



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE METODOS PARA  
DETERMINAR GRASA EN LECHE EVAPORADA**



EXAMENOS PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**TESIS MANCOMUNADA**

**QUE PARA OBTENER  
EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
PRESENTAN**

**ROSSANA MONICA NAVARRO CRUZ**

**MARTHA ELVIA ROJAS MORENO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Pag.
I.- Introducción	1
II.- Objetivo	2
III.- Antecedentes bibliográficos:	
3.1.- Leche entera y su composición	3
3.2.- Leche evaporada	8
3.2.1.- Proceso	10
3.3.- Valor nutritivo de la leche	13
3.4.- Composición de la materia grasa	15
3.5.- Métodos para determinar grasa en leche	20
3.5.1.- Tratamiento térmico	21
3.5.2.- Métodos volumétricos:	21
a) Gerber	22
b) Babcock	24
c) Complejometría indirecta	25
d) DPS	29
e) TeSa	30
3.5.3.- Métodos Ponderales:	33
a) Roese Gottlieb	34
b) Mojonnier	36
3.5.4.- Métodos Instrumentales:	39
a) Milko Tester	40
b) IRMA	42
c) Darison	43
d) Espectrofotométrico	44

	Pag.
3.5.5.- Propiedades que miden los métodos (cuadro)	48
3.5.6.- Ventajas y desventajas de los métodos	49
3.6.- Conceptos estadísticos	51
IV.- Desarrollo experimental:	
4.1.- Selección de métodos	54
4.2.- Material y reactivos	55
4.3.- Preparación de las muestras	57
4.4.- Preparación de diluciones	57
4.5.- Método de Roese Gottlieb	58
4.6.- Método de Gerber	59
4.7.- Método Espectrofotométrico	60
4.8.- Método de Complejometría Indirecta	60
V.- Resultados:	
5.1 Pruebas preliminares	62
5.2 Pruebas definitivas	67
VI.- Conclusiones	76
VII.- Bibliografía	78

## Introducción.-

Para todo producto dentro de la industria alimentaria, es importante llevar a cabo pruebas de control de calidad que nos indican uniformidad y aceptación de materia prima, eficiencia del proceso, calidad de producto terminado y algunas especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas que dictan las normas oficiales.

En la industria de productos lácteos todos estos análisis son de gran importancia, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos, se valora a cada uno de estos productos desde el punto de vista de calidad.

Para el análisis ponderal y nutritivo de la leche se consideran cuatro sus constituyentes principales: lactosa, proteínas, materia grasa y minerales. De estos cuatro constituyentes se le da mayor importancia al análisis de la fracción grasa, ya que de acuerdo a la cantidad presente de ésta, es su valor económico y también se deriva su uso para la elaboración de los diferentes productos.

En el presente trabajo, se estudian algunos métodos para la cuantificación de la materia grasa en leche evaporada con el objeto de ofrecer alternativas de uso, y poder analizar mayor número de muestras en un mínimo de tiempo, incluyendo reactivos y material comunes, técnicas de fácil manejo, y que en un momento determinado puedan ser aplicadas como métodos de rutina.

Objetivos.-

Llevar a cabo una revisión bibliográfica de los métodos existentes para determinar grasa en leche.

Realizar un estudio comparativo entre cuatro métodos basados en diferentes principios, empleando el método oficial en México como referencia, con el fin de obtener una serie de parámetros que nos indiquen precisión, costo, tiempo y posible aplicación como métodos de rutina.

## Antecedentes Bibliográficos.-

La leche se considera como uno de los alimentos más importantes en la dieta humana, debido a la calidad de sus componentes, mismos que son esenciales para el crecimiento.

La leche se define como la secreción láctea prácticamente libre de calostro, obtenida por la completa ordeña de una o más vacas saludables, la cual debe contener no menos de 8% de sólidos no grasos de leche y no menos de 3% de grasa de leche. (1) (5) (36)

La leche es un líquido blanco y opaco de sabor característico, considerada como una mezcla en equilibrio, compleja tanto por la naturaleza de sus constituyentes como por su estado físico.

El agua es el componente más importante desde el punto de vista cuantitativo, donde se encuentran los siguientes compuestos:

- Sustancias en solución verdadera, como azúcares, sales, vitaminas hidrosolubles, aminoácidos.
- Sustancias en estado de dispersión coloidal, tales como fosfocaseinato cálcico, citratos y fosfatos de Ca y Mg, y seroproteínas.
- Sustancias en estado de emulsión: lípidos, esteroides y vitaminas liposolubles.

La composición de la leche se encuentra reportada en el cuadro número 1.

Cuadro No. 1

Composición de la Leche de Vaca

a) Grasa:	Valores arrox.
- Ac. butírico	3.05%
- Ac. caproico	1.39%
- Ac. caprílico	1.51%
- Ac. cáprico	2.68%
- Ac. láurico	3.71%
- Ac. mirístico	12.01%
- Ac. palmítico	25.17%
- Ac. esteárico	9.17%
- Ac. oléico	33.3%
b) Compuestos Nitrogenados:	Promedio
- Proteína	3.2%
- Caseína	2.6%
- Albúmina	0.5%
- Globulina	0.1%
c) Lactosa	4.8%
d) Cenizas	0.71%
e) Fosfátidos y estearinas	0.03%
f) Vitaminas:	En 100 grámos

- Vit. A	0.05 a 0.20 mg
- Grupo vit. B	
Vit. B <sub>1</sub>	0.02 a 0.04 mg
Vit. B <sub>2</sub>	0.10 a .025 mg
Vit. B <sub>6</sub>	0.10 a 0.30 mg
Ac. nicotínico	0.10 a 0.40 mg
Ac. pantoténico	0.10 a 0.40 mg
- Vit. C (ácido ascórbico)	0.50 a 2.50 mg
h) Gases:	
En promedio	6.2 Vol. %
Ac. carbónico	3.4 a 6.3 Vol. %
N <sub>2</sub>	0.18 a 1.63 Vol. %
O <sub>2</sub>	0.3 a 0.61 Vol. %

---

Fuente: Rosell, J.M., Dos Santos, I. (31)

La composición de la leche de vaca puede variar por los siguientes factores:

- Especie y Raza.- Algunas especies presentan en general una composición semejante, pero en su análisis centesimal existen diferencias lo que implicaría propiedades distintas. Por ejemplo, en la leche humana se encuentra una mayor cantidad de lactosa, 65%, pero es pobre en elementos nutritivos. (36)

Estación.- En general, en invierno o en climas fríos, aumenta la grasa, proteínas y algunas sales, mientras que el contenido en azúcares no tiene un comportamiento estacional bien definido. (36)

Alimentación.- En condiciones normales, la vaca tiende a producir leche con una composición constante. Se ha visto que una disminución en la cantidad diaria de alimento puede disminuir el rendimiento y la cantidad de sólidos no grasos sin que se afecte notablemente la cantidad de materia grasa. Por el contrario si se incrementa la alimentación, aumentan los sólidos no grasos. (17) (36)

Lactación.- Durante la lactación la composición de la leche varía notablemente. Los primeros días se segrega el calostro que tiene mayor cantidad de Ca y P, más proteína total y menos lactosa. Al final de ésta se presenta un brusco aumento de materia grasa y sólidos totales.

En las primeras semanas de lactación la materia grasa, sólidos tota-

les, cloruros, Ca y P disminuyen, pero al final de la lactación aumentan notablemente. (1) (36)

Como se mencionó anteriormente, la leche es una mezcla en equilibrio de proteínas, grasas, carbohidratos y sales dispersos en agua que forman emulsiones, suspensiones coloidales y soluciones verdaderas.

Por la alteración de este sistema se obtienen los diferentes derivados que se mencionan a continuación:

- Leche en polvo.- Se obtiene generalmente por el método de aspersion eliminando una parte de agua por evaporación hasta obtener una leche concentrada aproximadamente a una tercera parte y a continuación se atomiza en una corriente de aire caliente.

- Leche evaporada.- También llamada leche condensada no azucarada. Es leche entera en la cual se ha eliminado aproximadamente el 50% de agua por evaporación. Los contenidos en grasa y sólidos no grasos son como mínimo de 7.5% y 20.5%, respectivamente.

- Leche condensada azucarada.- Es obtenida por la eliminación parcial de agua de una mezcla de leche y azúcar, que contenga no menos de 28% de sólidos totales y 8.5% de grasa. (36) La cantidad de azúcar utilizada oscila entre 40 y 45% sobre el peso total, considerada como la cantidad necesaria para evitar alteraciones de tipo microbiológico.

El procedimiento de elaboración es muy similar al de la leche concentrada, salvo la adición de azúcar que tiene lugar antes de la evaporación.

- **Queso.**- El queso contiene en forma concentrada muchos de los nutrientes de la leche, la caseína, grasa, sales insolubles y una parte de los constituyentes del suero. Las operaciones fundamentales en la elaboración de quesos son: pasteurización, adición de cultivos bacterianos, coagulación por acción del cuajo de diversos orígenes, separación de la cuajada, salado y maduración de la misma.

- **Productos lácteos fermentados.**- Son productos obtenidos de la leche total descremada o ligeramente concentrada que requieren microorganismos específicos para desarrollar su sabor y textura característica. Lo más importante a considerar en la elaboración de estos productos, es la fermentación láctica que utiliza la lactosa de la leche como sustrato y en la que se produce fundamentalmente ácido láctico.

- **Crema.**- Es una porción de la leche rica en grasa que se obtiene por separación del sobrenadante de la leche, mantenida en reposo o mediante centrifugación. El contenido en grasa varía en límites bastante amplios, que van del 12 al 60%.

- **Mantequilla.**- Es el producto obtenido del batido de la grasa o nata, que puede llevar adicionada sal en una cantidad del 2.5%. El producto final presenta un contenido graso próximo al 80%.

De todos los subproductos ya mencionados, la leche evaporada es uno de los derivados más importantes y presenta una demanda considerable en el

mercado por las siguientes ventajas que ofrece al consumidor: la seguridad que ofrece su proceso y por la disponibilidad que presenta en cualquier época del año, por lo que es utilizada para la alimentación infantil.

La norma oficial en México da la siguiente definición: "Se entiende por la leche evaporada al producto alimenticio obtenido por la evaporación de una parte del contenido acuoso de la leche".

Este tipo de leche puede contener aditivos tales como fosfato disódico, citrato de sodio, cloruro de calcio y carragenina, solos o mezclados - en una concentración no mayor de 0.1%.

Se ha demostrado que algunos lotes de este tipo de leche puede coagular durante la esterilización, aunque haya sido precalentada. Para evitar esto, se ajusta el contenido de sales mediante la adición de las sustancias antes mencionadas, en concentración inferior al 0.1% sobre peso de producto terminado. (36)

#### CUADRO No. 2

##### Composición de leche evaporada (reportado en %)

Prot.	Grasa	Humedad	Lactosa	Genizas	Ca	P
7.0	7.9	73.8	9.7	1.6	0.252	0.205

Fuente: Webb, H. Fundamentals of Dairy Chemistry. AVI. Dub. Co. (1978)

- Proceso.- El proceso que se sigue en la obtención de la leche evaporada se menciona a continuación:

- Recepción.- La leche fluída se recibe en la planta, se filtra, se enfría y se bombea a tanques de almacenamiento. La grasa y los sólidos totales son estandarizados, después de lo cual quedan dentro de los límites permitidos, para grasa 7.9% y para sólidos totales 25.9%.

- Precalentamiento.- La leche es calentada a una temperatura cercana a los 93°C y se pasa a tanques donde se mantiene la temperatura durante 10 minutos. El tiempo y la temperatura usados para el precalentamiento son elegidos con el fin de reducir la viscosidad y mejorar la estabilidad física del producto final. Los tiempos específicos y las temperaturas no son dadas porque las características de la leche varía con la estación del año y el proceso puede modificarse.

- Evaporación.- El siguiente paso en el proceso es la evaporación del agua hasta la concentración de sólidos arriba del punto deseado. La evaporación es favorecida por la reducción de la presión atmosférica provocando ésto que la leche hierva a 54-57°C lo que previene la contaminación microbiana. (10) (17)

- Homogenización y estandarización.- La leche ya evaporada se pasa a un tanque de homogenización en donde se destruyen los glóbulos de grasa dando como resultado partículas más pequeñas de manera que no se forma una capa de crema durante el esterilizado. Para esta etapa se usan dos presiones:-

2,500 psi y después 500 psi. La menor presión destruye los grupo de glóbulos grasos y se previene la formación de capas de crema.

A continuación la composición de la leche es reestandarizada a los límites permitidos.

- Esterilización.- El último paso en la producción de la leche evaporada es la esterilización en latas a una temperatura de 114 - 245°C durante 15-17 minutos en un esterilizador continuo.

Los tiempos y temperaturas varían de acuerdo al nivel de la contaminación microbiana, los tipos de microorganismos y el tipo de equipo usado.

(10)

Norma Oficial.-

De acuerdo a la norma oficial, se le clasifica en dos tipos con un solo grado de calidad:

Tipo I	Lecha evaporada entera
Tipo II	Lecha evaporada semidescremada

Cualquiera de estos tipos deberá cumplir con los siguientes requisitos físicos y químicos:

---

Especificación	Tipo I	Tipo II
- Grasa butírica % mínimo en peso	7.9	4.0
- Sólidos totales % mínimo en peso	25.9	24.0
- Acidez en ácido láctico	0.34 a 0.40	0.36 a 0.40
- Cenizas % mínimo en peso	1.80	1.80

---

## Valor Nutritivo.-

La leche es un alimento de un gran valor nutritivo para el hombre, - de acuerdo a la composición que se presenta en el cuadro número 1.

Para referirse a este valor nutritivo es válido resumir a cuatro sus constituyentes: carbohidratos, proteínas, materia grasa y minerales.

- Carbohidratos.- La lactosa es el único azúcar libre que existe en cantidades importantes en la leche y que sirve como una fuente importante de calorías, especialmente para el niño (30% del total). La lactosa es importante también porque es capaz de atravesar la pared estomacal sin modificaciones notables y es lentamente absorbida en el intestino, promueve la proliferación de bacterias intestinales, capaces de sintetizar vitaminas como la biotina, riboflavina, ácido fólico y piridoxina, y favorece una fermentación de tipo ácido, que contribuye a una mejor utilización del calcio y da origen a condiciones desfavorables para los microorganismos de la putrefacción. La lactosa se hidroliza en galactosa y glucosa por la acción de la lactasa. (1) La galactosa a causa de su estabilidad, es probablemente el glúcido que más fácilmente atraviesa la barrera intestinal. Se sabe también, que la galactosa es un componente de los cerebrósidos que forman parte de los tejidos nerviosos. (36)

- Proteínas.- La principal proteína de la leche es la caseína que se encuentra en un 80%, formado el resto por lactoalbúminas y lactoglobulinas.-

(35) Las proteínas de la leche contienen los aminoácidos esenciales para el hombre adulto, lo mismo que la histidina que es considerada por algunos autores como aminoácido esencial para el crecimiento de los niños. (1)

Su digestibilidad es muy alta de tal manera que puede compararse a la proteína de la carne y del huevo presentando un valor biológico de 99,100 y 93 respectivamente. (11) La leche se considera como alimento ideal, pero debe combinarse con otros alimentos, como los cereales, para obtener una dieta balanceada.

- Grasa.- Uno de los componentes más importantes de la leche es la grasa por su alto valor energético y además porque es portadora de vitaminas liposolubles. Por otra parte, también contiene ácidos grasos esenciales para el hombre, como son el ácido linolénico y el ácido linoleico. Otra propiedad importante es su punto de fusión, hacia los 30°C lo cual la hace favorable para la digestión.

- Minerales.- La leche es uno de los alimentos ricos en calcio cubriendo los requerimientos diarios para el niño y el adulto. Presenta una relación Ca/P óptima para la asimilación de ambos constituyentes. Por otra parte - los elementos minerales de la leche se absorben y retienen mejor que los - minerales de otros alimentos. Esto puede ser debido a la presencia de ácido cítrico.

- Vitaminas.- La leche es también una importante fuente de vitaminas, en contrándose en mayor cantidad la vitamina A y vitaminas del complejo B: Riboflavina (lábil al calor), tiamina y niacina. La proporción de vitaminas pueden tener variación natural de acuerdo a la alimentación y a la época - del año.

#### Composición de la grasa de la leche.-

La grasa es el constituyente más importante de la leche, de acuerdo a aspectos económicos, nutritivos, de sabor y a las características físicas que le imparten. La grasa de la leche se encuentra dispersa en forma de - glóbulos con un diámetro promedio de 3 micras, rodeados por una película - protectora o membrana, constituida por una asociación de tres tipos de sus - tancias: triglicéridos de alto punto de fusión, fosfolípidos y próteidos.- Estas dos últimas sustancias están ligadas entre sí y se encuentran en -- equilibrio con el plasma que los contiene. (35)

En general las razas bovinas que producen leche rica en grasa dan una proporción elevada de glóbulos grasos de gran tamaño, y a la inversa, aque - llas que producen una leche pobre en grasa, dan sobre todo, glóbulos peque - ños. El diámetro medio de los glóbulos tiende a disminuir a medida que - avanza el ciclo de lactación y en el curso del ordeño las primeras porcio - nes contienen glóbulos más pequeños que las últimas.

Los glóbulos grasos están estabilizados por una capa, conteniendo en - tre otros componentes, proteínas y fosfolípidos. Algunos autores han des -

crita a los fosfolípidos como una fuerza estabilizante primaria que previene el crecimiento exhaustivo de los glóbulos de grasa. (35) De acuerdo a este concepto, las moléculas de triglicéridos secretadas por la glándula mamaria, que son insolubles en la fase acuosa, se combinan con moléculas similares previa o simultáneamente formadas y de esta manera estructuran un glóbulo graso. Al mismo tiempo, los fosfolípidos presentes en el fluido o simultáneamente secretados, son depositados en forma aleatoria durante el crecimiento de los glóbulos. Las moléculas de fosfolípidos con sus grupos polares y no polares, se orientan hacia la superficie de los glóbulos grasos con sus grupos polares hacia la fase acuosa.

Como resultado de esta deposición aleatoria, la superficie del glóbulo graso es completamente cubierta con fosfolípidos, ésta es sellada contra la continua deposición de moléculas de triglicéridos y así detiene su crecimiento. Las proteínas de la capa superficial son después adicionadas de una forma compleja con los grupos polares de los fosfolípidos.

Sommer (33) ha concluido que el contenido de fosfolípidos de la leche es por lo tanto suficiente para formar una monocapa en toda la superficie del glóbulo y de esta manera detener su crecimiento.

En la materia grasa de la leche se encuentran tres tipos de sustancias triglicéridos, fosfolípidos y sustancias insaponificables.

CUADRO No. 3

Composición de los Lípidos de la Grasa de Leche

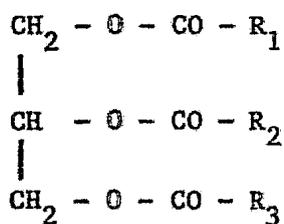
---

Lípido	Peso (5)
Triglicérido	97-98
Diglicérido	0.28-0.59
Monoglicérido	0.016-0.038
Acidos grasos libres	0.10-0.44
Esteroles libres	0.22-0.41
Fosfolípidos	0.1 -1
Esteres de esteroles	trazas
Hidrocarburos	trazas

---

Fuente: Janse, R.G.; J. Am. Oil Chemist Soc.; 50:136 (1973)

Los triglecéridos son ésteres del glicerol y de ácidos grasos alifáticos. Presentan la siguiente estructura:



Los radicales ácidos R pueden ser de una sola clase y son llamados triglicéridos simples. Si contienen dos o más ácidos grasos diferentes forman los triglicéridos mixtos. Cuando contienen dos ácidos grasos diferentes A y B, pueden existir en seis formas isómeras diferentes, BBA, AAB, ABA, ABB, BAA, BAB, cuatro de los cuales (AAB, BAA, ABB, BBA) son esteroisómeros. (22)

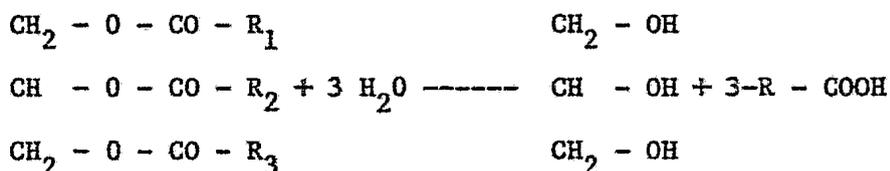
Los ácidos grasos presentes son saturados e insaturados presentando estos últimos cuatro dobles enlaces.

Los ácidos grasos saturados tienen un número par de átomos de carbono y el punto de partida de su síntesis es el ácido acético ( $C_2$ ). Los ácidos de número impar de átomos de carbono tienen probablemente su origen en el ácido propiónico ( $C_3$ ). Antes se admitía que estos ácidos grasos eran producto de la degradación de ácidos superiores, pero actualmente se consideran como productos metabólicos intermediarios que permanecen bajo forma de ésteres. (1)

Los ácidos grasos insaturados se encuentran en gran variedad en la leche y presentan 1 a 6 dobles enlaces, pero tan sólo el ácido oléico (mono insaturado de  $C_{18}$ ), constituye el 75% de los ácidos de esta categoría. La proporción de ácidos insaturados varía con la alimentación. Los lípidos de origen vegetal constituyen la fuente de los ácidos con 18 carbonos o menos. Los ácidos grasos de la hierba, son generalmente de cadenas largas y

contienen una proporción alta de ácidos grasos insaturados. (35) Esta grasa está formada aproximadamente por un 60% de ácido linoléico (trieno) que en gran parte se hidrogena en el rumen en dieno y monoeno, produciendo -- principalmente ácido oléico, que tiene forma "cis" y ácido vaccénico, éste en menor proporción, que es un derivado "trans", el cual presenta propiedades muy diferentes, es sólido, mientras que los derivados "cis" son líquidos.

Los ésteres que forman parte de los triglicéridos, pueden ser representados por la siguiente reacción:



Al llevarse a cabo la hidrólisis de los ésteres, éstos liberan al ácido correspondiente. La hidrólisis puede llevarse a cabo, ya sea por la acción de lipasas provocando el enranciamiento o por la acción de álcalis ocurriendo la reacción de saponificación.

La leche también contiene fosfolípidos (lecitinas) que son grasas fosforadas y animadas pertenecientes a un grupo biológico importante que se encuentra especialmente en las células nerviosas. En su estructura uno de los radicales del glicerol, está esterificado con el ácido fosfórico, el cual a su vez, está ligado a una base orgánica nitrogenada. En la leche se

encuentran tres sustancias de este tipo, con la siguiente proporción media: lecitina 30%, cefalina 45% y esfingomielina 25%.

#### Métodos Empleados para Determinar Grasa en Leche.-

En la literatura se encuentran reportados dos principios fundamentales en los cuales están basados los métodos para determinar grasa en leche. Es tos son: cantidad de materia grasa separada y propiedades de los glóbulos grasos o de los triglicéridos.

De los métodos encontrados se mencionan a continuación los que se con sideran los más representativos:

#### 1.- Cantidad de grasa separada:

##### - Volumétricos

- a) Gerber
- b) Babcock
- c) Método DPS
- d) Método TeSa

##### - Ponderales

- a) Roese Gottlieb

#### 2.- Propiedades de Glóbulos grasos y de los Triglicéridos:

##### - Electrónicos o instrumentales

- a) Milko Tester (turbidimetría)
- b) IRMA (absorción de radiaciones)
- c) Darison (ondas ultrasonoras)

Antes de describir cada uno de los métodos mencionados, es importante indicar que como primer paso se lleve a cabo un tratamiento térmico para homogenizar la muestra.

En el AOAC (3) se reporta la siguiente técnica: se mantiene la muestra a 20°C, se mezcla pasando de un recipiente a otro repetidamente hasta que se homogeniza perfectamente la muestra, midiendo o pesando inmediatamente. Si se ve formación de crema, se calienta la muestra en baño de agua a 38°C aproximadamente y se continúa mezclando hasta homogenizarla usando un gendarme si es necesario para reincorporar cualquier residuo de crema adherido al recipiente. Cuando la grasa se encuentra dispersa, se calienta o se enfría la muestra a 20°C antes de transferir la porción de muestra.

Cuando se trabaja con el método de Babcock, la leche fresca o tratada se calienta a 38°C aproximadamente, se mezcla hasta homogenizarla e inmediatamente se pipetea las porciones.

#### Métodos Volumétricos.-

Los métodos volumétricos consisten en medir el volumen de la fase grsa separada de la acuosa, por centrifugación, utilizando aparatos graduados llamados butirómetros.

## Método Gerber.-

Esta prueba fué ideada por el Dr. Gerber entre 1892 y 1895. Esta prueba está reconocida por la APHA para productos tales como leche bronca, leche pasteurizada, homogenizada y compuesta (con preservativos).

En esta prueba se utilizan dos reactivos: el ácido sulfúrico y el alcohol isoamílico, teniendo como fundamento los siguientes puntos:

- Al mezclar el ácido sulfúrico en la proporción correcta con la leche, se hidroliza la proteína permitiendo que la grasa se separe.
- Al aplicar la fuerza centrífuga, la grasa es forzada a acumularse en el cuello del butirómetro, debido a la diferencia en gravedad específica entre la grasa (g.e.=0.93) y la solución ácida (g.e.=1.43). (29)

En esta prueba se usan butirómetros Gerber cuya graduación puede ir de 0 a 90% de acuerdo al producto que se trate: leche 0 - 8%, leche descremada 0 - 0.5%, helados 0 - 25%, crema 0 - 50%, mantequilla 0 - 90%. También se utiliza una pipeta volumétrica de 11 ml. para tomar la muestra.

El ácido sulfúrico debe tener una densidad de 1.82 a 1.83. Este ácido es un reactivo muy usado en este tipo de pruebas por las ventajas que presenta, disuelve rápidamente los sólidos no grasos, como la caseína, disminuye la viscosidad de la leche liberando de esta forma la grasa, genera una temperatura tal que permite que la grasa se conserve en estado líquido

para tener una separación adecuada de fases, no produce gases, no es volátil y es fácil de conseguir. Así mismo presenta una desventaja que su alta peligrosidad por lo que se debe tener precaución al trabajar con él — (mantener la cara alejada y trabajar en un lugar apartado). (4)

El alcohol isoamílico tiene como función el disminuir la tensión interfacial de la grasa, favorece la ruptura de la emulsión, la separación de la grasa y previene la sulfonación y carbonización de la misma. Este reactivo no afecta los resultados ya que reacciona con el ácido sulfúrico formando un éster que es completamente soluble en el ácido.

Técnica.— Se toman 10 ml. de ácido sulfúrico y se colocan en el butirómetro. Se adicionan 11 ml. de la muestra problema, escurriendo perfectamente la pipeta durante 20 seg. y soplando la última gota, (4) dejándola resbalar por las paredes del butirómetro para que se forme una capa sobre el ácido, teniendo cuidado de no mezclar. Se adiciona 1 ml. de alcohol isoamílico tapando enseguida los butirómetros con los tapones correspondientes. Se agita vigorosamente hasta tener una mezcla homogénea, se centrifuga durante 5 min. a 1,100 rpm. Pasado este tiempo se colocan los butirómetros en un baño de agua a 60°C, se lee la cantidad de grasa. Esta lectura se hace empujando el tapón con la clavija hasta que el extremo inferior de la columna de grasa coincida con una graduación. Esta lectura nos da directamente el por ciento de grasa.

Algunos autores (19) reportan que para leche pasteurizada y homogeni-

zada y para leche esterilizada y homogenizada, se han encontrado resultados reproducibles en la prueba de Gerber, llevando a cabo de dos a tres centrifugaciones a  $1100 \pm 100$  rpm durante 5 min. calentando 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$  entre cada centrifugación.

#### Método de Babcock.-

El método de Babcock fué creado en 1890 y tiene el mismo principio que la prueba de Gerber, es decir, al mezclar el ácido sulfúrico y la leche el ácido disuelve los sólidos no grasos y permite que la grasa suba. El calor generado por la reacción licua la grasa y facilita aún más la separación. - El ácido también incrementa la diferencia entre el peso de la grasa y la solución, lo que hace que la fuerza centrífuga actúe con más facilidad.

Para esta prueba se utilizan butirómetros y una centrífuga especiales. También incluye una pipeta de 17.6 ml. (que equivalen a 18 g. que se necesitan para la prueba) y otra pipeta de 17.5 ml. para el ácido sulfúrico.

El ácido sulfúrico es el único reactivo que se emplea y debe tener una densidad de 1.82 a 1.83, siendo preferible 1.825 a  $20^{\circ}\text{C}$ . (4)

Técnica.- La técnica que sigue este método es muy similar a la del Gerber sólo que ésta prueba se centrifuga dos veces y después de cada centrifugación se adiciona agua a  $60^{\circ}\text{C}$  para aumentar el volumen con el fin de leer la columna de grasa (hasta que alcance la máxima graduación).

La lectura se hace cuando la columna de grasa está estabilizada (después de 5 min. en un baño a 75°C) usando un compás o calibrador colocando un extremo en el punto donde empieza la columna y el otro en la parte alta del menisco, dando esta medida el porcentaje de grasa. (4) La columna de grasa al tiempo de ser leída deberá ser translúcida, de color amarillo oro o ámbar y libre de cualquier partícula suspendida. (3)

#### Método de Complejometría Indirecta.-

Este método se encontró reportado en la bibliografía (12) para productos tales como semilla de girasol, chocolate, aceitunas, orujo y para derivados lácteos como mantequilla y crema.

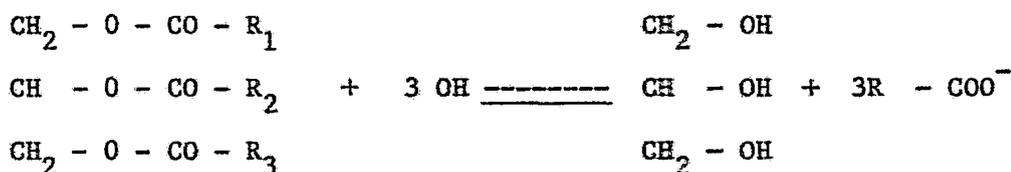
Este método es una aplicación de la complejometría y uno de los compuestos más empleados en este tipo de titulaciones es el ácido etilen diamino tetraacético, que tiene ligas covalentes para unirse a un ión metálico y es por lo tanto quelatante hexadentado.

En la práctica analítica no se emplea directamente el ácido debido a su baja solubilidad, comunmente se usa la sal disódica con dos moléculas de agua de cristalización.

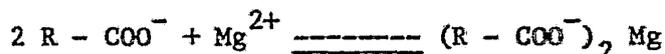
Un indicador usado en este tipo de titulaciones es el eriocromo negro T que es un ácido tribásico. La estabilidad de los complejos de este indicador con los iones  $Mg^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  permite que durante la titulación con solu

ción de EDTA el complejo formado se encuentre impartiendo color a la solución hasta que el punto de equivalencia se aproxima, siendo entonces cuando el color cambia por bajar la concentración del complejo, hasta su desaparición total quedando en su lugar el indicar sólo con su propia coloración roja. (24)

El método se fundamenta en que los glicéridos que constituyen la grasa se hidrolizan en medio hidroalcohólico con hidróxido de potasio, siguiendo la reacción:



Los aniones de los ácidos grasos ( $\text{R} - \text{COO}^-$ ) en medio regulado ( $\text{PH}=10$ ) precipitan con un exceso de disolución titulada de Mg II de acuerdo con la siguiente reacción:



El precipitado anterior separado por filtración permite valorar en el filtrado el exceso de Mg II con solución de EDTA de igual molaridad:



en presencia de eriocromo negro T como indicador.

La diferencia entre el volúmen añadido de disolución de Mg y el gasto de EDTA en valorar el exceso, permitirá deducir la riqueza de gr<sup>a</sup>sa del producto.

Para este método se utilizan material y reactivos comunes en el laboratorio como serían pipetas volumétricas y graduadas, equipo de saponificación, bureta, etc., y sustancias como EDTA, sulfato de magnesio, solución reguladora (pH = 10) y solución alcohólica de KOH indicador eriocromo negro T.

Técnica.- Se pesan P gramos de muestra, (13) se pasan a un matr<sup>á</sup>z de unos 200 ml con 40 ml de disolución alcohólica de KOH al 8%. El matr<sup>á</sup>z se adapta a un refrigerante de reflujo y se saponifica durante 20-30 minutos. - Transcurrido el tiempo se filtra por filtro de pliegues el producto de la hidrólisis y el filtrado se recoge en un matr<sup>á</sup>z aforado de 250 ml, lavando el matr<sup>á</sup>z y el residuo de la saponificación con 40 ml. de etanol al 40%. - Se completa con agua destilada hasta aforar a 500 ml.

De la disolución así preparada se toman 2-3 porciones de 50 ml con pipeta volumétrica y se depositan en vasos de precipitados de 250 ml agregando a cada uno 6-7 ml de disolución reguladora y con la ayuda de un agitador magnético se dejan caer lentamente en cada matr<sup>á</sup>z 25 ml de disolución 0.05 M de sulfato de magnesio medidos con pipeta volumétrica. Los presipitados se mantienen en reposo 10-15 minutos para filtras seguidamente por filtro de pliegues. Sobre el filtro se lava con 50 ml., de agua des-

tilada cada uno. Los líquidos del filtrado se recogen en matraces erlenmeyer de 250 ml, se añaden 7-8 gotas de indicador negro T de ericromo y se titulan con disolución de EDTA 0.50 M hasta vire al color azul.

Cálculos.- Están fundados en el conocimiento del peso molecular medio de los ácidos grasos que constituyen las grasas estudiadas y del cual se ha podido deducir el peso molecular medio de los glicéridos de cada grasa (Pm).

Teniendo en cuenta la estequiometría de las reacciones expuestas en el fundamento del método, el factor F calculado, corresponde a la cantidad de grasa que ha sido precipitada por 1 ml de disolución 0.05 M de Mg II según:

$$1 \text{ ml. de Mg II } 0.05 \text{ M} = \frac{2 \times Pm \times 0.05}{3 \times 100} = F$$

Y el porcentaje de grasa de la muestra se deducirá de la diferencia entre los ml. de disolución de Mg II 0.05 M añadidos y los ml. de EDTA de igual molaridad gastados de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Grasa } \% = \frac{F (n-n') 500}{P}$$

Siendo n el número de ml. de Mg II 0.05 M. añadidos, n' los ml. de EDTA consumidos y P los gramos de muestra. (13)

Pruebas de Detergentes.-

Un nuevo principio fue introducido hacia 1949 por el Dr. Phillip -- Schain para la determinación de grasa el cual no requería de ácido sulfúrico ni de centrífuga. En lugar del ácido se adicionan agentes surfactantes activos y se requiere de un baño de agua.

El Dr. Schain usó dos soluciones de surfactantes; la primera solución con el propósito de separar la grasa de los otros constituyentes de la leche y la otra, para clarificar los sólidos no grasos, lo cual facilita el ascenso de la grasa en el cuello del recipiente de medida.

Las lecturas obtenidas por este método mostraron que los resultados no eran reproducibles, por lo que se hicieron modificaciones como la llamada prueba DPS (Dairy Products Section).

Prueba DPS.-

Los reactivos que se utilizan en esta prueba son dos:

a) Disolver 7 gr. de tetrafosfato de sodio, 2 gr. de  $\text{NaHCO}_3$  y 3 gr de - Tritón X-100\* ó Tergitol NPX\*, agitar y diluir a 100 ml. con agua destilada.

b) Alcohol metílico.- 50% en volúmen.

---

\* Tritón X-100 y el dispersante Tergitol NPX están registrados por Rohm & Haas Co. y Carbide & Carbon Chemicals Co., respectivamente.

Técnica.- Para esta prueba se utilizan el butirómetro y la pipeta del método de Babcock, así como la centrífuga, calibrador y baño de agua. La muestra se prepara ajustando la temperatura de la leche a 20°C. La determinación se continúa como sigue:

Parte A.- Con la pipeta de 17.6 ml transferir la muestra al butirómetro.- Añadir 5 ml de reactivo (a). Agitar y mezclar. Transferir el butirómetro a un baño de agua hirviendo a que se cubra el butirómetro en el cual deberá permanecer 2 minutos, agitar y regresarlo al baño por 5 minutos más, - agitar y repetir la operación, sacar sin agitar.

Parte B.- Mientras el butirómetro aún está caliente añadir el alcohol metílico hasta llegar a lo alto de la escala graduada del mismo, permitiendo al alcohol fluir por el cuello del butirómetro. Centrifugar por 2 minutos después transferir a un baño de agua a 55-60°C por 5 minutos, leer el porcentaje de grasa. (4)

Prueba TeSa.-

El desarrollo y evaluación de un nuevo procedimiento de detergentes - fue reportado en 1958, proveniente del Laboratory Section of the Milk Industry Foundation. En esta prueba se usa esencialmente una solución alcalina suave que contiene agentes dispersantes para su acción mecánica.

Este método está aprobado por la AOAC y por la Dairy Herd Improvement Association para su uso en la determinación del contenido de grasa en le-

che bronca. Sin embargo se considera que esta prueba es exacta para la mayoría de productos lácteos tales como leche bronca, leche pasterizada, ho-mogenizada o compuesta, leche con chocolate, postres con alto y bajo conte-nido de grasa, helados y crema.

El reactivo TeSa está compuesto por un agente solubilizante de proteí-nas, dos agentes dispersantes, un complemento alcalino y una solución amor-tiguadora. Esta mezcla de reactivos es suministrada como un polvo que se mezcla con agua antes de su uso.

En el método no se requiere el uso de centrífuga. Se usa el equipo -especial TeSa.

Preparación del reactivo TeSa.- Para preparar este reactivo, se di-suelve el contenido del paquete en agua y se completa a un volumen total -de 500 ml para 78 gr de reactivo. El polvo debe ser añadido lentamente a 2/3 partes del total de agua requerida para evitar pérdidas debidas a la -formación de espuma.

Preparación de la muestra.- Agitar la muestra hasta tener una mezcla homogénea. Si la muestra es muy espesa, calentar a 30-36°C y mezclar. - Ajustar la temperatura de las muestras a 20°C y pipetear.

Técnica.- Este técnica se aplica a la leche bronca, leche pasterizada, ho-mogenizada y compuesta:

- A los 500 ml del reactivo TeSa preparado, adicionar 100 ml de etanol.

- Pipetear 17.6 ml de leche dentro del recipiente TeSa.
- Añadir 15 ml del reactivo TeSa-metanol y mezclar.
- Poner en el baño de agua hirviendo los recipientes durante 10 min.
- Sacar los recipientes y dejar que permanezcan de 5 a 7 minutos a temperatura ambiente.
- Transferir al baño de agua a temperatura 57-60°C.
- Después de 2 ó 3 minutos, sacar del baño y leer el porcentaje de grasa.

## Métodos Ponderales.-

En los métodos ponderales se lleva a cabo una extracción de la grasa con disolventes, generalmente éter. Estas extracciones se pueden realizar de una manera discontinua por decantaciones sucesivas tubos (método de Roe se Gottlieb y Mojonnier) o de una manera continua en aparatos especiales - hasta agotamiento (aparato Soxhlet).

Después de la evaporación del solvente se pesa la grasa por diferencia. (1)

Para las pruebas de extracción se usan los siguientes reactivos:

- Agua destilada.- Esta debe ser químicamente pura; se adiciona con el propósito de aumentar la fase acuosa para distinguirla de la fase etérea.
- Hidróxido de amonio.- Con una densidad de 0.8974 a 16°C; se usa para disolver la caseína (que no se encuentra en solución verdadera en la leche) que se encuentra en forma de partículas gelatinosas.

También neutraliza la acidéz del producto y reduce la viscosidad de la mezcla.

- Alcohol.- Con una concentración del 95% y una densidad de 0.8164. Este reactivo previene la formación de mezclas gelatinosas que pueden ocurrir cuando el éter es agitado con la leche.
- Eter etílico.- Se usa con una densidad de 0.713 a 0.716 a 25°C. Este reactivo tiene la propiedad de disolver compuestos que no sean solubles en hidróxido de amonio, como triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos

y vitaminas liposolubles.

- Eter de petróleo.- Densidad de 0.638 a 0.66 a 25°C. Este compuesto - además de disolver materia grasa, tiene la propiedad de eliminar las trazas de agua que puedan estar presente en la fase eférea. (4)

#### Método de Roesé Gottlieb.-

Este método está reconocido por la AOAC como método oficial para la leche evaporada.

El método de Roesé Gottlieb se fundamenta en la extracción de la grasa con una mezcla de éter etílico y éter de petróleo, en presencia de amoníaco y etanol.

Técnica.- La técnica a seguir en esta prueba se menciona a continuación:

- Ajustar la temperatura de la muestra a 20°C, pesar 10 g de muestra y transferir a un embudo de separación.
- Adicionar 1.25 ml de hidróxido de amonio (2 ml si la muestra está ácida) mezclar bien.
- Agregar 10 ml de etanol al 95%. Mezclar bien.
- Adicionar 25 ml de éter etílico, tapar y agitar vigorosamente durante un minuto, teniendo cuidado de dejar escapar los gases formados por la parte inferior del embudo colocada hacia arriba.
- Adicionar luego 25 ml de éter de petróleo y repetir la agitación vigoro

- sa. (iguales condiciones que el punto anterior).
- Dejar en reposo hasta que el líquido superior se presente prácticamente claro o centrifugar a 600 rpm (aparato Mojonnier).
  - Decantar la solución etérea dejándola caer sobre la cápsula de porcelana, previamente tarada.
  - Repetir la extracción de la fase acuosa remanente por dos veces consecutivas, pero utilizando solamente 15 ml de cada solvente orgánico (éteres)- y decantando siempre la capa etérea la cual se deja caer sobre la cápsula conteniendo el primer extracto. Si es necesario elevar la línea divisoria de las capas, agregar suficiente cantidad de agua destilada antes de decantar la capa etérea.
  - Evaporar los extractos combinados sobre una placa de calentamiento a una temperatura que no ocasione proyección de la grasa (30°C aproximadamente).
  - Desecar luego en una estufa a 100°C hasta peso constante.
  - Enfriar el residuo desecado en un desecador de vidrio hasta que adquiera la temperatura ambiental y pasar rápidamente.
  - Reportar este resultado en porcentaje, previa corrección en base a una determinación en blanco realizada con todos los reactivos pero sin muestra.

Modificación del Método Roese Gottlieb: Método Mojonnier.-

Este método está basado en el Roese Gottlieb, pero es más rápido porque está integrado por un aparato especial el cual determina además de la

grasa, la humedad (sólidos totales).

Esta determinación requiere los mismos reactivos que el método de -  
Roese Gottlieb (agua, hidróxido de amonio, alcohol, éter etílico y éter de  
petróleo).

Técnica.- La técnica a seguir para esta prueba es la siguiente (para pro-  
ductos como la leche fluida, leche en polvo y suero):

a) Primera extracción.-

- Mezclar perfectamente la muestra pasando de un recipiente a otro.
- Colocar 10 g de muestra en un tubo de extracción.
- No añadir agua a estas muestras.
- Añadir 1.5 ml de hidróxido de amonio y mezclar.
- Adicionar 10 ml de alcohol, tapar y agitar por medio minuto.
- Adicionar 25 ml de éter etílico, agitar vigorosamente por 20 seg.
- Adicionar 25 ml de éter de petróleo, agitar vigorosamente por 20 seg.
- Centrifugar los tubos.
- Color el extracto etéreo en la cápsula especial previamente pesada, eva  
porar en estufa al vacío a 135°C por 5 min. y después enfriar en desaca  
dor por 7 min.

b) Segunda extracción.-

- Adicionar 5 ml de alcohol al residuo en el tubo y agitar 20 seg.
- Adicionar 15 ml de éter etílico, tapar y mezclar por 20 seg.
- Adicionar 15 ml de éter de petróleo, tapar y mezclar 20 seg.

- Centrifugar.
- Colocar la solución etérea en la misma cápsula usada en la primera extracción.
- Evaporar el éter en la placa eléctrica a Completar la evaporación  
por estufa al vacío a 135°C por 5 min.
- Enfriar por 7 min. en desecador.
- Pesar rápidamente, anotar resultados y calcular el porcentaje de grasa.-

(4)

Esta prueba también es útil para evaluar el contenido de grasa en productos como helados, leche evaporada, leche condensada azucarada, leche entera en polvo, mantequilla, queso y queso cottage.

Para leche evaporada se calienta la muestra a 21°C o arriba de 38°C - si es necesario, para obtener una mezcla homogénea. Se mezcla y se pesa - cerca de 5 gr de muestra en un recipiente, se adicionan 4 ml de agua destilada y se continúa con la técnica antes mencionada. (4)

Entre las ventajas de este método están las siguientes: los reacti - vos se mantienen en recipientes especiales de fácil manipulación donde pueden medirse rápidamente; la separación del extracto etéreo se facilita mediante el empleo de tubos de extracción especiales que pueden centrifugar - se en el mismo aparato; la evaporación del solvente se realiza en estufa - al vacío termostáticamente controlada; la desecación del residuo se hace sobre placas de calentamiento y en desecadores con temperaturas controladas

y finalmente la pesada puede hacerse en una balanza analítica anexa. Todas estas facilidades juntas contribuyen a desarrollar el análisis con mayor rapidez y seguridad. (4)

#### METODOS INSTRUMENTALES.-

A últimas fechas la industria de productos lácteos se ha topado con problemas como sería el tiempo empleado en cada determinación o el personal con que se dispone para cada área. A partir de esto, se han desarrollado modernos aparatos para la cuantificación de la materia grasa.

- Los métodos instrumentales están basados en las propiedades que presentan los glóbulos grasos o triglicéridos de dispersar la energía luminosa.- Estos métodos presentan la siguiente clasificación de acuerdo a su principio:

- 1.- Turbidéz
- 2.- Absorción de radiaciones
- 3.- Ondas ultrasonoras
- 4.- Espectrofotométricos

1.- Turbidimetría.- Este método se fundamenta en el paso de luz a través de una capa de leche, provocando una pérdida de energía causada por la turbidéz. Esta dispersión de luz depende de dos factores principalmente: contenido de grasa y tamaño de glóbulo graso.

Un procedimiento nefelométrico para determinar el contenido de proteína y grasa en leche fue desarrollado por Beitz. (7) La proteína es agregada en una suspensión coloidal por la adición de un agente anhidro que -- consiste en 15.7% de anhídrido acético. 83.75% de ácido acético glacial y 0.5% de ácido p-toluen sulfónico. La proteína entonces se disuelve y la grasa forma una emulsión por la adición de una solución acuosa de un surfactante, el IGEPAL DM 970.

Las proteínas son disueltas y como consecuencia se forma una emulsión con la grasa, la cual es inestable después de la adición de agua. Soluciones acuosas de diferentes surfactantes y detergentes fueron probados para mantener la estabilidad de la emulsión: urea-imidazol por Nakai (21) sales cuaternarias de amonio (7), goma arábica, tritón X-20 y tritón X-100. La solución acuosa de Igepal DM-960 al 5% estabilizó la emulsión adecuadamente y mantuvo el nivel constante de la turbidez por 30 minutos. A partir de entonces el IGEPAL DM-100 fue adoptado como el reactivo de grasa de este estudio. (7)

La correlación del método nefelométrico con el Babcock para la determinación de grasa es de 0.985. (7)

Otro método basado en el mismo principio es el propuesto para el uso del aparato Milko Tester que fue desarrollado por la Foss Electric Company de Dinamarca y fue exhibido en 1963 en un congreso internacional de lácteos.

El contenido de grasa se determina en el Milko Tester por el paso de un rayo de luz a través de una muestra de leche, estudiando la turbidez de la muestra.

El Milko Tester homogeniza la leche y después la clarifica con una solución de versenato (EDTA). La turbidez es medida en una celda.

Una celda fotoeléctrica registra la cantidad de luz que pasa a través de la muestra, dejando pasar más luz una muestra con menor cantidad de grasa que una con alto contenido graso. De esta manera el Milko Tester realiza un cómputo del contenido de grasa de la muestra.

El modelo MK II puede analizar 80 muestras por hora y el modelo MK III puede analizar 120 muestras por hora. Este último usa solamente 1.6 ml de muestra por determinación. (4)

Otros estudios realizados con el Milko Tester han demostrado que también revela la eficiencia de la homogenización. (2)

Técnica.- Los pasos a seguir son los siguientes:

- Medir 1.5 ml de leche homogenizada
- Medir 25 ml de EDTA
- Transferir a una celda
- Leer la absorbancia o por ciento de transmitancia (0.6)
- Hacer una curva estandar: absorbancia vs por ciento de grasa.

2.- Absorción de radiaciones.- El aparato representativo de este método es el IRMA (Infra Red Milk Analyzer). El desarrollo inicial del método infrarrojo para el análisis de leche se debió a J.D.S. Goulden quien demostró en 1961 que puede ser usado para estimar porcentajes de grasa, proteínas, sólidos totales y lactosa en leche. (3)

Por este método pueden analizar muestras de leche bronca, leche pasterizada y homogenizada.

El análisis de leche por infrarrojo, está basado en la absorción de energía infrarroja por grupos funcionales a longitudes de onda específica grupos carbonilo en el enlace éster de las moléculas de grasa ( $5.723\mu$ ), por enlaces peptídicos entre aminoácidos de moléculas de proteína ( $6.465\mu$ ) y por grupos hidroxilo en moléculas de lactosa ( $9.61\mu$ ). (8)

El aparato IRMA consiste de muestreador automático, agitador, bomba para elevar o sacar la muestra, doble rayo de luz infrarroja, filtro, espectrofotómetro, control de temperatura para la muestra, celdas, cambio automático de longitud de onda, amplificador, voltímetro digital y registrador.

Preparación de la solución estandar.- (evaluación de grasa)

a) Disolver 16 gr de 4-butirolactona en agua y diluir a un litro.

b) Disolver 9.62 g de butirolactona en agua y diluir a un litro.

Ambas soluciones se deben disolver a 20°C. Se recomienda refrigerar las soluciones cuando no se usan.

Técnica.- El volúmen de muestra necesario es de 13 a 15 ml. Calentar 5 minutos a  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , mezclar y determinar la lectura del instrumento a la longitud de onda para grasa ( $5.72\mu$ ) para agua ( $5.69\mu$ ) y para la solución estándar ( $0.43\mu$ ).

El instrumento se opera de acuerdo a las instrucciones del manual de manufactura. (3)

Lo interesante en el uso del método infrarrojo para análisis de leche es que es más rápido y menos caro que otros métodos que se han empezado a usar. Con el uso del IRMA, dos técnicos pueden preparar las muestras y hacer el análisis para grasa, potéina y lactosa a la rapidéz de una muestra por minuto.

También se han desarrollado investigaciones para determinar si es posible y práctico el uso del instrumento para el análisis de otros productos lácteos fluídos tales como leches concentradas, helados, crema, etc.

(8)

3.- Ondas Ultrasonoras.- La velocidad de propagación de las ondas ultrasonoras en un líquido depende de la concentración de sustancias disueltas y en suspensión, así como de la temperatura. En el caso de la leche la materia grasa en estado globular hace disminuir esa velocidad y los componentes del extracto seco desengrasado lo aumentan. Estos efectos opuestos varían con la temperatura y pueden diferenciarse midiendo la velocidad a

dos temperaturas diferentes.

Sobre este principio se ha concebido un nuevo aparato para la determinación rápida de la materia grasa y del extracto seco desengrasado: el Darison M-103. Comprende dos celdas sumergidas a 41 y 65°C. Si la muestra se precalienta, el tiempo de medición es de 90 segundos. La precisión es excelente; la homogenización previa no es necesaria, por el contrario las leches homogenizadas exigen un tratamiento o ajuste especial. (1)

El Darison consiste de una celda ultrasónica para la muestra, un control de temperatura, componentes electrónicos para producir y recibir los pulsos del ultrasonido y un apuntador de la frecuencia electrónica. (4)

4.- Espectrofotométricos.- Estos métodos permiten medir la absorción - en tanto por ciento de transmisión o en densidad óptica basado en la ley - de Lambert y Beer: la densidad óptica es proporcional al espesor atravesado y a la concentración de la sustancia considerada en la solución. (6)

Los espectrofotómetros consisten de cuatro partes fundamentales:

a) Fuente luminosa; b) Monocromador; c) Celdas; d) Detector

La fuente luminosa suministra un espectro que cubre el intervalo requerido, pasando su luz a través de una rendija al monocromador. De aquí se dirige un espejo cóncavo para obtener un haz luminoso paralelo, que pasa después a un prisma o red de difracción dispersándose la luz en un es--

pectro. El haz disperso se dirige hacia otro espejo cóncavo que focaliza el espectro en una rendija de salida, permitiendo por lo tanto, solo el paso de una banda muy estrecha, obteniéndose de esta manera luz monocromática.

Finalmente el detector debe ser un instrumento que mida la intensidad de la luz transmitida por la muestra, y consiste normalmente de un dispositivo que convierta la energía luminosa en una señal eléctrica que puede amplificarse.

En los espectrofotómetros de un solo haz, se tiene un monocromador de prisma de cuarzo y su alcance es la región visible y la ultravioleta.

Estos aparatos de un sólo haz se adaptan especialmente a los análisis cuantitativos de sustancias únicas y de mezclas simples.

En los espectrofotómetros de doble haz, la luz monocromada se desdo--bla en dos haces de igual intensidad, uno pasa por el blanco y el otro por la solución muestra. La luz transmitida por cada celda es captada en fotocéldas separadas dando lugar a una corriente eléctrica proporcional a la - energía luminosa. La diferencia entre las dos respuestas (corriente de - desequilibrio) alimenta un servomotor que opera un atenuador situado en el haz del blanco. De esta manera los haces se mantienen en equilibrio y el movimiento del atenuador puede hacerse proporcional a la transmitancia o a la densidad óptica. (33)

Un método espectrofotométrico para la determinación de proteína y grsa en leche, fué propuesta por Nakai. (32) Usó ácido acético para disol-  
ver y disociar proteína y grasa obteniendo una solución completamente cla-  
ra. Después se lee absorbancia a 280 m.; una solución de urea-imidazol -  
fué añadida para desarrollar turbidéz, medida a 400 m. La turbidéz resul-  
tante se relaciona con el contenido de grasa y el tamaño del glóbulo graso.

Reactivos.- (a) Acido acético diluido al 97% en volúmen; (b) solución de  
urea-imidazol (20% de urea y 0.02% de imidazol disueltos en agua).

Técnica.- Añadir 5 ml. de ácido acético al 97% a 0.05 ml. de leche en un-  
tubo de prueba y mezclar perfectamente. Medir la absorbacia a 280 con-  
tra un blanco en espectrofotómetro. Añadir en el mismo tubo 2.5 ml. de so-  
lución urea-imidazol, mezclar bien y dejar reposar 30 minutos; medir la -  
absorbancia a 400 . (22)

El ácido acético se adiciona con el propósito de obtener una solución  
clara, pues disuelve la proteína. La solución de urea-imidazol tiene un -  
doble propósito. Desarrolla la turbidéz en la mezcla y proporciona estabi-  
lidad a esta turbidéz, actuando como surfactante, al igual que soluciones  
acuosas conteniendo sales cuaternarias de amonia, goma arábica, IGEPAL DM-  
960.

Gomas vegetales, surfactantes químicos y etanol fueron efectivos para  
estabilizar la grasa, aunque no estabilizaron lo suficiente para un análi

sís cuantitativo. En una solución de urea conteniendo imidasol, la turbidez fue estabilizada de 30 a 120 minutos medida en una celda redonda con un Espectronic 20.

Las mismas muestras usadas en este estudio fueron analizadas por el método de Babcock. La correlación con el método turbidimétrico fue alta. Se hizo una curva de grasa con los resultados. La calibración con la curva de grasa no fue lineal y para construirla se usaron diferentes diluciones. (22)

CUADRO No. 4

Propiedades que miden los Métodos

Pruebas	Propiedades medidas	Componentes incluidos	Factores críticos
Extracción éter Roese-Gottlieb Mojonnier	Componentes solubles en éter e <u>in</u> solubles en <u>alcali</u> diluído	Triglicéridos, fosfolípidos, algunos ácidos grasos. <u>Vitami</u> nas liposolubles colesterol	Técnica de pesada.
Métodos de ác.-sulfúrico. Ej.: Gerber y Babcock	Componentes ligeros e insolubles en ác. sulfúrico fuerte.	Grasa verdadero algunos ácidos grasos y vitaminas	Concentrac. y cantidad de ácido, temperatura, fuerza centrífuga Alcohol isoamílico en Gerber
Métodos detergentes. Ej.: DPS y TeSa	Componentes ligeros e insolubles en la solución de detergente	Grasa verdadera algunos ácidos grasos, <u>vitami</u> nas y fosfolípidos.	Control de temp. particularmente durante la digestión, mezcla de reactivos - con leche.
Milko Tester	Transmisión de luz a través de la <u>suspensión</u> de glóbulos grasos (depende del No. de glóbulos)	Todos los <u>compo</u> nentes que <u>exis</u> ten como glóbulos insoluble - en EDTA.	Tamaño del Glóbulo, calibración del <u>instru</u> mento.
IRMA	Absorción <u>infra</u> rroja (depende del No. de <u>molé</u> culas de grasa	Grasa verdadera fosfolípidos	Calibración del instrumento, <u>ta</u> maño del glóbulo graso.

Cortesía de W.F. Shipe (4)

CUADRO No. 5

Ventajas y Desventajas en las Pruebas para Evaluar Grasa

---

Extracción con éter

Ventajas

- 1.- Gran precisión (para analistas calificados)
- 2.- Inclusión de todos los constituyentes grasos
- 3.- Puede ser usado para muestras homogenizadas

Desventajas

- 1.- Tedioso (más error)
- 2.- Se lleva bastante tiempo
- 3.- Dificultad de trabajar con éter

Babcock

Ventajas

- 1.- Muy rápido
- 2.- Aceptable exactitud y precisión
- 3.- Reactivos baratos y material de vidrio común

Desventajas

- 1.- Peligroso el trabajar con  $H_2SO_4$
- 2.- Requiere una centrífuga especial
- 3.- No es satisfactorio para muestras homogenizadas

Gerber

Presenta las mismas ventajas y desventajas que el Babcock excepto que se puede utilizar para leche homogenizada.

TeSa

Ventajas

- 1.- Rápido
- 2.- No se usa el ácido sulfúrico
- 3.- Se elimina el uso de la centrífuga

Desventajas

- 1.- Reactivos y material de vidrio más caro que Babcock
- 2.- Requiere un cuidadoso control en la temperatura del baño de agua.

Milko Tester

Ventajas

- 1.- Muy rápido
- 2.- Manejo simple
- 3.- Se requiere mínimo aprendizaje para realizar la prueba.

- Desventajas
- 1.- Relativamente caro
  - 2.- No tiene una calibración estándar adecuada
  - 3.- No puede ser usado para productos homogenizados o que hayan recibido alto tratamiento térmico.

IRMA

- Ventajas
- 1.- Muy rápido
  - 2.- Relativamente simple de operar
  - 3.- Puede determinar también proteínas y lactosa
  - 4.- Puede usarse para leche homogenizada

- Desventajas
- 1.- Muy caro
  - 2.- Requiere cuidadosa calibración
- 

Cortesía de W.F. Shipe (4)

## Conceptos Estadísticos.-

En los estudios experimentales sucede a menudo que se busca tener una expresión matemática que permita usar el valor de una variable para obtener el de otra. Por ejemplo, el relacionar las lecturas obtenidas en densidad óptica con valores de la misma muestra analizados por otro método. Otro punto importante consiste en determinar si existe una relación entre ciertas variables y de ser así, obtener una medida numérica de la cercanía de la asociación entre las variables. Por ejemplo, establecer ésta medida numérica para predecir que tanto se corresponden un método con otro.

Existen dos técnicas de análisis estadístico de uso frecuente, con los que se puede obtener una ecuación de predicción partiendo de datos observados y describir el procedimiento para medir el grado de asociación entre dos variables observadas: el análisis de regresión y el análisis de correlación, respectivamente.

Los datos para los análisis de regresión y correlación, consisten en pares que se seleccionan de la población de interés.

## Coefficiente de Correlación.-

Con frecuencia el análisis estadístico debe aplicarse para determinar la fuerza de la relación entre las variables que se están estudiando. La medida del grado de asociación de dos variables, X y Y, que se emplea más

a menudo, está dada por el coeficiente de correlación que se representa - por la letra "r", su fórmula es la siguiente:

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

Los valores de r quedan dentro del intervalo  $-1 \leq r \leq +1$ . Cuando se tiene un valor grande r (ya sea positivo o negativo) indica una fuerte relación entre X y Y. Un valor negativo de r indica que los valores grandes de X, están asociados con valores pequeños de Y, o bien, que los valores pequeños de X se asocian con valores grandes de Y. Por otro lado, una r positiva revela que los valores grandes de X se asocian con valores grandes de Y y que los valores bajos de X se relacionan con valores pequeños - de Y.

#### Ecuación de Regresión.-

El propósito más común del análisis de regresión es obtener una ecuación que se pueda usar para predecir o calcular el valor de una variable - correspondiente a un valor dado de otra variables.

Si se parte de una muestra, se obtiene una ecuación matemática que de fine la relación entre la variable dependiente Y y la variable independiende

te X; a continuación se verifica una comprobación estadística de la hipótesis que permita llegar a una decisión objetiva. Después la ecuación se utiliza para predecir valores de la variable dependiente, Y, partiendo de valores de la variable independiente, X.

Para determinar la ecuación de pares de datos seleccionados se recordará que cualquier línea recta tiene la fórmula general:

$$Y = a + bx$$

en donde b es la pendiente de la línea y a es el punto de donde esta intercepta al eje Y. Para dos puntos cualesquiera es muy sencillo determinar la ecuación para la línea que conecta ambos puntos, sin embargo en problemas estadísticos con tres o más puntos, no es muy fácil encontrar la línea que pase por todos los puntos, por lo tanto el planteamiento estadístico para encontrar esta línea que es la adecuada, se conoce como el método de los cuadrados mínimos y el trazo se conoce como línea de regresión.

La línea de regresión de muestra se escribe como sigue:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

en donde las estimaciones de los cuadrados mínimos

$$\beta_1 = \frac{\sum xy}{\sum x^2} \quad \text{y} \quad \beta_0 = \bar{Y} - \beta_1 X$$

Los valores  $\beta_0$  y  $\beta_1$  se calculan partiendo de una muestra de observaciones tomadas de la población completa de interés.

## DESARROLLO EXPERIMENTAL.-

Después de llevar a cabo la revisión bibliográfica, se seleccionaron los siguientes métodos que se consideraron como representativos de diferentes principios:

- Método de Gerber
- Método Espectrofotométrico
- Método de Complejometría Indirecta
- Método de Roese Gottlieb\*

\*Este método es reconocido como oficial por la AOAC para leche evaporada y es el que se toma como referencia en el presente trabajo.

La principal razón por la que se eligieron estos métodos es que se disponía del material, equipo y reactivos necesarios para llevarlos a cabo.

Por otra parte, con el estudio de estas técnicas se trata de ofrecer alternativas de uso considerando ventajas y desventajas que presentan cada uno con respecto a los siguientes factores: exactitud, precisión, tiempo, costo, personal y tamaño de la industria.

Todas las muestras que se usaron fueron de leche evaporada proteinada semidescremada de marca Carnation en latas de 170 g. (reportado en la etiqueta 4% de Grasa y 24% de sólidos no grasos). Se trabajó con leche proteinada porque era el único tipo de leche Carnation existente en el mercado durante el desarrollo de este trabajo.

Estas latas se adquirieron en diferentes zonas de la ciudad y se utilizaron aproximadamente 50.

Cada muestra se sometió a un tratamiento térmico para homogenizar la grasa que tiende a depositarse en la superficie de la lata. Este tratamiento es necesario porque durante su almacenamiento no es invertida la lata - con la frecuencia requerida.

Durante el desarrollo del trabajo se optó por trabajar con diluciones ya que se observó que de esta manera se obtenían resultados reproducibles.

Por otra parte también fue necesario trabajar con la leche deluída en diferentes concentraciones, ya que en el método espectrofotométrico era necesario obtener varias lecturas de absorbancia para relacionar estos datos con el porcentaje de grasa obtenido en el método de Roesé Gottlieb.

#### MATERIAL Y REACTIVOS.-

El material y los reactivos utilizados en las pruebas, son los siguientes:

- Butirómetros Gerber
- Pipetas volumétricas de 11 ml.
- Pipetas volumétricas de 0.5 ml.
- Embudos de separación
- Cápsulas de porcelana

- Equipo de saponificación
- Agitador magnético
- Parrillas eléctricas
- Centrífuga Gerber
- Celdas sílicas cuadradas de 1 cm. x 1 cm.
- Espectrofotómetro Perkin-Elmer. Hitachi 200
- Acido sulfúrico  $H_2SO_4$
- Alcohol isoamílico
- EDTA
- Cloruro de calcio  $CaCl_2$
- Carbonato de calcio  $CaCO_3$
- Acido clorhídrico HCl
- Sulfato de magnesio  $MgSO_4$
- Etanol al 96%
- Indicador de eriocromo negro T
- Metanol
- Hidróxido de amonio  $NH_4OH$
- Hidróxido de potasio KOH
- Acido acético al 97%
- Urea
- Imidazol
- Eter etílico
- Eter de petróleo

En la preparación de las muestras se llevó a cabo un tratamiento térmico con el fin de homogenizar perfectamente la leche y evitar que la grasa se separe. El tratamiento térmico aplicado fue el siguiente: 'se introduce la lata en un baño de agua a que se cubra completamente la lata, a una temperatura de 45°C durante dos horas, agitando cada 15 minutos. Transcurrido este tiempo se deja enfriar la lata a temperatura ambiente.

Preparación de Diluciones.- Se pesa la lata de leche cerrada, se transfiere su contenido a un recipiente limpio, escurriendo perfectamente su contenido a un recipiente limpio, escurriendo perfectamente. Una vez escurrida la lata, se lava con agua tibia destilada con la ayuda de un gendarme, con el objeto de evitar que se quede residuo adherido a las paredes. Esta agua es usada posteriormente para completar el volumen de la dilución. La cantidad de leche contenida en la lata se conoce al pesar la lata vacía.

Esta operación se repite para cada una de las diluciones.

Las diluciones con las que se trabajó son las siguientes: 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3.

Toma de muestra.- Preparada cada dilución se somete a agitación magnética durante 30 minutos. Para tomar la muestra se detiene la agitación, continuándola después de tomada la muestra.

Método de Roesse Gottlieb.-

La toma de muestra se hace por diferencia en un recipiente a peso - constante, de la siguiente manera: Se detiene la agitación, se toma la - muestra con una pipeta limpia y se deja caer en el recipiente previamente tarado hasta tener la cantidad de muestra necesaria.

Pesada la muestra se transfiere al embudo de separación y se pesa nuevamente el recipiente.

La cantidad de muestra varía de acuerdo a la dilución que se trate - aumentándola proporcionalmente. Los pesos para cada dilución son los si-- guientes:

No.	Diluciones:	
	Leche / Agua	Peso de Muestra* (g)
1	1:0.5	7.5
2	1:1	10
3	1:1.5	12.5
4	1:2	15
5	1:2.5	17.5
6	1:3	20

\*Nota.- Estas cantidades fueron las fijadas para trabajar pero al llevar-

las a la práctica el peso era aproximado a las cantidades mencionadas, tomando en cuenta las cuatro cifras decimales que nos dá la balanza analítica.

La técnica seguida es reportada en el AOAC y se describe en antecedentes bibliográficos.

Para llevar a cabo las extracciones se utilizaron embudos de separación, dejando reposar cada una por lo menos una hora o hasta que se separan perfectamente las dos fases.

#### Método de Gerber.-

En la toma de la muestra se usa una pipeta volumétrica de 11 ml. La muestra se deja resbalar por las paredes del butirómetro para evitar que se mezcle con el ácido depositado previamente en el butirómetro.

Se trabajó con las seis diluciones siguientes: 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, llevando a cabo la técnica reportada en antecedentes bibliográficos.

La única modificación a esta técnica consistió en efectuar una doble centrifugación calentando en baño de agua los butirómetros a 60°C durante 5 minutos entre cada centrifugación, con el objeto de que hubiera una mejor separación de la fracción grasa.

#### Método Espectrofotométrico.-

Para tomar la muestra se utiliza una pipeta volumétrica de 0.5 ml. se deja escurrir aproximadamente 20 segundos y se lava la pipeta con el ácido acético.

Se lleva a cabo la técnica reportada en antecedentes bibliográficos - con las siguientes modificaciones: En la técnica original se toma una muestra de 0.05 ml. cantidad que se incrementó a 0.5 ml. que al tomar una muestra tan pequeña sin contar con el material adecuado, el error era muy grande.

También se aumentó en proporción la cantidad de ácido acético de 5 a 50 ml. y de solución de urea imidazol de 2.5 a 25 ml. ya que si se mantenía la cantidad original de reactivos y se aumentaba la cantidad de muestra - los resultados no eran reproducibles.

Se hicieron pruebas respecto al tiempo leyendo una misma muestra a - intervalos de 10 minutos durante una hora, observando que la variación era mínima, manteniéndose constante la lectura después de ese tiempo.

#### Método de Complejometría Indirecta.-

Para llevar a cabo esta técnica se hicieron varias pruebas con la leche sin diluir y se observó que no se apreciaba el vire en la titulación - lo que repercutía en resultados no reproducibles. Por esta razón se deci-

de trabajar con leche diluída en diferentes concentraciones hasta obtener un cambio perceptible en el vire de la coloración.

Para fijar la cantidad de muestra, ya que en la bibliografía no viene reportada, se hicieron pruebas variando la cantidad desde 10 hasta 50 gramos, con el objeto de fijar una cantidad de muestra tal, que nos permitiera tener resultados reproducibles.

Para tomar la muestra se pesan 50 gramos por diferencia de la dilución 1:3 que resultó la apropiada para la determinación, después de las pruebas antes descritas. La muestra ya pesada se transfiere al matríz redondo y - se sigue la técnica reportada en antecedentes bibliográficos.

Una modificación hecha a la técnica reportada, consistió en realizar la filtración al vacío en sustitución del filtro de pliegues con el fin de acelerar la filtración.

Resultados.-

### Pruebas Preliminares

Método de Roese Gottlieb.- Al empezar a trabajar con esta técnica, se hicieron pruebas de ensayo con el fin de dominar la técnica y conocer los problemas que podrían presentarse durante el desarrollo de ésta y poder controlarlos.

A continuación en la tabla número I se muestran los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, donde se puede observar que estos van mejorando a medida que se aumentaba el número de muestras y se practicaba la técnica, hasta obtener valores muy semejantes entre sí lo cual nos indicaba que ya se tenía un mejor dominio de la técnica.

A partir de esto, se trabajó en el método para obtener cinco resultados de cada una de las diluciones con los cuales se aplicaría el análisis estadístico.

Tabla No. I

Método de Roesse Gottlieb

( % de grasa)

Diluciones:

1:0.5	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3
3.25	4.73	5.26	4.53	2.40	6.14
3.63	3.60	4.27	4.21	3.98	5.34
4.79	5.17	4.31	6.01	4.01	3.96
4.22	4.94	3.62	5.76	2.76	6.73
4.76	3.81	3.35	3.74	3.25	3.31
5.44	4.86	4.72	3.45	5.27	4.78
5.22	4.22	5.13	4.40	3.87	4.32
4.71	5.86	4.51	4.82	4.76	4.39
4.60	4.85	5.76	4.95	4.84	4.10
3.49	3.42	4.45	4.37	3.96	3.95
4.30	3.51	3.77	4.58	5.14	2.87
2.89	4.26	4.27	4.36	4.71	4.46
4.30	4.39	2.96	5.74	4.43	4.81
4.12	4.14	3.98	5.12	4.13	4.51
4.22	4.02	4.02	4.26	5.86	4.71
4.02	4.08	4.19	4.11	4.05	3.93
4.08	3.86	4.14	4.09	3.97	3.98
4.06	3.91	4.11	4.21	3.91	4.09
4.11	4.11	4.23	4.33	4.11	4.02
4.07	4.10	4.01	3.06	4.02	4.19
3.98	4.14	4.02	3.98	4.02	4.09
4.19	3.88	3.96	3.92	4.05	4.02
4.13	4.05	4.06	4.05	4.13	4.16
4.02	4.10	4.05	4.06	4.08	4.09
4.01	4.08	4.15	4.11	4.15	4.08
4.16		4.18	4.10	4.06	4.16
4.21		4.05	4.12		
4.03					

Método Espectrofotométrico.-

En las primeras pruebas que se hicieron para este método, se usó una pipeta graduada de 1 ml. tomando 0.1 ml. de muestra, 10 ml. de ácido acético y 5 ml. de solución de urea-imidazol. Se trabajó con las diluciones 1:1 y 1:1.5 y al observar que se obtenían resultados reproducibles, no se siguió probando con el resto de las diluciones con esta cantidad de muestra.

Los resultados que se obtuvieron en estas pruebas, se muestran a continuación:

Dilución:	Muestras:	
	# 1	# 2
	(absorbancia)	
1:1	0.30	0.50
	0.32	0.62
	0.45	0.69
	0.38	0.55
1:1.5	0.31	0.65
	0.24	0.65
	0.32	0.72
	0.33	0.36

Otras pruebas realizadas fueron con respecto al tiempo para observar la variabilidad en la lectura después de los 30 minutos, tiempo fijado para leer en el espectrofotómetro. Estas lecturas se tomaron por duplicado cada 10 minutos y se muestran en la tabla No. II.

Tabla No. II

Dilución	Tiempo (min.)	Lecturas (absorbancia)	
		#1	#2
1:0.5	0	0.36	0.35
	10	0.38	0.37
	20	0.38	0.38
	30	0.40	0.39
	40	0.41	0.41
	50	0.42	0.42
	60	0.42	0.42
	70	cte.	cte.
1:1	0	0.28	0.26
	10	0.31	0.28
	20	0.32	0.29
	30	0.33	0.30
	40	0.34	0.31
	50	0.35	0.32
	60	0.35	0.32
	70	cte.	cte.
1:1.5	0	0.21	0.22
	10	0.22	0.24
	20	0.23	0.24
	30	0.24	0.25
	40	0.25	0.26
	50	0.25	0.26
	60	cte.	cte.
	1:2	0	0.15
10		0.16	0.17
20		0.17	0.17
30		0.17	0.17
40		0.17	0.18
50		cte.	0.18
60			cte.

cont. Tabla No. II

Dilución	Tiempo (min.)	Lecturas	
		(absorbancia) #1	#2
1:2.5	0	0.13	0.13
	10	0.15	0.15
	20	0.17	0.17
	30	0.20	0.19
	40	0.20	0.20
	50	0.20	0.20
	60	cte.	cte.
1:3	0	0.11	0.10
	10	0.11	0.11
	20	0.12	0.11
	30	0.12	0.12
	40	0.13	0.12
	50	0.13	0.12
	60	cte.	cte.

Cte.: constante

Para el método de Gerber se hicieron pruebas de ensayo con cada una de las diluciones obteniéndose resultados reproducibles, por lo que no fué necesario aumentar el número de pruebas.

En el método complejométrico se hicieron un gran número de muestras de ensayo, tanto para determinar el peso de la muestra, como para seleccionar la dilución óptima.

Estos resultados no se reportan porque no fueron confiables y son -

totalmente erróneos. Elegida la cantidad de muestra y la dilución, se -  
 corrieron varias muestras cuyos resultados se muestran en la tabla No. VII.

### Pruebas Definitivas

En la tabla No. III se muestran los datos obtenidos en los métodos -  
 Roese Gottlieb y Espectrofotométrico.

Tabla No. III

Métodos:	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3
R. G.	2.71	2.01	1.64	1.34	1.14	1.02
	2.71	2.02	1.64	1.34	1.15	1.02
	2.80	2.03	1.65	1.34	1.15	1.02
	2.80	2.03	1.66	1.34	1.16	1.03
	2.84	2.04	1.66	1.35	1.16	1.03
Esp.	0.34	0.26	0.20	0.15	0.13	0.11
	0.34	0.26	0.20	0.15	0.13	0.11
	0.35	0.26	0.20	0.15	0.13	0.11
	0.35	0.26	0.20	0.15	0.14	0.11
	0.36	0.26	0.20	0.16	0.14	0.11

R.G.: Roese Gottlieb; Esp.: Espectrofotométrico.

Los valores reportados en el método espectrofotométrico, son de absor-  
 bancia y para obtener el valor real de grasa se utiliza la ecuación de re-  
 gresión que se muestra posteriormente.

A continuación en la tabla número IV, se muestran los datos con los que se trabajó para obtener el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para el método espectrofotométrico. En la página siguiente se muestran los datos graficados:

TABLA No. IV

x	y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	xy
2.71	0.34	7.3441	0.1156	0.9214
2.71	0.34	7.3441	0.1156	0.9214
2.80	0.35	7.84	0.1225	0.9800
2.80	0.35	7.84	0.1225	0.9800
2.84	0.36	8.0656	0.1296	1.0224
2.01	0.26	4.0401	0.0676	0.5226
2.02	0.26	4.0804	0.0676	0.5252
2.03	0.26	4.1209	0.0676	0.5278
2.03	0.26	4.1209	0.0676	0.5278
2.04	0.26	4.1616	0.0676	0.5304
1.64	0.20	2.6896	0.04	0.3280
1.64	0.20	2.6896	0.04	0.3280
1.65	0.20	2.7225	0.04	0.33
1.66	0.20	2.7556	0.04	0.3320
1.66	0.20	2.7556	0.04	0.3320
1.34	0.15	1.7956	0.0225	0.2010
1.34	0.15	1.7956	0.0225	0.2010
1.34	0.15	1.7956	0.0225	0.2010
1.34	0.15	1.7956	0.0225	0.2010
1.34	0.16	1.8225	0.0256	0.2160
1.14	0.13	1.2996	0.0169	0.1486
1.15	0.13	1.3225	0.0169	0.1495
1.15	0.13	1.3225	0.0169	0.1495
1.16	0.14	1.3456	0.0196	0.1624
1.16	0.14	1.3456	0.0196	0.1624
1.02	0.11	1.0404	0.0121	0.1122
1.02	0.11	1.0404	0.0121	0.1122
1.02	0.11	0.0404	0.0121	0.1122
1.03	0.11	1.0404	0.0121	0.1133
<u>1.03</u>	<u>0.11</u>	<u>0.0404</u>	<u>0.0121</u>	<u>0.1133</u>
49.87	6.02	93.4543	1.4098	11.4642

x = Roese Gottlieb;      y = Espectrofotométrico

Coefficiente de correlación:

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

$$\underline{r = 0.99}$$

Ecuación de regresión:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

$$\underline{Y = -0.0287 + 0.138 X}$$

El intervalo de confianza en  $\beta_1$  está dado por:

$$CI (\beta_1) = \beta_1 \pm t_{\alpha/2} S_{yx} / \sqrt{\sum x^2}$$

$$\beta_1 = 0.138 \qquad S_{yx} / \sqrt{\sum x^2} = 0.0015$$

El valor t tabulado para  $\alpha = 0.05$  y 28 grados de libertad es 2.048.

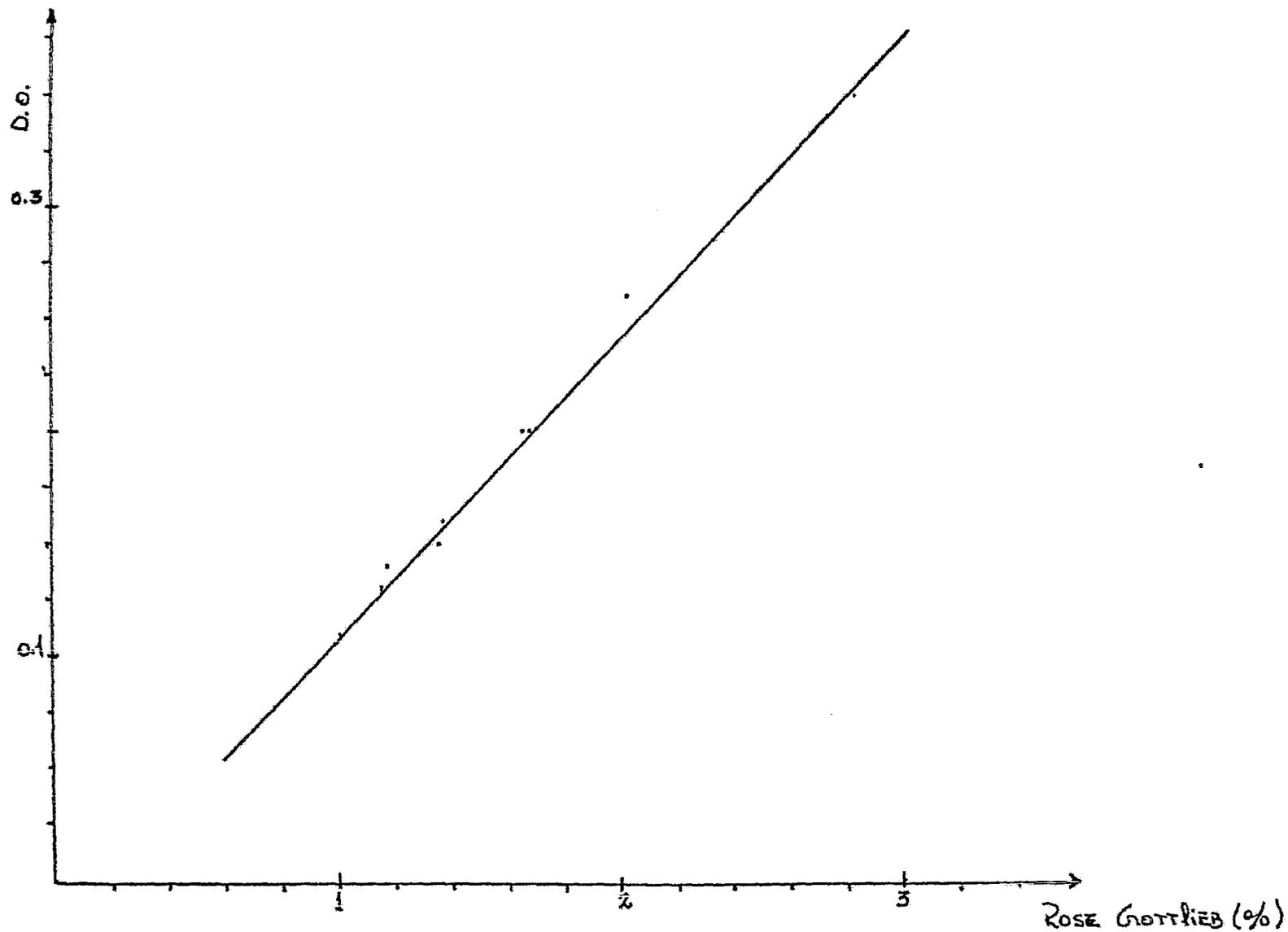
El intervalo de confianza al 95% para  $\beta_1$  está dado por:

$$0.138 \pm (2.048) (0.0015)$$

$$CI = 0.138 \pm 0.003072$$

$$[0.1410, 0.1349]$$

# MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO vs. MÉTODO ROESE GOTTLIEB.



En la tabla número V se muestran los datos que se obtuvieron al reali-  
zar el método de Roese Gottlieb y el método de Gerber.

Tabla No. V

Métodos:	1:0.5	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5	1:3
R. G.	2.71	2.01	1.64	1.34	1.14	1.02
	2.71	2.02	1.64	1.34	1.15	1.02
	2.80	2.03	1.65	1.34	1.15	1.02
	2.80	2.03	1.66	1.34	1.16	1.03
	2.84	2.04	1.66	1.35	1.16	1.03
Gerber	2.8	2.1	1.7	1.4	1.2	1.1
	2.8	2.1	1.7	1.4	1.2	1.1
	2.8	2.1	1.7	1.5	1.2	1.1
	2.9	2.2	1.8	1.5	1.3	1.1
	2.9	2.2	1.8	1.5	1.2	1.1

R.G.: Roese Gottlieb.

En la tabla número VI se muestran los datos con los que se obtuvo el coeficiente de correlación y la ecuación de regresión para el método de Gerber:

TABLA No. VI

x	y	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	xy
2.71	2.9	7.3441	8.41	7.859
2.71	2.9	7.3441	8.41	7.859
2.80	2.8	7.84	7.84	7.84
2.80	2.8	7.84	7.84	7.84
2.84	2.9	8.0656	8.41	8.236
2.01	2.1	4.0441	4.41	4.221
2.02	2.2	4.0804	4.84	4.488
2.03	2.1	4.1209	4.41	4.263
2.03	2.1	4.1209	4.41	4.242
2.04	2.2	4.1616	4.84	4.466
1.64	1.7	2.6896	2.89	2.805
1.64	1.7	2.6896	2.89	2.788
1.65	1.8	2.7225	3.24	3.06
1.66	1.7	2.7556	2.89	2.788
1.66	1.8	2.7556	3.24	2.988
1.34	1.4	1.7956	1.96	1.876
1.34	1.5	1.7956	2.25	2.025
1.34	1.4	1.7956	1.96	1.876
1.34	1.5	1.7956	2.25	2.01
1.35	1.5	1.8225	2.25	2.01
1.14	1.2	1.2996	1.44	1.368
1.15	1.2	1.3225	1.44	1.38
1.15	1.2	1.3225	1.44	1.392
1.16	1.3	1.3456	2.25	1.495
1.16	1.2	1.3456	1.44	1.392
1.02	1.1	1.0404	1.21	1.133
1.02	1.1	1.0404	1.21	1.122
1.02	1.1	1.0404	1.21	1.122
1.03	1.1	1.0609	1.21	1.122
1.03	1.1	1.0609	1.21	1.133
<u>50.62</u>	<u>52.6</u>	<u>93.5884</u>	<u>103.7</u>	<u>98.199</u>

x = Rose Gottlieb; y = Gerber

Coefficiente de correlación:

$$\underline{r = 0.975}$$

Ecuación de regresión:

$$\underline{Y = - 0.1971 + 1.156 X}$$

El intervalo de confianza en  $\beta_1$  está dado por:

$$CI (\beta_1) = \beta_1 \pm t_{\alpha/2} s_{yx} / \sqrt{\sum x^2}$$

El valor t tabulado para  $\alpha = 0.05$  y 28 grados de libertad es:  
2.048.

El intervalo de confianza al 95% para  $\beta_1$  está dado por:

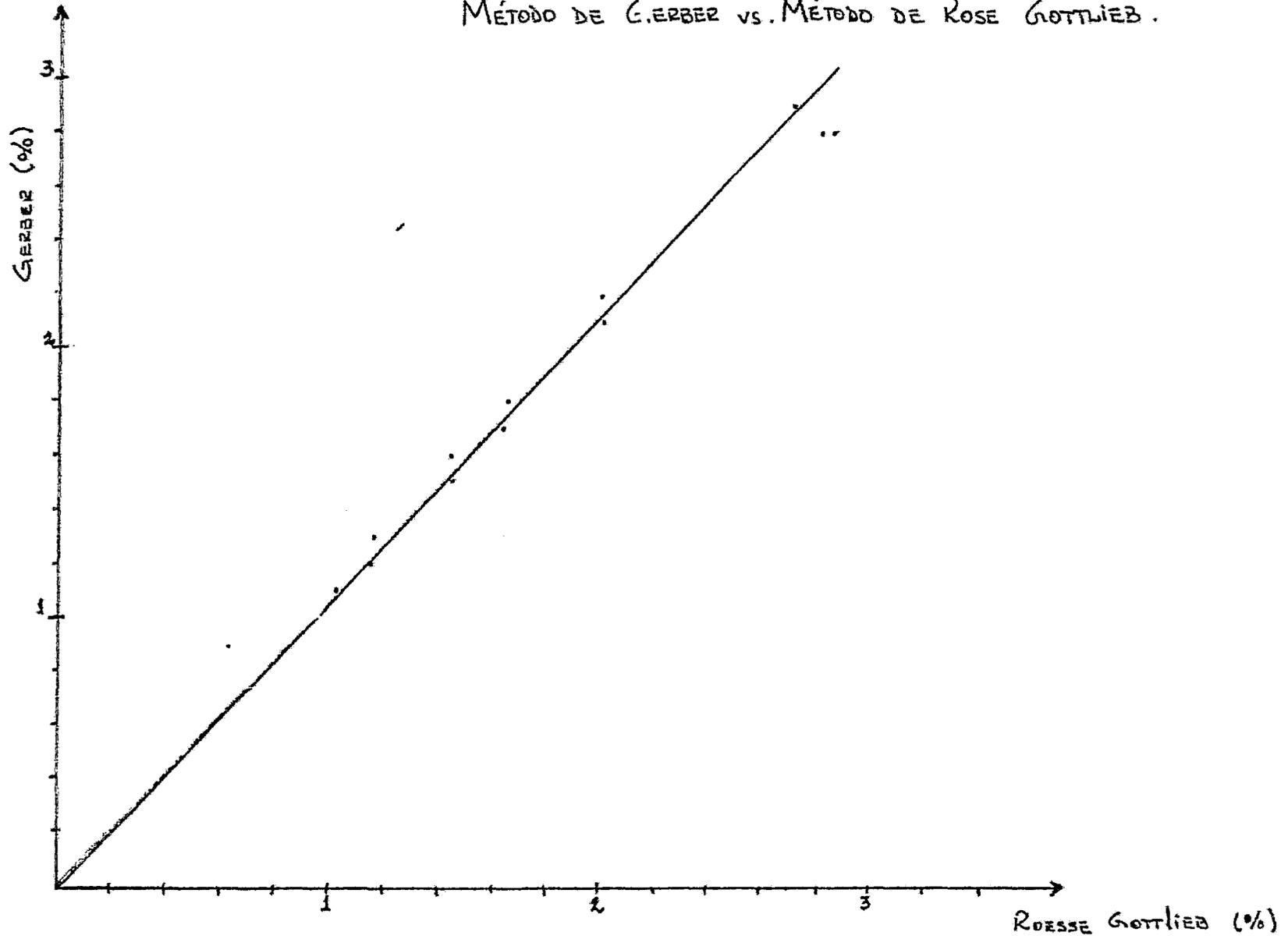
$$1.156 \pm ( 2.048 ) ( 0.1262 )$$

$$CI = 1.156 \pm 0.2584$$

$$[1.4144, 0.8976]$$

En la página siguiente se muestra la gráfica de los valores de Gerber vs Roese Gottlieb.

MÉTODO DE GERBER vs. MÉTODO DE ROSE GOTTLIEB.



En la tabla número VII se muestran los datos con los cuales se obtuvo el porcentaje de grasa mencionado para la dilución 1:3 que fué con la única que se obtuvieron resultados reproducibles. Cada muestra se trabajó por triplicado.

Tabla No. VII

Peso Muestra ( g )	Vol. EDTA ( ml. )	% grasa
50.3690	21	4.08
	21.1	3.97
	21.1	3.97
50.1462	21	4.1
	21	4.1
	21.1	4.1
50.4186	21	4.07
	21.1	3.97
	20.9	4.17
50.3427	21.2	3.87
	21.2	3.87
	21.2	3.87
50.06	21.1	4.0
	21.1	4.0
	21	4.1
50.3238	21.1	3.98
	21	4.08
	21.1	3.98
50.3964	21	4.07
	21	4.07
	21.2	3.87
49.8160	21.2	3.92
	21.2	3.92
	21.3	3.81

cont. Tabla No. VII

---

Peso Muestra ( g )	Vol. EDTA ( ml. )	% grasa
49.7191	21.3	3.82
	21.3	3.82
	21.1	4.0
51.9221	20.8	4.15
	20.8	4.15
	20.9	4.05
50.4315	21.8	3.26
	21.4	3.66
	21.4	3.66
50.3318	21.2	3.88
	21.3	3.77
	21.3	3.77
49.9027	20.9	4.22
	20.8	4.32
	21	4.12

---

En la tabla no. VIII se muestra el porcentaje de grasa obtenida en los métodos Roese Gottlieb, Espectrofotométrico y Gerber. Para el método espectrofotométrico se utilizó la ecuación de regresión para convertir los valores de absorbancia en porcentaje de grasa.

Tabla No. VIII

	1:0,5	1:1	1:1,5	1:2	1:2,5	1:3
R. G.	4.06	4.02	4.10	4.02	4.00	4.08
	4.06	4.04	4.10	4.02	4.02	4.08
	4.20	4.06	4.12	4.02	4.02	4.11
	4.20	4.06	4.15	4.02	4.06	4.11
	4.26	4.08	4.15	4.05	4.06	4.11
Gerber	4.3	4.2	4.2	4.2	4.2	4.4
	4.3	4.2	4.2	4.2	4.2	4.4
	4.3	4.2	4.2	4.5	4.2	4.4
	4.3	4.4	4.5	4.5	4.2	4.4
	4.3	4.4	4.5	4.5	4.5	4.4
Esp.	4.005	4.18	4.14	3.88	4.025	4.02
	4.005	4.18	4.14	3.88	4.025	4.02
	4.11	4.18	4.14	3.88	4.025	4.02
	4.11	4.18	4.14	3.88	4.27	4.02
	4.22	4.18	4.14	4.10	4.27	4.02

---

R. G.: Roese Gottlieb; Esp.: Espectrofotométrico.

## Conclusiones.-

1.- De acuerdo a los resultados obtenidos, el método Roesse Gottlieb se considera un método exacto y preciso. Comparando estos resultados con el método Gerber se le considera a este un método exacto, basando esta afirmación en el valor obtenido en el coeficiente de correlación.

Con respecto al costo, no hay gran diferencia entre ambos, porque en el Gerber se usa una centrífuga especial pero únicamente dos reactivos en pequeña cantidad, mientras que en el Roesse Gottlieb se emplea material de vidrio común pero más reactivos y en mayor cantidad. En cuanto al tiempo el método Gerber es más rápido y de más fácil manipulación.

2.- De acuerdo al valor del coeficiente de correlación, el método Espectrofotométrico también se considera un método exacto.

Aunque este método implica una inversión inicial muy alta, con el tiempo se compensa su adquisición ya que dentro de un laboratorio se puede usar para un sinnúmero de análisis con un mínimo de tiempo y personal. Por otro lado los resultados de este método no dan el contenido graso de una muestra por lo que se tiene que apoyar en algún otro método para obtener cantidades de grasa por medio de una ecuación de regresión.

3.- Con respecto al método complejométrico no se obtuvieron los resultados esperados, ya que sólo se tuvieron cantidades válidas para la dilución 1:3, porque en el resto de las diluciones no se distinguía el vire del indicador

durante la titulación. Estos datos no eran suficientes para hacer un análisis estadístico más completo.

Se probó trabajar con leche evaporada con ésta técnica ya que en la bibliografía se encontró reportado para productos lácteos tales como: mantequilla y crema, y se consideró como un método novedoso, además de que el material y reactivos que se emplean existen en cualquier laboratorio analítico.

4.- Con los resultados que se obtuvieron, se consideran a los métodos Espectrofotométrico y Gerber, como confiables tanto en exactitud como en precisión, por lo que se recomienda su uso como método de rutina en un laboratorio analítico.

## Bibliografía.-

- 1.- Alais, Charles. Ciencia de la Leche. Cia. Ed. Continental. S.A. México ( 1980 ).
- 2.- Ashworth, U.S., ( 1969 ). Turbidimetric methods for measuring fat content of homogenized milk. J. Dairy Sci. 52:262
- 3.- Association of Official Agricultural Chemist. Ed. Washington, D.C. ( 1980 )
- 4.- Atherton, Henry V., Chemistry and Testing of Dairy Products. AVI Publishing Co. Inc., Westport, Connecticut. 2a. Ed. ( 1981 )
- 5.- Bañui, Dargal S., Química de los Alimentos. Ed. Alhambra Mexicana, 1a. Ed. ( 1981 )
- 6.- Barnara, A.J. y Chayen, R., Métodos Modernos de Análisis Químicos. Ed. Urmo, España ( 1970 )
- 7.- Beitz, M.E., Philips, Eklund, S.H., A nephelometric procedure for determination of fat and protein in milk. J. of Dairy Sci. vol.60 no. 5 ( 701 - 705 ).
- 8.- Biggs, D.A. Milk analysis with the infrared milk analyzer. J. of Dairy Sci. 50: 799 - 803.
- 9.- Desrosier, W.N. The Technology of Food Preservation. AVI Pub. Co. Inc., Westport, Connecticut, 4a, ed. ( 1977 ).
- 10.- Duncan, R.C., Knapp, R.G., Miller III, M.C., Biestadística. Ed. Interamericana, México ( 1977 )
- 11.- Encyclopedia of Chemical Technology. Vol 13: 552 - 553 ( 1967 ) Ed. Board, 3a. ed.

- 12.- Fisher, P. y Bender, A., Valor Nutritivo de los Alimentos. Ed. Limusa, S.A. México ( 1980 )
- 13.- García Villanova R., López Mtz. M. C., Método general de determinación de grasa por complejometría indirecta con Mg II. Anales de Bromatología . Tomo XXIX No. 2 ( 1977 )
- 14.- García Villanova R. y Sevillano, J. Valoración de grasa en nata y mantequilla por complejometría indirecta con magnesio II. Anales de Bromatología. Tomo XXIII No. 3 ( 1971 )
- 15.- Haugaard, G. ( 1966 ) Photometric determination of fat in milk. J. Dairy Sci. 49:1185-1189.
- 16.- Haugaard, G. y Pettinati ( 1959 ) Photometric milk fat determination. J. Dairy Sci. 42 : 1255 - 1275.
- 17.- Jacobs, Morris. The Chemistry and Technology of Food and Food Products. Interscience Publishers Inc., New York, Vol III ( 1951 )
- 18.- Judkins, H. F. y Keener, H.A., La Leche. Su Producción y Procesos Industriales. Cía. Ed. Continental, S.A. 9a. impresión - México ( 1981 )
- 19.- King, R. L. ( 1973 ) Automated determination of fat in milk: Preliminary and collaborative studies, J. Assoc. Off. Agric. - Chem. 56 : 1401
- 20.- Mljekarstvo ( 1974 ) Standardization of control laboratory methods in dairy industry; Determination of fat content in homogenized milk. ( Biotehniška Fakulteta, Ljubljana, Yugoslavia ) 24 ( 8 )- 190 - 192.

- 21.- Kramer, A. y Twigg, B. Quality Control for the Food Industry.  
AVI Pub. Co. Inc. Westport, Connecticut. 3a ed. ( 1970 )
- 22.- Lehninger, Albert. Bioquímica. Ed. Omega, S.A. Barcelona. 2a.  
ed. ( 1978 )
- 23.- Nakai, S. y Le, A. C. ( 1970 ) Spectrophotometric determination  
of protein and fat in milk simultaneously. J. Dairy Sci. 53:276
- 24.- Norma Oficial Mexicana. NOM F - 51 - S ( 1980 ) Leche Evaporada
- 25.- Orozco Díaz F. Análisis Químico Cuantitativo. Ed porrúa, México  
6a. ed. ( 1970 )
- 26.- Patton Stuart. La Leche. Selecciones del Scientific American:  
Los Alimentos. Julio ( 1969 ) 147:155
- 27.- Pearson. The Chemical Analysis of Food. Ed. J & A Churchill.  
6a. ed. London ( 1970 )
- 28.- Peckman, G.G. Foundations of Food Preparation. Mc Millan Pub.  
Co. Inc. Westport Connecticut ( 1971 )
- 29.- Pomeranz and Meldon. Food Analysis: Theory and Practice. AVI  
Pub. Co. Inc. Westport Connecticut ( 1971 )
- 30.- Revella, R.A. Tecnología de la Leche. Ed. Herrero Hnos. ( 1967 )
- 31.- Rosell, J.M. y Dos Santos I. Métodos Analíticos de Laboratorio  
Lactológico. Ed. Labor, S.A. España ( 1952 )
- 32.- Sommer, H.H. Cherry Burrel Circle. 37 ( 7-8 ), 7 ( 1952 )
- 33.- Stookey, L.A., Conneta y Zehnder H. ( 1972 ) Automated Determina-  
tion of Milk Fat. J. Dairy Sci. 55:403

- 34.- Strobel, A. H. Instrumentación Química. Ed. Limusa, Méx. ( 1940 )
- 35.- Taylor, D., Taylor, H. A. Texto de Química Física. Ed. El Ateneo  
Buenos Aires ( 1952 )
- 36.- Webb, H., Alford, J. A. Fundamentals of Dairy Chemistry. AVI  
Pub Co. Inc. Westport Connecticut, 2a. ed. ( 1978 )
- 37.- Yúfera, E. P. Química Agrícola III. Alimentos. Ed. Alhambra.  
Madrid ( 1979 ).