala que la temperatura de almacenamiento debe ser de -15°C , aunque en la práctica se utiliza temperatura muy baja, de -30°C , que permiten el almacenamiento de la mantequilla durante periodos de tiempo de más de 1 año. Al salir de la cámara fría, la mantequilla debe atemperarse hasta $6-8^{\circ}\text{C}$ en condiciones de humedad controlada para limitar la condensación. En esta fase se deben de comprobar la calidad composicional y la calidad organoléptica, antes de triturar y volver a mezclar la mantequilla. Estas operaciones son necesarias para restaurar la plasticidad mediante la ruptura de la matriz de cristales de grasa y además proporcionan una oportunidad de aumentar los contenidos de sal o de agua hasta los máximos permitido y de corregir cualquier problema de agua libre.

En un reenvasado a pequeña escala, la mantequilla se trocea en un triturado y se vuelve a mezclar en un tanque equipado con cuchillas-Z que giran en sentido contrario a una velocidad variable. El equipo de mezclado continuo parece al de la fase de amasado de un sistema de fabricación continua, equipado con cuchillas para triturar la mantequilla.

La mantequilla podría tener un valor añadido agregándole diferentes especias antes de que se envase, mezclando mantequillas de diferente procedencia, pudiéndose añadir también cultivos iniciadores y concentrados de diacetilo (12).



1.6. Composición De Ácidos Grasos En Mantequilla

Las mantequilla presentan diferentes ácidos grasos saturados e insaturados En la tabla 1.4 muestra los ácidos grasos separados de la mantequilla.

Tabla 1.4: Desglose típico de los ácidos grasos en la mantequilla

Saturados	Insaturados	Otros
<p>Butírico (4:0), 3.6%</p>	<p>Miristoleico (14:1), 1.3%</p>	<p>Linoleico (18:2), 2.1%</p>
<p>Caproico (6:0), 2.5%</p>	<p>Palmitoleico (16:1), 2.5%</p>	<p>Linolénico (18:3), 0.7%</p>
<p>Caprílico (8:0), 1.5%</p>		
<p>Cáprico (10:0), 3.6%</p>	<p>Oleico (18:1), 15.2%</p>	<p>Ramificados, hidroxilados, trans y otros 3.6%</p>
<p>Láurico (12:0), 4.8%</p>		
<p>Mirístico (14:0), 12.4%</p>		
<p>Pentadecanoico (15:0) 1.5%</p>		
<p>Palmítico (16:0), 35.7%</p>		
<p>Esteárico (18:0), 9.1%</p>		

Fuente: Álvarez Manzo, (2018) (20).

La grasa de la leche se compone principalmente entre un 96 y un 98 % de triglicéridos, con pequeñas cantidades de mono y diglicéridos, fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas. Los triglicéridos son de composición diversa con respecto a los ácidos grasos que los componen, alrededor del 23 % de los cuales son grasas insaturadas; la firmeza varía con la longitud de la cadena, el grado de insaturación y la posición de los ácidos grasos en el glicerol. (20).

1.7. Defectos de la mantequilla

1.7.1. Defectos de olor y sabor

Son los efectos más comunes ya que la mantequilla es un alimento con mucha facilidad de adoptar los olores de lugares donde está almacenada sobre todo si está en lugares con alimentos de intenso olor como ajos, cebollas, etc. Así como también muchos sabores pueden proceder de la leche o de la flora contaminante. Pueden ser de origen microbiano, químico y además también puede tener algunos problemas en su elaboración que podría alterar el sabor.

Sabor a pescado: Pasa en mantequilla conservada; causado por el uso de crema acida en mantequilla salada, el uso de equipo de cobre durante su elaboración ya que las sales de cobre causan este efecto, exposición de aire cuando durante su producción se han olvidado de aplicar vacío. El olor a pescado es causado por *Pseudomonas ichthyosmia*.

Sabor metálico: Causado por el almacenamiento de crema ácida en estanques fabricados en cobre debido al exceso de iones de Fe y Cu, otra causa también es el pH demasiado bajo.

Rancio: Causado por una mala conducción de pasteurización sin la destrucción de la lipasa ya que esta enzima ataca la grasa liberando glicerina y ácidos grasos como el ácido butírico produciendo un olor picante y sabor desagradable, por lo tanto la acción de hongos, lipasa mamaria y bacterias productoras de lipasa como *Pseudomonas fragi* causan enranciamiento.

Sabor a sebo: Su principal causa es la oxidación de la grasa produciendo aldehídos y cetonas que se puede verificar con la prueba de Kreiss (reacción sensible entre la floroglucina y el aldehído epidrínico que es una sustancia que se encuentra en las grasas rancias). El proceso de oxidación es precedido

de una fase de absorción de oxidación. Evitar que la mantequilla este en contacto con metales como cobre y hierro (la presencia de estos metales aceleran el proceso), evitar que la crema este expuesta a la luz ya sean del sol o de los rayos UV (esto podría acelerar el proceso), la temperatura baja atrasa el proceso. Para evitar estos efectos es recomendable usar focos de luz amarilla en el centro de fabricación y en la cámara y vidrios de color amarillo para ventanas.

Sabor a vaca y a potrero: Causado por el desarrollo de *Echerichia* y *Enterobacter*.

Sabor a queso o sabor pútrido: Casado por el desarrollo de bacterias proteolíticas que atacan la caseína (12).

1.7.2. Defectos de textura y cuerpo:

Textura grasienta: Causado por la deficiente cristalización de la grasa, batido a temperatura muy alta, agua del lavado poco fría y mantequilla demasiado amasada.

Textura abierta dejando salir la humedad: Causado por el batido de la crema a temperatura baja y con grasa que no está cristalizada, sal mal disuelta, batidora demasiado llena al momento de batir la crema y mantequilla mal trabajada (12).

1.7.3. Defectos de aspecto y color

Mantequilla manchada, marmoleada: Sus causas puede ser el salazonado defectuoso, sal mal distribuida, el uso de agua de lavar a temperatura mucho más baja que el de la mantequilla, mezcla de mantequillas de días diferentes.

Mantequilla con la superficie decolorada: Causado por exponer la mantequilla a la luz, la permanencia de la mantequilla durante mucho tiempo en agua, rozamiento de la superficie con las paredes de cajas.

Superficie de la mantequilla de color más cargado: Por la evaporación de la humedad a la superficie (12).

1.8. Alteraciones De La Grasa Láctea

1.8.1. Oxidación

Esta reacción química se da durante el almacenaje de la mantequilla provocando la formación de peróxidos que al degradarse liberan aldehídos y cetonas responsables del sabor a sebo. Esta alteración puede estar favorecida por varios factores como la luz, temperatura, NaCl, acidez, cobre, hierro, etc. La reacción se puede frenar con el uso de antioxidantes.

1.8.2. Lipólisis

La lipólisis es la hidrólisis de enlaces ésteres de triglicéridos liberando ácidos grasos, responsables del sabor a rancio. Las responsables de la lipólisis son las enzimas lipasas, son muy termoresistente, soportan hasta 99°C - 30 s. Se producen defectos de enranciamiento de la mantequilla a partir de 10^5 , y hasta 10^4 gérmenes psicrótrofos muy termoresistentes por mililitro de leche agravándose la situación por las alteraciones mecánicas de los glóbulos grasos durante el periodo en que se recoge la leche de la granja hasta que se transporta a la industria (21).

1.9. Mantequilla y margarina diferencias:

La margarina es un sustituto alimenticio de la mantequilla, ambas se diferencian químicamente según las grasas y aceites que se han utilizado para su elaboración (22). La mantequilla es un producto que proviene de la grasa de la leche mientras que la margarina es elaborada a partir de grasas insaturadas de origen 100 % vegetal o de una mezcla de grasas de origen tanto vegetal como animal llamadas margarinas mixtas, estas margarinas son obtenidas mediante procedimientos industriales (23).

Tienen diferencias tanto en el olor, sabor como en la textura al paladar. A diferencia de la mantequilla, en las margarinas el aporte de vitaminas A, D y E provienen de adiciones. Además la margarina predominan los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados a diferencia de la mantequilla que por su origen animal, presenta una mayor proporción de saturación en las cadenas alifáticas: En la figura 1.3 se compara la proporción de cadenas de ácidos saturados (14:0, 16:0 y 18:0) vs ácido insaturados (18:1 y 18:2) (3).



Figura 1.3: Porcentaje de saturación en mantequilla

Fuente: Álvarez Manzo, (2018)

Por la consistencia líquida de los aceites insaturados que son los que se usan como materia prima para la elaboración de las margarinas prácticamente obliga a someter estos aceites a un proceso de hidrogenación utilizando altas temperaturas que van de 100 a 200 °C como también altas presiones que convierten la mayoría de los ácidos insaturados en saturados que al ser estos sólidos a temperatura ambiente con un punto de fusión más elevado, permiten la obtención de un producto de consistencia similar a la de la mantequilla (22).

Al momento de comenzar a elaborar las margarinas se perfeccionó la técnica de la hidrogenación, siendo el propósito de los industriales reducir los costos de producción y darles a estos productos características fisicoquímicas que pudieran hacerlos más duraderos en el tiempo (24).

El método químico de hidrogenación al transformar las grasas insaturadas en saturadas altera su estructura, cambiando sus enlaces de carbono en los cuales se incorporan átomos de hidrógeno dando lugar a una estructura artificial perjudicial para el ser humano “El isómero trans” (25).

1.10. Parámetros de calidad fisicoquímica

La calidad es estandarizada en diferentes países por distintas organizaciones. En Perú tenemos el INACAL el cual adopta normas internacionales que estandarizan la calidad de productos en las Normas Técnicas peruanas.

1.10.1. Norma Técnica Peruana

Documento técnico que tiene requisitos de calidad, que sirve de referencia técnica para que los productores o actores económicos al utilizarlas, incorporen calidad a sus bienes y servicios. En el caso de la mantequilla podemos observar sus valores normales en las siguientes tablas (26).

Tabla 1.5: Requisitos Físico Químico de la Mantequilla

Parámetros	Requisitos	Método de ensayo
Materia grasa de leche (g/100g)	> 80%	FIL-IDF 80-3(2003)/ISO 3727-3
Humedad (g/100g)	< 16%	FIL-IDF 80-3(2002)/ISO 3727-1
Sólidos no grasos de la leche (g/100g), Acidez, expresada como ácido oleico (g/100g)	< 2% < 0.3%	FIL-IDF 80-3(2002)/ISO 3727-2 FIL-IDF 6B:1989
Índice de peróxido (meq de peróxido /kg de materia grasa),	< 1.0	AOAC 965.33

Fuente: Norma Técnica Peruana, 202.024, (2005) (26).

Tabla 1.6: Requisitos microbiológicos

Requisitos	n	M	M	C	Método de ensayo
Coliformes(NMP/g) Estafilococos	5	<3	10	2	FIL IDF 73B:1998 FIL IDF
Coagulasa positivos (ufc/g)	5	10	1 x 10 ²	1	145A:1997/ AOAC 2003.08
Salmonella en 25g	5	0	-	0	FIL IDF 93(2001)/ ISO 6785

Fuente: Norma Técnica Peruana, 202.024, (2005) (26).

2. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica donde se volatiliza la muestra para luego inyectarla en la columna cromatográfica donde se usa como fase móvil un gas inerte como el helio. Se distingue de otros tipos de cromatografía debido a que la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito siendo así su único trabajo la de trasladar el analito a través de la columna cromatográfica. La cromatografía de gases puede ser clasificada en: fases sólidas estacionarias, se llevan a cabo por proceso de adsorción, denominada cromatografía de gas sólido (GSC). En el caso de fases líquidas estacionarias, se llevan a cabo procesos de solución. Esta cromatografía de partición se llama cromatografía de gas líquido (GLC). La técnica GLC es la técnica de GC más distribuida (27).

2.1. Descripción general del equipo

El cromatógrafo de gases principalmente se compone por una fuente de gas inerte (gas transportador), como el helio.

El sistema de inyección, es el lugar en el cual se inserta la jeringa con la muestra o donde se encuentra el sistema automático de inyección. El horno y la columna, son medios para comenzar la detección de las muestras, donde participa tanto el electrodo colector como los gases de llama que se encienden al llegar a la temperatura que el operador ha indicado.

Luego la muestra es llevada al sistema de detección o amplificador y después pasa al sistema de registro, lugar donde se logra observar el cromatograma. Para terminar el proceso, el software junta los datos del sistema de registro y del amplificador, proporcionando así el tratamiento de los datos (28).

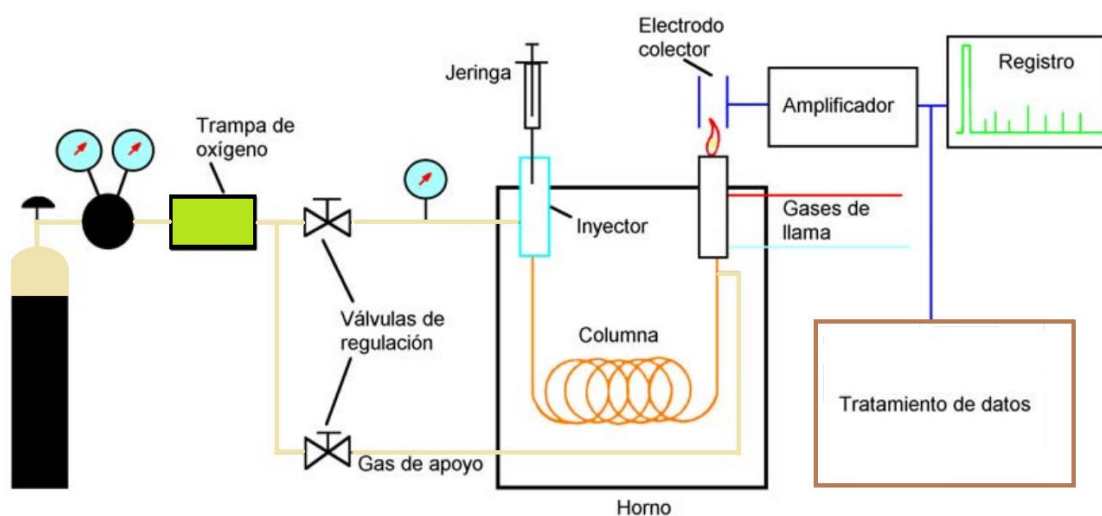


Figura 1.4: Esquema de un cromatógrafo de gases.

Fuente: Ronald, (2016) (28).

2.2. Sistema de inyección de la muestra

Se inyecta la muestra con una jeringa hipodérmica que contiene un septum compuesta de goma de silicona (auto sellador), a un *glass insert* (alineador de vidrio) en un bloque de metal, donde la muestra se vaporiza y es barrida hasta la columna. El bloque es calentado hasta cierta temperatura la cual se ha fijado antes, esta temperatura es lo necesariamente alta para poder convertir la muestra que era líquida, y de manera instantánea a vapor (28).

2.3. Tipos de inyectores para columnas capilares

Los sistemas de inyección de muestras que trabajan con columnas, se basan en los principios de los sistemas de inyección que se usan para columnas de HPLC

(empaquetadas). El cambio más significativo entre los sistemas que usan columnas de HPLC (empaquetadas) y los que usan las columnas capilares, está en que la cantidad de muestra que las columnas capilares pueden separar es bastante menos que en las empaquetadas, por otro lado, las columnas capilares pueden ser alteradas por solventes, ya que los volúmenes que se insertan son muy bajos. Es por este motivo que el volumen mínimo de inyección que se puede insertar con precisión es de $0.1\mu\text{l}$. Los inyectores que se usan en estos tipos de columna tienen dos funciones, la primera de que la muestra se vaporice y se mezcle con el gas portador y la segunda de inyectar solamente una alícuota a la columna de la muestra total inyectada (29).

2.4. Tipos de inyectores de la muestra

Los inyectores de muestra introducen a las columnas capilares solamente una alícuota de la muestra inyectada total. Para poder llevar a cabo este proceso se pueden usar 2 técnicas: inyección en *SPLITLESS* y la inyección en *SPLIT* (30).

2.4.1. Inyector *Split*

Es la técnica más utilizada y sencilla en GC. Este tipo de inyector, contiene casi los mismos compuestos que contiene un inyector normal, con la diferencia que incluye un sistema de división de flujo que está situada en la salida de la cámara de mezcla. A través de este inyector, el flujo de gas portador es dividido en 2: una porción es introducida en la columna y el resto, por medio de una válvula de aguja, escapa del sistema. El flujo de gas portador en estos tipos de sistemas se controla manteniendo la precisión constante en la cámara de inyección, lo cual permite que el caudal del gas que pasa por el inyector varíe según que la válvula esté cerrada o abierta. Este tipo de inyectores tienen 2 inconvenientes: el primero es que al dividirse la muestra puede ocasionar que al momento de llegar al detector, las cantidades de analito separadas, sean bastante pequeñas, y esto genera que los límites de detección aumenten considerablemente, por lo que no es conveniente al momento de hacer un análisis de trazas. Por otro lado, estos inyectores pueden dar lugar a discriminación entre los compuestos de la muestra, en algunos casos (30).

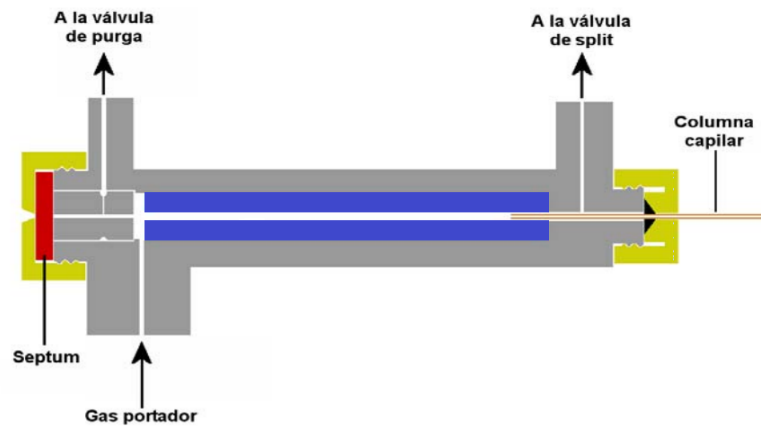


Figura 1.5: Formato de un inyector

Fuente: Watson, 2005 (29).

2.4.2. Inyección *splitless*

En este tipo de técnica, la muestra total inyectada pasa hacia la columna, la cual mantiene una temperatura por debajo del punto de ebullición del compuesto más volátil en la muestra, durante la inyección. La muestra total se inyecta, y esta es condensada en la columna (cabeza), esta actúa en la columna como un disolvente condensado donde los componentes se concentran a analizar, a modo de trampa.

Cuando transcurre un tiempo apropiado, una válvula de purga se abre en el inyector para sacar hacia la atmósfera el solvente vaporizado que pudo haberse quedado dentro del inyector, en el mismo momento se empieza a calentar la columna para continuar con el análisis.

Esta técnica tiene 2 ventajas: la primera que no exista división entre la muestra, permitiendo así aumentar notablemente la sensibilidad, siendo conveniente para un análisis de trazas. Por otro lado, que la muestra se reconcentre en la cabeza de la columna ocasiona que las pérdidas de eficacia por una mala inyección sean menos importantes a diferencia con otras técnicas de inyección (29).

2.5. Tipo de detector

Los detectores en GC, se pueden clasificar generalmente en detectores específicos y detectores universales, estos últimos tienen la ventaja de responder en su mayoría a cualquier componente que pueda eluir una columna, pero, esta ventaja podría volverse en un inconveniente al momento de realizar análisis de mezclas complejas, por lo que usar detectores específicos es más ventajoso ya que respondería solamente a un grupo de limitado de compuestos, además de ofrecer los cromatogramas simplificados (30).

2.5.1. Detector de ionización de llama (FID)

Se basa en la existencia de la relación directa que tiene la conductividad eléctrica de un gas con la concentración de partículas cargadas que existen en una muestra. Se usa como una fuente de ionización de moléculas orgánicas una llama de hidrógeno que fluyen en el detector. El detector se compone de un sistema de electrodos, en donde la parte negativa se encuentra en la base de la llama y la parte positiva se encuentra alrededor de la llama cargado con +300V con una forma de cilindro o de cestilla (31). Al momento de salir la corriente gaseosa de la columna es mezclada con el combustible que es una corriente de hidrógeno, produciéndose la combustión al momento de entrar al detector. Se introduce oxígeno o aire para que la base del detector soporte la llama. En el momento en que un compuesto orgánico llega a la llama se produce la combustión, en el cual se forma partículas cargadas dependientes de la velocidad del flujo y la naturaleza del soluto, por lo que se relaciona directamente con la cantidad del soluto. Este tipo de detector es capaz de responder prácticamente a todo tipo de sustancias, excepto al monóxido de carbono, argón, dióxido de carbono, helio, agua etc. El adecuado funcionamiento de este tipo de detector va depender de elegir adecuadamente los 3 flujos utilizados o sea el hidrógeno, gas portador y aire (32).

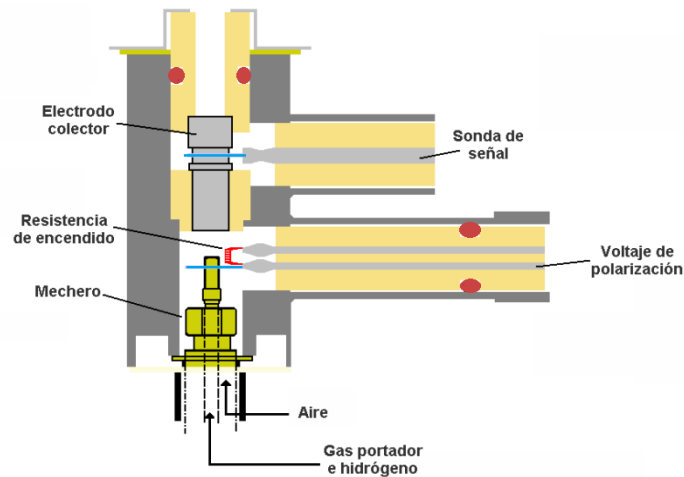


Figura 1.6: Descripción de detector FID

Fuente: Watson, 2005 (29).

2.5.2. Detector de masas

El fundamento de este detector se basa en obtener iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, cuando ya se obtienen estos iones, se proceden a separar por su carga y su masa, luego llegan a ser detectados finalmente.

El espectro de masas es un parámetro que relaciona con la abundancia de distintos tipos de iones con relación masa/carga de cada uno de estos. Los iones que se determinan mediante esta técnica se identifican por su masa (29).



Figura 1.7: Representación de un espectro de masas

Fuente: Watson, 2005 (29).

3. Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica moderna de separación e identificación de analitos de una mezcla de compuestos, en donde el analista coloca muestras en la bandeja del equipo para su inyección automática en la columna, usando una fase móvil (solvente) que se bombea a través de la columna en donde se encuentra la fase estacionaria, separándose así los compuestos para luego ser detectados por un detector al salir de la columna emitiendo un cromatograma (señal en función del tiempo). Este sistema está compuesto básicamente de una fase móvil contenida en un reservorio, de una bomba, de un inyector, de una columna de separación y su respectivo detector (33).

3.1. Instrumentación

Se muestra un diagrama básico de la instrumentación de un sistema de HPLC detallando sus partes posteriormente (34).

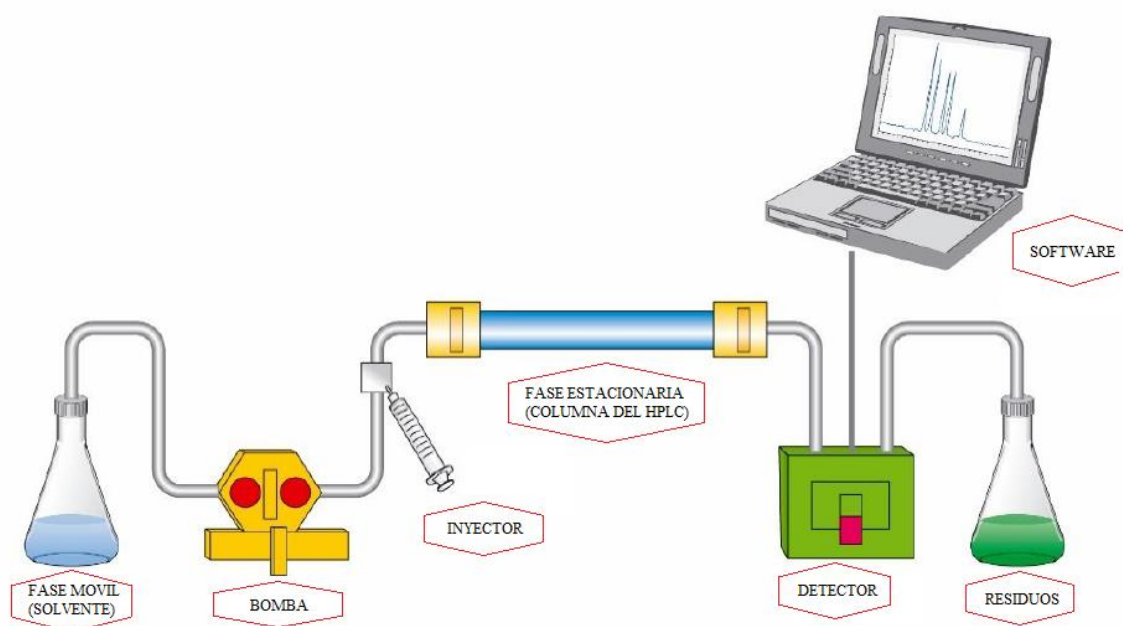


Figura 1.8: Componentes básicos del sistema de HPLC

Fuente: Töppner K, Hansen D, Herbig, (2015) (34)

3.2. Bombas

El sistema de bombeo tiene la función de proporcionar un flujo continuo al solvente a través de la columna y el resto del sistema. Los requisitos que reúne son:

Un rango de flujo de: 0.01 a 10 mL/min

Un rango de presión: de 1 a 5000 psi

Pulsos de presión: menos del 1% para HPLC normal e inverso (35).

En HPLC se utilizan mayormente bombas de pistón (Figura 1.11), que proporciona a la fase móvil alta presión.

Los tipos de bombas son:

Las de presión constante: estas son fáciles de utilizar, evitan los pulsos de presión y tienen un mantenimiento bajo. Su inconveniente es que necesita una observación constante del flujo ya que las variaciones pueden producir fallos.

De flujo constante: son capaces de mantener el flujo (36).

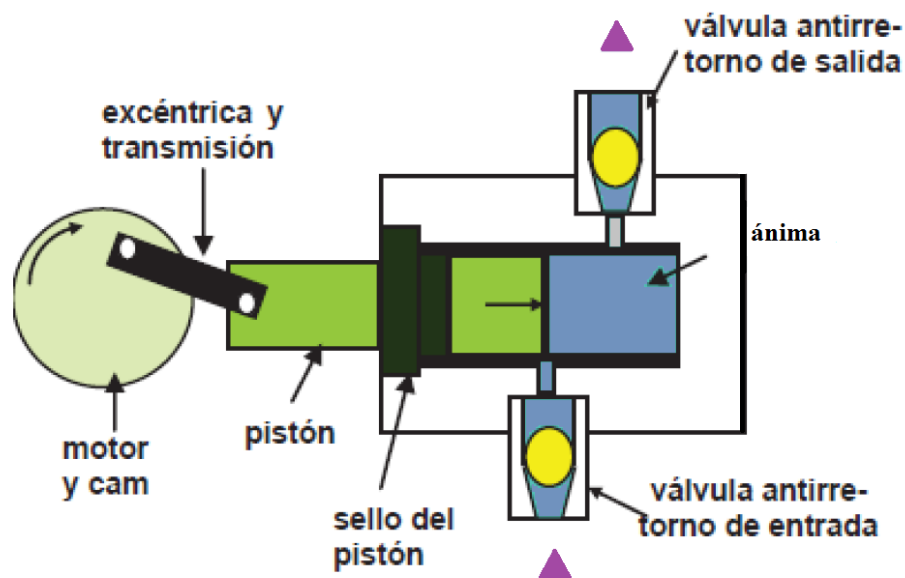


Figura 1.9: Esquema de una bomba de HPLC de pistón.

Fuente: García & Yusá, 2016 (36).

3.3. Inyectores

Los inyectores introducen las muestras líquidas con una alta precisión y alta presión en un rango de volumen de 0.1-100 mL, contienen válvulas con un bucle que permite la inyección de la muestra y la purga del sistema junto con la eliminación de burbujas (33). Está situado entre la salida de la bomba y la columna, además de ser hermetico. Los inyectores de válvulas son los más utilizados gracias a su reproducibilidad y a su resistencia a altas presiones (36).

3.4. Columna

La columna es el sistema más importante en el HPLC, tiene forma de un cilindro, mayormente metálico que contiene la fase estacionaria rellena de microparticulas (Fig. 1.14). Usualmente compuesta de acero inoxidable, suele tener diámetros internos desde 2.6-5 mm, mayormente contiene filtros de acero poroso (36).

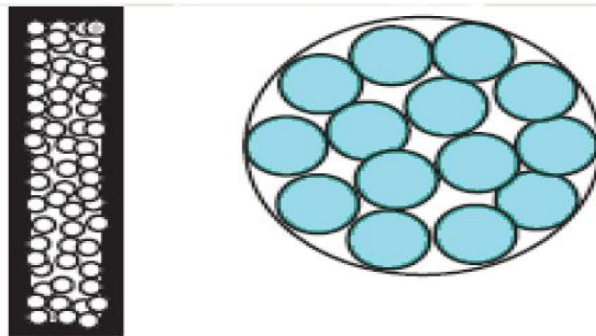


Figura 1.10: Columna cromatográfica rellena de micropartículas

Fuente: García & Yusá, 2016 (36).

Las columnas cromatográficas han ido mejorando continuamente con la intención de alargar su vida útil, obteniendo rellenos con partículas más rígidas y robustas, sus diámetros más reducidos y con un tamaño más uniforme. Los rellenos porosos tienen variedad de diámetros de poro y nuevos núcleos poliméricos de carbon poroso, zirconio, alúmina, titanio, etc. La superficie particular mejor recubierta presenta niveles reducidos de metales residuales en rellenos más homogéneos.

Se debe revisar cada cierto tiempo el estado de la columna haciendo un test con patrones específico, para comprobar así mediante pruebas de idoneidad los límites de cada parámetro cromatográfico, (36).

3.5. Tubos conectores

Son los tubos que trasladan las sustancias dentro del sistema, ya sea de columna a detector, de columna a columna o de detector a detector, estos no deben de tener un diámetro interno mayor de 0.634 mm, ya que pueden causar picos en las mediciones posteriormente (36).

3.6. Filtros

Tienen la función de evitar la contaminación por la entrada de ciertas sustancias y la de evitar que se produzca un colapso en la columna, se encuentran entre la bomba y el sistema de inyección de muestras. Mayormente los filtros están hechos de acero poroso (36).

3.7. Medidores de presión

Ayudan a indicar si es que existe algún fallo en el sistema ya sea por la existencia de una fuga en cuanto a su infraestructura del sistema o por si es que algún flujo continuo está fallando por presión (35).

3.8. Termostatos de columna

Mantienen la columna en una temperatura óptima, de ahí se da su importancia ya que las variaciones de temperatura pueden causar un cambio en la viscosidad del solvente y tal vez influir en el volumen de retención, mayormente en un análisis cualitativo (35).

3.9. Detectores

Un detector de Cromatografía Líquida De Alta Eficacia tiene precisamente dos propiedades, la primera, responde a muestras que están en estado líquido y la segunda realizarlo bajo flujo continuo, para poder generar los gráficos on-line (cromatograma) de su señal frente al tiempo, cuando las muestras atraviesan su celda de flujo continuo.

Un detector de HPLC junto a las propiedades antes mencionadas, tiene que mostrar mínimo ruido, tener alta sensibilidad, respuesta rápida, varios órdenes de linealidad, un volumen muerto pequeño, ser robusto, debe ser de manejo comprensible y sencillo, no debe causar destrucción a las muestras, debe ser capaz de detectar los analitos que sean el objetivo del análisis y mostrar cierta selectividad antes posibles contaminantes. Los detectores se pueden clasificar por

su fundamento físico-instrumental en: detectores ópticos, que se basan en una interacción de los analitos con la radiación, estos pueden ser los detectores UV-VIS, arreglo de diodos, refractométricos, fluorimétricos, y polarimétricos, por otro lado existen los detectores eléctricos que se basan en la medida de una propiedad eléctrica como por ejemplo los detectores electroquímicos y conductimétricos; otros detectores existentes son los radiométricos, viscosimétricos y detección hibridada, acoplando HPLC a otras técnicas.

Los detectores espectrofotométricos UV-VIS y de cualquier otro tipo, tienen como base la absorción de la radiación que está regida por la ley de Lambert Beer, el cual establece que “la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromático es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria”. El detector espectrofotométrico en HPLC consta de fuentes de radiación, mayormente dos, una que emite radiaciones UV (se usa lámparas de deuterio) y otra que emite radiación visible (se usa lámparas de tungsteno-halógeno), aunque algunos montan solo una sola lámpara de vapor de xenón para ambas regiones UV-VIS. Todas estas fuentes emiten radiación policromática en donde un selector de longitud de onda reduce a radiación monocromática (Figura 1.15) (36).

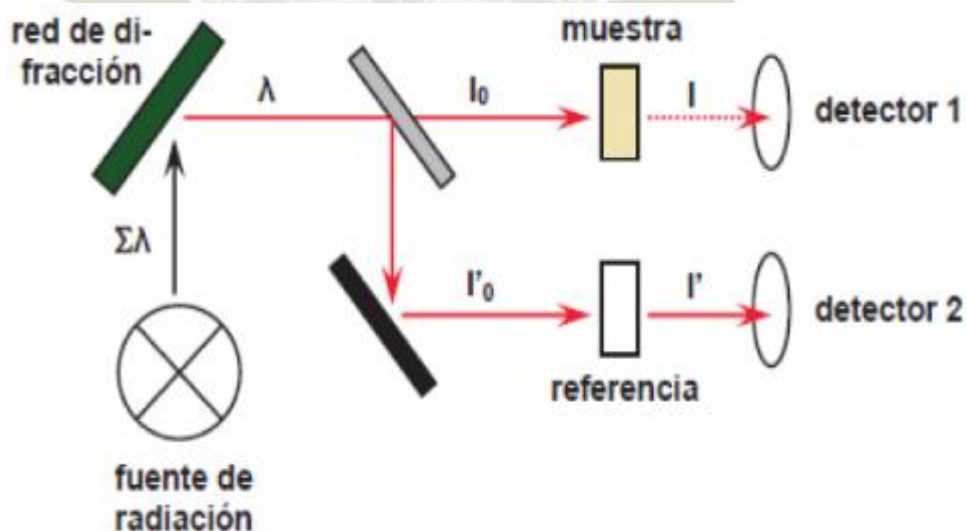


Figura 1.11: Óptica de un detector espectrofotométrico de doble haz

Fuente: García & Yusá, 2016 (36).

4. Validación

Todo método analítico debe validarse, es un proceso importante para poder confirmar y asegurar que los resultados producidos den fiabilidad. Cuando un laboratorio realiza la validación de un método, pretende determinar que el método es adecuado para los objetivos que se le ha previsto, todo esto con fundamento estadístico. Para este proceso es importante que sea asignado un responsable para poder cumplir con ese fin y así poder efectuar la validación de manera ordenada, confiable, trazable y en forma metódica. Es necesario que el laboratorio tenga claro los requerimientos del método para poder realizar la validación antes de iniciarla. Es fundamental, tener conocimiento del método que se va a validar, su aplicabilidad, en otras palabras, el analito, su concentración y las matrices o matriz en las que se quiere utilizar (37).

4.1. Definición

Según la ISO-17025 propone como definición de validación la siguiente:

“La confirmación, a través del examen y del aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” (37).

Entre los parámetros de calidad que se realizan en este trabajo son: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

4.2. Linealidad y rango

La linealidad de una técnica analítica se refiere a la capacidad de la misma de obtener resultados que presenten directa proporción entre la concentración del analito dentro de un rango específico. Es recomendable que se usen como mínimo cinco niveles de concentración con rangos mínimos especificados que va desde 80 al 120 % de la concentración prevista. A menudo, la aceptabilidad de los resultados obtenidos de linealidad se valora examinando el coeficiente de correlación junto con la intersección del eje “y” de la línea de regresión para la gráfica de concentración vs su respuesta. Generalmente se considera que un coeficiente de correlación, presenta evidencia de un ajuste aceptable cuando su valor es > 0.999 . Al aplicar la regresión lineal a los resultados, el intercepto debe ser diferente a cero significativamente, consiguiendo este resultado a través de una evaluación estadística. Para calcular el % C.V (para los datos) se toma la línea de regresión como la media y este resultado no debería exceder al 2,0 % (38).

4.3. Sensibilidad

Una técnica es sensible cuando una mínima variación de la concentración, determina una alta variación de su respuesta. Así permitiendo observar si el método es capaz de proporcionar una respuesta instrumental con una concentración de analito determinada. El comportamiento del analito se visualiza con el tiempo (39).

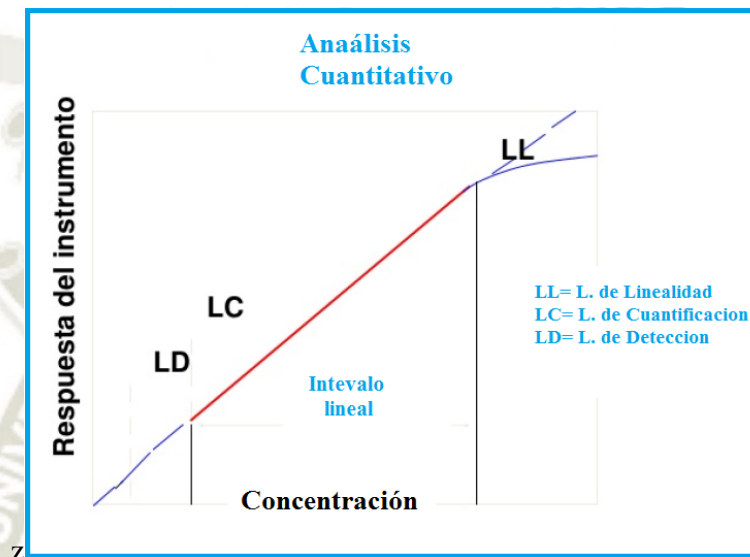


Figura 1.12: Representación de la sensibilidad

Fuente Bravo, 2012 (39)

4.4. Límite de detección

Es la menor cantidad o concentración de analito que puede detectarse con suficiente certeza por un proceso analítico dado. Es la concentración que emite una señal que es significativamente diferente al blanco (39).

4.5. Límite de cuantificación

Es la mínima concentración de analito que se puede determinar con exactitud y precisión, en ciertas condiciones ya establecidas. Es expresado en unidades de concentración (39).

4.6. Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de una serie repetida de análisis, sobre una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas (39).

4.6.1. Repetibilidad

Es la medida de la precisión de un método realizado bajo las mismas condiciones, se trabaja con el mismo analito, con el mismo método y con mismo analista, utilizando el mismo instrumento de medida en un intervalo de tiempo corto (39).

4.6.2. Precisión intermedia

Es la medida de la precisión de un método realizado bajo las mismas condiciones, trabajando sobre el mismo analito, con el mismo método, el mismo analista, utilizando el mismo instrumento de medida en un intervalo de tiempo prolongado como por ejemplo realizar el análisis en diferentes días. (39).

4.6.3. Reproducibilidad

Examina la variación de un método entre diferentes laboratorios, trabajando con condiciones operativas también diferentes. En la Tabla 1.7, se puede observar los factores que varían en las evaluaciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (40)

Tabla 1.7: Diferencias entre repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad

Factores	Repetibilidad	Precision Intermedia	Reproducibilidad
Instrumento			
Día de análisis	Igual	Diferente	Diferente
Analista			
Otros factores:			
- Columna Cromatografica			
- Condiciones ambientales	Igual	Diferente	Diferente
- Reactivos, etc.			
Laboratorio	Igual	Igual	Diferente

Fuente: Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, 2001 (41).

4.7. Exactitud

Es la proximidad de los resultados obtenidos, del método analítico, al valor real. Mayormente se puede valorar de diferentes formas. Una manera de evaluar es analizando una muestra con una concentración conocida, comparando así el valor medido con el valor real. Otra forma de evaluar es comparando los resultados que proporciona la nueva técnica con resultados obtenidos de un procedimiento alternativo bien caracterizado con el conocimiento de que este es preciso. Una tercera manera, se basa en la recuperación de cantidades conocidas de analito en matriz. La ICH “*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human*” hace referencia a una recomendación en cuanto a las muestras enriquecidas. Indica que las muestras deberían de prepararse mínimo por triplicado con un rango de 50-150% de la concentración objetivo. El último enfoque mencionado es el método de las adiciones estándar, que es utilizado también para poder determinar la recuperación. Esta manera es usada cuando no se puede realizar la preparación de una matriz de muestra. Para una técnica analítica se dice que el criterio de observación se basa en que la recuperación media va de 95 -105 % (muestras mayores a 1 ppm) y de 90 a 107 % cuando las concentraciones de las muestras son menores a la concentración antes mencionada (38).



CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de investigación

Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad en la Universidad Católica de Santa María (Arequipa), en noviembre, diciembre (2019) y enero (2020).

2. Materiales

2.1. Materiales de laboratorio

- Fiolas ámbar de 10 ml
- Bureta calibrada de 25 ml
- Vasos de precipitado de 100 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 10 ml calibradas
- Lunas de reloj
- Espátula de laboratorio.
- Viales (ámbar) para HPLC
- Embudo (filtración al vacío)
- Jeringa descartable de 5 mL
- Viales (ámbar) para GC.
- Matraces aforados de 25 mL.
- Tubos con tapa rosca
- Filtro de membrana Nylon (0.22 μm) para HPLC, (marca Repliquick).
- Micropipeta de 100-1000 μl (marca Kyntel).
- Jeringa 1 μL para GC (marca SGE).

2.2. Equipos y aparatos

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta resolución, modelo La Chrom elite ,(marca Merck Hitachi).
 - Detector DAD (Diode Array Detector), marca Merck Hitachi
 - Bomba programable, marca Merck Hitachi
 - Columna Lichrocart 250 mm x 4 mm x 5 μm RP-18, marca Merck.
 - Software Chorm HPLC “System Manager”.
- Equipo de cromatografía de gases (GC/MS-QP2010), con detector de ionización de llama (marca Shimatsu).
- Software “Gas Chromatography *Solution*”

- Columna capilar compuesta de sílice fundido con un tamaño de 100 μ m (largo) y 0.25 mm (diámetro), cubierto interiormente con una fase estacionaria de bicianopropil polisiloxano 100%.
- Balanza analítica de cinco dígitos, modelo Discovery, con sensibilidad de 0.1 mg (marca Ohaus).
- Balanza analítica de cuatro dígitos (marca Kern).
- Bomba al vacío (marca Lab companion).
- Vortex agitador (marca Barnstead).
- Centrífuga (marca Branson)
- Purificador de agua (marca Purelab) (42,43).

2.3. Reactivos

- Estándar de β -caroteno $\geq 99\%$ (pureza), (marca Sigma-Aldrich Química)
- Acetonitrilo grado HPLC (marca Merck)
- Diclorometano grado HPLC (marca Merck)
- Hexano grado analítico (marca Merck)
- Acido pirogálico grado analítico (marca Seelze Hannover)
- Etanol comercial grado analítico
- Ácido clorhídrico grado analítico (marca Merck)
- Dietil éter grado analítico (marca Merck)
- Éter de petróleo grado analítico (marca Merck)
- Cloroformo grado analítico (marca Merck)
- Boro Trifluoruro-metanol complejo, solución en metanol al 20% (marca Merck)
- Tolueno grado analítico (marca Merck)
- Agua destilada
- n-Hexano para GC, (marca Merck) (42,43).

3. Métodos

3.1. Muestra de Estudio

Se seleccionó 8 mantequillas al azar de diferentes marcas provenientes de mercados y supermercados de la ciudad de Arequipa, a cada una de las muestras se le otorgó un código (A, B, C, D, E, F, G, H). La muestra A, B, D provienen de supermercados, las muestras E, F, G, H, de mercados y la muestra C es una

mantequilla casera de conocida procedencia. Se tomó en cuenta el correcto almacenamiento de estas.

3.2. Métodos

3.2.1. Acidez

Definición y principio: La acidez de la grasa de la mantequilla es igual a mg de KOH requeridos para neutralizar 1 g de grasa. La grasa separada por la mantequilla derretida se disuelve en una mezcla de alcohol éter y se titula con un estándar alcalino.

Determinación:

Pesar al mg más cercano porción de muestra bien mezclada de 5-10 g en un Erlenmeyer de 250-300 ml, agregar 50-100 ml del combinado de alcohol éter y 0.1 ml de fenolftaleína, titular con 0.1 M de hidróxido de potasio alcohólico hasta rosa permanente por más de 10 segundos (44).

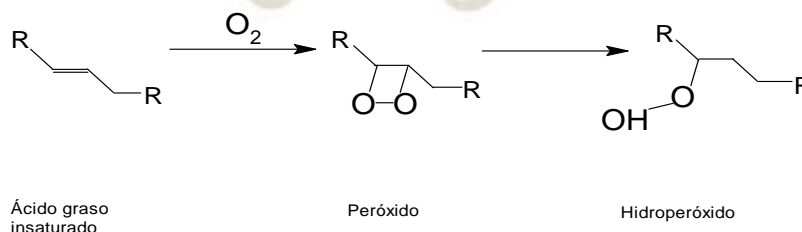
$$\text{Acidez} = \frac{\text{ml de gasto de KOH alcohólico} \times \text{molaridad de KOH} \times 56.1}{\text{g usados de muestra}}$$

La diferencia entre duplicados no debería ser menor o igual a 0.1 mg de hidróxido de potasio por gramo de grasa.

3.2.2. Índice de peróxido

Principio:

Método basado en la capacidad de los peróxidos de oxidar los iones ioduro del KI y producir iodo que se valora con el tiosulfato.



Determinación:

Pesar 5 g de la porción en un Erlenmeyer de 250 ml, agregar 30 ml de cloroformo y ácido acético y agitar hasta disolver, agrega 5 ml de solución de ioduro de potasio saturado, agitarlo por un minuto y agregar 30 ml de agua,

titula con el tiosulfato de sodio 0.01 N hasta que el amarillo esté a punto de desaparecerse y agregar 0.5 ml de almidón al 1% hasta que el azul desaparezca (45).

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(\text{gasto del blanco} - \text{gasto del titulante}) \times \text{Molaridad del titulante} \times 1000}{\text{g de muestra}}$$

3.2.3. Índice de Yodo:

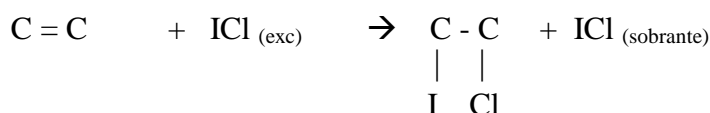
Principio:

La grasa o el aceite se mezclan con una solución de cloruro de iodo para halogenar dobles enlaces en grasa o aceite. El exceso de cloruro de iodo se reduce a iodo libre en presencia de ioduro de potasio, y el iodo libre se mide por titulación con tiosulfato de sodio usando almidón como indicador. El índice de iodo (IV) calculado como g de iodo absorbido por g de muestra (% de iodo absorbido) es una medida de la insaturación de grasas y aceites (46).

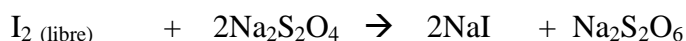
Reactivo de Wijs



Muestra



Blanco



Determinación:

Calentar la muestra si aún no es líquida y filtrar. A 1 g de muestra preparada agregar 15 ml de ciclohexano-ácido acético agitar bien para asegurarse que este bien disuelto , agregar 25 ml de reactivo de Wijs, ponerle el tapón y agitar , dejarlo reposar por 1 o 2 horas y ponerlo en un frasco ámbar a 25 ± 5 °C durante la reacción , remover el frasco de la zona oscura y agregar 20 ml de ioduro de potasio y mezclar, agregar aproximadamente 150 ml de agua y

titular con 0.1 estándar de tiosulfato de sodio hasta que el color amarillo desaparezca y luego agregar 1-2 ml del almidón hasta que el color azul desaparezca.

Cálculos:

$$\text{Indice de iodo} = \frac{(\text{gasto del blanco} - \text{gasto de la titulacion}) \times \text{molaridad de tiosulfato de sodio} \times 12.69}{\text{peso de muestra}}$$

3.2.4. Cromatografía de gases para la determinación de ácidos grasos

Se identificó ácidos grasos en mantequillas usando una técnica validada en el laboratorio de control de calidad de la UCSM.

3.2.4.1. Extracción de ácidos grasos

Para extraer las matrices de estudio, en las muestras, se usó la técnica perteneciente a la AOAC 996.06. Y se prosiguió de la siguiente manera:

- Pesar de 100 a 200 mg de muestra y añadir 100 mg de ácido pirogálico más 2 ml de etanol (96°), 4 ml de agua y 2 ml de NH₄ OH concentrado.
- Colocar la mezcla en baño maría a temperatura de 70-80 °C durante un tiempo de 40 minutos.
- Después del tiempo transcurrido dejar enfriar a temperatura del medio ambiente y añadir gotas de indicador fenolftaleína, observar si la solución cambia a color rosa, si no es así, añadir gotas de NH₄ OH.
- Una vez termine la digestión, dejar enfriar y añadir 25 ml dietiléter, luego pasar a centrifugar a 250 RPM por unos cinco minutos, después añadir 25 ml de éter de petróleo y pasar a centrifugar a 250 RPM por cinco minutos. Si es que la solución permanece turbia se puede volver a centrifugar.
- El sobrenadante se procede a decantar y se continúa con la evaporación hasta sequedad haciendo uso del aire comprimido.
- La grasa que se extrae se disuelve en 2 ml de cloroformo más 2 ml de dietiléter.
- Se procede a evaporar de nuevo a sequedad usando el aire comprimido hasta el olor a solvente se deje de sentir (47).

- . Modo: Split
- . Split ratio: 100
- . Presión: 279.3
- . Flujo total: 137.4
- . Flujo de la columna: 1.33
- . Temperatura inicial de la columna: 100°C
- . Temperatura de estabilización: 240°C (27).

3.2.5. Cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de β -caroteno

Se identificó el tiempo de retención de β -caroteno usando un estándar con pureza > 99 %. Se observan las condiciones cromatográficas en la Tabla 2.1

Tabla 2.1: Condiciones cromatográficas para la determinación de β -caroteno en mantequilla

Fase Móvil	Acetonitrilo : Diclorometano (20 : 80)
Columna Cromatografica	Rp 18 Merck Lichrocart
Flujo	1 mL/min
Volumen de inyecciones	20 ul
Tiempo de Corrida	15 min
Sistema	Isocratico
Temperatura	18 - 23 °C
Detector UV	420 nm

Fuente: Elaboración propia

Para poder identificar cual sería la proporción adecuada de las fases móviles, velocidad de flujo y un adecuado tiempo de retención, se ejecutaron distintas pruebas de ensayo, permitiéndonos así separar óptimamente el β -caroteno. Se usaron dos fases móviles, la fase móvil A (diclorometano) y la fase móvil B (acetonitrilo), se realizaron en un sistema isocrático (48).

3.2.5.1. Preparación de la fase móvil

La fase móvil está compuesta de acetonitrilo y diclorometano (20:80) se preparó filtrando cada fase móvil al vacío (filtro de 0.2 μm), para después poder continuar con el análisis cromatográfico (43).

3.2.5.2. Preparación de la solución stock del estándar de β -caroteno

Se preparó una solución stock pesando 1 mg del estándar de β -caroteno y se traspasó a una fiola ámbar de 10 mL la cual se enrasó con hexano grado HPLC, obteniendo una solución stock de 100 ppm.

3.2.5.3. Validación del método analítico para β -caroteno pro HPLC

Se evaluaron los parámetros de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud para cumplir con los requerimientos de validación anteriormente citados.

3.2.5.3.1. Linealidad

Como ya se mencionó antes la linealidad se refiere a la proporcionalidad que hay entre la concentración del analito y su respuesta, por lo mismo la estimación de este parámetro se realizó al identificar señales de detección en el instrumento según la concentración del analito elaborando una línea de regresión mediante una gráfica de calibración (49).

Empezando de una solución stock de 100 ppm que se preparó como se observa en la Figura 2.1, de esta solución se tomó alícuotas de 0.3 ; 0.6; 1.2; 2.4 y 4.8 mL, enrasando con hexano una vez llevadas a fiolas ámbar de 10 ml , consiguiendo concentraciones de 3; 6; 12; 24 y 48 ppm , como se muestra en la Figura 2.1 y la Tabla 2.2. Estas soluciones se situaron en viales de HPLC luego de ser filtradas con discos de 0.2 μm para posteriormente poder efectuar la lectura cromatográfica. El proceso se repitió tres veces.

Tabla 2.2: Concentración de β -caroteno para la gráfica de calibración en HPLC.

Concentración de β -caroteno (ppm)	Solución 100 ppm (ml)	Volumen total (ml)
3	0.3	10
6	0.6	10
12	1.2	10
24	2.4	10
48	4.8	10

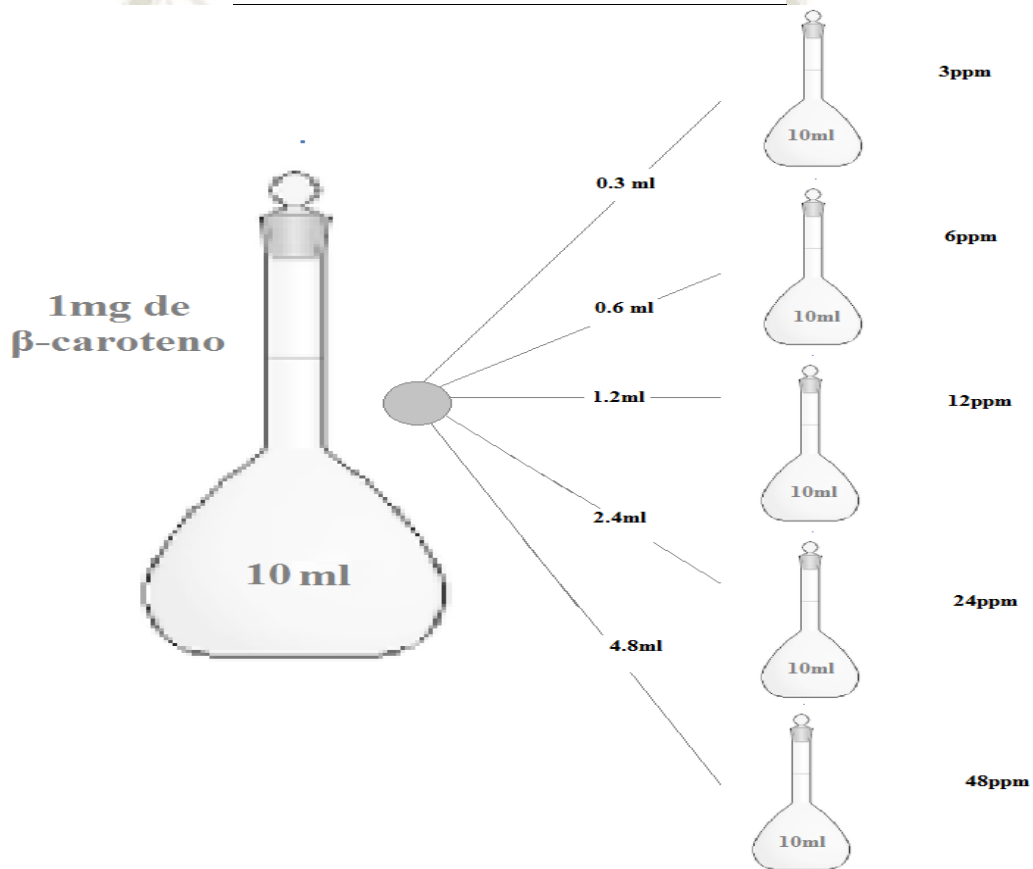


Figura 2.1: Preparación de la gráfica de calibración

La linealidad se refiere a la proporcionalidad que existe entre la concentración de un analito y su respuesta. Para estudiar la linealidad no es necesario solamente una representación gráfica, sino que implica también tener que comprobarlo estadísticamente. Después de obtener la gráfica de calibración, se dispone de la ecuación de la recta (49).

$$Y = bX + a \quad (\text{Ec 2.1})$$

Siendo a y b los estimadores de regresión, la ordenada al origen o intercepto (a) y la pendiente (b) respectivamente, en el número de mediciones (n), es la concentración (X_i) y el valor medido en el método o la señal es (Y_i). (49).

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad (\text{Ec 2.2})$$

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n} \quad (\text{Ec 2.3})$$

Independientemente de cómo sea la apariencia de la recta, es adecuado evaluar estos estimadores de regresión (a y b) en un intervalo de confianza dado ($p=0.05$):

- La ordenada al origen o intercepto (a) se determina para evaluar la proporcionalidad de la función analítica, es otras palabras, que la recta pase por el origen y cualquier desviación sea debido únicamente a un error aleatorio.
- La pendiente (b) se determina como parámetro que indica de la sensibilidad del método o para examinar la correlación de diferentes métodos.
- Coeficiente de regresión lineal (r), evalúa el ajuste del modelo lineal que se propuso, $Y = bX + a$ (49).

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n})(\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n})}} \quad (\text{Ec 2.4})$$

Cuando el valor de $r = 1$ indica una correlación perfectamente lineal positiva, y cuando $r = -1$ indica una correlación perfectamente lineal negativa y si r es 0 no existe correlación entre X e Y. Generalmente r es mayor a 0.99 y los valores que están por debajo de 0.90 son raros (49).

3.2.5.3.2. Sensibilidad

Nos referimos a sensibilidad cuando la cantidad mínima de un analito produce un resultado significativo. La sensibilidad se puede clasificar en dos tipos:

- Primero tenemos la sensibilidad de calibración que corresponde a la pendiente en la curva de calibración.
- Segundo, la sensibilidad analítica que corresponde al resultado del cociente entre la desviación estándar de la medida y la sensibilidad de calibración

Se puede decir que dos métodos o el mismo método desarrollado para distintas matrices, podrían tener igual sensibilidad de calibración, pero diferente sensibilidad analítica, esto se debe a factores propios.

Para evaluar la sensibilidad de un método se ven los siguientes parámetros:

Límites de detección: Es la mínima concentración de un analito que se puede detectar en una muestra en condiciones dadas, según la USP XXII. Se puede expresar en unidades de porcentaje, ppm, ppb, etc, (unidades de concentración). Para determinar el LD se puede realizar una comparación del mismo con la respuesta del blanco, observando que es positiva en el momento que la señal supera la relación señal/ruido, según criterio del que está analizando o en un factor de 2 o 3.

Límites de cuantificación: Es la mínima concentración de un analito que se puede determinar con precisión y exactitud en ciertas condiciones dadas. Se puede expresar en unidades de concentración.

Estos parámetros se pueden determinar partiendo de la gráfica de calibración, por lo que se determinó lo siguiente:

-Se determina la pendiente y el intercepto de la gráfica de calibración, (concentración vs respuesta) en un rango apropiado. La ordenada tiene el mismo valor del Y_{bl} .

-Determinando la desviación estándar de cada concentración, para así obtener otra gráfica de calibración de concentración vs desviación estándar. El S_{bl} es igual a la ordenada obtenida en esta gráfica

Para la obtención del límite de detección se usa tres desviaciones estándar del blanco y el límite de cuantificación usa 10 desviaciones estándar del blanco. (49,50).

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec 2.5})$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \quad (\text{Ec 2.6})$$

3.2.5.3.3. Precisión

La precisión de un método es la dispersión de la medida alrededor del valor medio, correspondiente a la correlación entre medidas individuales cuando el método es realizado repetidamente en varias alícuotas de una muestra.

Matemáticamente la precisión es expresada como la desviación estándar s , estimada normalmente como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV). La desviación estándar se calcula de la siguiente manera:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ec 2.7})$$

Donde (X_i) es el valor que se midió en el ensayo, el número de medidas es (n) y (\bar{x}) representa al estimador de la media.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Ec 2.8})$$

Por otra parte, la desviación estándar relativa o CV son calculados de la siguiente manera:

$$RSD = \frac{s * 100}{\bar{X}} \quad (\text{Ec 2.9})$$

Tanto la desviación estándar y la RSD pueden determinar la incertidumbre estimando la medida en distintas escalas. La precisión puede medirse en condiciones repetitivas es decir en un mismo día, usando el mismo instrumento y con el mismo analista, puede medirse también en condiciones reproducibles o sea en días distintos, utilizando diferente instrumento y con otro analista. El criterio de aceptabilidad del RSD según la USP varía de acuerdo al objetivo pero generalmente el RSD no debe pasar el 2%, inyectando mínimo cinco veces la solución estándar (49).

Para poder valorar este parámetro se desarrolló las pruebas a continuación:

Precisión intermedia

Para calcular la precisión intermedia se usó un estándar de 12 ppm el cual se preparó mediante la disolución de 1.2 ml en una fiola ámbar de 10 ml partiendo de la solución madre (100 ppm), que se realizó al valorar el parámetro de linealidad. La precisión intermedia se realizó mediante la lectura de seis estándares de 12ppm bajo las mismas condiciones como: el mismo tratamiento, equipo y analista pero en distintos días.

La RSD se calcula también según Horwitz , ya que este relaciona la desviación estándar relativa de Horwitz de un método con la concentración del analito en una muestra. Cuando $\%RSD < \%Horwitz$ demuestra una precisión intermedia adecuada. Para calcular este parámetro se usa la siguiente ecuación:

(Ec 2.10)

$$RSD \text{ de Horwitz } (\%) = 2^{(1-0.5 \log c)}$$

En esta ecuación C representa la concentración del analito.

Repetibilidad

Para el cálculo de la repetibilidad se llegó hacer seis lecturas de un estándar de 12 ppm siguiendo el mismo procedimiento de la precisión intermedia, también siguiendo las mismas condiciones es decir con el mismo equipo y el mismo analista. Igualmente cuando $\%RSD <$

%Horwitz demuestra una repetibilidad adecuada. También se necesita calcular la desviación estándar relativa según Horwitz, este parámetro para repetibilidad se calcula de la siguiente ecuación: (Ec 2.11)

$$CV \text{ de Horwitz } (\%) = 0.5 * 2^{(1-0.5 \log C)}$$

En esta ecuación “c” representa la concentración del analito (49).

3.2.5.3.4. Exactitud

La exactitud llamada también tendencia o error sistemático es la diferencia que existe entre la media y el valor real. Se expresa matemáticamente de la siguiente manera.+

La desviación es expresada como:

$$B = \bar{X} - \hat{X} \quad (\text{Ec 2.12})$$

La desviación relativa es expresada como:

$$B\% = \frac{B}{\bar{X}} * 100 \quad (\text{Ec 2.13})$$

Finalmente la recuperación se expresa así :

$$R = \frac{X}{\hat{X}} * 100 \quad (\text{Ec 2.14})$$

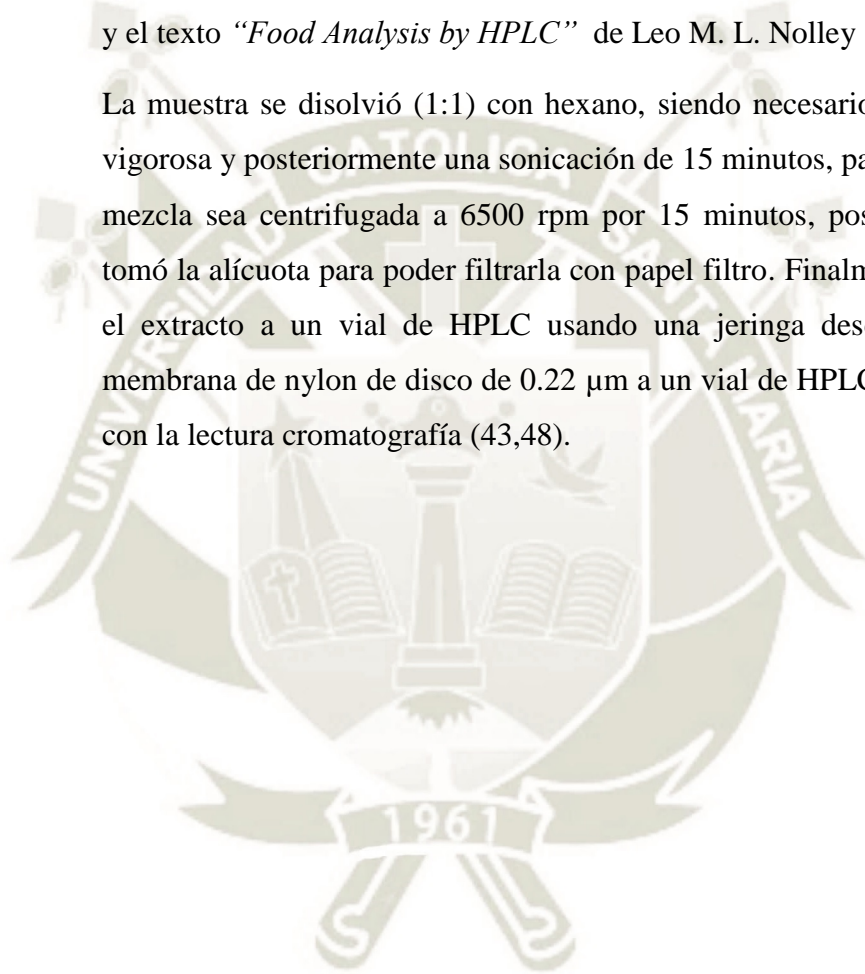
El valor medio está representado por \bar{x} y el valor real por \hat{x} . De las tres ecuaciones la que se utiliza mayormente es la recuperación. Es cierto que el valor real de concentración se desconoce, pero este puede estimarse; haciendo posible la preparación de una muestra mediante un procedimiento que sea más exacto que el que se ha evaluado, para poder ser usado como una referencia.

La exactitud tiene que ser lo más pequeña posible para que el valor de referencia y el valor medido se aproximen, es decir que el resultado de recuperación del analito debería estar cerca al 100 %. Para determinar este parámetro de recuperación se realizó el agregado de 12 ppm de analito a un volumen ya definido (49).

3.2.5.4. Cuantificación de β -caroteno por HPLC

La técnica empleada para la extracción de β -caroteno en las matrices de estudio se realizó tomando como referencia el método de extracción utilizado por la universidad complutense de Madrid departamento de ciencia de los alimentos, facultad de farmacia en su estudio “*Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivates and b-carotene in milk and soy juice based beverages by HPLC with diode-array detection*”, y el texto “*Food Analysis by HPLC*” de Leo M. L. Nolley (43,48).

La muestra se disolvió (1:1) con hexano, siendo necesario una agitación vigorosa y posteriormente una sonicación de 15 minutos, para que luego la mezcla sea centrifugada a 6500 rpm por 15 minutos, posteriormente se tomó la alícuota para poder filtrarla con papel filtro. Finalmente se agregó el extracto a un vial de HPLC usando una jeringa descartable y una membrana de nylon de disco de 0.22 μm a un vial de HPLC y se procedió con la lectura cromatografía (43,48).





1. Pruebas fisicoquímicas requeridas por la Norma Técnica Peruana.

Las siguientes pruebas fisicoquímicas se realizaron para corroborar que estas cumplan con los parámetros de calidad requeridas en Perú. En la tabla 3.1 se observan los resultados que se obtuvieron en la evaluación. (Datos; Anexo 2)

Comparando los resultados de la tabla 3.1 con los de la NTP 202.024:2005 cuyos valores normales son: materia grasa mínima 80%, humedad máxima 16%, solidos totales no grasos máximo 2%, acidez máxima 0.3%, índice de peróxido máximo 1.0 (26).

Tabla 3.1: Resultados obtenidos de pruebas fisicoquímicas requeridas por la NTP de ocho muestras de mantequillas.

Muestras \ Pruebas	% Grasa	% Humedad	% Solidos no Grasos	% Acidez	Índice de peróxido (ppm)
A	81.7	15.6	0.95	0.113	0.2
B	83.4	13.9	0.93	0.141	0.1
C	86.6	12.1	0.62	0.056	0.1
D	77.2	15.9	1.98	0.085	0.2
E	84.1	14.7	0.65	0.141	0.1
F	83.5	14.9	0.85	0.085	0.1
G	86.8	11.5	0.81	0.056	0.1
H	85.9	12.2	0.96	0.085	0.1

Fuente: Elaboración propia

La mantequilla “C” es un producto natural de conocida procedencia libre de aditivos y preservantes. Mientras que las otras son productos provenientes de mercados y supermercados.

Precisando que la acidez brinda valores sobre la presencia de ácidos grasos libres que se encuentran presentes en mantequilla y el índice de peróxido evalúa si se produjo una oxidación inicial de ácidos grasos insaturados formando así peróxidos. Siendo estos los parámetros para evaluar la rancidez de la mantequilla.

Se logra inferir que estos valores están dentro de los parámetros requeridos por la NTP así demostrándonos que no tienen grado de rancidez gracias a su correcta acidez e índice de peróxido. Además de que los porcentajes de grasa, humedad y solidos no

grasos presentan resultados adecuados exceptuando la muestra D que su porcentaje de grasa es inferior a lo recomendado.

2. Índice de yodo

Este parámetro para las mantequillas oscila entre 26 y 42 tomando como referencia que los valores fuera de este rango podrían deberse a distintos factores. En la Tabla 3.2 se observan los resultados que se obtuvieron en las muestras (Datos, Anexo 3).

Tabla 3.2: Resultados obtenidos en la prueba de índice de yodo en ocho muestras de mantequilla.

INDICE DE YODO		
Muestra	Gasto (ml)	Índice de yodo
A	31.3	39.7197
B	47.8	60.6582
C	29.4	37.3086
D	38.5	48.8565
E	27.5	34.8975
F	69.5	88.1955
G	20.6	26.1414
H	21.3	27.0297

Fuente: Elaboración propia

Observando la tabla 3.2 se puede inferir que las muestras analizadas que tienen un valor alrededor de los valores normales de índice de yodo en mantequilla según el libro de Química y Bioquímica de los alimentos II (51), representan pocos ácidos grasos insaturados que es un indicativo o sugerencia que el producto viene de crema de leche, en cambio valores de índice de yodo que exceden estos valores, pueden ser indicativos de una posible adulteración con grasa vegetal u otro tipo de grasas, ya que estas aumentan el valor de índice de yodo en mantequilla. Siendo el caso de las muestras B, D, y F que superan el valor referencial.

3. Cuantificación de ácidos grasos en mantequilla por GC

El estudio se desarrolló para el análisis de ocho mantequillas, a consecuencia de reportes sobre adulteración de productos lácteos en el Perú.

Analizando así el perfil de ácidos grasos de ocho muestras de mantequillas, distinguiéndose estas muestras en el día de tratamiento debido a que si no fuera así habría posibles contaminaciones cruzadas. En la Tabla 3.3 se puede observar los resultados obtenidos después de que se evaluó cada muestra por GC (Datos; Anexo 4).

Tabla 3.3: Perfil de ácidos grasos en mantequilla en las ocho muestras de mantequilla

Ácidos Grasos Muestra	Tridecanoico (%)	Mirístico (%)	Palmitico (%)	Heptadecanoico (%)	Estearico (%)	Oleico (%)	Linoleico (%)	Linolenico (%)	Eicosadienoico (%)	Pentadecanoico (%)	Otros (%)
A	13.08	nd	25.18	1.54	16.40	20.19	Nd	7.7	3.32	4.28	8.32
B	nd	20.14	nd	Nd	4.58	10.82	6.70	Nd	40.83	nd	16.93
C	nd	8.22	23.94	26.52	8.99	20.19	1.11	Nd	nd	nd	11.03
D	nd	0.924	nd	Nd	35.147	Nd	58.05	Nd	nd	nd	5.880
E	nd	12.08	26.33	2.07	21.43	16.02	Nd	Nd	8.98	nd	13.09
F	nd	nd	4.01	0.63	1.06	Nd	73.42	20.88	nd	nd	nd
G	nd	23.73	22.06	6.87	27.38	Nd	Nd	1.11	18.85	nd	nd
H	1.95	10.20	nd	0.78	65.25	18.95	2.87	Nd	nd	nd	nd

Fuente: Elaboración propia

Los porcentajes de ácidos grasos en mantequilla tienen valores referenciales en distintas investigaciones, comparando así nuestros resultados de la tabla 3.3 y obteniendo una data que nos permite observar claramente valores que salen de lo conocido.

El ácido pentadecanoico el cual se puede o no encontrar en mantequillas entre valores alrededor de 1.2% como nos indica el artículo “Fatty Acid Composition of Butter Originated from North-Eastern Region of Poland”, (52) observando así que la

muestra A presenta valores altos a lo referencial pudiéndose tratar del agregado de una grasa rica en este compuesto

Otro ácido presente en alto porcentaje sería el ácido linoleico de las muestras D y F este ácido normalmente lo encontramos en valores que oscilan entre 1.2% - 2.2% según el estudio “Determinación de los Niveles de Ácido Linoleico Conjugado (Alc) en Alimentos Lácteos en Chile”, (53) así sobrepasando lo valores de este estudio

Además, los valores obtenidos de ácido linolenico en la muestra A y F, demuestran estar por encima de los valores referenciales de estudios antes nombrados cuyos valores oscila entre 0.1% - 1%. Para terminar el eicosadienoico en la muestra B muestra valores elevados.

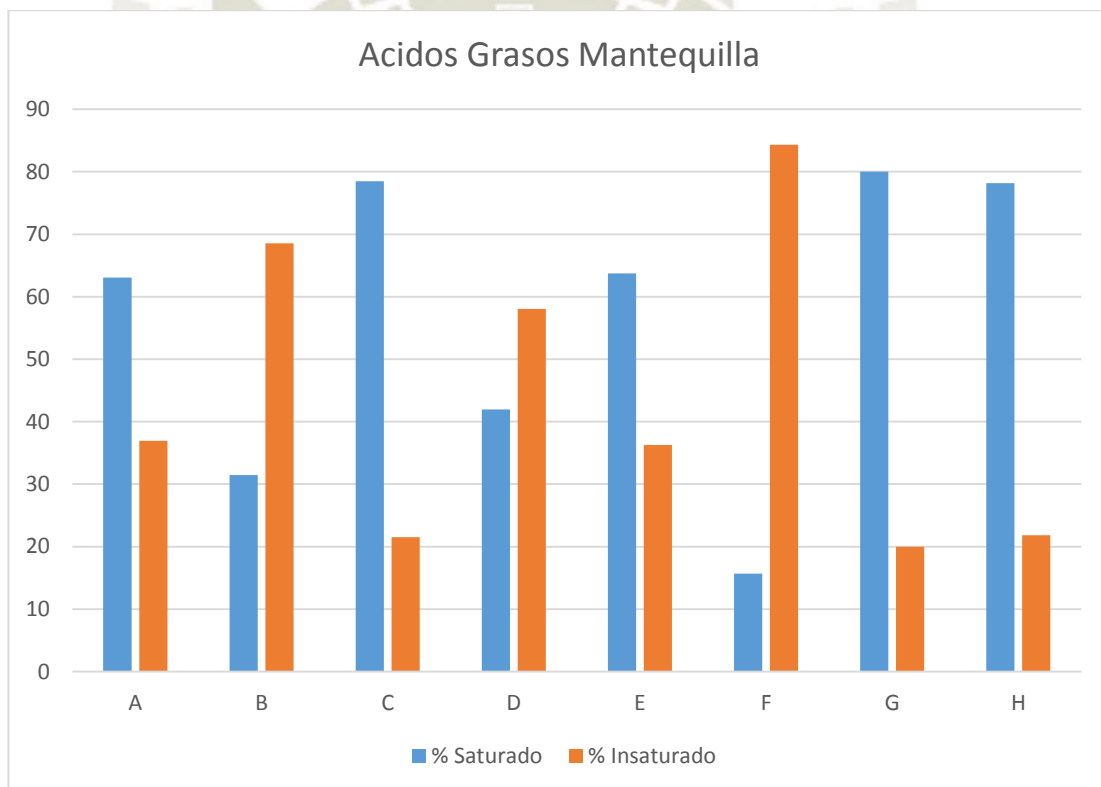


Figura 3.1: Porcentaje de insaturación y saturación en las ocho muestras de mantequilla.

Fuente: Elaboración propia

La mantequilla normalmente presenta un porcentaje mayor de ácidos grasos saturados que insaturados, en proporción de 75% y 25% correspondientemente, por la naturaleza de su composición (20).

En la figura (3.1) las muestras B, D, y F presentan un mayor número de ácidos grasos insaturados que saturados lo que podría significar una posible adición de grasa vegetal.

4. Cromatografía líquida de alta resolución para determinar β -caroteno.

El β -caroteno lo encontramos en reducidas cantidades en la mantequilla, así viéndonos en la necesidad de usar un método sensible como el HPLC para poder detectarlo con mayor eficiencia y en el menor tiempo posible.

4.1. Tiempo de Retención

Se utilizó como fase móvil acetonitrilo y diclorometano (20:80 , v/v) , permitiendo que el β -caroteno presente 8.5 minutos de tiempo de retención, esto se observa en la figura 3.2.

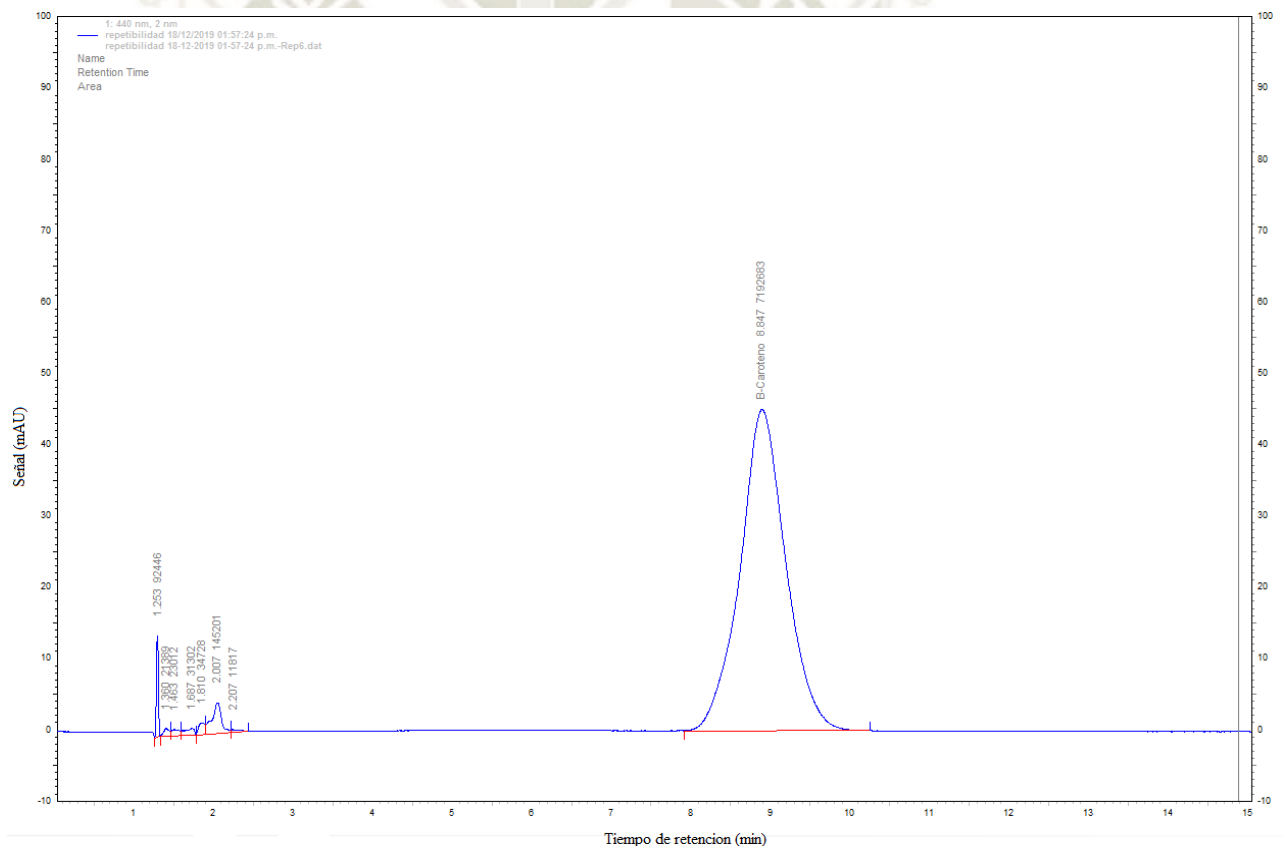


Figura 3.2: Se observa un pico aislado de β -caroteno de 12 ppm

Fuente: Elaboración propia

El Departamento de “Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid” (Anexo 5), en la que nos basamos en principio, usó la fase móvil que constaba de metanol: THF: agua (67:27:6, v/v/v),

no logrando aislar adecuadamente el pico de β -caroteno. Continuando con la búsqueda el libro *Food analysis by HPLC*, (48) utiliza la fase móvil acetoneitrilo: MeOH: diclorometano (80:14:6, v/v/v). Mostrándonos mejoras en el pico, después de varios ensayos concluimos que la fase móvil óptima para hallar β -caroteno en mantequilla es acetoneitrilo:diclorometano (20:80,v/v). En la figura 3.2 podemos observar claramente un pico adecuadamente separado de lo conocido como ruido, se forma entorno a los minutos 8-9 demostrando que el uso de nuestras fases móviles y sus proporciones son idóneas para lograr reconocer el pico representante de β -caroteno.

4.2. Validación del método analítico

Después de una búsqueda bibliográfica de métodos para la determinación de β -caroteno en mantequilla por HPLC, se encontraron diversas determinaciones en otras matrices, viendo así la necesidad de la validación de este método para asegurar resultados fiables

4.2.1. Linealidad en la determinación de β -caroteno

La linealidad es la relación que existe entre la concentración del analito y su respuesta o señal por lo que en este punto se pretende demostrar que el método de determinación de β -caroteno tiene un comportamiento lineal. (Figura 3.3) (35), por lo que se llevó a cabo la preparación de una solución stock de 100 ppm de esta solución se tomó alícuotas de 0.3; 0.6; 1.2; 2.4 y 4.8 ml, enrasando con hexano una vez llevadas a fioas ámbar de 10 ml, consiguiendo concentraciones de 3; 6; 12; 24 y 48 ppm, el proceso se repitió tres veces, para la gráfica de calibración.

En la Tabla 3.4 se registra un resumen de los datos evaluados y en la Figura 3.4 se observa la señal de β -caroteno por HPLC.

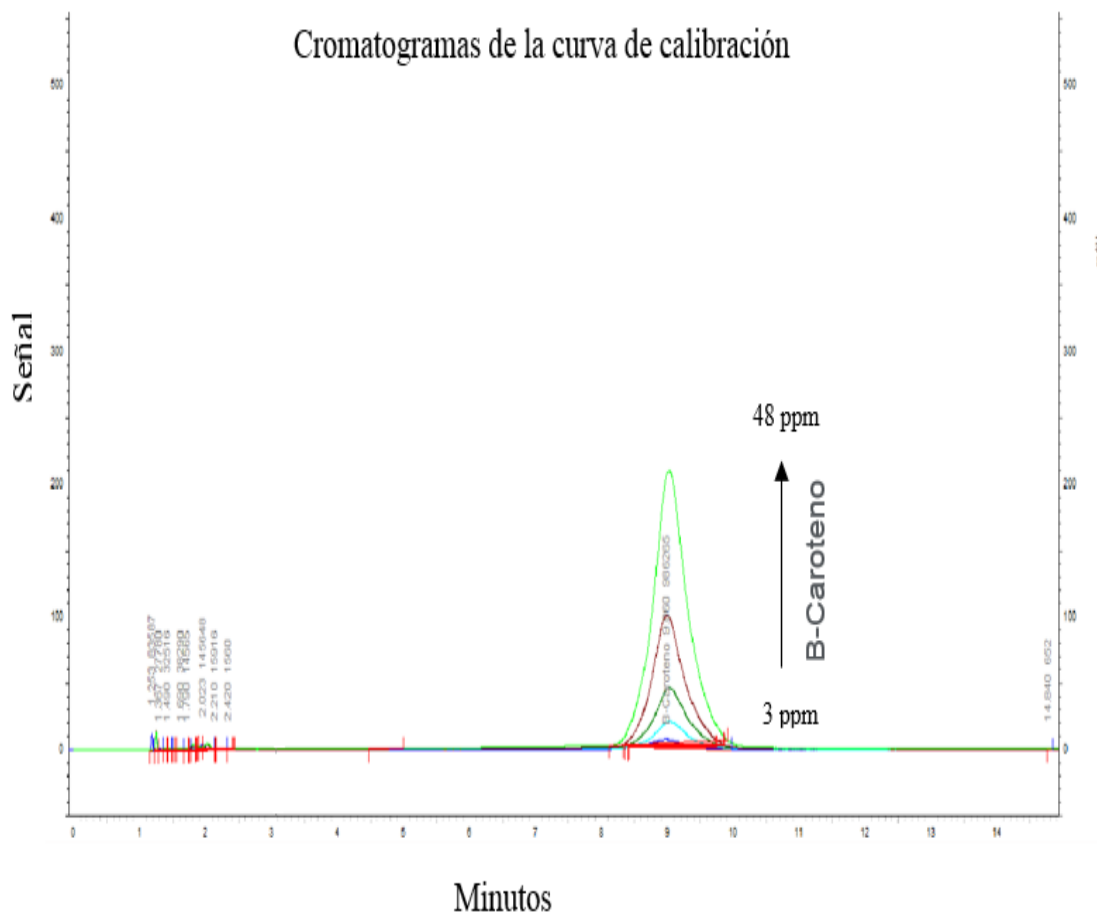


Figura 3.3: Gráfica de calibración de los estándares de β -caroteno en el rango de concentración de 3 a 48 ppm.

Fuente: Elaboración propia

En la figura 3.3 se observa que los picos se sobreponen y son proporcionales a su concentración dándonos una sospecha de comportamiento lineal que nos indicaría la proporción entre la concentración del analito y su señal. (35) Siendo idónea a simple vista lo cual se verá reflejado más adelante en su curva de calibración en la figura 3.4.

Tabla 3.4: Registro de los datos evaluados para determinar la linealidad del método de determinación de β -caroteno en HPLC.

ppm ^(I)	Áreas Cromatografías			Promedio ^(II)	SD ^(III)
3	1306122	901304	986265	1064563.67	213465.25
6	2865404	2812432	2499752	2725862.67	197600.69
12	6283989	6543548	6092699	6306745.33	226284.32
24	14219814	13957143	14219814	14132257	151653.17
48	29639519	30067563	30067563	29924881.7	247131.32

(I) Concentración en ppm del estándar. (II) Promedio (áreas cromatografías). (III) Desviación estándar de las áreas cromatográficas.

Fuente: Elaboración propia

Se observa que los puntos tomados de concentraciones desde 3 ppm a 48 ppm presenta como se esperaba, un comportamiento lineal aparente de la concentración versus la respuesta o señal, pero es importante, además de obtener la gráfica de calibración, calcular el % de linealidad, y evaluar que en todos los puntos tomados de concentración se haya extendido el mismo comportamiento antes mencionado.

Como se puede observar en la Figura 3.4 en el gráfico de calibración se obtuvieron valores de la pendiente con el valor de $644808.9365 \text{ ppm}^{-1}$, del intercepto con valor de $1162584.1442 \text{ ppm}^{-1}$ y sus respectivas desviaciones estándar, con valores de desviación estándar de la pendiente de 7218.990048 y 178850.3874 la desviación estándar del intercepto. El valor del coeficiente de correlación (r) fue de 0.9998 el cual indica que se tiene un buen grado de correlación entre la señal obtenida y la respectiva concentración del analito

ya que según la AOAC, este parámetro debe ser mayor a 0.999 para que el método sea fiable en cuanto al ajuste lineal. (Tabla 3.5). (54,49)

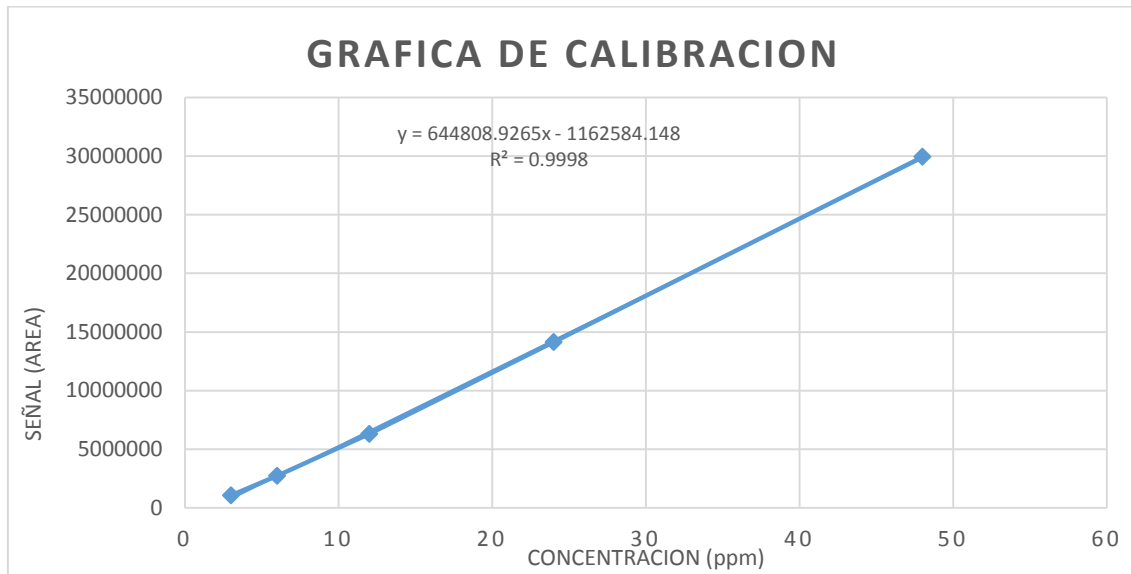


Figura 3.4: Gráfica de calibración para el β -caroteno en HPLC.

Fuente: Elaboración propia

Igualmente, el porcentaje de linealidad puede ser apreciado desde la pendiente (b) y su desviación estándar (S_b) de la siguiente manera:

$$\% \text{ Linealidad} = \left(1 - \frac{S_b}{b} \right) * 100 \quad (\text{Ec 3.1})$$

Contemplando que dicho parámetro es de 99.9 %, se encuentra dentro del rango de 95-100 % por lo que complementariamente es una confirmación de linealidad entre los dos parámetros (49).

Tabla 3.5: Datos obtenidos estadísticamente de la gráfica de calibración de β -caroteno.

Ecuación lineal	$y = bx + a$	$Y = 644808.9365X - 1162584.148$
Pendiente	B	644808.9365
Intercepto	A	-1162584.148
Desviación estándar de la pendiente	S_b	7218.990048
Desviación estándar del intercepto	S_a	178850.3874
Coef. de correlación	R	0.9998

Fuente: Elaboración propia

Se desarrolló un análisis de varianza ANOVA para ratificar si es que hay correlación o no entre las áreas que se obtuvieron, en la que se planteó 2 hipótesis : La hipótesis nula (H_0) donde $b = 0$, lo que significa que si la pendiente es igual a cero esta hipótesis se acepta y refiere que no existe alguna correlación en el gráfico de calibración, la segunda hipótesis es la hipótesis alternativa (H_1) donde $b \neq 0$, lo que significa que si la pendiente es diferente a cero, se acepta que existe diferencia entre los valores afirmando así la existencia de correlación en el gráfico de calibración . En la Tabla 3.6 se especifica los resultados que se obtuvieron al realizar el análisis estadístico.

Tabla 3.6: Resultados obtenidos de ANOVA de regresión lineal para β -caroteno.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	5.56811E+14	5.56811E+14	7978.278812	3.09322E-06
Residuos	3	2.09372E+11	69790824153		
Total	4	5.5702E+14			

Fuente: Elaboración propia.

Se puede observar que el valor F hallado es 7978.278812, contemplando que está sobre el Valor Crítico F que es de 0.000003, por lo tanto se puede afirmar la existencia de evidencia experimental para aceptar la H_1 y rechazar la H_0 , usando un nivel de confianza del 95%, demostrando así que en las mediciones halladas en el gráfico de calibración para β -caroteno, hay existencia de correlación entre los valores (49).

4.2.2. Sensibilidad:

La sensibilidad establece la concentración mínima, que puede ser detectable, de β -caroteno, determinando así los valores del límite de detección y los valores del límite cuantificación para poder evaluar este parámetro. Con esta finalidad, la respuesta del bl (blanco) se relaciona tanto con el valor del intercepto (a) como con el valor de su respectiva desviación estándar (S_0) próxima al valor del intercepto (S_a).

Es así que de este modo se determina el límite de detección usando la, Ecuación 2.5, con un resultado de 1.22 ppm, y el límite de cuantificación usando la Ecuación 2.6, con un resultado de 4.0970 ppm. Dicho de otra

manera, la concentración mínima de β -caroteno que se puede detectar es de 1.22 ppm y la concentración mínima que se puede cuantificar con precisión es de 4.0970 ppm (49).

Tabla 3.7: Resultados del límite de detección y límite de cuantificación para la determinación de β -caroteno

Límite de detección.	1.22 ppm
Límite de cuantificación.	4.09 ppm

Fuente: Elaboración propia

4.2.3. Precisión

La precisión como se explicó antes, es fundamentalmente la dispersión o grado de concordancia entre las medidas individuales alrededor de su valor medio o central, cuando se aplica múltiples veces el método (49).

4.2.3.1. Precisión intermedia.

Este parámetro se valora con la obtención de las áreas cromatográficas y sus respectivas concentraciones (ppm) adquiridas en 6 distintos días, con lectura del estándar utilizando una concentración (teórica) de 12 ppm, (tabla 3.8).

Tabla 3.8: Concentraciones en ppm de seis muestras estándar con sus respectivas áreas cromatográficas analizadas en distintos días

Días	1	2	3	4	5	6
Áreas cromatográficas	7111543	7106786	7192683	7137355	7559649	7296895
Concentración (ppm)	12.9904	13.3851	13.1147	13.0299	13.2173	13.2743

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados obtenidos se logró calcular la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV) usando la ecuación (2.9), después se hizo una comparación con el coeficiente de Horwitz estimando el valor máximo de CV de acuerdo a la concentración teórica del analito (ecuación 2.10).

Tabla 3.9: Resultados obtenidos para precisión intermedia

C.V (%)	
Promedio	13.168617
Desviación estándar (s)	0.1512049
C.V. (%)	1.1482214
C.V. Horwitz (%)	
Concentración teórica	12ppm
C.V. Horwitz (%)	11.007458

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 3.9 se observa que el resultado en porcentaje del coeficiente de variación es de 1.14 % y el resultado hallado para el coeficiente de variación de Horwitz es de 11.007 %, por lo que el valor de C.V está por debajo del valor del C.V de Horwitz. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que entre los resultados que se han obtenido de los análisis realizados en distintos días, no existe una variación significativa.

4.2.3.2. Repetibilidad.

Este parámetro se valora con la obtención de las áreas cromatográficas y sus respectivas concentraciones (ppm) realizando seis lecturas que se repitieron el mismo día (Tabla 3.10), con lectura del estándar utilizando una concentración teórica de 12 ppm. (53)

Tabla 3.10: Concentraciones en ppm de seis muestras estándar con sus respectivas áreas cromatográficas analizadas en lecturas continuas

Nº Lecturas	1	2	3	4	5	6
Áreas cromatográficas	7137355	7559649	7296895	1389109	7356991	7318433
Concentración en ppm	13.0299	13.2173	13.2743	13.4165	13.3664	13.3073

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados obtenidos se logró calcular la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (C.V) usando la ecuación (2.9), después se hizo una comparación con el C.V de Horwitz para repetibilidad

estimando el valor máximo de CV de acuerdo a la concentración teórica del analito (ecuación 2.11).

En la Tabla 3.11 se observa que el resultado en porcentaje del coeficiente de variación es de 1.0255 % y el resultado hallado para el C.V de Horwitz es de 5.5037 %, por lo que el valor de C.V está por debajo del valor del C.V de Horwitz. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que entre estos resultados no existe variación significativa. (49).

Tabla 3.11: Resultados obtenidos para repetibilidad.

C.V. (%)	
Promedio	13.268617
Desviación estándar (s)	0.1360726
C.V. (%)	1.0255224
C.V. Horwitz (%)	
Concentración teórica	12ppm
C.V. Horwitz (%)	5.50372878

Fuente: Elaboración propia

La ICH indica que al tomar los datos recopilados mediante la obtención de mínimo 6 repeticiones para la evaluación de precisión, se debería tomar en cuenta la desviación estándar, el cual no debe superar el 2.0 %. Se puede observar que la desviación estándar es de 0.136%, siendo inferior al 2.0%, corroborando así la aceptabilidad del método (55).

4.2.4. Exactitud

Para valorar este parámetro, la exactitud se expresó en porcentaje de recuperación, para lo cual se desarrolló el análisis cromatográfico de un estándar conocido y de una muestra de mantequilla (Figura 3.5).

Luego se realizó la adición del estándar de conocida concentración en la misma muestra; los resultados se llevaron a ppm para poder calcular el % de recuperación (Tabla 3.11) (56).

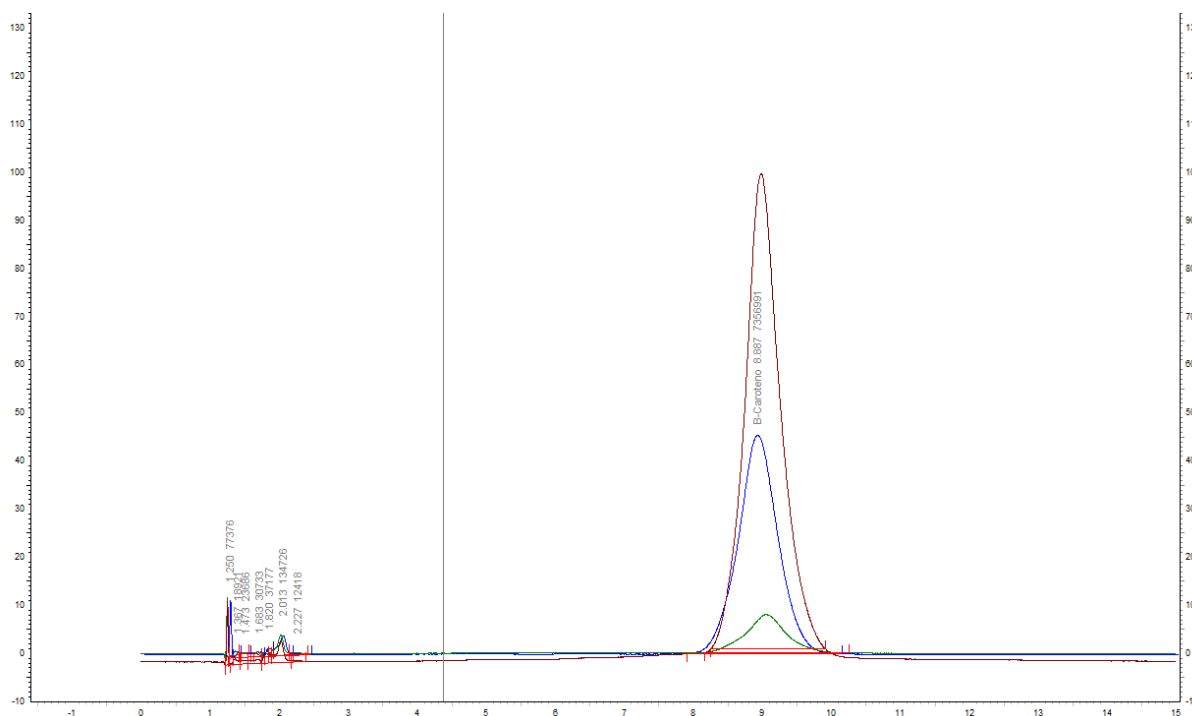


Figura 3.5: Cromatograma de picos sobrepuestos que representan a el estándar de β -caroteno (12 ppm), a una muestra de mantequilla y estándar más muestra que se usaron para poder hallar el % de recuperación.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.12: Datos para hallar la exactitud expresada en % de recuperación.

Muestra ⁽¹⁾	M+ Estándar ⁽²⁾	Estándar ⁽³⁾	Δ ⁽⁴⁾	R% ⁽⁵⁾
4.617	16.6159	12.9904	11.9989	92.38
4.983	16.7995	12.9831	11.8165	91.02
5.1652	16.9888	13.0299	11.8236	90.74
5.2612	17.0521	13.1147	11.7909	89.91
5.5306	17.5421	13.2173	12.0115	90.88
5.4078	17.5884	13.2743	12.1806	91.76
5.5306	17.4324	13.3073	11.9018	89.44
%R Promedio				90.87

(1) Concentración de una muestra en ppm (2) Concentración de la muestra con adición de estándar en ppm (3) Concentración en ppm del estándar mas muestra (4) Diferencia de 2 y 1 (5) % de recuperación: $100 \times (4)/(3)$

Fuente: Elaboración propia

El porcentaje de recuperación que el método de análisis presenta es de 90.87% estando este valor dentro del rango requerido 80-110% (esto de

acuerdo a la concentración del analito) (Tabla 3.13), por lo que se puede decir que el método de análisis es exacto. (56,42).

Tabla 3.13: Porcentaje de recuperación que se espera según la concentración del analito.

Unidades	% de Recuperación
100%	98-102
10%	
1%	97-103
0.10%	95-105
100ppm	90-107
10ppm	80-110
1ppm	
100ppb	80-110
10ppb	60-115
1ppb	40-120

Fuente: AOAC Official Methods of Analysis, 2012 (42)

4.3. Cuantificación de β -caroteno en mantequilla por HPLC

Las concentraciones se calcularon tomando en cuenta la relación entre la concentración de estándar conocido y el área de pico de las muestras, se tomó en cuenta también las diluciones realizadas en cada muestra. Presentando los resultados del contenido de β -Caroteno en ppm de las ocho mantequillas analizadas por triplicado (Tabla 3.14) (35).

Tabla 3.14: Contenido de β -caroteno por el Método de HPLC.

Muestras	Tiempo de retención	Área	β -caroteno (ppm)	β -caroteno (ppm)	S
A1	8.22	9322841	4.3782		
A2	8.23	8207221	4.2009	4.39	0.1976
A3	8.23	9464755	4.5955		
B1	8.55	56622394	8.6784		
B2	8.47	53472502	9.0036	9.09	0.4631
B3	8.35	55008769	9.592		
C1	8.24	10281737	5.8471		
C2	8.24	10368645	5.9802	5.91	0.0674
C3	8.23	6233568	5.8954		
D1	8.48	11656920	7.9538		
D2	8.53	11796935	8.1683	8.17	0.2212
D3	8.48	11945651	8.3961		
E1	8.25	9940414	5.3242		
E2	8.27	10064610	5.5144	5.48	0.1356
E3	8.28	10111812	5.5867		
F1	8.31	1743513	0.8461		
F2	8.27	1268946	0.6158	Nd	Nd
F3	8.25	1193939	0.5794		
G1	8.23	10130865	5.6159		
G2	8.24	10127262	5.6104	5.67	0.1047
G3	8.26	10247433	5.7945		
H1	8.38	12751744	5.4078		
H2	8.46	12368967	5.2612	5.39	0.1349
H3	8.3	13072371	5.5306		

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados del gráfico y su comparación con una mantequilla de conocida procedencia el valor de β -caroteno natural encontrado en mantequilla oscila alrededor de 5 ppm. Observando la ausencia de este compuesto en la muestra F, dándonos información de que podría ser por falta de pastura en la alimentación del animal disminuyendo su contenido o podría darnos indicios, corroborando con las pruebas anteriores, de que este producto no pueda ser denominado mantequilla.

Además de mostrarnos como las muestras B y D están superiores en β -caroteno al promedio de las demás suponiendo un agregado de aditivo.

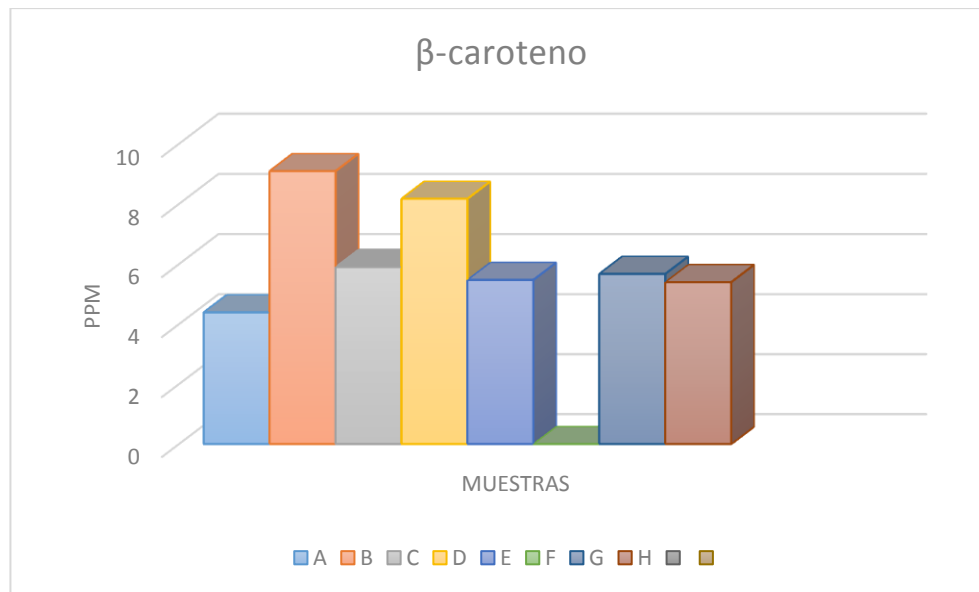


Figura 3.6: Comparación del contenido de β -caroteno (ppm) en las diferentes muestras de mantequilla.

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar en la figura (3.5) en la muestra F las concentraciones de β -caroteno se encuentran por debajo del límite de detección y del límite de cuantificación, por lo que el método es inexacto a concentraciones de β -caroteno < 1 ppm y demostrándonos que su color amarillo no es proveniente de su grasa láctea ya sea por su falencia de esta o debido a algún colorante añadido.

Además de que las muestras B y D muestran un valor elevado a 5 ppm lo cual es una posible detección del incremento de un aditivo.

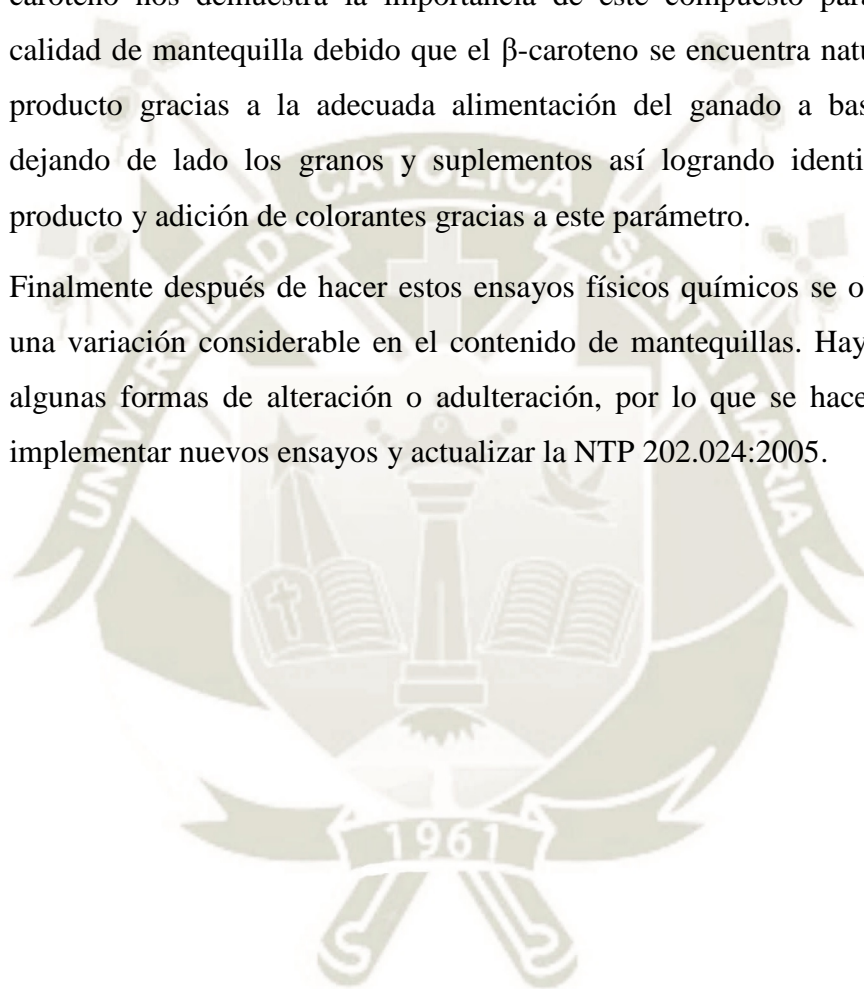
Al concluir la investigación logramos inferir y detectar puntos claves que incrementaran la relevancia de lo investigado así teniendo presente los siguientes puntos:

Un parámetro importante es el índice de yodo pues nos indica que las mantequillas probablemente se le haya añadido o combinado con otro tipo de grasa tanto vegetal o animal. Debido a que las margarinas poseen un mayor contenido de ácidos grasos insaturados y su índice de yodo es ínfimamente superior al de la mantequilla ,la sustitución o combinación entre mantequilla y margarina es posible, pero la denominación no debería ser mantequilla sino margarina. Probablemente para las muestras de mantequilla que presentan un valor diferente a lo referencial, podría ser debido a su combinación con margarina

Asimismo se observa del análisis por GC que el perfil de una buena mantequilla no debe contener exceso de ácidos grasos como linolenico, linoleico, eicosadienoico y pentadecanoico. Permitiéndonos reconocer estos compuestos, podríamos suponer la verdadera naturaleza del producto así quitándole la denominación de mantequilla.

Además el estudio realizado mediante el HPLC para la cuantificación de β -caroteno nos demuestra la importancia de este compuesto para identificar la calidad de mantequilla debido que el β -caroteno se encuentra naturalmente en el producto gracias a la adecuada alimentación del ganado a base de pasturas, dejando de lado los granos y suplementos así logrando identificar un mejor producto y adición de colorantes gracias a este parámetro.

Finalmente después de hacer estos ensayos físicos químicos se observa que hay una variación considerable en el contenido de mantequillas. Hay indicativos de algunas formas de alteración o adulteración, por lo que se hace recomendable implementar nuevos ensayos y actualizar la NTP 202.024:2005.



CONCLUSIONES

PRIMERO:

Los parámetros establecidos por la NTP 202.024:2005 son humedad máxima 16%, materia grasa mínima 80%, sólidos no grasos máximo 2%, acidez máxima 0.3% , índice de peróxido máximo 1 meq O₂/kg. Realizándose los ensayos requeridos por la NTP para mantequillas en ocho muestras, observando una muestra que incumplen los requisitos de materia grasa al ser inferior a 80%.

SEGUNDO:

El rango de los valores de índice de yodo obtenidos oscila desde 26.1414 hasta 88.1955 de gramos de I absorbido por cada 100 g de muestra donde los valores normales tienen un valor que oscila entre 26-42 observando 3 muestras que son elevados, lo cual nos indica una posible adulteración con margarina u otro tipo de grasas.

TERCERO:

Se identificó ácidos grasos por GC basada en la AOAC 996.06 logrando corroborar la presencia elevada de ácidos grasos insaturados en 3 muestras, los cuales fueron: ácido pentadecanoico, linolenico, linoleico y eicosadienoico.

CUARTO:

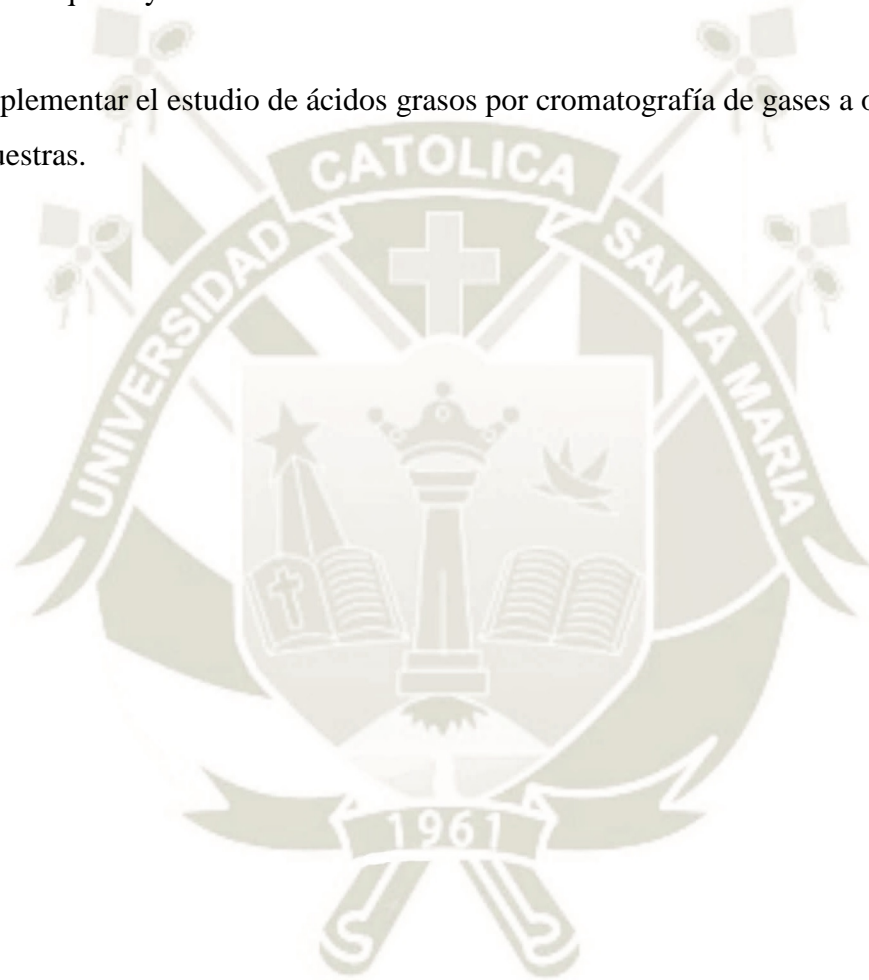
Se validó una técnica analítica por HPLC para la cuantificación de β -caroteno. Para la validación se evaluó los parámetros de: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, estando los resultados dentro de lo aceptado por la ISO 17025.

QUINTO:

Se cuantifico β -caroteno en ocho muestras de mantequilla de diferentes zonas de Arequipa por HPLC observando una muestra la ausencia de este compuesto el cual naturalmente debería estar presente.

RECOMENDACIONES

1. Un mayor control por parte de la autoridad responsable, en mantecillas de la ciudad de Arequipa, para un correcto etiquetado y ofrecernos un producto de calidad
2. Ampliar el estudio del β -caroteno en otras muestras, como son los distintos tipos de aceites que hay en el mercado.
3. Implementar el estudio de ácidos grasos por cromatografía de gases a otro tipo de muestras.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

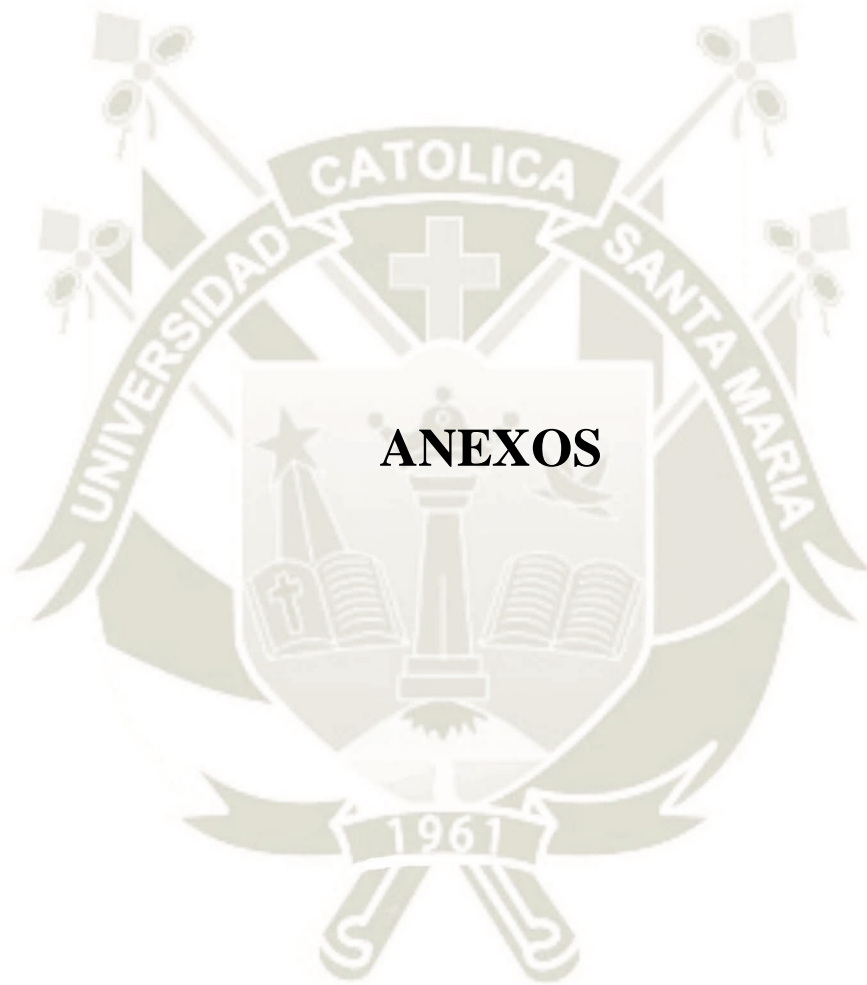
1. Víctor M. Esnaola Lewis. Mantequilla: situación internacional y evolución de la producción y consumo en Chile. Oficina de estudios y políticas agrarias; ODEPA. [consultado 15 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2014/07/Mantequilla2014.pdf>.
2. Walstra, T.J.Geurts, A. Noomen, A. Jellema y M.A.J.S. van Boekel. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. 1 Ed. España; Acribia S.A. 2001.
3. Ramirez Orellana, Juan. Principios de lactología. 1 Ed. Perú: S.L; S.E; S.A.
4. Joseph Mercola. Por qué la mantequilla es amarilla si la leche es blanca. Mercola. 05 noviembre 2016. [consultado 15 agosto 2019]. Disponible en: <https://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2016/11/05/porque-la-mantequillas-es-amarilla.aspx>.
5. Codex Alimentarius (1999). Métodos de análisis y de muestreo en orden alfabético de las categorías y de los nombres de los productos. CODEX STAN 234-1999. Disponible en.: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/codex/stan/CXS_234s.pdf.
6. Caso Gloria: Indecopi solicita a Digesa que aclare si productos de empresa son inocuos o no. La República. 31 julio 2019 [consultado: 05 agosto 2019]. Economía. Disponible en: <https://larepublica.pe/economia/2019/07/31/caso-gloria-indecopi-solicita-a-digesa-que-aclare-si-productos-de-empresa-son-inocuos-o-no/>.
7. Indecopi confirma multa de casi S/ 5 millones a Gloria y Nestlé por publicidad engañosa. PerúRetail. 05 febrero 2019. Mercados. [consultado: 05 agosto]. Disponible en: <https://www.peru-retail.com/indecopi-sanciona-gloria-nestle-publicidad-enganosa/>.
8. Comisión del Códex Alimentarius. Leche y productos lácteos. Leche y productos lácteos. Roma: Organización Mundial De La Salud Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación. 2007. 1p. Norma Del Codex Para La Mantequilla (Manteca) Codex Stan 279-1971.
9. Consejo De La Unión Europea. Reglamento (CE) N° 2991/94 Del Consejo por el que se aprueba las normas aplicables a las materias grasas para untar. Diario Oficial de

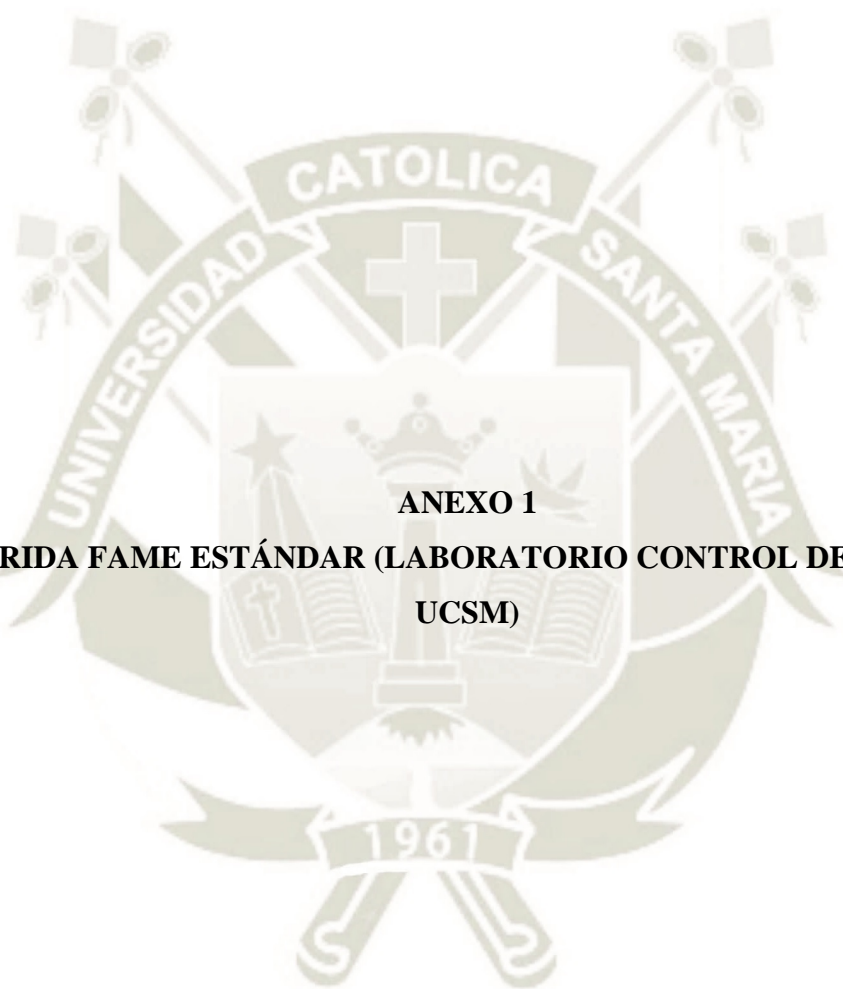
- las Comunidades Europeas, Bruselas. 1994, diciembre 5. Artículo I. p. 3.
10. Parada Delgado Claudio Alejandro. Elaboración de mantequillas tecnológicamente modificadas para obtener propiedades sensoriales similares a la mantequilla fermentada. [Tesis para optar al Grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos]. Valdivia – Chile: Facultad de Ciencias Agrarias Escuela de Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile; 2011.
 11. Instituto De Investigación Tecnológica Industrial Y De Normas Técnicas. Resolución Directoral N° 197-ITINTECDG/DN. 83/07/04. El Peruano. Peru: 1983, 24 de Julio.
 12. Alan H. Varnam y Jane P. Sutherland. Milk and Milk Products. Technology, chemistry and microbiology. (Food Products Series 1). 1th. ed. Londres: Chapman & Hall, 2-6 Boundary Roy, London SE1 8HN, UK; 1995.
 13. Patricia flores ramos. Elaboración de mantequilla. [Tesis para a la obtención del título de: Ingeniero de industrias]. Arequipa: Universidad Nacional De San Agustín Facultad De Ingeniería De Procesos. Escuela Profesional De Ingeniería De Industrias Alimentarias. 2015.
 14. Marco, R.Meyer. Elaboración de productos lácteos. Primera Edición. México: Editorial Trillas. S.A;1988.
 15. Pieter Walstra, Robert Jenness. Química y Física Lactológica. España:Editorial Acribia, S.A;1987.
 16. Antonio Madrid Vicente. Curso De Industrias Lácteas. Primera Edición. Madrid : AMV Ediciones;1966.
 17. Eduardo p. Yúfera. Química De Los Alimentos. Primera Edición. España. Editorial Síntesis S.A;1997.
 18. Mantequilla [en línea] España:Fundación española de la nutrición; Fecha de acceso [08 de marzo del 2020]. URL disponible en: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/mantequilla.pdf>.
 19. Bonet Serra, Jaime Dalmau Serra, Inmaculada Gil Canalda, Pedro Gil Gregorio,Manuela Juárez Iglesias, Pilar Matía Martín, Rosa Mª Ortega Anta. Leche, nata, mantequilla y otros productos lácteos [en línea]. España. Federación Nacional de Industrias Lácteas ; 2014 [Fecha de acceso 14 de setiembre 2020] URL Disponible.en:

- http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_leche_nata_mantequilla_a_otros.pdf.
20. Rodolfo Alvarez Manzo. Lípidos II.[diapositivas]. México: SlideShare;2018. 58 diapositivas.
 21. Michel Mahaut, Romain Jeantet, Pierre Schuck, Gérard Brulé. Les produits industriels laitiers.1th. ed. Paris. Technique et Documentation-Lavoisier; 2000.
 22. Mataix Verdú y Fermin Sánchez de Medina. Lipidos. España. Majadahonda Ergon; 2004.
 23. Fundación española de la nutrición. Margarina, España.2010.Disponible en: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/margarina.pdf>.
 24. García Cortés. Las grasas trans, un asunto de cuidado, Colombia. 2010. Disponible en : <http://www.ucaldas.edu.co/docs/NutriUCaldas07.pdf>.
 25. Palmetti, N. Grasas Saludables. Edición de autor. Argentina. 2010.
 26. Norma Técnica Peruana, 202.024:2005 leche y productos lácteos. Mantequilla requisitos, 2015.
 27. Trujillo, T. Desarrollo y validación de una técnica analítica por cromatografía de gases para la determinación de ácidos grasos trans en snacks salados, cobertura de chocolate y sus probables componentes-Arequipa 2014. 2015.
 28. Ronald A. Hites; Gas Chromatography Mass Spectrometry. Indiana University; EEUU. 2015.
 29. Watson and K. Biemann, Gas chromatography. EEUU.2005.
 30. Rodriguez, Magadan Héctor. Cromatografía de gases. Mexico.2004.
 31. Dabrio, M.V.Cromatografía de gases. Vol. I. Ed. Alhambra, S.A. España.1971.
 32. Jennings, W. Analytical Gas Chromatography. Academic Press. Inc. Canada. 1987.
 33. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Introd. to Mod. Liq. Chromatogr. (2010). doi:10.1002/9780470508183.
 34. Töppner K, Hansen D, Herbig. HPLC Analysis: The Role of Ultrapure Water 2015. Sartorius.

35. Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. I. & Laba, R. F. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Introd. a la HPLC Apl. y Práctica. 1992.
36. García, A. & Yusá, D. HPLC instrumental. (2016 citado mayo 19). Disponible en: https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/18923b6c-0080-4aab-b237-547a4678e10b/TOC_6234_01_01.pdf?guest=true.
37. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Santiago de Chile. 2010.
38. Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. in J.Chromatogr. A 987 (1-2), 57-66 (2003).
39. Bravo, Yerko. Validación de técnicas analíticas. España. 2012.
40. Organización for Standardization. Estadística vocabulario y símbolos. 2th. ed. ISO 3534 Ginebra, Suiza. 2006.
41. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validacion de metodos analiticos. España. Asociacion Española de Farmacéuticos de la Industria; 2001.
42. Official Methods of Analysis AOAC. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements; 2012.
43. Leo M. L. Nolled. Food Analysis by Hplc. 2a Ed. Gante, Belgica: CRC Press. 2000. The fat-soluble vitamins.p.321-402.
44. Official Methods of Analysis AOAC. AOAC Official Method 969.17: Acid Value of Butterfat; 2012. Titrimetric Method.
45. Official Methods of Analysis AOAC. AOAC Official Method 965.33: Peroxide Value of Oils and Fats. Titration Method; 2012.
46. Official Methods of Analysis AOAC. AOAC Official Method 993.20: Iodine Value of Fats and Oils, Wijs Method. 2012.
47. Official Methods of Analysis AOAC. AOAC Official Method 996.06: Prepaton of methyl esters of long-chain fatty acids. 2012.

48. Andres V, Maria Jose V, Maria dolores T. Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and b-carotene in milk and soy juice based beverages by HPLC with diode-array detection. Elsevier, LWT - Food Science and Technology. 2014: 1-6.
49. James N. Miller Libro miller, Janes C. Miller. Estadística y Quimiometría para química analítica. 4ª Ed. Madrid, España: Pearson Education, S.A. 2002.
50. Sáez, Leonardo. Profesor patrocinante: Dalton Alarcón S. Tesis doctoral. Universidad Austral de Chile. 2002.
51. Boatella Riera J, Codony Salcedo R, Lopez Alegret P. Química y Bioquímica de los alimentos II. 1st ed. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2004.
52. Rutkowska & A. Adamska. Fatty Acid Composition of Butter Originated from North-Eastern Region of Poland. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2011; 61(3): p. 187-193.
53. Avilez R J, Vilches C, Alonzo M. Determinación de los niveles de ácido linoleico conjugado (alc) en alimentos lácteos en Chile. Revista chilena de nutrición. 2009; 36(2): p. 143-150.
54. Departamento de química analítica y tecnología de alimentos. Primera relación de problemas. calibración en química analítica. 2020.
55. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Bruselas, Belgica; 1990. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
56. Verdú Andrés, Jorge. Generalización del método de adición estándar del punto H (HPSAM): eliminación de interferencias espectrales conocidas o desconocidas y optimización de las señales analíticas. 1995.
57. Venegas Valverde, Pedro Alberto. Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para su uso como antioxidante en aceites comerciales. 2016.



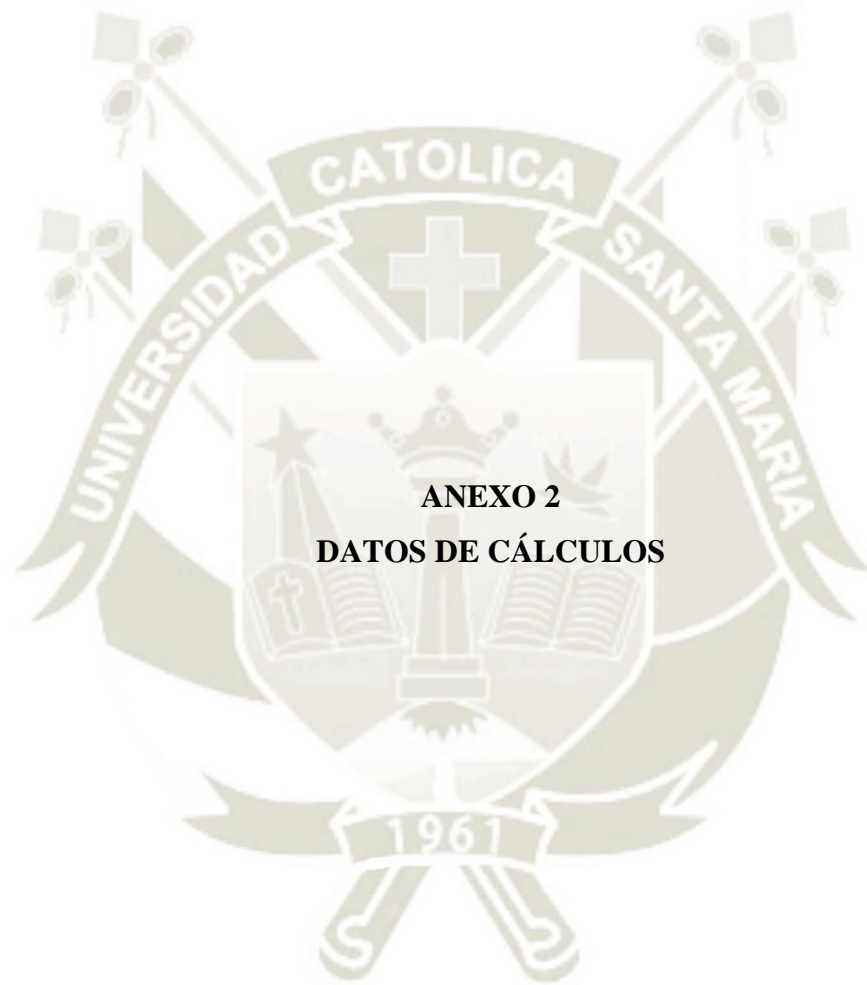


ANEXO 1
CORRIDA FAME ESTÁNDAR (LABORATORIO CONTROL DE CALIDAD
UCSM)

CORRIDA FAME ESTÁNDAR						
Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente
1	10,47	34564810	8235351	0,0000		
2	11,202	126880	44596	4,0000	%	Butirico
3	13,404	154431	48367	4,0000	%	Caproico
4	17,251	174318	49140	4,0000	%	Caprilico
5	22,548	189019	51101	4,0000	%	Caprico
6	25,436	95439	25772	2,0000	%	Undecanoico
7	28,345	199663	53120	4,0000	%	Laurico
8	31,175	101885	27530	2,0000	%	Tridecanoico
9	33,934	208146	53553	4,0000	%	Miristico
10	36,15	102371	27289	2,0000	%	Miristoleico
11	36,557	105871	28612	2,0000	%	Pentadecanoico
12	38,726	105202	27976	2,0000	%	Cis-Pentadecanoico
13	39,11	323970	76396	6,0000	%	Palmitico
14	40,855	106156	28463	2,0000	%	Cis-Palmitoleico
15	41,49	109623	29072	2,0000	%	Heptadecanoico
16	43,211	106752	28520	2,0000	%	Cis-Heptadecanoico
17	43,819	222712	52258	4,0000	%	Estearico
18	44,835	109710	28232	2,0000	%	Octadecanoico
19	45,293	219380	55461	4,0000	%	Cis-oleico
20	46,456	107635	28740	2,0000	%	Linoleadate
21	47,449	108254	28625	2,0000	%	Cis-Linoleico
22	48,161	224291	49921	4,0000	%	Araquidonico
23	49,051	106205	27602	2,0000	%	Cis-Linoleico
24	49,519	106298	27674	2,0000	%	Cis-Eicosanoico
25	49,9	107617	27644	2,0000	%	Cis-9,12,15 linoleico
26	50,192	112885	27705	2,0000	%	Heneicosanoico

27	51,588	110105	27957	2,0000	%	Cis-Eicosadienoico
28	52,23	228820	45193	4,0000	%	Behenoico
29	53,17	107264	26266	2,0000	%	Cis-Eicosatrienoico
30	53,591	111410	26587	2,0000	%	Cis-Erucico
31	54,017	106356	25707	2,0000	%	Cis-Eucosatrinoico
32	54,235	114491	25223	2,0000	%	Cis-Araquidonico
33	54,428	103511	24555	2,0000	%	Tricosanoico
34	55,708	109923	25906	2,0000	%	Cis-Docosadienoico
35	56,094	222278	21118	4,0000	%	Lignoserico
36	56,327	229086	35342	2,0000	%	
37	57,096	99263	22317	2,0000	%	Cis-Nervonico
38	57,768	114560	24128	2,0000	%	





DATOS PARA EL CALCULO DE INDICE DE PEROXIDO

INDICE D PEROXIDO			
Muestra (g)	Gasto	Normalidad Na ₂ S ₂ O ₃	Índice de peróxido (m-eq peróxido/kg de muestra)
5	0,1	0,01	0,2
5	0,05	0,01	0,1
5	0,05	0,01	0,1
5	0,1	0,01	0,2
5	0,05	0,01	0,1
5	0,05	0,01	0,1
5	0,05	0,01	0,1
5	0,05	0,01	0,1
5	0,05	0,01	0,1



DATOS PARA EL CÁLCULO DE LA ACIDEZ

Gasto (ml)	Molaridad KOH	Masa molar del KOH	Acidez
0,20	0,1	56,1	0,113
0,25	0,1	56,1	0,141
0,10	0,1	56,1	0,056
0,15	0,1	56,1	0,085
0,25	0,1	56,1	0,141
0,15	0,1	56,1	0,085
0,10	0,1	56,1	0,056
0,15	0,1	56,1	0,085

DATOS PARA EL CALCULO DE PORCENTAJE DE HUMEDAD

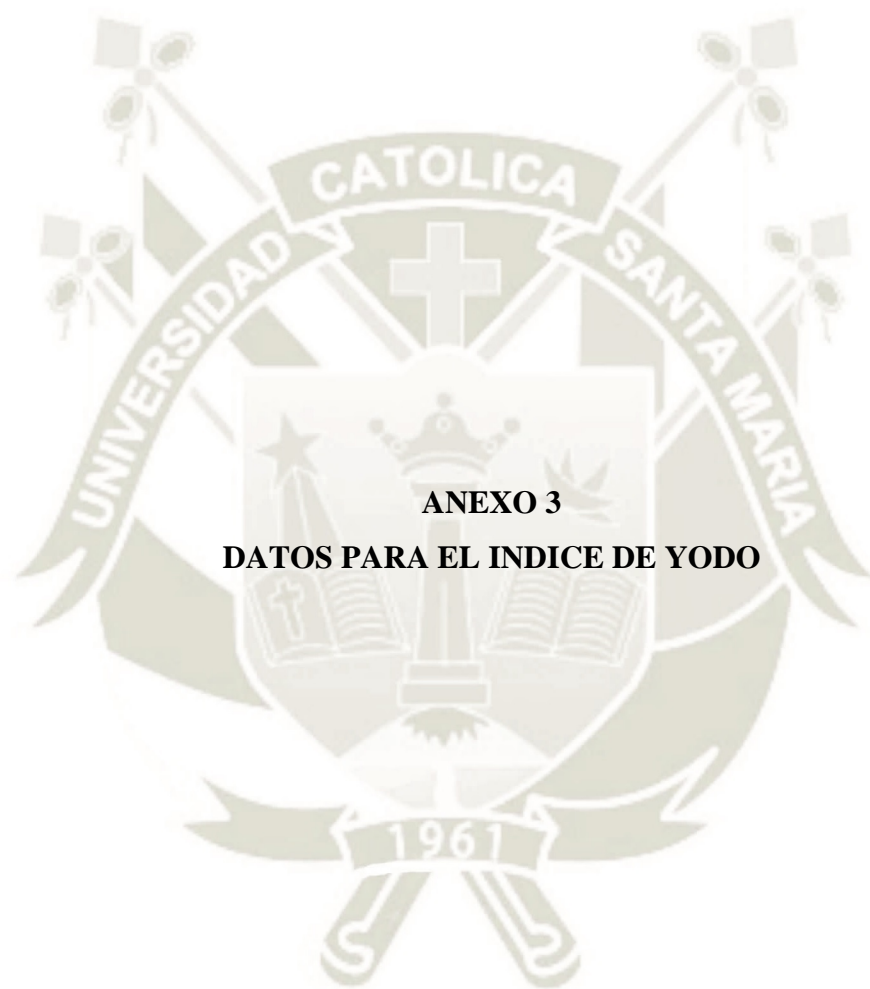
PORCENTAJE DE HUMEDAD

Muestra	Peso muestra (g)	Placa + Muestra (g)	Placa + Muestra seca (g)	Placa Vacía (g)	% Humedad
A	5	88,9621	88,18256	83,9571	15,575
B	5	96,2814	95,5851	91,2827	13,930
C	5	90,5018	89,8953	85,4943	12,111
D	5	98,2606	97,5099	93,5447	15,919
E	5	81,5328	80,7957	76,5257	14,722
F	5	98,3858	97,6389	93,3848	14,9342
G	5	90,2661	89,7536	85,7498	11,348
H	5	81,4956	80,8884	76,5328	12,236

DATOS PARA EL CALCULO DE PORCENTAJE DE GRASA

PORCENTAJE DE GRASA				
Muestra (g)	Peso de Muestra + Vaso (g)	Peso del Vaso (g)	Peso de Vaso con Grasa (g)	% Grasa
3,1392	77,081	73,9418	76,5052	81,658
3,1067	73,0131	69,9064	72,4857	83,346
3,1442	74,1425	70,9983	73,7207	86,585
3,0648	75,3844	72,3196	74,6854	77,196
3,0393	76,9784	73,9391	76,4947	84,085
3,0712	75,4897	72,4185	74,9828	83,495
3,1368	76,9983	73,8615	76,5832	86,768
3,1061	73,0039	69,8978	72,5675	85,949





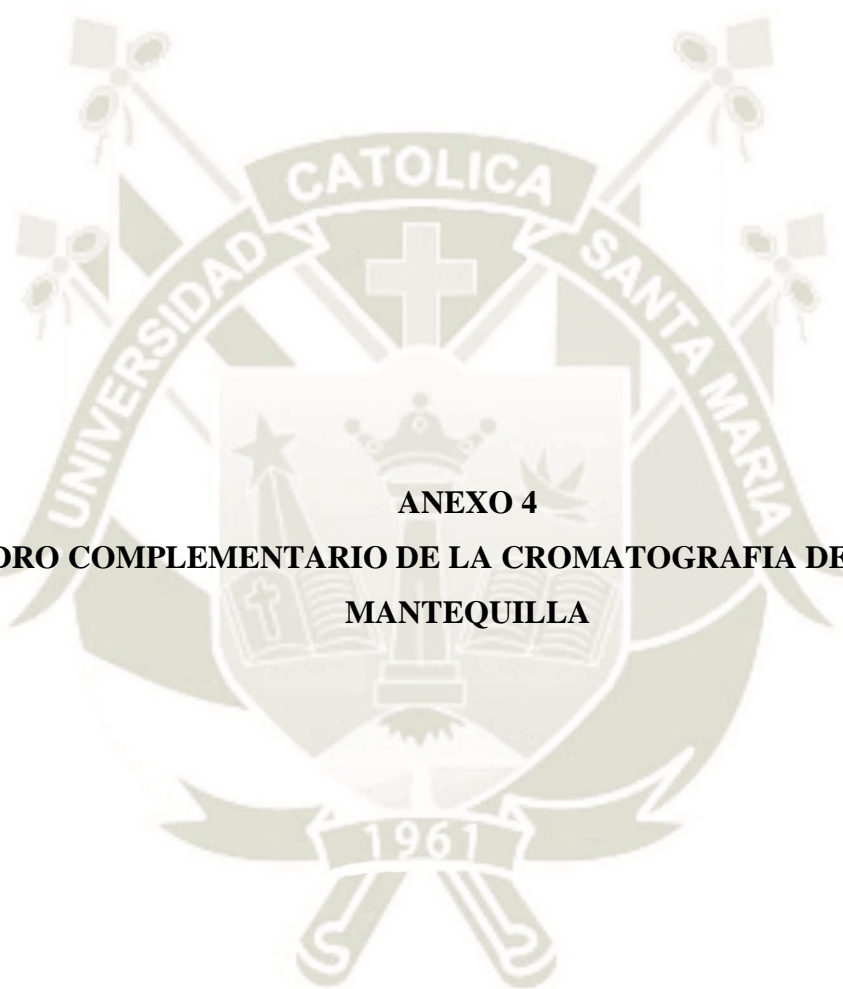
ANEXO 3

DATOS PARA EL INDICE DE YODO

INDICE DE YODO

Muestra	Gasto de la titulacion (ml)	Gasto del blanco (ml)	Δ	Molaridad del tiosulfato	Peso de la muestra (g)	Equivalente del yodo	Índice de yodo
A	31,5	0,2	31,3	0,1	1	12,69	39,7197
B	47,8	0,2	47,6	0,1	1	12,69	60,6582
C	29,6	0,2	29,4	0,1	1	12,69	37,3086
D	38,5	0,2	38,3	0,1	1	12,69	48,8565
E	27,7	0,2	27,5	0,1	1	12,69	34,8975
F	69,5	0,2	69,3	0,1	1	12,69	88,1955
G	20,8	0,2	20,6	0,1	1	12,69	26,1414
H	21,4	0,2	21,2	0,1	1	12,69	27,0297

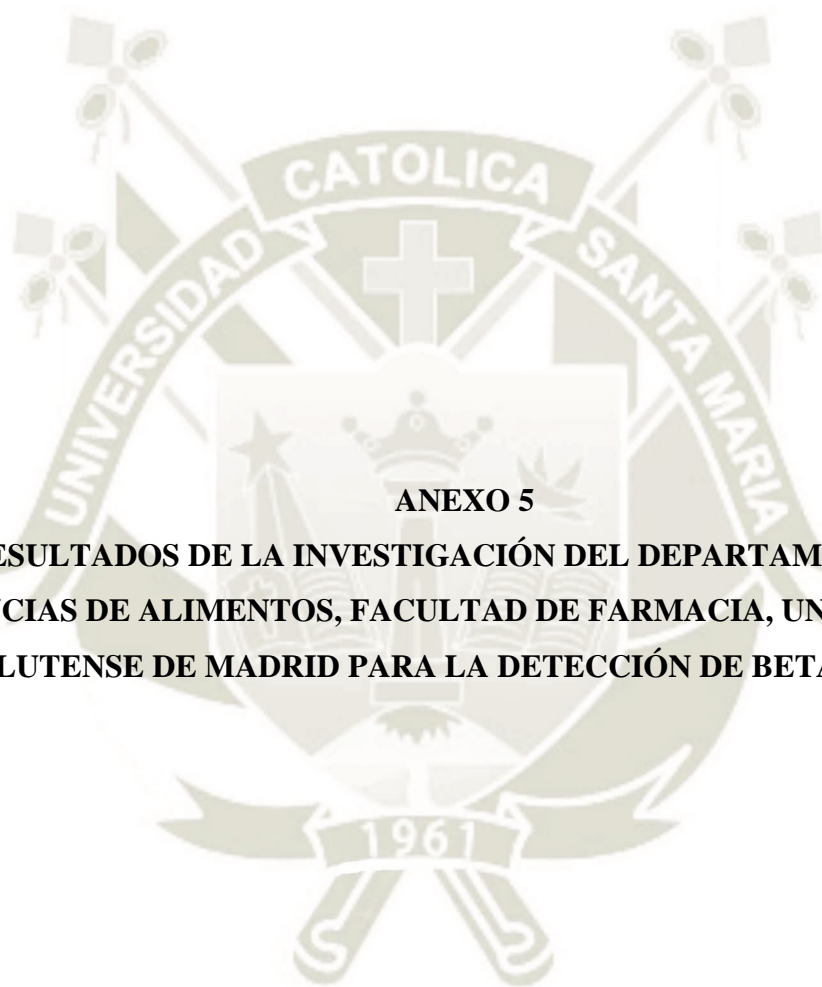




ANEXO 4
CUADRO COMPLEMENTARIO DE LA CROMATOGRAFIA DE GASES EN
MANTEQUILLA

Muestra A							Muestra B						
Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente	Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente
1	31,766	1383	74	13,085	%	Ácido Tridecanoico	1	13,119	319	93	6,729	%	Ácido Caprilico
2	38,381	761	98	4,275	%	Ácido Cis-Pentadecano	2	34,22	1286	41	20,143	%	Ácido Miristico
3	40,04	1664	279	25,184	%	Ácido Palmitico	3	40,59	138	3	2,12	%	Ácido Palmitoleico
4	43,028	277	51	1,536	%	Ácido Cis-Heptadecanoico	4	43,577	313	35	4,579	%	Ácido Estearico
5	43,944	491	63	12,523	%	Ácido estearico	5	45,434	728	60	10,82	%	Ácido Oleico
6	44,81	719	15	3,873	%	Ácido Octadecanoico	6	47,489	361	53	5,434	%	Ácido Linolenico
7	45,486	3746	465	20,193	%	Ácido Oleico	7	48,729	82	17	1,262	%	Ácido Cis-Linoleico
8	46,164	1402	182	7,7	%	Ácido Linolenico	8	51,4	2758	127	40,831	%	Ácido Eicosadienoico
9	48,571	970	112	5,112	%	Ácido Araquidonico	9	57,318	492	50	8,082	%	Ácido Nervonico
10	51,681	617	48	3,315	%	Ácido Eicosadienoico							
11	52,503	496	50	2,563	%	Ácido Behenoico							
12	53,034	116	42	0,641	%	Ácido Eicosatrienoico							
Muestra C							Muestra D						
Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente	Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente
1	11,053	174332	84	3,611	%	Ácido Butirico	1	22.740	2018	377	5.776	%	Ácido Decanoico
2	13,119	319	93	6,729	%	Ácido Caprilico	2	33.753	355	58	0.924	%	Ácido Miristico
3	28,502	192	2	0,484	%	Ácido Dodecanoico	3	38.522	40	20	0.104	%	Ácido Pentadecano
4	34,166	634	47	8,224	%	Ácido Miristico	4	44.339	14251	879	35.147	%	Ácido Octadecanoico
5	39,371	2842	233	23,936	%	Ácido Palmitico	5	47.788	23225	659	58.050	%	Ácido linoleico
6	42,322	3786	127	18,287	%	Ácido Heptadecanoico							
7	43,302	1659	147	8,229	%	Ácido Cis-Heptadecano							
8	43,723	840	102	8,992	%	Ácido Estearico							
9	45,556	2057	135	20,193	%	Ácido Oleico							
10	46,016	113	21	1,11	%	Ácido Linoleico							
11	47,985	181	39	0,205	%	Ácido Araquidonico							

Muestra E							Muestra F						
Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente	Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente
1	22,448	59	18	1,822	%	Ácido Decanoico	1	39,519	2430	38	4,012	%	Ácido Palmítico
2	33,774	432	83	12,084	%	Ácido Mirístico	2	41,827	385	35	0,627	%	Ácido Heptadecanoico
3	39,053	977	54	26,327	%	Ácido Palmítico	3	44,09	660	42	1,056	%	Ácido Estearico
4	42,052	277	51	2,067	%	Ácido Heptadecanoico	4	46,114	12607	354	20,881	%	Ácido Linolenico
5	43,538	820	30	21,429	%	Ácido Estearico	5	48,866	43741	820	73,424	%	Ácido Cis-Linoleico
6	45,763	728	60	16,022	%	Ácido Oleico							
7	51,151	642	73	8,983	%	Ácido Eicosadienoico							
8	52,623	838	93	11,266	%	Ácido Behenoico							
Muestra G							Muestra H						
Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente	Numero de Pico	Tiempo de Retencion	Area	Peso	Concentracion	Unidad	Nombre del Componente
1	34,22	1286	41	23,73	%	Ácido Mirístico	1	30,76	621	45	1,949	%	Ácido Tridecanoico
2	39,147	325	147	22,064	%	Ácido Palmítico	2	33,753	716	172	10,201	%	Ácido Mirístico
3	41,226	709	46	6,865	%	Ácido Heptadecanoico	3	41,441	175	34	0,509	%	Ácido Heptadecanoico
4	45,031	2830	263	27,377	%	Ácido Octadecanoico	4	43,35	91	1	0,273	%	Ácido Cis-Heptadecanoico
5	46,016	113	21	1,11	%	Ácido Linolenico	5	44,539	29577	671	65,25	%	Ácido Octadecanoico
6	51,435	2499	374	18,854	%	Ácido Eicosadienoico	6	45,693	2039	228	18,947	%	Ácido Oleico
							7	47,462	971	133	2,871	%	Ácido Linoleico



ANEXO 5

**RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN DEL DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS DE ALIMENTOS, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID PARA LA DETECCIÓN DE BETACAROTENO.**

Sample	Labelling Vit. A ($\mu\text{g}/100\text{ mL}$)	$\mu\text{g}/100\text{ mL}$	
		Retinyl palmitate	β -Carotene
1 MJ	120	179.0 ± 1.3	165.9 ± 3.7
2 MJ		nd	311.4 ± 7.1
3 MJ	120	nd	211.3 ± 20.4
4 MJ	120	227.0 ± 1.6	nd
5 MJ	120	179.0 ± 1.4	29.9 ± 0.0
6 MJ		nd	45.6 ± 1.2
7 MJ		nd	228.9 ± 67.5
8 MJ	120	225.9 ± 6.1	84.6 ± 8.0
9 MJ	120	278.7 ± 6.2	nd
10 MJ	120	187.4 ± 20.3	19.2 ± 4.8
11 MJ	120	162.2 ± 1.4	608.1 ± 87.6
12 MJ	120	nd	nd
13SJ		nd	nd
14SJ		nd	314.3 ± 15.1
15SJ		nd	688.8 ± 34.5
16SJ		nd	23.8 ± 3.3

MJ: milk-juice based beverages.

SJ: soy-juice based beverages.

Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Nd: not detected.

