

4
205



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE FORMULAS EN POLVO PARA
NIÑOS INTOLERANTES A LA LACTOSA

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

GUADALUPE AGUIRRE TOLEDO
MA. DEL ROCIO GONZALEZ SOTOMAYOR



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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

	PAGINA
- INTRODUCCION	1
- OBJETIVO	3
- ANTECEDENTES	4
- PARTE EXPERIMENTAL	51
*Análisis Proximal	
Humedad	53
Cenizas	54
Proteína	56
Grasa	58
Fibra	60
Carbohidratos asimilables	62
*Densidad calórica	63
*Análisis Físico	
Densidad Aparente	66
*Pruebas de Reconstitución	
Volumen de Sedimentación	68
Solubilidad	69
Humectabilidad	71
*Pruebas Reológicas	
Angulo de Reposo	72
Velocidad de Flujo	73
*Pruebas de Estabilidad	
Estabilidad al calor	75
Indice de Peróxidos	76

Indice de Acidez	78
Determinación de pH	80
*Análisis Microbiológico	
Mesófilos aerobios	81
Coliformes	83
Escherichia coli	85
Salmonella	87
Staphilococcus aureus	88
Hongos y Levaduras	90
*Diagramas	92
*Tablas de NPM y	
Morfología Colonial de Bacterias	93
- RESULTADOS Y DISCUSION	97
- CONCLUSIONES	115
- RECOMENDACIONES	116
- BIBLIOGRAFIA	117

INTRODUCCION

La desnutrición proteínico-calórica es uno de los principales problemas de salud pública del mundo; ésta puede iniciarse por diversos motivos como son una baja disponibilidad de alimento, barreras de tipo cultural o infecciones gastrointestinales. (1)

Así mismo, la desnutrición y las enfermedades gastrointestinales son algunas de las principales causas de mortalidad en el mundo, especialmente en niños. (2)

Los niños desnutridos presentan con frecuencia trastornos digestivos, siendo uno de los tejidos más sensibles la mucosa intestinal; la cual sufre una atrofia que le impide realizar sus funciones de secretar disacaridasas.

Estos trastornos digestivos impiden su recuperación al ser alimentados con fórmulas lácteas; por este motivo, se han empleado sustitutos de éstas basados fundamentalmente en caseinatos de calcio y soya que a pesar de ser más fisiológicas son poco prácticas por su alto costo y escasez (3,4).

Desde hace 20 años, primero en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), y posteriormente en la Facultad de Química de la UNAM se han estudiado y diseñado varias fórmulas destinadas a niños desnutridos e intolerantes a la lactosa a partir de garbanzo, pollo, maíz, arroz y sus mezclas con el objeto de tener sustitutos de leche de bajo costo y alto valor nutricional.

(1,3,4,5,6,7)

En este trabajo se pretende caracterizar las fórmulas en polvo, seleccionadas por su calidad nutricional, manejo y bajo costo, con el interés de desarrollar un producto en polvo, que cumpla con las especificaciones que marcan las normas de productos no lácteos para su comercialización.

En la caracterización se establecerán las condiciones de secado, control de la composición química, parámetros físicos, reológicos, de reconstitución, estabilidad y análisis microbiológicos.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Caracterizar las fórmulas en polvo seleccionadas con el fin de comercializarlas.

Objetivos específicos:

- Determinar el análisis químico de las fórmulas en polvo seleccionadas .
- Realizar las pruebas físicas, reológicas y de reconstitución de las fórmulas en polvo seleccionadas.

- Estudiar la estabilidad del producto: estabilidad al calor, acidez, pH e índice de peróxidos.

- Analizar la calidad microbiológica de las fórmulas en polvo seleccionadas.

ANTECEDENTES

Alimentación y desnutrición

La alimentación es un factor determinante en la formación y progreso de las sociedades. A pesar de ésto la desnutrición proteínico calórica es el principal factor asociado con altas tasas de mortalidad y escaso desarrollo físico, siendo el niño el cual se ve más afectado debido a su carácter de dependencia y a sus altos requerimientos de nutrimentos en las primeras etapas de vida. (8)

En la desnutrición participan una serie de factores geográficos, culturales, históricos, biológicos, económicos y sociales. Por lo anterior, el estudio de los problemas relacionados con la alimentación y la desnutrición necesita de un enfoque global y multidisciplinario (9,10,11,12).

Debido a que el nivel de vida corresponde al grado de satisfacción de las necesidades de los individuos y a su vez es determinado por los recursos y oportunidades que éstos tengan, el problema de desnutrición se encuentra principalmente donde hay pobreza e ignorancia (9,11).

La deficiencia nutricional manifiesta es poco común en las poblaciones de países desarrollados, aunque puede encontrarse en cierto grado entre grupos de menores recursos, ancianos y personas con requerimientos nutricios mayores como son: niños en crecimiento, mujeres embarazadas o en época de lactancia. En países en desarrollo las deficiencias manifiestas son más comunes y además la mala absorción de nutrimentos y los defectos de enzimas digestivas conducen a estados patológicos como la intolerancia a la lactosa. En México y América Latina los grupos más vulnerables son los que se concentran fundamentalmente en los cinturones de miseria de las grandes ciudades, así como en numerosas comunidades rurales aisladas (11,13).

Los términos empleados para describir la desnutrición por insuficiencia de alimentos proteínicos y calóricos, son el Kwashiorkor o síndrome policarencial infantil y el Marasmo. Ambas formas de desnutrición frecuentemente aparecen conjuntamente y se consideran como problemas sanitarios mundiales (14).

a) Kwashiorkor

La carencia crónica de proteínas en los niños se llama Kwashiorkor "enfermedad de la cese de la lactancia". Los niños son amamantados durante períodos relativamente largos, pero cuando se interrumpe la lactancia, éstos reciben una dieta suficiente en carbohidratos pero insuficiente en proteínas.

El Kwashiorkor se presenta generalmente entre 1-5 años de edad y sus principales características son:

- Se considera un grado agudo de desnutrición.
- Los tejidos presentan cierto grado de edema debido a los bajos niveles de proteínas séricas.
- El crecimiento se retarda y el peso no es adecuado a su talla.
- Se presenta anorexia.
- Los niños son apáticos.
- Se puede presentar diarrea y por lo tanto deshidratación.
- La tasa de mortalidad es muy elevada y en el caso de supervivencia, se produce un déficit fisiológico permanente ya que no hay una buena absorción de nutrimentos por el daño causado en la mucosa intestinal (14,15,16,17).

b) Marasmo

El Marasmo se produce en niños menores de un año a los cuales se les ha retirado de la lactancia materna y no están recibiendo los nutrimentos en la cantidad adecuada.

Sus principales características son:

- Se considera una desnutrición crónica.
- Hay anemia y detención de crecimiento.
- El niño no presenta edema.
- Hay una pérdida total de grasa subcutánea.
- La piel está pegada al hueso.
- Hay una reducción de peso.
- El niño se muestra inquieto y activo (8,14,15).

Requerimientos del lactante

La alimentación del lactante debe ser :

- 1) Suficiente
- 2) Equilibrada
- 3) De buena calidad
- 4) Digerible
- 5) Libre de contaminación
- 6) Apropriada para la edad (presentación y composición)
- 7) Proporcionada con ternura.(18).

Durante los primeros meses de vida, el crecimiento es más rápido que en cualquier otro período y durante éste crecen con gran rapidez el cerebro y el sistema nervioso por lo que es importante el abasto de nutrimentos esenciales para el desarrollo normal.

Los requerimientos nutricionales de los lactantes comprenden 60% de carbohidratos, 10% de proteínas y 30% de grasa (19).

La necesidad calórica de los lactantes es mucho mayor que la de los niños mayores o adultos ya que el niño tiene mayor cantidad de tejidos activos y

mayor superficie corporal en proporción a su peso que el adulto; en consecuencia, hay mayor pérdida de calor además que se necesitan calorías complementarias para el crecimiento y la actividad.

La energía requerida en el primer año es de 112 Kcal/Kg/día y las especificaciones nutricias de los alimentos de destete dependen del uso que pudieran tener:

- a) Como sustituto total o parcial de la leche materna.
- b) Como alimento empleado a partir del destete.
- c) Como complemento de la leche materna durante el primer año de vida.

En el cuadro No. 1 se presentan las necesidades de energía de los lactantes a diferentes edades (20).

CUADRO No 1

Necesidades de energía de los lactantes

Edad	kcal/kg
3 meses	120
3-5 meses	115
6-8 meses	110
9-11 mese	105
1 año	112

Las calorías contenidas por unidad de volumen constituyen una

característica importante. Hasta los primeros tres meses de vida, una ingestión de 850 ml/ día de leche materna suministra 120 Kcal/Kg (0.7 Kcal/ml) (19,20).

Carbohidratos

Estos constituyen el principal suministro de energía en la dieta del lactante. Sus principales fuentes son la leche (con lactosa), azúcar de la caña (como sacarosa), frutas y vegetales (glucosa, fructosa y galactosa).

Sus principales funciones son:

- a) Energéticas.
- b) Como material de reserva.
- c) Estructurales, dando lugar a la integración de sustancias que constituyen parte de los tejidos de sostén.
- d) Como precursores biológicos de otras sustancias orgánicas como lípidos y proteínas, de dos factores vitamínicos ácido ascórbico e inositol y en la formación de glucósidos.

Durante el comienzo de la lactancia, el carbohidrato generalmente proporciona 35-55% de la ingestión calórica y la lactosa representa generalmente una porción importante e incluso puede ser el único carbohidrato consumido (21)

Durante el proceso de digestión de los carbohidratos, el intestino secreta diferentes disacaridasas (maltasa, sacarasa, lactasa), dando lugar a partir de su sustrato diferentes monosacáridos (glucosa, galactosa, fructosa), los cuales pueden ser absorbidos y atravesar la mucosa intestinal (22,23).

Los problemas más frecuentes en el aprovechamiento de los carbohidratos están relacionados con la digestión, absorción intestinal e incluso con la utilización anormal de dichos nutrimentos. En el caso de las disacaridasas, éstas son las que se ven más afectadas durante la desnutrición

conduciendo a diferentes estados patológicos como la intolerancia a la lactosa (24).

Intolerancia a la lactosa

Los principales carbohidratos aportados por la dieta son el almidón, la lactosa y la sacarosa.

La lactosa es un disacárido que se encuentra exclusivamente en la leche de los mamíferos y está constituido por una molécula de galactosa y una de glucosa unidas por un enlace glucosídico β (1-4) (25, 26).

Durante la digestión la lactosa experimenta hidrólisis por acción de la lactasa intestinal también llamada β galactosidasa. Esta enzima es muy activa en los lactantes, pero solamente los europeos nórdicos y algunas tribus africanas tienden a retener la actividad lactasa intestinal al alcanzar la edad adulta. Sin embargo, los adultos de la mayor parte de los demás grupos humanos, poseen poca actividad lactasa y muchos de ellos presentan intolerancia a la lactosa (15).

Si la lactosa no es hidrolizada o lo es mínimamente, el azúcar intacta permanece en el lumen intestinal haciendo que la presión osmótica se eleve reduciendo la difusión del agua y los minerales al plasma sanguíneo. El exceso de lactosa es fermentado por bacterias entéricas del colon y en consecuencia, se produce un crecimiento exagerado de estos microorganismos acoplado con la producción de dióxido de carbono e hidrógeno, dando lugar a la distensión abdominal y probablemente a daños en la mucosa intestinal. Por lo tanto, los síntomas de intolerancia a la lactosa son flatulencia, distensión abdominal, diarrea y heces ácidas (25,27).

La intolerancia a la lactosa puede ser de dos tipos:

a) Primaria.- generalmente ésta se transmite genéticamente como un carácter dominante y se caracteriza por la ausencia de la enzima lactasa en

pacientes con histología normal del intestino delgado.

b) Secundaria o adquirida.- ésta se puede adquirir por una deficiencia nutricional o bien mediante múltiples padecimientos como diarrea inespecífica, enfermedad celiaca, etc. (28,29,30,31).

Hay dos pruebas clínicas útiles para determinar la mala absorción de la lactosa. Una de ellas mide el incremento en la concentración de glucosa durante la administración en el fluido sanguíneo de una carga de lactosa y la otra mide el hidrógeno expirado. Así un incremento de glucosa en la sangre de más de 20 mg/dl es evidencia clara de la digestión efectiva de la lactosa y un incremento de hidrógeno de más de 20 ppm es evidencia de la mala absorción de lactosa (27).

Proteínas

El incremento de nitrógeno en el organismo durante el crecimiento, se basa en dos componentes: la acumulación de tejido nuevo, indicada por el aumento de peso y un aumento en la concentración de nitrógeno en el cuerpo que se menciona con frecuencia como maduración. Además, las proteínas proporcionan los aminoácidos indispensables requeridos para la síntesis de las proteínas propias del cuerpo, tanto estructurales como biológicamente activas.

La necesidad de proteínas en los lactantes es mayor que en cualquier otro período debido a que están sintetizando tejidos que forzosamente exigen de todos los aminoácidos.

En el cuadro No. 2 se presentan los requerimientos e ingestión recomendada de proteína dependiendo de la edad del lactante (32).

CUADRO No 2

Necesidades de proteína por kg de peso corporal por día para lactantes normales

Edad	Requerimientos	Ingestión recomendada
menos de 4 meses	1.6	1.9
4-12 meses	1.4	1.7
12-36 meses	1.2	1.4

En el caso un de niño sano de 4-6 meses de edad, son suficientes 240mg de N_2 /kg/día obtenidos a través de la leche materna o de algún sustituto de ésta (12,32).

La calidad de una proteína depende de su composición en aminoácidos indispensables y de su digestibilidad.

Suplementación

Existen varios procedimientos para mejorar la calidad de una proteína con los cuales se tiende a lograr un mejor balance de aminoácidos en la proteína. Estos procedimientos son:

- a) Mejoramiento genético.
- b) Adición de los aminoácidos limitantes.
- c) Utilización de concentrados proteínicos.
- d) Complementación, la cual consiste en la combinación adecuada de ciertos alimentos.

El proceso de suplementación debe contener :

- 1.- Todos los aminoácidos indispensables en una cantidad suficiente.
- 2.- Debe realizarse con un alimento convencional de alto consumo.
- 3.- La cantidad del suplemento debe ser la adecuada para no modificar las características sensoriales y físicas del producto final.
- 4.- El suplemento utilizado debe ser altamente disponible y de relativo bajo costo (33).

Lípidos

No podemos precisar con exactitud la ración necesaria de grasa; si bien, su valor calórico constituye una reserva durante los primeros meses de vida donde las necesidades energéticas son grandes. Sin embargo, a pesar de que los lípidos son necesarios para el organismo humano, su consumo excesivo produce serios problemas de salud como son la obesidad y algunas enfermedades cardiovasculares.

Los lípidos deben estar en forma fácilmente digerible, y de preferencia emulsificada. Los requerimientos mínimos de ácidos grasos indispensables son del orden del 3% total de la dieta y sus fuentes principales son las semillas oleaginosas; y de origen animal, la grasa de cerdo (12).

Fibra.

Los altos niveles de fibra pueden reducir la densidad del nutrimento del alimento y pueden causar irritaciones gastrointestinales en niños de corta edad. por lo tanto, es conveniente que el alimento durante el destete tenga un menor contenido de fibra mientras más corta es la edad del niño.

De acuerdo con las recomendaciones de la FAO (Food Agricultural Organization), para los niños menores de un año, el nivel de fibra en sus alimentos no debe exceder del 2% (12,34).

Vitaminas

La carencia de ellas produce malestares o enfermedades. Su principal función es como coenzimas participantes en numerosas reacciones químicas enzimáticas para el buen funcionamiento del organismo.

Son indispensables ya que el organismo no las sintetiza en cantidades suficientes pero sus requerimientos son mínimos (entre μg y mg /día).

La deficiencia de vitaminas en los lactantes es muy rara, en el caso de la vitamina A su deficiencia se manifiesta en lactantes con esteatorrea y se ha visto deficiencia de tiamina en niños que reciben fórmulas a base de soya (19,21,26).

Minerales

Todos son indispensables. Algunos actúan como cofactores de complejos enzimáticos, otros sirven para controlar la presión osmótica de fluidos celulares y el pH, o forman parte de algunas macromoléculas.

Según sus requerimientos, los minerales se clasifican en tres grupos:

1.- Los de mayor requerimiento (en orden de mg): calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, cloro y azufre.

2.- Los que se requieren en menores cantidades (en orden de μg): hierro, cobre, iodo, manganeso, cobalto, cinc, molibdeno.

3.- Los que se requieren en concentraciones mínimas (trazas): flúor, boro, selenio, cadmio, cromo y aluminio (21,26).

Densidad Calórica

Los alimentos como cualquier otro combustible, cuando se queman (es decir, se oxidan), producen energía o calor; la cual es utilizada por el organismo para conservar su temperatura y realizar cualquier trabajo. En el campo de la nutrición se emplea la Caloría (kilocaloría o gran caloría) para medir la energía (14,35).

La densidad calórica, también denominada densidad energética de un alimento o dieta, es la cantidad de energía en términos de kilocalorías, que proporciona un gramo de alimento o dieta y varía de un alimento a otro; así, las grasas proporcionan 9 kcal/g mientras que los carbohidratos y las proteínas proporcionan 4 kcal/g. Sin embargo, desde 1977, en la Trigésima Asamblea Mundial de la Salud celebrada en Ginebra, hubo acuerdo en utilizar el "Joule" como unidad de trabajo, energía o calor; la abreviatura aceptada para el joule es "J". En nutrición se maneja el Kilojoule (KJ); una Kcal es equivalente a 4.184 KJ quedando para lípidos 38 KJ, y para proteínas y carbohidratos 17KJ.

La bomba calorimétrica es un aparato que se emplea para obtener el contenido calórico de un alimento, el cual se somete a una combustión total, dentro de un recipiente cerrado y en presencia de un exceso de oxígeno que asegure una completa combustión (35,36,37,38).

Leche materna

El análisis de las características de la leche humana en comparación con las de otras especies y el del amamantamiento y sus consecuencias permite afirmar que por lo menos durante los tres primeros meses de vida, el alimento más apropiado y deseable para el niño es la leche materna y no hay ningún alimento natural o preparado que lo pueda sustituir (19).

El tratamiento alimenticio para corregir la desnutrición consiste en dar al paciente una dieta abundante y combinada. En el caso de los lactantes, la leche es el alimento ideal para su recuperación (39).

La leche o fórmulas a base de leche proporcionan un gran porcentaje de la ingestión calórica del lactante aún cuando se introducen otros alimentos en la dieta.

Sin embargo, en el caso de los niños con desnutrición severa la administración de leche puede verse restringida ya que en éstos, se modifica parcialmente su sistema enzimático digestivo; en estos casos, la leche debe darse en concentraciones bajas o utilizar sustitutos como fórmulas a base de caseinato de calcio, soya, etc. para lograr la regeneración de la mucosa intestinal y tejido pancreático (40).

Sustitutos de leche

Los sucedáneos o sustitutos de leche materna se definen en un acuerdo internacional (1981) como: "todo alimento comercializado o de otro modo presentado como sustituto parcial o total de la leche materna sea o no adecuado para este fin".

Se define también "preparación de lactante", a todo sustituto de la leche materna preparado industrialmente según normas aplicables al Codex Alimentarius, para satisfacer las necesidades nutricias de los lactantes hasta la edad de 4-6 meses y adaptado a sus características fisiológicas (40).

Las fórmulas infantiles de continuación son las preparaciones destinadas a los lactantes a partir de los 4-6 meses y forman parte de una alimentación diversificada.

Apesar del progreso y de los diferentes estudios realizados, las leches maternizadas no han mostrado grandes ventajas respecto a la leche humana y a la leche de vaca (41).

En general la leche evaporada y las fórmulas para lactantes preparadas comercialmente, son estandarizadas en relación a la concentración de sus nutrimentos y en base a la composición de la leche.

Estas fórmulas se clasifican como leches descremadas, leches enriquecidas, fórmulas sin leche y fórmulas especiales. Las dos últimas se administran a lactantes con problemas particulares como los que presentan intolerancia a la lactosa; estas fórmulas se preparan apartir de caseinato o soya, aceites vegetales y sólidos de jarabe de maíz principalmente (42).

El empleo de sustitutos de leche en la alimentación de niños que manifiestan intolerancia a la lactosa, es una alternativa dietética que al mismo tiempo soluciona un problema clínico, frecuentemente de evolución crónica. Para el diseño de estos productos se toma como referencia la cantidad de energía, proteína, minerales y vitaminas contenida en la leche. Los productos que se expenden en forma comercial cubren razonablemente las recomendaciones de nutrimentos en niños lactantes, al menos durante los primeros meses de vida (43).

En base a estudios hechos previamente se ha encontrado que los cereales y leguminosas son alimentos potencialmente útiles para ser empleados en la etapa de destete y en la elaboración de sustitutos de leche ya que generalmente son accesibles, de relativo bajo costo y son culturalmente aceptados por todas las poblaciones pues forman parte de la dieta diaria de la población de México y de Centroamérica. Además, los cereales pueden ser modificados para convertirlos en valiosos alimentos infantiles:

- a) La calidad de la proteína de las papillas de los cereales puede ser

mejorada con la adición de pequeñas cantidades de leguminosas, granos de oleaginosas, leche, carne, aves o pescados.

b) La densidad energética puede ser incrementada mediante la adición de azúcar de caña o de aceite. La cantidad de aceite a agregar dependerá del valor calórico y contenido proteínico de la papilla, siendo ideal llegar a una densidad energética comparable a la de la leche (0.7 kcal/g) y con un porcentaje de calorías proteínicas entre 11 y 16% (43,44).

En varias partes del mundo se han empleado diferentes formulaciones con el fin de resolver en parte los problemas de desnutrición existentes. Así como en la desnutrición participan una serie de factores anteriormente mencionados las materias primas empleadas varían de un lugar a otro.

- En Tailandia en 1977 se probó una fórmula infantil a base de harina de soya, arroz y sacarosa fortificada con metionina, vitaminas y minerales, el producto tuvo una buena aceptación y actualmente se produce y vende en Tailandia. Su uso se ha extendido a otros países asiáticos incluyendo Malasia, Filipinas y Singapur.

- Debido a la mala nutrición que presenta las madres tarahumaras, éstas son incapaces de alimentar a sus hijos y las fórmulas que se encuentran en el mercado están fuera de su alcance económico; por lo anterior, se trabajó sobre una fórmula infantil a base de soya y avena (evaluación nutricional, pruebas clínicas y evaluación de costos). El producto presentó una buena calidad microbiológica, estabilidad y dispersión en agua. Así mismo, las pruebas en las clínicas mostraron que la fórmula fue bien aceptada y tolerada.

Actualmente la fórmula se encuentra en venta en algunas farmacias y otros centros comerciales de varias partes de Chihuahua, y ha sido probada con niños en hospitales de Monterrey, Tijuana y Ciudad de México (45).

- La semilla de amaranto es un alimento tradicional en México cuyo costo es prácticamente igual al del maíz y mucho más bajo que el de soya. La harina de esta semilla se podría emplear en la alimentación infantil ya que presenta una alta calidad proteínica; sin embargo, ésto no ha sido posible debido a los altos costos de su obtención y elaboración (46).

- En Chile las industrias lecheras nacionales han elaborado algunos sustitutos lácteos en base a lupino incorporando harina de esta leguminosa en niveles de 12 y 15 % en productos como Superchil, Superlac y Lactoda. (47).

Actualmente los productos comerciales con los que se cuenta son los siguientes: (48)

Cuadro No. 3
Características de los sustitutos de leche comerciales

Marca Comercial	Sobee	Prosobee	Isomil	Nursoy	Milsan	NAN sin lactosa
Descripción del producto	Fórmula a base de harina de soya, sin lactosa ni sacarosa	Fórmula a base de proteína aislada de soya, con L-metionina sin lactosa ni sacarosa	Fórmula a base de proteína aislado de proteína de soya con hierro	Fórmula a base de proteína aislada de soya con hierro	Producto granulado de leche descremada con lactosa reducida y vitaminas	Fórmula exenta de lactosa
Análisis Proximal (%)						
Proteínas	14	15.6	13.7	16	17.5	14
Carbohidratos	58.8	51.4	52.4	52	67.8	55.5
Grasas	19.8	27.9	28.0	27	8.4	25
Humedad	4.0	2.5	2.5	2.0	3.0	3.0
Minerales	2.7	2.6	3.4	2.6	3.5	2.5

*Nota.- todos estos productos tienen una presentación en lata de 450 g

En base a la información que se presenta en el tema de proteínas y a los estudios realizados en trabajos previos (7), se eligió para este trabajo utilizar como materias primas el maíz, por ser un cereal básico en la alimentación de nuestro país; y el arroz por ser el cereal de mejor calidad proteínica, económico y ampliamente usado. Así mismo, ambos cereales fueron suplementados adecuadamente con pechuga de pollo.

Por lo que a continuación se presentan algunas características de estas materias seleccionadas.

Maíz

El maíz es un cereal originario de América, donde es ampliamente cultivado, en México ha sido y es el alimento básico de la población (49).

Como otros cereales el maíz pertenece a la familia de las gramíneas y al género *Zea* el que cuenta con una especie, *mays*, aunque se reconocen diferentes variedades las cuales difieren principalmente en la estructura de la semilla (50).

Las principales variedades del maíz son:

- Maíz dentado: al madurarse los granos presentan una concavidad pronunciada debido al encogimiento del endospermo por pérdida de humedad.
- Maíz harinoso: es grande y blando, el endospermo se demenuza con facilidad. Estas características permiten que el grano se muele fácilmente formando harina.
- Maíz dulce: esta variedad de maíz se caracteriza por retener su textura blanda y succulenta y su sabor dulce por un período más largo durante su desarrollo.
- Maíz ceroso: no contiene cera pero debe su textura a las grandes cantidades de la fracción de amilopectina del almidón.

- Maíz palomero: tiene la propiedad de que cuando se tuesta revienta, tiene un mínimo de endospermo harinoso (51).

La composición del maíz es diferente para cada variedad, pero en general contiene entre un 8.5-10% de proteínas, 3.5-4.5% de grasa, 68-72% de carbohidratos y 2-2.4% de fibra.

Como todos los cereales, el maíz es rico en carbohidratos y pobre en el contenido de proteínas.

Las proteínas del maíz son las prolaminas (50-55%) y gluteninas (30-45%). Su proteína principal es la zeína, la cual presenta deficiencia de dos aminoácidos indispensables (lisina y triptófano), haciéndola una proteína de mala calidad (6).

El carbohidrato principal es el almidón (98%), aunque también se encuentra la sacarosa, fructuosa y rafinosa pero en cantidades pequeñas (1-3%).

Los lípidos que contiene principalmente son: ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linolénico y araquidónico.

Todas las vitaminas están presentes con excepción del ácido fólico y la cianocobalamina. Las vitaminas que más destacan son la A, D y K, mientras que la niacina sólo es disponible después del proceso de nixtamalización (52).

La nixtamalización es el tratamiento térmico alcalino que se le realiza al maíz. El proceso consiste en cocer el maíz con agua e hidróxido de calcio (1-3%) durante 20-40 min., seguido de un reposo de 12 hrs. Los granos se lavan (descartando el agua de cocción) y se muelen en un molino de piedra, obteniéndose una masa.

A pesar de existir pérdidas de algunos aminoácidos, grasa y minerales, el maíz nixtamalizado presenta un mayor valor nutritivo que el maíz crudo.

Por otra parte la enfermedad de la pelagra causa dermatitis, diarrea y demencia, esta enfermedad se manifiesta en poblaciones como Africa, India y algunas regiones de Yucatán en México, cuya dieta está basada esencialmente en maíz sin ningún tratamiento térmico alcalino.

La pelagra se presenta normalmente debido a :

- Grandes deficiencias de niacina y triptofano en la dieta, siendo el triptofano precursor de la niacina en el humano, su equivalencia es de 60 mg de triptofano por 1 mg de niacina.

- Elevada concentración de leucina en el maíz que es aproximadamente de 12-15% de la proteína.

La alta relación de leucina/isleucina en el maíz se reduce en los tratamientos térmicos-alcálinos mejorando el valor nutritivo de la proteína (26).

Arroz

El arroz ocupa el tercer lugar, después del trigo y del maíz en términos de producción mundial de cereales; sin embargo, es el principal cultivo alimentario de casi la mitad del mundo.

Las zonas más importantes de cultivo son la India, Bangladesh, China, Japón y Asia Suroriental.

El arroz pertenece a la familia de las *gramíneas*. Se conocen más de 8,000 variedades de arroz que en gran medida forman dos grupos principales:

- La variedad Indica : *Oryza Sativa Indica*, que tiene un grano largo.

- La variedad Japónica : *Oryza Sativa Japónica*, que tiene el grano corto y mayor cantidad de almidón (53).

La composición del arroz va a variar dependiendo de la variedad, pero en general contiene de 6-10% de proteína, 2-2.5% de grasa y 72-74% de carbohidratos.

Las proteínas que se encuentran en el arroz son las gluteninas, prolaminas, globulinas y albuminas, de las cuales las que se encuentran en mayor porcentaje son las gluteninas. La proteína del arroz se considera de mejor calidad que la de los demás cereales, aunque al igual que todos éstos, tiene como aminoácido limitante a la lisina. Por lo tanto, esta proteína no es adecuada para el crecimiento óptimo de los niños, por lo que se requiere suplementar con los aminoácidos limitantes o bien, se puede complementar con leguminosas (54).

Su carbohidrato principal es el almidón y en cuanto a ácidos grasos, cuenta principalmente con el palmítico, oleico y linoleico.

Este cereal es el único que se utiliza como alimento en forma entero, descascarillado y pulido, por lo que se eliminan las vitaminas hidrosolubles que se encuentran principalmente en la cascarilla (19).

Se ha visto que el arroz está libre de tóxicos y factores antinutricionales, se considera un alimento que no produce alergia y es uno de los primeros alimentos que consumen los niños (55).

Comúnmente a los niños con diarrea se les da el agua de arroz con una pizca de sal. El agua de arroz es el agua con almidón que queda después de cocer el arroz durante 10-20 min., la solución electrolítica del agua de arroz se prepara añadiendo de 30 - 50 g de arroz/l agua, además de los electrolitos necesarios (Na, K, Cl).

En 1980 se comparó la solución de arroz con las soluciones empleadas para la rehidratación en niños con diarrea las cuales contienen generalmente glucosa o sacarosa con algunas sales y se encontró que el agua de arroz presenta varias ventajas:

- Rehidrata al niño y reemplaza a los electrolitos perdidos
- Disminuye y elimina la diarrea

- Es económica
- No aumenta la osmolaridad, lo que sucede con la glucosa.

Las desventajas que presenta son:

- Su vida de anaquel es corta debido al contenido de almidón ya que puede haber fermentación y crecimiento de bacterias después de 12 hrs.
- Requiere de cocción.
- Si la diarrea es muy aguda, a los niños menores de tres años se les dificulta la digestión de la solución (58).

Pollo

Durante las últimas décadas, la industria avícola en los E.U. ha llegado a ser la más eficiente como productora de proteínas animales en toda la historia de la avicultura (51).

Anteriormente, la mayor parte de la carne de pollo provenía de las mismas aves que producían huevos, pero actualmente se crían exclusivamente por su carne, con características óptimas de crecimiento rápido, resistencia a las enfermedades y carne blanda de buen sabor.

Las aves tienen valor económico bajo por unidad en relación a otras carnes, un tiempo de generación corto y sirven como fuente rica de nutrientes para la alimentación humana.

La clasificación comercial de las aves se basa generalmente en su edad y peso antes del sacrificio. Estas clasificaciones para los pollos empezando con los jóvenes incluyen: pollo de leche, asadero, capón, pollo para guisar y pollo viejo. La blandura de la carne disminuye proporcionalmente con la edad. Los pollos de leche se utilizan para el procesamiento en forma fresca y congelada. Dentro de estas clasificaciones hay también normas federales de calidad individual de las aves basadas en plumaje, forma, cantidad de carne, grasa y

ausencia de defectos.

La composición de las partes comestibles del pollo depende de la manera en que se parte y del método de cocimiento. La carne blanca asada sin pellejo contiene aproximadamente un 64% de agua, 32% de proteína y 3.5% de grasa. La carne oscura asada sin pellejo contiene más proteína y menos grasa que la roja. La proteína es de calidad excelente ya que contiene todos los aminoácidos indispensables y la grasa es más saturada que en la carne roja. Al igual que los otros tejidos animales la carne de las aves es una buena fuente de minerales y vitaminas del complejo B (57).

La fórmula a base de carne de pollo es una buena alternativa para alimentar niños con intolerancia a la lactosa. En las naciones en desarrollo ha habido la necesidad de sugerir el empleo de fórmulas "caseras" a base de carne de pollo.

Aún cuando la composición de estas fórmulas "caseras" tiene ciertas discrepancias entre unas y otras, no se ha cuestionado la bondad de su empleo, dado el consejo general de experiencias favorables que se han obtenido con ellas (43).

-Conservación por desecación.

La mayoría de los alimentos contienen humedad suficiente para que actúen sus propias enzimas y los microorganismos se desarrollen, por lo que hace siglos se ha empleado la desecación como método de conservación de los alimentos.

La desecación generalmente se practica eliminando el agua, pero cualquier método que reduzca la cantidad de humedad disponible en un alimento es una forma de desecación.

La aplicación de calor durante la desecación reduce el número total de microorganismos. La desecación generalmente destruye todas las levaduras y la mayoría de las bacterias, pero las esporas bacterianas y fúngicas suelen sobrevivir, lo mismo que las formas vegetativas de algunas bacterias termorresistentes, así mismo, si las condiciones durante el secado no son adecuadas, puede tener lugar el crecimiento de microorganismos.

Cualquier método que suponga un cambio brusco y considerable en la temperatura puede dañar el metabolismo de algunos microorganismos lo que hace mayores sus exigencias nutritivas.

El contenido microbiano y la temperatura del agua usada para hidratar de nuevo los alimentos puede afectar la calidad de los mismos.

Los microorganismos requieren una actividad acuosa (A_w) óptima y mínima, de las que depende su multiplicación; por lo tanto, si el alimento mantiene una actividad acuosa por debajo de la mínima en la que puedan crecer microorganismos, obtendremos un producto microbiológicamente estable (58).

La mayoría de los alimentos deshidratados tienen una actividad acuosa del orden de 0.2-0.3 por lo que están perfectamente protegidos frente a las alteraciones microbianas. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente,

pueden presentarse ciertos riesgos sanitarios por lo que existen argumentos válidos para utilizar en los alimentos deshidratados las normas microbiológicas, como parte final de un sistema de garantía preventiva.

Así mismo, las exigencias más estrictas corresponden naturalmente a las fórmulas deshidratadas para niños (59).

Secado por aspersión

Los métodos modernos de secado buscan otros fines que la simple preservación en los alimentos, la reducción de peso y algunas veces de volumen, constituye una importante ventaja para el transporte y almacenamiento, la comodidad de empleo también es una característica muy buscada (60,61).

El secado por atomización es el proceso de mayor aceptación para la formación de partículas. Se emplea para la producción continua de sólidos secos en forma de polvo, granulados o aglomerados partiendo de productos líquidos tales como soluciones, emulsiones y suspensiones bombeables.

El proceso consiste en la atomización de un líquido en una nube de pequeñas gotas, las cuales entran en contacto con el aire caliente en el interior de una cámara de secado. La nube del líquido atomizado es producida mediante un atomizador rotativo o por boquillas.

Se seleccionan las condiciones de operación y el diseño de la planta de acuerdo a las características del producto de alimentación y la especificación del producto final deseado (62). La evaporación de la humedad y la formación de las partículas secas tienen lugar bajo condiciones controladas de temperatura y caudal del aire de secado.

Los factores que deben tenerse presentes para un control adecuado en el secado son:

- 1) Temperatura de entrada y salida.
- 2) Humedad relativa del aire
- 3) Velocidad del flujo de aire
- 4) Tiempo de secado.
- 5) Presión de entrada y salida.

El control inadecuado de estos factores determina la aparición de endurecimiento externo debido a la mayor rapidez de evaporación de humedad superficial que de la interior (59).

El secado por aspersión conserva bien las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, debido a la rapidez del secado.

En los secadores de aspersión que son de gran tamaño, se puede reciclar una parte de las partículas ya secas, en forma de gotitas húmedas, con el fin de formar una aglomeración en gránulos de 100-250 μ m, que son más fácilmente rehidatables que los polvos finos (60).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Diversos agentes patógenos y toxigénicos se transmiten por los alimentos. Algunos ocasionan sus efectos tóxicos a través de los metabolitos producidos durante el crecimiento de microorganismos en los alimentos, otros mediante la ingestión de los microorganismos y algunos necesitan la ingestión elevada de gérmenes que esporulan en el tracto digestivo y liberan la toxina. La contaminación en el alimento puede tener lugar durante su industrialización o más probablemente durante su preparación (63,64).

Entre los requisitos que deben presentar los alimentos para que se consideren de buena calidad higiénica es que deben estar exentos de microorganismos peligrosos o que éstos se encuentren a un nivel que los haga inocuos. En general, no es posible examinar el alimento para investigar la presencia de cada microorganismo.

La práctica que ha estado vigente durante muchos años está representada por la determinación de la calidad higiénica de los alimentos, a través de su contenido de determinados microorganismos indicadores como son: mesófilos aerobios (recuento total de microorganismos), coliformes y enterococos (64).

Mesófilos aerobios

Cuando se pretende investigar la carga bacteriana en un alimento la técnica más utilizada es la de recuento en placa.

Cuando la concentración de mesófilos aerobios es alta, ésto nos indica la posible presencia de microorganismos patógenos.

Su análisis determina:

- La eficiencia del proceso de desinfección o cualquier otro tipo de tratamiento.

- Determina la aceptabilidad de un producto en términos de cumplimiento de una norma microbiana.

- Estima la peligrosidad del alimento.

Las técnicas que se han venido utilizando para su determinación son:

1.- Cuenta en placa

Esta técnica se aplica para una gran variedad de microorganismos. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus distintas necesidades

nutricionales, hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente.

2.- Técnica del número más probable (NMP)

Si la concentración de microorganismos en un alimento es pequeña o si el medio requiere de un enriquecimiento previo a la identificación de algún microorganismo, resulta más satisfactorio aplicar la técnica de dilución en tubos que la de recuento en placas (63,64,65,66,67).

Coliformes

Los organismos coliformes son buenos indicadores de contaminación fecal en agua.

Son bacilos cortos, gram (-), no esporulados, lactosa (+) con producción de gas en 48 hrs a 35 °C, oxidasa (-), resistentes a sales biliares y a colorantes.

Los coliformes comprenden además de *E. coli* las especies de *Enterobacter* y *Klebsiella* las cuales no son de origen fecal.

La *Escherichia coli* se acepta como el indicador más positivo de contaminación fecal.

Las técnicas que se han venido empleando para su determinación son las siguientes:

1.- Número más probable (NMP) que comprende dos etapas :

a) Prueba presuntiva, aquí se seleccionan los tubos de caldo lactosado donde existe formación de gas.

b) Prueba confirmativa, en éste se requiere de un medio selectivo como es el caldo bilis verde brillante.

2.- Se emplea el caldo Mac Conkey.

3.- Se usa caldo lactosa verde brillante, y posteriormente se confirma su presencia en agar bilis rojo violeta y en agar Endo (63).

Escherichia coli

El aislamiento de *E. coli* se puede agrupar en tres categorías:

a) Las patógenas oportunistas que son inofensivas en su habitat normal, hasta que llegan a otros sitios o tejidos. Pueden producir infecciones del aparato urinario, pulmonares, sépticas, de la piel y heridas, bacteriemias, meningitis y absesos.

b) Las *E. coli* enteropatógenas que causan gastroenteritis aguda en el tubo digestivo principalmente en recién nacidos o niños menores de 2 años.

c) Las *E. coli* productoras de enterotoxinas que son incapaces de invadir la mucosa intestinal, pero dejan en libertad la enterotoxina que es absorbida por las membranas de las células epiteliales que estimulan la actividad de la Adenilicilasa, produciendo enfermedades semejantes al cólera y a la disentería bacilar (63,66,69).

Salmonella

El género *Salmonella* está formado por bacilos no esporulados de pequeño tamaño y gram (-). Estos organismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza.

La toxoinfección alimenticia por *Salmonella* se produce por la ingestión de alimentos que contienen un número significativo de cepas activas (66).

Los alimentos involucrados con *Salmonella* son la carne y sus derivados, la leche y sus derivados y las verduras.

Todas las *Salmonellas* deben considerarse como potencialmente patógenas para el hombre.

Se diferencian de otros microorganismos entéricos y dentro de su género por reacciones bioquímicas, aspectos de las colonias en medios de cultivo diferenciales y por tipificación serológica (63,66,69).

Staphylococcus aureus

S. aureus es un microorganismo formador de toxinas, coco gram (+) y catalasa (+). El daño causado en el hombre es una intoxicación ya que las enterotoxinas responsables se encuentran preformadas en el alimento.

Después de un corto período de incubación el proceso se manifiesta muchas veces de modo fulminante, siendo el vómito y la diarrea sus síntomas principales. En raras ocasiones estas toxemias terminan en muerte a excepción de niños muy pequeños o personas débiles.

No todas las cepas producen enterotoxinas, siendo elevado el porcentaje en las cepas de origen humano y muy variado en las de origen animal. Las cepas enterotoxigénicas pueden encontrarse en los alimentos desde su obtención o bien, llegar posteriormente a ellos por manipulación. Un porcentaje de personas sanas son portadoras de *S. aureus* en fosas nasales y garganta. Este germen se encuentra también en la piel y sobre todo en procesos cutáneos (acné, heridas infectadas, etc.).

Si las condiciones de temperatura, pH, etc. son adecuadas, *S. aureus* se multiplica pudiendo alcanzar un nivel de 10^5 colonias/g y fomándose enterotoxinas suficientes para causar daño.

Estas toxinas presentan una gran termorresistencia y también son resistentes al pH. Los alimentos que se encuentran más implicados con esta intoxicación son aquellos que presentan una baja actividad acuosa (*Aw*) (63,64).

Hongos y levaduras

Los hongos y las levaduras son microorganismos que tienen interés como causa de alteración y como elementos biológicos utilizados en la manufactura de algunos alimentos como son queso o cerveza.

Ciertos hongos al desarrollarse en el alimento pueden producir toxinas dañinas para el hombre (micotoxinas).

Los hongos tienen una gran ubicuidad en la naturaleza, siendo muy comunes en el polvo y la tierra; las levaduras se desarrollan con facilidad en los utensilios y equipo mal lavados que se utilizan en industrias que manejan carbohidratos (64,69).

Hongos

Los hongos son microorganismos eucarióticos y quimioorganotróficos. Se reproducen en forma natural por medio de esporas aunque existen algunas excepciones.

No tienen clorofila y sus cuerpos son usualmente alargados o filamentosos.

Fisiológicamente, los hongos se adaptan a condiciones más severas que los otros microorganismos:

- A diferencia de las bacterias, soportan una presión osmótica elevada.
- Toleran y se desarrollan en condiciones de acidez elevada. Soportan un pH entre 2 y 9 aunque su pH óptimo es 5.6 (64,69).
- Pueden sobrevivir en ambientes deshidratados, donde producen esporas o pasan al estado de resistencia.

Casi todos los hongos son estrictamente aerobios, se desarrollan en condiciones de temperatura muy variadas siendo la óptima entre 22 y 30 °C para la mayor parte de las especies. Algunos hongos pueden crecer a 0 °C y algunos otros se desarrollan a 62°C.

La glucosa es una fuente de carbono muy aprovechada aunque también son utilizados otros azúcares como la sacarosa, la maltosa, y compuestos orgánicos como son el almidón y las celulosas (69).

Levaduras

Las levaduras se distinguen de los hongos ya que su forma dominante es unicelular. Generalmente se reproducen por gemación por lo que se reproducen más aprisa que los hongos filamentosos y en proporción a su peso, son más aptos para efectuar cambios químicos, se diferencian de la mayor parte de las bacterias por su tamaño relativamente grande y su morfología.

Las levaduras son capaces de crecer en un amplio margen de temperatura desde 0 hasta 47°C, algunas no se desarrollan a más de 15°C y otras lo hacen a temperaturas mucho menores. Su temperatura óptima está entre 20 y 30°C y las variedades patógenas crecen bien entre 30 y 37°C.

En general las levaduras se desarrollan mejor en medios ácidos (pH ajustado entre 3.5-3.8) donde se inhiben casi todas las bacterias (63,64,69).

En el cuadro No. 4 se presentan las especificaciones de microorganismos en fórmulas no lácteas (70).

CUADRO No. 4

Especificaciones de microorganismos en fórmula en polvo no lactea

Determinación	Especificación
Cuenta Microbiana	No más de 10000 UFC/g
Hongos y levaduras	No más de 50 UFC/g
Salmonella sp	Ausente
Staphilococcus aureus	Ausente
Escherichia coli	Ausente

*UFC = Unidades Formadoras de Colonias

ANÁLISIS PROXIMAL

El análisis proximal consiste en la estimación porcentual de un cierto componente del alimento en forma general, incluye las determinaciones de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda, fibra cruda y carbohidratos asimilables por diferencia.

Este análisis conocido también como sistema analítico Weende, fué desarrollado en Alemania hace más de 100 años y es de gran importancia en la nutrición.

Humedad

Todos los alimentos contiene una cierta humedad, la cual se define como el material perdido por un alimento durante el calentamiento del mismo a temperaturas no superiores a la de ebullición del agua o al ponerlo en contacto con un agente deshidratante o por calentamiento al vacío.

Algunas ventajas que resultan de su determinación son:

- 1) Permite expresar los resultados en una cierta base (húmeda o seca).
- 2) Permite saber la cantidad real de otros nutrimentos en el alimento.
- 3) Tiene gran importancia económica.
- 4) Nos da una idea de la estabilidad del alimento (71.72).

Cenizas

La determinación de cenizas en un alimento es importante ya que nos proporciona la siguiente información:

- 1) Grado de refinación del alimento.
- 2) Adulteraciones en el alimento.
- 3) Permite cuantificar la materia orgánica presente y realizar la determinación de minerales (71.72).

Proteína cruda

La determinación de proteína cruda incluye no sólo el nitrógeno proveniente de las proteínas de las muestras sino también el nitrógeno de cuerpos nitrogenados no proteicos como son aminoácidos libres, aminas, etc.

Esta determinación se realiza generalmente mediante el método de Kjeldahl, el cual supone que las proteínas contienen 16% de nitrógeno. De esto resulta un factor (6.25) que se utiliza para calcular la cantidad de proteína en la muestra apartir de la cantidad de nitrógeno encontrado. Este factor varía en algunos alimentos.

La importancia de las proteínas es la siguiente:

- 1) Nutricional, ya que son nutrimentos indispensables para el organismo.
- 2) Contribuyen a las propiedades organolépticas del alimento.
- 3) Influyen en la textura y propiedades reológicas de los alimentos.
- 4) Es un índice de calidad en diferentes alimentos (71,72).

Grasa cruda

La determinación de grasa cruda es también llamada extracto etéreo, incluye una gran variedad de compuestos orgánicos y la importancia de las grasas es la siguiente:

- 1) Son fuentes importantes de calorías.
- 2) Permiten almacenar vitaminas liposolubles.
- 3) Forman parte de la membrana celular.
- 4) Son acarreadores de algunas proteínas.
- 5) Influyen en las propiedades sensoriales del alimento.
- 6) Permiten saber si ha habido adulteraciones en algunos alimentos (71,72).

Fibra Cruda

La fibra cruda está compuesta por carbohidratos como la celulosa, la hemicelulosa, lignina y pentosanos. La fibra beneficia las funciones intestinales; por lo tanto, si no la ingerimos se pueden presentar problemas graves como constipación, estreñimiento, etc. (73).

Carbohidratos asimilables

Los carbohidratos asimilables son la fuente energética más importante y se obtiene por diferencia después de haber realizado la determinación porcentual de los otros componentes de la muestra (71).

En el cuadro No.5 se presentan las especificaciones del contenido de humedad, proteína, grasa vegetal y carbohidratos en fórmulas no lácteas (70):

Cuadro No. 5

Especificaciones del contenido Nutricional en una fórmula no láctea en polvo

Determinación	Especificación
Humedad	No más del 3,0%
Proteína	Entre 13,0 y 18,0%
Grasas Vegetal	De 8,0 a 18,0%
Carbohidratos	De 53,0 a 66,0%

PROPIEDADES FÍSICAS, REOLÓGICAS, DE RECONSTITUCIÓN Y ESTABILIDAD DE ALIMENTOS EN POLVO.

Cuando se produce un alimento en polvo para uso comercial, éste tendrá que llenar ciertos estándares físicos, químicos y microbiológicos; por lo tanto, es de vital importancia disponer del análisis de los polvos para conocer si éstos cubren los requerimientos dados por las autoridades oficiales y si no como pueden alterarse los parámetros de secado para cambiar sus propiedades.

Las propiedades físicas y químicas de las leches en polvo tienen especial importancia en relación con su envasado, almacenamiento y utilización (74).

Propiedades físicas

El comportamiento físico de materiales en polvo está determinado por la magnitud del parámetro de cohesión entre las partículas.

La cohesión a su vez es función de propiedades intrínsecas del material como su composición y condiciones ambientales (humedad relativa y temperatura). Sin embargo, la medición directa de la magnitud de cohesión es poco confiable y se requiere de instrumentos especializados y costosos, una alternativa es medir propiedades del polvo que le estén correlacionados.

La densidad y la comprensibilidad son propiedades físicas que pueden ser correlacionadas con la cohesión.

La información cuantitativa de tales propiedades encuentran utilidad práctica como control del comportamiento de materiales en polvo durante su procesamiento o almacenamiento bajo diferentes condiciones o como criterio de calidad de las materias primas, producto semielaborado y/o terminado (75).

Las determinaciones que comúnmente se les realiza a las leches en polvo para conocer su comportamiento físico son: humedad y densidad.

Humedad

El contenido de humedad tendrá una influencia en la conservación de la calidad del polvo. Un alto contenido de humedad decrementará la conservación de la calidad en las fórmulas en polvo, ya que las proteínas se desnaturalizan a causa de las reacciones de Maillard, que es una reacción entre los aminoácidos y los azúcares presentes y el polvo puede volverse granuloso.

La humedad se puede controlar por la temperatura de salida del secador o aplicando más calor al fluidizador. La absorción del agua debe eliminarse y se recomienda una rehumidificación del aire de enfriamiento, en las áreas húmedas.

El material de empaque debe de ser de tal calidad que solo muy poco vapor pueda penetrar a la bolsa o contenedor. Como siempre hay alguna difusión de vapor, se recomienda almacenar el polvo en un lugar frío y seco donde la presión de vapor de agua sea baja.

Densidad

La densidad se define como el peso de un volumen dado del polvo y es expresado en g/ml, g/100ml, g/l.

La densidad es una propiedad importante desde el punto de vista económico, comercial y funcional. Cuando los polvos son enviados a grandes distancias, los productores se interesan en una alta densidad para reducir los volúmenes de embarque. Una alta densidad también reduce los requerimientos de material de empaque y capacidad de almacenamiento.

La densidad es también una importante característica de los polvos, ya que influye en las propiedades de instantaneidad.

La densidad de la leche en polvo es una propiedad muy compleja, ya que es el resultado de muchas otras propiedades, los factores que determinan principalmente la densidad son:

1) Densidad de las partículas

La densidad de las partículas se da por la densidad de los sólidos en polvo y del aire ocluido de las partículas. La densidad de los sólidos del polvo no se puede cambiar sin alterar su composición y es por lo tanto constante para un producto dado. El contenido de aire ocluido esta influido por varios factores:

- Temperatura de pasteurización
- Cantidad de aire concentrado
- Capacidad de formación de espuma del concentrado
- Condiciones de secado.

2) Cantidad de aire intersticial

Está determinada por la distribución del tamaño de partícula y el grado de aglomeración. Un polvo con partículas del mismo tamaño sería ideal desde el punto de vista de secado, pero indeseable desde el punto de vista de densidad, ya que el espacio de aire entre las partículas sería muy grande, dando así una baja densidad. Lo ideal es una amplia distribución de tamaño de partícula con suficientes partículas pequeñas para llenar los espacios externos entre las partículas medianas y grandes, resultando así un polvo con una alta densidad.

3) Fluibilidad

La fluibilidad de un polvo aún no se comprende completamente, una buena fluibilidad se obtiene de las partículas grandes y de los aglomerados sin partículas pequeñas. Esto sin embargo, tenderá a decrementar la densidad (76).

Pruebas de reconstitución de la leche en polvo

Entre las principales propiedades de la leche en polvo que regulan su capacidad para la reconstitución mediante la adición de agua, se encuentra la humectabilidad, es decir la capacidad de penetrar rápidamente el agua; su dispersabilidad y solubilidad, todas estas propiedades están ligadas entre sí. La composición de las partículas es una de las más importantes, un alto contenido de grasa, la presencia de triacilglicéridos de alto punto de fusión y la existencia de grasa libre son factores desfavorables para la humectabilidad y dispersabilidad adecuadas.

La reconstitución de una masa de polvo es complicada, el polvo es una superficie compuesta, con un gran sistema ramificado de capilares de varias dimensiones y un patrón geométrico, teniendo diferentes efectos de atracción

El efecto capilar, depende de la estructura del polvo tal como el tamaño de los aglomerados, el tamaño y la cantidad de las partículas no aglomeradas, la cantidad de aire intersticial y el área superficial del polvo (77).

Los caracteres físicos del polvo también intervienen en la aptitud para la reconstitución. La humectabilidad y dispersabilidad aumenta con el tamaño de las partículas. La humectabilidad se ve mejorada con el aumento del peso específico ya que se puede vencer más fácilmente la tensión superficial del agua, también se ha observado que las partículas que tienen una superficie irregular presentan una mejor humectabilidad que las esféricas. Las condiciones en que se efectúa la reconstitución también juega un papel; la temperatura del agua es el factor más importante. La humectabilidad y la dispersabilidad aumentan cuando la temperatura del agua esta de 20-50 °C y disminuye a temperaturas superiores.

En la leche entera hay un aumento sensible de la dispersabilidad entre 32 y 38°C (zona de temperatura que corresponde al punto de fusión de la grasa) (78,79).

En el caso de la leche en polvo, se requiere que el agua esté a más de 40°C, ya que las partículas de la leche entera están cubiertas por una delgada capa de grasa que hace que el polvo sea repelente al agua fría (80).

Las principales pruebas que se realizan para conocer la reconstitución de una leche en polvo son las siguientes: humectabilidad, solubilidad y volumen de sedimentación.

- Humectabilidad

En general la humectación es un proceso en el cual la fase gaseosa de la superficie de la fase sólida es reemplazada por una fase líquida. Estas tres fases coexisten durante algún tiempo tal, que no sólo es posible, sino usualmente inevitable cierta cantidad de intermezclas y soluciones.

El factor determinante para la completa humectación es la tensión interfacial entre las partículas de superficie y el agua. Las partículas de la leche en polvo descremada usualmente serán fácilmente humectadas, esto se presenta sólo cuando tengan menos de 0.03% de grasa sobre la superficie, ya que el material principal del polvo es la lactosa y proteínas, los cuales absorben agua rápidamente.

Sin embargo, las partículas de la leche entera en polvo están siempre cubiertas por una capa de grasa haciéndolas repelentes al agua. Esta repelencia al agua de las partículas a causa de su cubierta de grasa se puede vencer, y conseguir una tensión interfacial, facilitando la humectación por adición de tensoactivos.

Se sabe que los fosfolípidos tales como la lecitina son utilizados para este propósito. La lecitina presenta la ventaja de ser un producto natural y también un componente natural de la leche.

Cuando las partículas han sido humectadas, los componentes individuales del polvo de leche empiezan a disolverse y dispersarse formando así una solución concentrada de leche alrededor de las partículas. Al mismo tiempo las partículas empiezan a hundirse al fondo, pero para que las partículas se hundan su densidad debe ser mayor que la del agua.

Como se mencionó, el polvo es una superficie compuesta con un gran sistema ramificado de capilares de varias dimensiones y un patrón geométrico, teniendo diferentes efectos de atracción capilar.

Bajo estas condiciones, debo haber humectación no solo sobre la superficie del agua sino también de las partículas situadas encima de la superficie mediante la extracción del agua hacia ellas por atracción capilar. La mayoría de veces, este reemplazamiento del aire intersticial por agua, a través de la penetración capilar, es incompleto, es insuficiente la cantidad de penetración de agua tal que quedan burbujas de aire entre las partículas humectadas. Teniéndose 3 fases simultáneas coexistiendo en varias concentraciones.

Esta coexistencia es perjudicial debido a que después de un tiempo, el espacio entre las partículas se va llenando con leche de diferentes concentraciones produciéndose una jalea pegajosa con islas de polvo sin humectar y aire residual, además que se crean grumos que son húmedos e inflados afuera y secos adentro. Como éstos son impenetrables al agua, es extremadamente difícil su completa reconstitución aún con fuerte agitación.

La penetración del agua dentro del polvo, se elimina fácilmente cuando el polvo de leche contiene grandes aglomerados. La aglomeración se controla mediante la introducción de polvos finos a la cámara y la cantidad de polvos reciclados (77).

- Solubilidad

La leche en polvo obviamente tiene que ser soluble en agua; sin embargo, no todos los componentes del polvo son redisueltos cuando se reconstituye en agua.

La determinación del valor de la solubilidad de la leche en polvo es fundamentalmente empírica, depende de factores como el método de deshidratación, la temperatura de secado, la acidez y el método de realizar la prueba. Los resultados tienden a ser comparativos.

La mayor parte de los polvos secados por aspersión son casi 100% solubles mientras que la solubilidad de los polvos secados en cilindro usualmente es del 80-95%. En la norma de leche entera en polvo del IMSS, se especifica un valor mínimo de 98% de solubilidad.

Los polvos que son humedecibles, dispersables y se disuelven en agua en pocos segundos sin agitación, pueden tener propiedades de almacenamiento inferiores debido al contenido de humedad (81).

Volumen de sedimentación

Por razones termodinámicas, una vez iniciado el proceso de dispersión se desarrolla simultáneamente una tendencia del sistema a volver de un estado energéticamente más estable, manifestada por fenómenos de sedimentación, floculación y coalescencia. Si estos cambios físicos no se inhiben o controlan no

se lograrán buenas dispersiones o éstas se perderán durante su vida en el estante.

Cuando se reconstituyen leches en polvo con poca solubilidad, se forma en la base del recipiente un sedimento constituido, en gran parte por glóbulos de grasa que han llevado a la superficie algo de proteínas insolubles.

El volumen de sedimentación (F) es la relación entre el volumen de equilibrio (V_u) y el volumen total de la suspensión (V_o).

$$F = V_u / V_o$$

Cuando aumenta el volumen de sedimentación que aparece ocupado por el sedimento, también aumenta el valor F; que normalmente es de 0-1. En el sistema donde $F = 0.75$ por ejemplo el 75% del volumen total en el recipiente está aparentemente ocupado por flocúlos que forman el sedimento.

Es evidente que en una suspensión determinada si es posible hacer que F se acerque más a la unidad del producto se hace más aceptable, porque el volumen del sobrenadante se reduce progresivamente. Cuando $F = 1$ no hay sedimento visible aunque el sistema está floculado. Esta es la suspensión ideal porque en estas condiciones no hay sedimentación y la suspensión tiene un aspecto estético, debido a que no presenta un sobrenadante claro o visible (82).

Pruebas reológicas de los polvos.

Existen varios tipos de fuerzas que pueden actuar entre las partículas sólidas. Pipel identificó 5 tipos de fuerza: fuerza friccional, fuerza de tensión superficial, fuerza mecánica, fuerza electrostática y fuerza cohesiva.

Estas fuerzas pueden afectar a las propiedades de flujo de un sólido. Los factores que influyen en las propiedades de fluidez en un polvo son :

- 1.- Tamaño de partícula
- 2.- Forma de partícula
- 3.- Textura de superficie (asperocidad)
- 4.- Energía de superficie
- 5.- Grado de interacción partícula-partícula.

Comúnmente las propiedades que se consideran para el comportamiento de fluibilidad en los polvos son: ángulo de reposo y velocidad de flujo

Angulo de reposo

Diferentes tipos de propiedades angulares han sido empleadas para evaluar la fluibilidad de los polvos, algunas de ellas son:

- 1.- Angulo de reposo
- 2.- Angulo de deslizamiento o fricción
- 3.- Angulo de ruptura
- 4.- Angulo de espátula
- 5.- Angulo de fricción internacional

El ángulo de reposo y el ángulo de fricción internacional son los más usados para predecir el flujo de la partícula.

El valor del ángulo de reposo para un polvo es dependiente de las propiedades de la superficie de la partícula, el cual puede afectar también a la fluidez del mismo.

Varios factores han sido estudiados en base al ángulo de reposo , como son tamaño de partícula, deslizamiento, efectos de humedad y forma de partícula.

Se ha observado que el ángulo de reposo se comporta de la siguiente manera:

- Generalmente se incrementa conforme el tamaño de la partícula reduce.
- Aumenta su valor conforme el % de fineza de la partícula incrementa.
- Cuando los materiales son expuestos a altas humedades , el material se vuelve más cohesivo y se apelmaza presentando características de fluidez pobre.

- Incrementa conforme el coeficiente de deformación de la partícula incrementa .

En general el ángulo de reposo no es una propiedad inherente de un sólido, pero su valor nos puede ayudar a conocer los parámetros para el diseño de equipo y las condiciones de calidad del producto (83).

Según el ángulo de reposo, los polvos se clasifican de la siguiente forma:

Aquellos que fluyen:	Angulo de reposo
- Muy ligeramente	< 25
- Ligeramente	25-55
- Moderadamente	56-60
- Polvos cohesivos	> 60

Siendo lo ideal que fluyan moderadamente (3).

Velocidad de Flujo

En la evaluación del movimiento de una formulación, la medición de la velocidad de flujo es más significativa que la del ángulo de reposo el cual es una característica estática de la partícula. El movimiento de un polvo o granulado se expresa mejor mediante un término dinámico como es la velocidad de flujo a través de un flujómetro. La correlación entre la velocidad de flujo y el ángulo de reposo es muy pobre.

La uniformidad del movimiento puede ser determinada graficando el peso del fluido proveniente del flujómetro contra tiempo. Si la gráfica obtenida es una línea recta el flujo y el movimiento son uniformes. Si la gráfica obtenida no es una línea recta, el flujo no es uniforme y el movimiento a través del equipo puede no ser satisfactorio (84).

Estabilidad al calor

Las proteínas se modifican en cierto grado al aplicarles calor, tanto en sus propiedades físicas como en su utilidad fisiológica. Por los métodos de cocción comunes, las proteínas de huevo, carne y pescado se coagulan por el calor pero no cambia su contenido de aminoácidos.

En las Normas de leche entera en polvo y de fórmulas no lácteas en polvo del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se utiliza la prueba de estabilidad al calor como un control de calidad. En esta prueba la muestra no debe precipitar, lo que nos indica que es estable al calor (14,68,70).

Deterioro de Lípidos

Las grasas y los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo de los alimentos, y además producen compuestos volátiles que imparten olores y sabores desagradables. Esto se debe a que el enlace éster de los acilglicéridos es susceptible a la hidrólisis química o enzimática, ya que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación. Los ácidos grasos insaturados predominan en los aceites vegetales y en las grasas de animales marinos, por lo que estos alimentos son más susceptibles a deterioro.

El deterioro de lípidos se divide en dos grupos de reacciones :

- Rancidez hidrolítica, ésta se debe a la acción de las lipasas que liberan los ácidos grasos de los triacilglicéridos.

- Rancidez oxidativa, ésta se refiere a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos.

Índice de peróxidos

Los productos primarios de la oxidación de los lípidos son los hidroperóxidos que normalmente reciben el nombre genérico de peróxidos.

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados es del tipo de reacción en cadena, que consta de tres pasos: iniciación, propagación y terminación.

En la reacción de iniciación el oxígeno se une al ácido insaturado produciendo los correspondientes hidroperóxidos ($RH + O_2 \rightarrow ROOH$). Durante esta etapa se sustrae uno de los átomos de hidrógeno adyacentes a la doble ligadura, formándose un radical libre al cual el oxígeno se pueda unir fácilmente. Posteriormente, el radical hidroperóxido reacciona con nuevos ácidos grasos, formando más radicales libres con lo cual se propaga la reacción. El paso final de las reacciones de oxidación se efectúa a través de reacciones de condensación, donde se forman compuestos muy estables.

Los hidroperóxidos formados en la etapa de propagación continúan proveyendo de radicales libres a la reacción, y tienen la capacidad de interaccionar con otras moléculas o de intervenir en reacciones secundarias, generando nuevas sustancias.

Debido a que los peróxidos son productos intermedios de una secuencia de reacciones y en determinadas condiciones se descomponen rápidamente tras su formación, el empleo de la concentración de peróxidos como índice de oxidación es muy relativo.

El índice de peróxido se basa en un análisis yodométrico sujeto a muchas variaciones. El método oficial del AOCS. es el más empleado y el que generalmente se usa para efectos comparativos (26).

Índice de acidez

La acidez está representada por una suma en la que ninguno de los componentes se conoce con exactitud :

Acidez natural + reacciones secundarias + acidez desarrollada

La acidez de los lípidos comestibles está relacionada con su calidad, ya que favorece el enranciamiento. Los aceites recientemente procesados son prácticamente neutros y los ácidos grasos que los conforman se encuentran en forma esterificada; pero a medida que envejecen, se liberan ácidos grasos y esta liberación se incrementa en condiciones inadecuadas debido a la acción enzimática y al desarrollo de microorganismos. Así mismo, la luz, el calor, la humedad y la presencia de algunos metales aceleran el deterioro de las muestras (26,86).

Determinación de pH

Los valores de pH y acidez no están estrechamente ligados. La intensidad de los cambios que sufren los alimentos durante su conservación y almacenamiento es influida marcadamente por la concentración del ión hidrógeno más que por la acidez titulable.

Así mismo, los valores de pH representan un estado y son más significativos que los valores de acidez, especialmente en lo que se refiere a la estabilidad del alimento. De aquí que la medición de pH es importante para establecer la efectividad de los conservadores, así como para regular las operaciones de fabricación de alimentos (81).

PARTE EXPERIMENTAL

1.- Materias Primas

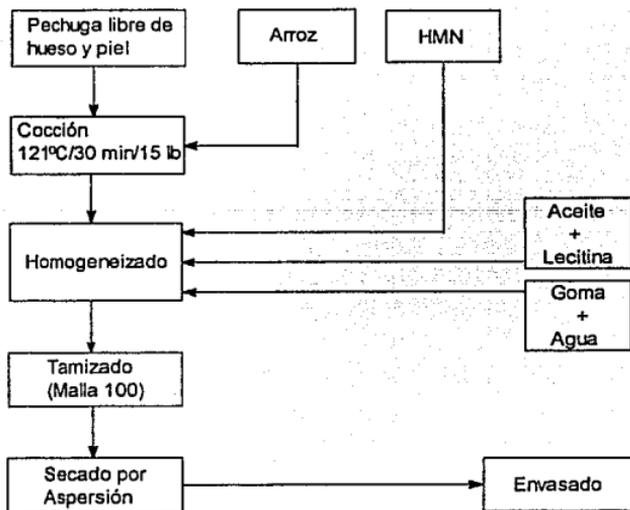
- Pechuga de pollo sin hueso y sin piel (P).
- Harina de maíz nixtamalizado marca Maseca (HMN).
- Arroz marca Morelos (A).

2.- Fórmulas seleccionadas

- P:HMN (50:50)

- P:A (50:50)

2.1 Diagrama de flujo del proceso de elaboración de las fórmulas.



*Nota.- Se siguen las mismas operaciones unitarias para cada fórmula.

2.2 Condiciones de Secado de las fórmulas: Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN) y Pollo-Arroz (P-A):

Fórmula	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	% de Sólidos de la solución inyectada al secador
P-HMN (50:50)	200	100-110	15
P-A (50:50)	200-210	100-110	15

3.- Análisis proximal de cada una de las fórmulas y de las materias primas empleadas.

4.-Determinación de la densidad calórica

5.- Determinación de los parámetros físicos, reológicos y de reconstitución.

6.- Pruebas de estabilidad (estabilidad al calor, acidez, pH e índice de peróxidos).

7.- Análisis microbiológico.

ANALISIS PROXIMAL

Los polvos obtenidos mediante un secado por aspersión, se les realizó un análisis proximal en base a los métodos del AOAC, el cual consta de las siguientes determinaciones: (87)

- Humedad
- Cenizas
- Proteína cruda
- Grasa Cruda
- Fibra Cruda
- Carbohidratos por diferencia

Humedad

Fundamento :

Esta determinación se basa en la pérdida de humedad de un muestra cuando se aplica calor. Si ésta se realiza a presión reducida, el punto de ebullición del agua se abate y es menor el daño que sufre la muestra por efecto de la temperatura (87, 88).

Material

- * Estufa de vacío LAB-LINE mod. 3620
- * Charolas de aluminio
- * Desecador
- * Balanza analítica

Procedimiento

Se pone a peso constante la charola de aluminio donde se va llevar a cabo la determinación colocándola en la estufa de vacío a 60-65 °C durante 1 a 2 horas aproximadamente. Una vez que está a peso constante se pesan alrededor de 2 a 3 gramos de muestra (la cual debe estar molida homogénea) y se meten la charola con la muestra a la estufa de vacío a 60-65 °C durante un tiempo determinado (4 hrs aproximadamente) se saca la charola, se coloca en un desecador donde se deja enfriar hasta llegar a temperatura ambiente y se pesa. El procedimiento anterior se repite hasta que dos pesadas sucesivas no registren una diferencia de 0.001 g.

Cálculos :

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{m} \times 100$$

Donde:

P_i = Peso de la charola más muestra húmeda (g)

P_f = Peso de la charola más muestra seca (g)

m = Peso de la muestra (g)

Conizas

Fundamento :

Las cenizas forman el residuo inorgánico que queda después de una incineración de la materia orgánica del alimento, por lo cual se puede cuantificar mediante una diferencia de pesos después de haber realizado la incineración (87, 88).

Material

- * Muffa THERMOLYNE, MOD. 1500
- * Balanza analítica
- * Desecador
- * Crisoles de porcelana

Procedimiento

Poner los crisoles a peso constante colocándolos en la muffa a una temperatura de 500 - 550 °C. Una vez que están a peso constante se pesan de 2 a 3 g. Y los crisoles junto con las muestras se colocan en un tripié con un triángulo de porcelana dentro de una campana y se calienta poco a poco con el mechero hasta lograr la carbonización completa de la muestra, luego se lleva a la muffa la cual debe encontrarse a una temperatura de 500-550 °C durante el tiempo necesario (2 hrs o más) hasta obtener cenizas blancas o grises homogéneas. Se dejan enfriar los crisoles, se colocan en un desecador y ya que están a temperatura ambiente se pesan.

Cálculos:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

P_f = Peso del crisol con las cenizas

P_o = Peso del crisol vacío

m = Peso de la muestra en gramos

Proteína cruda

Fundamento:

Esta determinación se realiza mediante el método de Kjeldahl, el cual se basa en la oxidación de la materia orgánica mediante una mezcla digestiva (H_2SO_4 , H_3PO_4 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) formándose una sal fija de sulfato ácido de amonio (NH_4HSO_4). Posteriormente se realiza una destilación durante la cual se libera el amoníaco de dicha sal mediante la adición de NaOH al 60% que se fija en una solución de ácido bórico formándose borato de amonio el cual se titula con una solución valorada de ácido clorhídrico. De esta forma se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra el cual al multiplicarlo por un factor, nos da el porcentaje de proteína cruda (87, 88).

Material y reactivos

- * Digestor TECATOR MOD. ab-20/40
- * Dispositivo de microdestilación LABCONCO
- * Tubos de digestión TECATOR de 75 ml
- * Balanza analítica
- * Mezcla digestiva (a)
- * Peróxido de Hidrógeno al 30%
- * Sulfato de Potasio RA
- * Solución de Hidróxido de sodio al 60%
- * Solución de ácido bórico con indicadores (b)
- * Solución de ácido clorhídrico 0.01N valorada

a) Mezcla digestiva : Disolver 3 g de Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en 20 ml de agua destilada, agregar 50 ml de ácido ortofosfórico ($H_3 PO_4$) y una vez que esté bien disuelta la sal, adicionar con cuidado y resbalando por las paredes 430 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se deja agitando la muestra durante 30 minutos aproximadamente

b) Solución de ácido bórico con indicadores: Se pesan 5 g de ácido bórico y se colocan en un matraz aforado de un litro, se adiciona agua destilada hasta disolver y se agregan 35 ml del indicador A (100 mg de fenolftaleína aforados a 100 ml con alcohol etílico) y 10 ml del indicador B (33 mg de verde bromo cresol más 66 mg de rojo de metilo aforados a 100ml con alcohol etílico). Se ajusta el color a un tono café rojizo con ácido o álcali según se requiera y se afora a un litro con agua destilada.

Procedimiento

Pesar de 20 a 80 mg de muestra (dependiendo de la cantidad de proteína de la misma) y colocarla en el tubo de digestión, agregar 0.5 g de sulfato de potasio y 3 ml de mezcla digestiva. Colocar el tubo en el digestor a 370°C durante 15 min. Después de ello sacar el tubo del digestor, dejar enfriar y adicionar 1.5 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % y colocar nuevamente en el digestor que se encuentra a 370°C. Se considera que la digestión está realizada cuando el tubo no muestra manchas ni puntos negros y la mezcla de digestión es transparente.

Una vez realizada la digestión se deja enfriar el tubo y se procede a realizar la destilación en el microdestilador el cual debe estar previamente caliente. La muestra se vacía en la copa de adición del dispositivo, el tubo de digestión se enjuaga dos veces con la mínima cantidad posible de agua destilada y este contenido se adiciona a la unidad de destilación. Posteriormente, se adiciona 15 ml de NaOH al 60 % a la copa enjuagando la misma con agua destilada.

El destilado se recibe en un vaso de precipitado que contenga 50 ml de ácido bórico y la destilación se continua hasta completar un volumen de 100 -

125 ml. Una vez que se acompleta la destilación, el destilado se titula con HCl 0.01 N hasta que vire el color de verde esmeralda a un rosa claro.

Cálculos:

Es conveniente realizar un blanco donde se sustituya la muestra por el equivalente en peso de glucosa o sacarosa trabajándose en la misma forma.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(P - B) \times N \times \text{meq} \times 100}{m}$$

$$\% \text{ Proteína cruda} = \% \text{ N}_2 \times 6.25$$

Donde:

P = ml de la titulación de las muestras

B = ml de la titulación del blanco

N = normalidad de la solución de HCl

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014)

m = peso de la muestra en gramos

Grasa cruda

Fundamento:

Esta determinación se basa en la solubilidad de las grasas en éter etílico el cual se calienta y volatiliza y al hacer contacto con una superficie fría se condensa y pasa a través de la muestra arrastrando consigo sustancias

solubles en el éter. Finalmente el éter se evapora y en el vaso queda el residuo conocido como grasa cruda (87, 88).

Material y reactivos

- Equipo para desengrasar Goldfish MARCA LABCONCO
- Balanza analítica
- Estufa de vacío LAB-LINE MOD. 3620
- Cartuchos de celulosa de 22 x 80 mm
- Vasos de borde esmerilado
- Eter de petróleo RA

Procedimiento

Se colocan de 2 a 5 g de muestra seca dentro de un cartucho de celulosa y se tapa con un pedazo de algodón. El cartucho se coloca en el portadetal y éste a su vez en el seguro metálico del aparato. A continuación se colocan aproximadamente 50 ml del solvente (éter de petróleo) en el vaso esmerilado puesto previamente a peso constante y éste con la ayuda de un anillo metálico con rosca se coloca en el aparato de extracción. Se sube la parrilla hasta que quede en contacto con el vaso, se abre la llave del agua para que ésta circule sobre los refrigerantes y se procede a un calentamiento moderado que permita un período de extracción de aproximadamente 8 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción se bajan las parrillas de calentamiento, se retira el portadetal con el cartucho y se sustituye por el recipiente de recuperación, el vaso se calienta nuevamente para eliminar el éter del mismo, el cual es retenido en el tubo recuperador.

Una vez que el vaso esté libre del solvente, se coloca en la estufa de vacío a 60-65°C, durante 2 hrs, se deja enfriar en el desecador hasta temperatura ambiente, se pesa y se repite la operación anterior hasta que el vaso esté a peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{P_f - P_o}{m} \times 100$$

Donde:

Pf = Peso del vaso con el extracto etéreo

Po = Peso del vaso a peso constante

m = Peso de la muestra en gramos

Fibra cruda

Fundamento:

La fibra cruda es la fracción orgánica de la muestra que resiste un tratamiento sucesivo de ácidos y álcalis en caliente. Este residuo está compuesto principalmente por celulosa y en menores cantidades por hemicelulosa y lignina (87, 88).

Material y reactivos

- * Aparato de digestión para fibra MARCA LABCONCO
- * Estufa de vacío LAC-LINE MOD 3620
- * Muffa THERMOLYNE MOD 1500
- * Vasos de Berzelius de 600 ml Kimax
- * Crisoles de porcelana
- * H_2SO_4 al 1.25 % (P/V)
- * NaOH al 1.25 % (P/V)
- * Antiespumante (Emulsión Sigma-B)
- * Alcohol etílico RA

Procedimiento

Pesar de 3 a 5 g de muestra desengrasada en un vaso de Berzelius que contenga 0.5 g de asbesto limpio y calcinado y unas perlas de vidrio. Adicionar 200 ml de H_2SO_4 al 1.25 % que esté hirviendo y unas gotas de antiespumante. Colocar inmediatamente en el aparato de digestión, el cual debe estar previamente caliente y digerir durante 30 min exactamente. Posteriormente vaciar el contenido sobre un buchner que contenga un filtro de lino y realizar la filtración con ayuda de vacío, lavar el residuo con agua destilada caliente hasta eliminar el ácido (aprox. 500 ml).

Una vez lavado el residuo, transferirlo nuevamente al vaso de Berzelius, adicionar unas gotas de antiespumante y 200 ml de NaOH al 1.25 % que esté hirviendo y mantenerlo en el aparato de digestión durante 30 min exactos. Vaciar nuevamente al filtro de lino y lavar el residuo con agua caliente (aprox 500 ml) hasta eliminar el álcali. Finalmente, lavar el residuo con 25 ml de alcohol etílico.

Pasar el residuo a un crisol previamente puesto a peso constante, colocar en la estufa de vacío durante 4 a 8 hrs para su secado, enfriar en el desecador y pesar. A continuación carbonizar e introducir a la muffa para su

incineración, enfriar y pesar. Realizar esta operación hasta que el crisol esté a peso constante.

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P_s - P_c}{m} \times 100$$

Donde:

P_s = Peso del crisol con el residuo seco

P_c = Peso del crisol con el residuo calcinado

m = Peso de la muestra (referido al peso de la muestra original)

Carbohidratos asimilables

Fundamento :

Estos comprenden a los carbohidratos asimilables y digeribles para el hombre como son azúcares, almidones y derivados

Cálculos:

Este dato se obtiene en forma teórica por diferencia al restar al 100 % el resultado de la suma de los porcentajes de humedad, cenizas, proteína cruda, grasa cruda y fibra cruda de la muestra.

DENSIDAD CALORICA

Fundamento:

Para obtener el contenido calórico (cantidad de energía en términos de kilocalorías que proporciona un gramo de alimento), se somete una fracción de la muestra a una combustión total, dentro de un recipiente cerrado y en presencia de un exceso de oxígeno que asegure una completa combustión. En el caso de la bomba calorimétrica Gallenkamp, la elevación de la temperatura por efecto de la combustión, es detectada por un termopar acoplado a un galvanómetro de alta sensibilidad, produciéndose una deflexión que se traduce en una lectura, la cual al interpolarla en una curva patrón previamente establecida y de material de densidad energética conocida, proporcionará su valor calórico (36, 37, 38).

Material y reactivos.

- * Bomba calorimétrica GALLENKAMP, mod, CBB - 330 - 010L.
 - * Balanza analítica
 - * Estufa de vacío
 - * Crisoles de acero inoxidable de 2.54 cm de diametro
 - * Mecha de algodón de 50 mm de longitud
 - * Acido benzoico (valor calórico certificado) (a)
 - * Mango metálico prensador
- a) Acido benzoico usado como estándar termoquímico, cuyo valor calórico es de 26,454.3 Joules/gramo (pesado al aire).

Procedimiento

Pesar de 0.4 - 1.5 g de muestra finamente molida, dependiendo de su contenido de humedad y del contenido calórico esperado.

Es conveniente que la muestra se seque antes de su combustión, pero si su contenido de humedad es menor al 10 % aprox., la determinación puede realizarse directamente sobre la muestra.

Así mismo, se debe pesar una muestra que libere aproximadamente 4 Kcal.

Manejo de la muestra.- La muestra se coloca en el crisol junto con la mecha de algodón y se compacta con el mango prensador, es conveniente tomar un peso preeliminar (PP), y después de compactada la muestra un peso final (PF).

El crisol se coloca en la parte superior del pilar central de la bomba, y se introduce el extremo suelto de la mecha en el alambre de ignición.

Montaje de la bomba.- Revisar que el anillo sellador de la bomba esté en perfectas condiciones y en el canal circular, levantar con la mano izquierda el anillo metálico estriado y con la otra mano bajar el cilindro de la bomba sobre el anillo asegurador, girar el cuerpo hasta su cierre y por último girar en sentido contrario el anillo hasta su ajuste hermético. A continuación introducir la terminal (plug) del termopar en el orificio superior del cilindro de la bomba.

Llenado de oxígeno.- Una vez abierto el tanque de oxígeno y ajustada la válvula de reducción, se gira de 1/4 a 1/2 la perilla de oxígeno para obtener una presión de 25 atm y cerrar la perilla respectiva.

Ajustar el galvanómetro a cero con el ajuste grueso localizado en la parte inferior y si es necesario, con el ajuste fino (perilla central).

Ignición de la bomba.- Apartarse de la bomba calorimétrica y presionar el botón de ignición, esperar aprox. de 10 - 15 seg. y anotar la máxima deflexión

del indicador del galvanómetro. Una vez tomada la lectura, liberar los gases de combustión, quitar la terminal del termopar y remover el cuerpo de la bomba en forma inversa a como se realizó el cierre.

Por último, cerrar la válvula de liberación de los gases de combustión y enfriar la bomba por inmersión en un baño de agua - hielo.

Cálculos:

Se debe contar con una curva estándar para la cual se realiza la combustión de diferentes cantidades (150 - 700 mg) de ácido benzoico (Valor Calórico Certificado) y de la mecha sola para tomar una lectura correspondiente a cero de valor energético (blanco). Se elabora la gráfica del contenido energético vs lectura del galvanómetro y una vez obtenida la lectura, se convierte ésta en términos calóricos, de acuerdo a los siguientes factores:

1g de ácido benzoico = 26, 254.3 Joules

1g de ácido benzoico = 6, 270.7 calorías

1 Kcal = 4.1868 KJoules.

ANALISIS FISICO

A los polvos seleccionados de las mezclas Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (50:50) y Pollo-Arroz (50:50) se les realizó el análisis físico que se lleva a cabo en leches en polvo.

Los parámetros físicos son los siguientes:

- 1) Densidad
- 2) Humedad (Método del AOAC).

Densidad aparente

Fundamento:

Es una propiedad importante desde el punto de vista económico, comercial y funcional, se define como el peso de un volumen dado del polvo y expresado en g/ml, g/100ml y g/l (3, 87).

Material

- Probeta de 100 ml
- Balanza analítica

Procedimiento

La muestra en polvo se coloca en una probeta de 100 ml y se deja caer 20 veces a una altura de 10 cm. sobre una superficie suave. Posteriormente se mide el volumen alcanzado por el polvo y se pesa.

Cálculos:

$$P = \frac{m}{v}$$

Donde :

P = densidad

m = masa

v = volumen

PRUEBAS DE RECONSTITUCION

Se les determinó a los polvos seleccionados las pruebas de reconstitución siguiendo la técnica de polvos instantáneos. Las determinaciones son las siguientes:

- 1) Volumen de Sedimentación
- 2) Solubilidad
- 3) Humectabilidad

*Se utilizaron dos gomas: Guar y Xantana para ver si se modificaban estas pruebas y elegir la que proporciona mejores resultados.

Volumen de sedimentación

Fundamento:

El volumen de sedimentación es la relación entre el volumen de equilibrio y el volumen total de la suspensión (82).

Material

- * Balanza analítica
- * Probeta de 100 ml

Procedimiento

Se pesan 10 g de muestra y se colocan en una probeta de 100 ml, se afora con agua; posteriormente se agita cada 2 hrs, y una vez que han transcurrido 24 hrs, se toma la lectura del volumen de sedimentación.

Cálculos:

$$\text{V. de Sedimentación} = \frac{\text{V. de Sedimentación final}}{\text{V. de Sedimentación inicial}}$$

Donde: V. de sedimentación = 100 ml

*Nota.- lo ideal es que el volumen de sedimentación sea 1

Solubilidad

Fundamento:

La determinación del valor de solubilidad es fundamentalmente empírica y depende de factores como el método de secado, la temperatura de secado y la acidez. Por lo anterior, los resultados tienden a ser comparativos (81).

Material

- Centrífuga DYNAC
- Estufa de Vacío Marca LAB-LINE MOD. 3620
- Balanza analítica
- Charolas de aluminio

Procedimiento

Se pesan 4 g de muestra, se transfieren a un tubo de centrifuga de 50 ml, se agregan 32ml de agua a 50°C, se agita el tubo durante 10 segundos y se coloca en un baño de agua a 50°C durante 5 minutos. Se centrifuga la suspensión a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se deja enfriar en el refrigerador

durante 2 hrs, posteriormente se retira la capa de grasa formada en la superficie, y una vez que esté a temperatura ambiente, el tubo se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión homogénea. Se transfieren 2 ml de esta suspensión a una charola previamente puesta a peso constante y se pesa. Se evapora a sequedad en la estufa y posteriormente, se transfieren a una estufa de vacío hasta peso constante.

La suspensión que se encuentra en el tubo se vuelve a centrifugar a 2000 r.p.m. durante 10 minutos, se transfieren 2 ml del líquido sobrenadante a una charola puesta previamente a peso constante y se pesa. Se evapora a sequedad y se seca a 100°C hasta peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{100 (T_1) (S_2)}{T_2 S_1}$$

Donde:

T_1 = Peso de la suspensión tomada para la determinación de sólidos totales después de la primera centrifugación.

T_2 = Peso de la suspensión para la determinación de sólidos totales después de la segunda centrifugación.

S_1 = Peso de los sólidos totales correspondientes a T_1 .

S_2 = Peso de los sólidos totales correspondientes a T_2 .

Humectabilidad

Fundamento:

La humectabilidad es el tiempo en que tarda una cantidad de polvo en humedecerse cuando se pone en contacto con el agua, es una medida de la habilidad del polvo para ser humedecido con agua a una temperatura dada. Este método analítico sólo se realiza en polvos instantáneos.

Material

- * Vaso de precipitado de 100 ml
- * Cronómetro
- * Mechero
- * Balanza analítica
- * Termómetro

Procedimiento:

Se pesan 10 g de muestra en polvo por duplicado, se colocan en un vaso de precipitado que contenga 75 ml de agua a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se mide el tiempo que se requiere para que todo el polvo se humecte.

PRUEBAS REOLOGICAS

Estas pruebas se determinaron a los polvos seleccionados de acuerdo a las técnicas establecidas para polvos instantáneos y las determinaciones son las siguientes:

- 1) Angulo de reposo
- 2) Velocidad de flujo

Angulo de reposo

Fundamento:

El ángulo de reposo es una medida relativa de la fricción de las partículas de polvo y es una medida que forma la superficie lateral del cono con la horizontal. El ángulo de reposo es pequeño cuando se trata de partículas finas, angulares o pegajosas; los valores óptimos para obtener un polvo de buena calidad están entre 30 y 40 grados. (82)

Material

- * Embudo de flujómetro (cuyo diámetro interno es de 7 cm)
- * Soporte universal
- * Base sólida marcada con diferentes radios conocidos

Procedimiento

Se pesan 10 gramos de muestra en polvo y se hacen pasar a través de un embudo liso a una altura de 10 cm, para formar una pila sobre una superficie de papel. Una vez formada ésta, se mide su altura y su radio.

Cálculos:

$$\text{Tang} = \frac{h}{R} \quad \text{Angulo de reposo} = \text{tang}^{-1}$$

Donde:

h = altura del cono de polvo

r = radio del cono de polvo

Velocidad de flujo**Fundamento:**

La velocidad de flujo permite saber que tan fácil fluye un polvo, considerándose el tiempo que tarda en pasar una cierta cantidad de polvo a través de un embudo de flujómetro

Material

- * Embudo de flujómetro
- * Soporte Universal
- * Base sólida
- * Cronómetro

Procedimiento

Se pesan 10 gramos de muestra, se hacen pasar por un embudo y se mide el tiempo que tarda en caer.

Cálculos:

$$\text{Velocidad de Flujo} = \frac{m}{t}$$

Donde :

m = peso de muestra (g)

t = tiempo (s)

PRUEBAS DE ESTABILIDAD

Estabilidad al calor

Fundamento:

La estabilidad al calor es una prueba utilizada para el control de calidad de leches en polvo, como norma oficial no debe presentar coagulación de proteínas después de un calentamiento con una presión de 0.49 kg/cm^2 (14,70).

Material

- * Autoclave
- * Balanza analítica
- * Matraces Erlenmeyer de 250ml
- * Probetas de 100 ml

Procedimiento

Pesar con precisión 7.5 g de la muestra y transferirlos a un matraz Erlenmeyer, adicionar 60 ml de agua destilada hervida y fría, mezclar, tapar el matraz con un algodón. Posteriormente, calentar en autoclave y mantener una presión de 0.49 kg/cm^2 (7 lb/pulg) durante 7 minutos.

Observar si existe precipitación en las muestras. Si en la muestra no hay precipitación de proteínas indica que es estable al calor y la prueba se considera negativa.

Las muestras a las que se les realizó las pruebas de estabilidad (índice de peróxido, ácido y pH) se sometieron previamente a diferentes condiciones de almacenamiento que a continuación se mencionan:

- 1er lote

T = ambiente (20-22°C)

t₁ = 0-5 meses

t₂ = 12 meses

- 2o lote

T = refrigeración (4°C)

t₁ = 0-5 meses

t₂ = 12 meses

Tipo de empaque = Bolsa de papel

Índice de peróxidos

Fundamento:

El índice de peróxidos se determina mediante un análisis yodométrico. El método oficial del AOCS es el más empleado y el que más se utiliza para efectos comparativos. En este método, se denomina índice de peróxidos a los miliequivalentes de oxígeno activo contenidos en un kilogramo de la materia ensayada, y se calcula a partir de yodo liberado del yoduro potásico.

Se supone que los peróxidos u otros productos similares procedentes de la oxidación de grasas, oxidan al yoduro potásico por lo que el índice obtenido puede tomarse en una primera aproximación, como una expresión cuantitativa de los peróxidos de la muestra (26, 90).

Material y reactivos

- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Probeta de 50 ml
- Pipetas graduadas de 1 y 5 ml
- Bureta de 50 ml
- Solución de ácido acético - cloroformo (a)
- Solución saturada de yoduro de potasio (b)
- Solución indicadora de almidón al 1%
- Solución estándar de tiosulfato de sodio 0.01N

Preparación de reactivos:

(a) Solución de ácido acético-cloroformo: mezclar 3 volúmenes de ácido acético y 2 volúmenes de cloroformo.

(b) Solución saturada de yoduro de potasio: disolver yoduro de potasio en exceso en agua recientemente hervida y fría. Guardar en la oscuridad. Probar diariamente adicionando de 0.5 a 30 ml de la solución (a), enseguida añadir 2 gotas de la solución indicadora de almidón al 1 %. Si la solución se forma azul y requiere más de una gota de la solución estándar de tiosulfato para que el color desaparezca, deberá prepararse solución nueva.

Procedimiento

Pesar 5 gramos de muestra y someterlos a una extracción de grasa por el método del AOAC, pasar la grasa ya extraída a un matraz Erlenmeyer. Agregar 30 ml de la mezcla de ácido acético - cloroformo y mezclar. Añadir 0.5 ml de la solución saturada de yoduro de potasio, mezclar y adicionar 30 ml de agua. Titular lentamente con la solución estándar de tiosulfato de sodio mezclando vigorosamente hasta que casi haya desaparecido el color amarillo. Agregar aproximadamente 0,5 ml del indicador y continuar titulado mezclando

fuertemente hasta que le color azul desaparezca. Determinar simultaneamente un blanco, el cual consiste en una muestra de aceite vegetal con el cual se preparó la muestra original (90).

Cálculos:

$$I. \text{ Peróxidos} = \frac{n \times N \times 100}{m}$$

Donde:

n = ml de tiosulfato de sodio gastados en el problema - los ml gastados en el blanco.

N = normalidad del tiosulfato de sodio.

m = peso de la muestra.

Índice de Acidez

Fundamento:

La acidez es una expresión convencional del contenido en tanto por ciento de los ácidos grasos libres en una muestra.

La acidez puede ser medida mediante una valoración con álcali cuyo punto final depende del indicador seleccionado y el resultado obtenido se puede expresar en términos de un ácido en particular (91).

Material y Reactivos

- * Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- * Pipetas graduadas de 1 y 10 ml
- * Bureta graduada de 50 ml
- * Solución valorada de Hidróxido de sodio 0.1N
- * Solución indicadora de fenolftaleína.

Procedimiento

Pesar con precisión 1 g de la muestra, transferir a un matraz Erlenmeyer, disolver en 10ml de agua, agregar 5 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína y 20 ml de agua hervida y fría. Titular con la solución valorada de NaOH 0.1N, hasta que aparezca un color rosado, el cual persiste de 10 a 15 segundos (68).

Cálculos:

$$\% \text{ Acido oleico} = \frac{V \times N \times 0.0282 \times 100}{m}$$

Donde:

V = ml de la solución valorada de NaOH 0.1N gastados en la valoración.

N = normalidad de la solución de NaOH.

m = peso de la muestra en gramos.

0.0282 = meq de ácido oleico

Determinación de pH

Fundamento:

La determinación potenciométrica de pH es la más precisa y el sistema de electrodos más empleado es el par de electrodo de referencia de calomel con cloruro potásico saturado y el electrodo de vidrio. La calidad del electrodo es un factor primordial en la medición de pH (85).

Material y reactivos

- Vasos de precipitado de 100 ml
- Piseta con agua destilada
- Potenciómetro CORNING MOD. 10
- Soluciones buffer de fosfatos de pH 4 y 7

Procedimiento

a) Preparación de la muestra:

En el caso de polvos, se recomienda preparar una solución al 25% y agitar durante 30 min para obtener una completa solubilización.

b) Determinación de pH:

Estandarizar el potenciómetro de acuerdo con las instrucciones del aparato, empleando dos soluciones de buffer de pH conocido (pH = 7 para la zona neutra y pH = 4 para la zona ácida). Una vez estandarizado el potenciómetro, se procede a realizar la determinación de pH en la muestra previamente preparada como se indicó en el anterior inciso (90).

ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizó según los métodos descritos en las Normas Oficiales del Seguro Social (IMSS) y la Farmacopea de los E.U.A (67,68).

Mésófilos aerobios

Fundamento:

Cuando se requiere determinar la concentración de microorganismos en una muestra, se emplean medios de cultivo y condiciones que favorezcan su desarrollo, el medio que comunmente se utiliza es el Agar soya-tripticaseína para el método de cuenta en placa (65, 67, 68).

Material y Medios de cultivo

- * Cajas petri de 100 x 15 mm
- * Pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml
- * Tubos de ensaye (20 x 150 mm)
- * Asas para siembra
- * Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 ml
- * Mechero
- * Campana de flujo laminar NIRO
- * Autoclave
- * Incubadora BLUEM
- * Contador de colonias Quebec
- * Agar soya-tripticaseína (Bioxon)
- * Caldo de soya-tripticaseína (Bioxon)
- * Solución reguladora de fosfatos pH 7.2 (a)
- * Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2 (b)

Preparación de soluciones:

(a) Solución reguladora de fosfatos pH 7.2:

Disolver en un matraz de 1000 ml, 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 ml de agua destilada. Mezclar y aforar a 1000 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 7.2 ± 0.1 agregando si es necesario una solución 2N de hidróxido de sodio. Guardarlo en refrigeración.

(b) Solución diluida de fosfatos pH 7.2:

Diluir 1 ml de la solución concentrada en 800 ml de agua destilada, ajustar a pH 7.2 ± 0.1 envasar y esterilizar en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos.

Procedimiento

Si espera que el producto esté altamente contaminado diluirlo para que 1 ml tenga entre 30 y 300 UFC (Unidades formadoras de colonias).

La muestra deberá diluirse en forma rápida y homogénea, bajo condiciones estériles y colocarse inmediatamente en los medios de cultivo. El medio de dilución no deberá contener sustancias nutritivas ni nocivas, para evitar una alteración en el número de microorganismos en la muestra. Los mejores resultados se han dado con las soluciones salinas tamponadas (Tampón de fosfato).

Observar el diagrama No. 1 para la preparación de diluciones.

Colocar 1 ml de cada dilución en cajas petri estériles e inmediatamente, agregar de 20-25 ml del medio de cultivo Agar soya-*tripticaseína*, previamente fundido y enfriado a 45°C . Mezclar con movimientos rotatorios y dejar solidificar a temperatura ambiente; una vez solidificado el medio, incubar en posición invertida durante 2-3 días a una temperatura de $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$. (Cada dilución se siembra por duplicado).

***Nota:** Para asegurar que el diluyente está libre de microorganismos se recomienda hacer un testigo el cual consiste en colocar 1 ml del diluyente en lugar de la muestra.

Seleccionar aquellas placas donde aparezcan entre 30 a 300 colonias, para tener el menor error en el recuento

Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, se utiliza la placa cuyo recuento se aproxime más a esta cifra

Para determinar el número de microorganismos se cuenta las colonias de 2 cajas por cada dilución se toma el valor medio y se multiplica por el factor de dilución. El número de microorganismo se indica en relación al peso (g) o la cantidad (ml) del material de ensaye.

Cálculos:

$$\text{UFC/ml} = \text{UFC} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

Donde:

UFC = Unidades formadoras de colonias

Coliformes

Fundamento:

Estos microorganismos fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas cuando se incuban a 32-35°C. Por lo anterior, una de las formas de realizar la demostración y recuento de organismos coliformes es mediante el

empleo de tubos de fermentación que contengan caldo lactosado y computando su número en base a las tablas del número más probable (NMP).

Material y medios

- * Tubos de ensaye (20 x 150 mm)
- * Tubos de Dunham
- * Asas para siembra
- * Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- * Mechero
- * Campana de flujo laminar VECO
- * Autoclave
- * Incubadora BLUEM
- * Caldo lauril triptosa LST (Bioxon)
- * Caldo lactosa bilis verde brillante LBVB (Bioxon)
- * Solución reguladora de fosfatos pH 7.2
- * Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2

Procedimiento

Pesar 10 g de muestra y transferirlos a un matraz que contenga 90 ml de la solución diluyente y homogeneizar. Continuar las diluciones de la muestra siguiendo los pasos que se ilustran en el diagrama No 1 utilizando pipetas diferentes para cada dilución

Una vez realizadas las diluciones, inocular 1 ml por dilución a cada uno de los tres tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa, como se indica en el diagrama No. 2.

Incubar los tubos por 48 ± 2 horas a 35°C , observar los tubos si hay formación de gas de las 48 horas, agitar suavemente los tubos con formación de gas. inocular de cada tubo al caldo lactosa bilis verde brillante, incubarlos por 48 ± 2 horas a 35°C y hacer la lectura sobre la formación de gas.

Determinar el número de microorganismos de acuerdo a la tabla de Número más probable (NMP) de microorganismos que aparece al final de esta sección (88).

Cálculos:

Reportar el NPM de coliformes por gramo (de acuerdo a la tabla de número más probable de organismos que aparece al final del análisis microbiológico).

Escherichia coli

Fundamento:

Después de su crecimiento en caldo lactosado, la presencia de E. coli se confirma empleando medios de enriquecimiento como son Agar-MacConkey y Agar-Levine-Eosina azul de metileno.

En el Agar de MacConkey la degradación de lactosa a ácido es indicado por el viraje del indicador rojo neutro a rojo oscuro. Debido al contenido de sales biliares, se seleccionan las bacterias intestinales y la flora restante gram (-) se ve inhibida por la violeta cristal.

El medio Levine - Eosina es un medio selectivo ya que todos los microorganismos Gram (+) son inhibidos por el contenido de colorantes.

Material y medios

- Cajas petri de 100 x 15 mm
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Asas de siembra
- Mechero
- Campana de flujo laminar NIRO
- Incubadora BLUEM
- Autoclave
- Caldo lactosado (Bioxon)
- Agar MacConkey (Bioxon)
- Agar levine-eosina-azul de metileno (Bioxon)

Procedimiento

Se pesan 10 g de muestra y se colocan en 100 ml de caldo lactosado estéril y se incuba a 30-35°C aproximadamente un día, hasta que comience el desarrollo. Apartir del crecimiento en el medio del caldo lactosado aislar por estría cruzada en Agar MacCokey e incubar durante 24 hrs a 35°C. Colonias de color rojo ladrillo, eventualmente con zonas precipitadas, son características de E. coli. Si el cuadro de colonias no es claro, se siembra sobre Agar levine-eosina-azul de metileno y se incuba de 24-48 hrs a 35°C. Las colonias de E. coli se caracterizan por dar un color negro azulado al trasluz y brillo metálico a la luz incidente (Tabla No 1).

La presencia de E. coli puede ser confirmada utilizando las pruebas bioquímicas adecuadas.

Salmonella

Fundamento:

Los métodos para aislamiento e identificación de Salmonella considera 4 pasos sucesivos:

- 1.- Cultivo en medio de enriquecimiento no selectivos (caldo lactosado).
- 2.- Cultivo en medios de enriquecimiento selectivos (caldo cistina - selenito y caldo tetrionato).
- 3.- Utilización de medios selectivos a base de agar (agar verde - brillante, agar xilosa - desoxicolato y agar sulfito de bismuto).
- 4.- Verificación y comprobación de colonias seleccionadas mediante pruebas bioquímicas determinativas.

Material y Medios

- Cajas petri de 100 x 15 mm
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Asas para siembra
- Mechero
- Campana de flujo laminar NIRO
- Incubadora BLUEM
- Autoclave
- Caldo lactosado
- Caldo selenito-cistina y tetrionato
- Agar verde-brillante
- Agar xilosa-lisina desoxicolato
- Agar sulfito-bismuto.

Procedimiento

Colocar 10 ml ó 10 g de muestra y 90 ml de caldo lactosado estéril e incubar a 30-35°C aprox. 1 día hasta que comience el desarrollo. Si se observa crecimiento, sembrar 1 ml del cultivo en 9 ml de los siguientes medios de enriquecimiento: Caldo selenito-cistina y caldo tetrationato, mezclar e incubar de 12-24 hrs a 35°C. Posteriormente se transplanta con ayuda de un asa a los siguientes medios de cultivo selectivos:

- Agar verde-brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa
- Agar xilosa-lisina-desoxicolato
- Agar bismuto-sulfito según Wilson Blair.

Los medios de cultivo se incuban 2 días a 35°C. Observar la morfología de las colonias y compararlas con las características de la tabla No. 2.

Las colonias sospechosas se pueden confirmar inoculando sobre el medio agar hierro triple azúcar donde se incuban durante 1-2 días. La formación de ácido (coloración amarilla), formación de gas y ennegrecimiento eventual son características del género de Salmonella.

Staphylococcus aureus

Fundamento:

El agar selectivo para Staphylococcus seg Vogel-Johnson es un medio de cultivo para la identificación precoz de Staphylococcus manita-positivos puesto que la capacidad de coagulación del plasma aparece casi siempre simultaneamente con la capacidad de la fermentación de la manita.

Se permite hacer una estimación de su contenido debido a su tolerancia a concentraciones elevadas de cloruro de sodio y su poca sensibilidad frente a los agentes bacteriostáticos cloruro de litio y telurito.

Material y Medios

- Cajas Petri de 100 x 15 mm
- Tubos de ensaye (20 x 150 mm)
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- Mechero
- Campana de flujo laminar NIRO
- Incubadora BLUEM
- Autoclave
- Solución reguladora de fosfatos pH 7.2
- Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2
- Caldo Soya Trypticaseína (Bioxon)
- Medio de Vogel-Johnson (Bioxon)

Procedimiento

Pesar 10 g de la muestra en polvo y colocarlo en 90 ml de la solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2 , realizar las diluciones correspondientes como se indica en el diagrama No. 1.

Colocar 1 ml de cada dilución de la muestra en tubos que contengan 4.5 ml de caldo soya tripticaseína, incubar a 35°C durante 48±3 horas.

Inocular por estría de los tubos con desarrollo a placas de Vogel-Johnson de manera que se puedan obtener colonias aisladas. Incubar a 35°C durante 48±3 horas.

Observar si existe crecimiento de colonias negras (reductoras de telurito), convexas y brillantes. Realizar la prueba de la coagulasa en caso de tener crecimiento de colonias características (ver las características de la tabla No. 3).

Hongos y Levaduras

Fundamento:

Para la determinación y cuenta total de hongos y levaduras se utiliza el medio agar papa-dextrosa, el cual es acidificado con ácido tartárico para inhibir el crecimiento bacteriano.

Material y Medios

- *Cajas petri 15 x 100 mm
- * Tubos de ensaye (20 x 150 mm)
- * Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- * Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml
- * Mechero
- * Campana de flujo laminar NIRO
- * Incubadora BLUEM
- * Autoclave
- * Solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2
- * Agar papa-dextrosa (Bioxon)

Procedimiento

Pesar 10 g de la muestra, transferilos a un matraz Erlenmeyer que contenga 90 ml de la solución diluida reguladora de fosfatos pH 7.2, realizar las diferentes diluciones como se ha indicado en la cuenta total de mesófilos aerobios (ver el diagrama No. 1) , colocar 1 ml de cada dilución por duplicado en cajas petri estériles y agregar de 12-15 ml de agar papa dextrosa fundido a 45-48°C y acidificado con una solución de ácido tartárico al 10 %.

Homegenizar y dejar solidificar. Invertir las cajas petri e incubar una serie de cada dilución a 22°C durante 5 días para la cuenta de hongos, la otra serie incubarla a 35°C durante 48 hrs. para la cuenta de levaduras

Cálculos:

$$\text{UFC/ml} = \text{UFC} \times \frac{1}{\text{Dilución}}$$

Donde:

UFC = Unidades formadoras de colonias

Contar las colonias de hongos y levaduras, multiplicar por la inversa de la dilución. Reportar: cuenta de hongos en placas de agar papa-dextrosa después de 5 días a 22 °C por gramo de muestra y cuenta de levaduras en placas de agar papa-dextrosa después de 48 hrs a 35°C.

DIAGRAMA No. 1
PREPARACION DE DILUCIONES

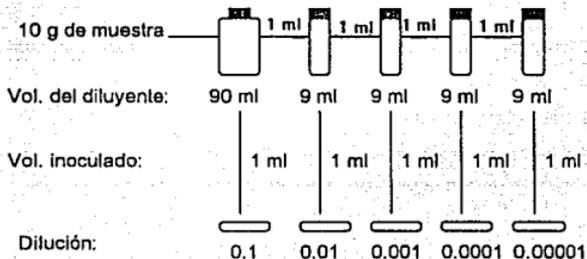
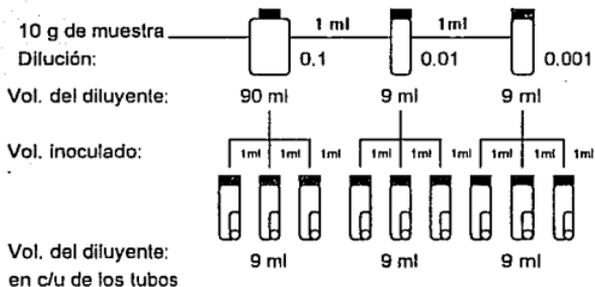


DIAGRAMA No. 2
RECuento DE MICROORGANISMOS POR DILUCION EN TUBO
PRUEBA PRESUNTIVA



NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS

Tubos inoculados : 3 con 1 ml dilución 1:10 = 0.1 g de muestra
 3 con 1 ml de dilución 1:100 = 0.01 g de muestra
 3 con 1 ml de dilución 1:1000 = 0.001 g de muestra

Tubos positivos NMP/g															
3	3	3		3	3	3		3	3	3		3	3	3	
(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)		(0.1)	(0.01)	(0.001)	
0	0	0	-3.0	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23.0
0	0	1	3.0	1	0	1	7.2	2	0	1	14.0	3	0	1	39.0
0	0	2	6.0	1	0	2	11.0	2	0	2	20.0	3	0	2	64.0
0	0	3	9.0	1	0	3	15.0	2	0	3	26.0	3	0	3	95.0
0	1	0	3.0	1	1	0	7.3	2	1	0	25.0	3	1	0	43.0
0	1	1	6.1	1	1	1	11.0	2	1	1	20.0	3	1	1	75.0
0	1	2	9.2	1	1	2	15.0	2	1	2	27.0	3	1	2	12.0
0	1	3	12.0	1	1	3	19.0	2	1	3	34.0	3	1	3	160.0
0	2	0	6.2	1	2	0	11.0	2	2	0	21.0	3	2	0	93.0
0	2	1	9.3	1	2	1	15.0	2	2	1	28.0	3	2	1	150.0
0	2	2	12.0	1	2	2	20.0	2	2	2	35.0	3	2	2	210.0
0	2	3	16.0	1	2	3	24.0	2	2	3	42.0	3	2	3	290.0
0	3	0	9.4	1	3	0	16.0	2	3	0	29.0	3	3	0	240.0
0	3	1	13.0	1	3	1	20.0	2	3	1	36.0	3	3	1	460.0
0	3	2	16.0	1	3	2	24.0	2	3	2	44.0	3	3	2	1100.0
0	3	3	19.0	1	3	3	29.0	2	3	3	53.0	3	3	3	+1100.0

TABLA No 1
Características coloniales y Bioquímicas de Escherichia coli

Medio de cultivo	Morfología colonial
Agar Mac Conkey	Colonias grandes rojas que pueden estar rodeadas de una zona precipitada de bilis
Agar Levine-eosina azul de metileno	Colonias pequeñas azul negro en la parte central con brillo metálico verdoso a la luz reflejada

TABLA No 2
Características coloniales y bioquímicas de Salmonella sp.

Medio de cultivo	Características morfológicas
Agar verde brillante	Colonias pequeñas transparentes incoloras rosas o blancas opacas, frecuentemente rodeadas de una zona rosa o roja
Agar xilosa-lisina desoxicolato	Colonias rojas con o sin centro negros
Agar sulfito de bismuto	Colonias negras o verdes
Agar hierro triple azúcar	Superficie alcalina (roja) picadura acida (amarilla), con o sin producción de ácido sulfúrico (negro)

TABLA No 3
Características de Staphylococcus aureus

Medio de cultivo	Características morfológicas
Agar Vogel Johnson	Colonias negras rodeadas de una zona amarilla

RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla No. 1

En la tabla No. 1 se presentan los resultados del análisis proximal de las fórmulas seleccionadas y de un producto comercial como patrón de referencia (Isomil).

En cuanto al el contenido de humedad se observa que la fórmula P-A (50:50) presenta un valor alto en relación a la mezcla P-HMN (50:50) y al producto comercial e incluso el valor se sale de lo especificado en las Normas Oficiales del Seguro Social (menor al 3%). El contenido de humedad tendrá una influencia en la conservación de la calidad del polvo y se puede controlar con la temperatura de secado.

Se observa que el contenido de proteína de la fórmula de P-HMN (50:50) presentan un porcentaje de proteína (13.37%) cercano al del Isomil (14.0%); ambos cumplen con las especificaciones de las Normas del Seguro Social (13 y 18% de proteína). Lo cual no ocurre con la mezcla de P-A (50:50) que presenta un valor bajo de 8.6% de proteína.

En lo que se refiere al contenido de cenizas se observa que las fórmulas seleccionadas presentan un valor inferior al del producto de referencia. Lo cual indica que éstas posiblemente se encuentran deficientes en algunos minerales; por lo que se recomienda ajustar dichas fórmulas.

En el contenido de grasa se observa que en las fórmulas seleccionadas el porcentaje de grasa es menor que el del Isomil, sin embargo únicamente la mezcla de P-A (50:50) cumple con lo especificado en la Norma del Seguro Social.

En relación al contenido de fibra se observa que los valores de las fórmulas seleccionadas son mayores que el del Isomil. Sin embargo no exceden

el 2% que recomienda la FAO para niños menores de 1 año , ya que altos niveles de fibra pueden reducir la densidad del nutrimento del alimento y causar irritaciones gastrointestinales en niños de corta edad.

Por último se observa que el contenido de carbohidratos en las fórmulas seleccionadas es mayor que el observado en el Isomil.

Tabla No. 2

En la tabla No. 2 se presenta el porciento de proteína de las fórmulas seleccionadas preparadas en biberones antes y después de su esterilización en una concentración de 10 g/100 ml. Se observa que el contenido de proteína después de su esterilización se ve afectada, aumentando ligeramente debido a la evaporación de agua que tiene durante la esterilización.

Tabla No. 3

La densidad calórica de la fórmula P-HMN 50:50 presenta un valor calórico (523.14 kcal/100g) mayor que el del Isomil (505.23 kcal/100g), mientras que la mezcla P-A 50:50 presenta un valor calórico (436.05 kcal/100g) menor que éste. Sin embargo a pesar de estas referencias las 3 muestras estudiadas cubren las necesidades energéticas de los lactantes. (20)

Tabla No. 4

En la tabla No. 4 se muestra los datos de densidad aparente y humedad de las mezclas seleccionadas y del producto comercial.

Los valores de densidad aparente de las fórmulas seleccionadas son semejantes entre sí y menores al del producto comercial. Por lo que se puede inferir que el tamaño de partícula es homogéneo en las fórmulas dando así espacios más grandes entre las partículas resultando una densidad baja.

La densidad de los polvos se ve afectada por el contenido de humedad incrementándose a medida que su contenido de humedad aumenta. Al comparar los resultados de humedad y densidad de las fórmulas seleccionadas con los obtenidos en el producto comercial, podemos ver que esta regla se cumple con la fórmula de P-HMN pero no ocurre lo mismo con la fórmula de P-A que presenta un densidad semejante a la de la fórmula P-HMN pero su contenido de humedad es superior, lo anterior se puede deber a la homogeneidad en el tamaño de las partículas que forman dicho polvo..

Tabla No. 5

En la tabla No. 5 se presentan los resultados de las pruebas de reconstitución cuyos parámetros estudiados fueron: Volumen de sedimentación, Solubilidad y Humectabilidad.

La reconstitución es de suma importancia para la evaluación y aceptabilidad de un polvo.

En cuanto al volumen de sedimentación se observa que los valores de las 3 muestras después de 24 horas de preparar la dispersión son cercanos a uno, lo que indica que las soluciones obtenidas después de disolver los polvos en agua son prácticamente estables.

Con respecto a la Solubilidad se observa que la fórmula P-HMN tiene un valor mucho menor en relación al producto comercial; ambas muestras sin embargo presentan valores de Solubilidad inferiores a los establecidos en la Norma Oficial del IMSS (mínimo 98%), esta diferencia es razonable ya que los valores dados en las Normas se dirigen a polvos instantáneos cuya Solubilidad debe ser mayor, por el tratamiento que reciben durante su secado, lo cual no sucede con las muestras sometidas a estudio.

Con lo que respecta a la fórmula P-A, se considera que es 100% soluble debido a que durante la determinación de solubilidad no hubo separación de fases.

Por otro lado se debe considerar que la determinación de Solubilidad es fundamentalmente empírica y depende de factores como el método de secado, la temperatura de secado y el método utilizado para su determinación.

En el mismo cuadro se muestran los valores de humectabilidad donde se observa que las fórmulas presentan tiempos de humectabilidad superiores al del producto comercial siendo la muestra de P-A la que presenta un tiempo mayor.

Lo anterior se debe a que la penetración no es suficiente quedándose burbujas de aire entre las partículas, éstas se van llenando con la solución formada pruciendo una pasta pegajosa con islas de polvo sin humectar y aire residual. Esto da lugar a la formación de grumos húmedos e inflados en la parte exterior y secos por dentro, lo cual dificulta su completa reconstitución.

Por otro lado los tiempos en que tardan en humectarse las muestras son mayores que los reportados en otros trabajos, ya que como se había mencionado anteriormente las muestras sometidas a estudio no son polvos instantáneos, los cuales se humectan aproximadamente en 15 segundos.

Tabla No. 6

El presente trabajo de tesis, se inició empleando como estabilizante de las mezclas goma Guar. Con el fin de mejorar las propiedades reológicas y de reconstitución de las fórmulas y encontrar la cantidad de lecitina así como tipo y cantidad de goma óptima, se probaron diferentes combinaciones adicionadas a las fórmulas y en cada una de éstas, se midió el volumen de sedimentación.

Las gomas que se probaron fueron goma Guar y goma Xantana, y las concentraciones en las que se trabajó cada uno de los aditivos fueron las siguientes:

Lecitina :	0.0, 1.0, 1.5 y 2.0%
Goma :	0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5%

Al finalizar esta parte del estudio se encontró que los mejores resultados se obtenían en la combinación: 2% de lecitina y 0.3% de goma Xantana por lo que se optó por seguir trabajando con estas concentraciones y este tipo de goma a lo largo del presente trabajo.

En la tabla No. 6 se presentan los valores obtenidos en la prueba reológica de velocidad de flujo y los obtenidos en las pruebas de reconstitución: volumen de sedimentación y solubilidad, antes y después de hacer los cambios de goma. Se puede observar que los tres parámetros en ambas fórmulas mejoraron de manera considerable al emplear la goma Xantana; por lo que una vez más se comprueba que esta goma actúa mejor como estabilizante en las fórmulas que la goma Guar.

Tabla No. 7

En esta tabla se presentan los valores obtenidos en las pruebas reológicas cuyos parámetros son ángulo de reposo y velocidad de flujo.

En cuanto al ángulo de reposo se observa que las tres muestras presentan valores semejantes, siendo un poco mayor el de la fórmula P-HMN (42.55°) y menor el de la fórmula P-A (37.69°).

El ángulo de reposo es una medida relativa de la fricción de las partículas del polvo por lo que está relacionada con la fluibilidad del mismo y su

determinación nos ayuda al diseño del equipo y condiciones de calidad del producto.

Lo ideal es contar con un polvo que fluya moderadamente, para lo cual se requiere un ángulo de reposo de 55-60°. En el caso de las muestras estudiadas, éstas presentaron valores de ángulo de reposo entre 38 y 43° por lo que se consideran polvos que fluyen ligeramente (ángulo de reposo de 22-55°).

En cuanto a velocidad de flujo se observa que los valores de las fórmulas son semejantes entre sí, pero mucho menores al del producto de referencia.

Para algunos autores la determinación de la velocidad de flujo es más significativa que la del ángulo de reposo ya que es una propiedad dinámica.

Al comparar los resultados de ángulo de reposo y velocidad de flujo obtenidos en el producto de referencia vemos que éstos no son coherentes, ya que se esperaba que el valor de ángulo de reposo fuera mayor que el obtenido, puesto que al realizar la prueba el polvo fluía con mayor facilidad que las fórmulas de P-HMN y P-A, las cuales presentaban grumos que dificultaban su fluibilidad.

Tabla No. 8

En la tabla No. 8 se muestra la prueba de estabilidad al calor, observándose que las 3 muestras no presentaron coagulación de proteínas al someterlas a condiciones de esterilización, por lo que se consideran estables al calor.

En las Normas de leche entera en polvo y de fórmulas no lácteas en polvo del IMSS, se utiliza la prueba de estabilidad al calor como un control de calidad.

Tabla No.9

En esta tabla se muestran las pruebas de estabilidad que consistieron de los siguientes parámetros : Índice de peróxidos, acidez y pH. Para realizar estas pruebas las fórmulas seleccionadas se sometieron a 2 temperaturas de almacenamiento, temperatura de refrigeración (4°) y temperatura ambiente (20-22°C), durante los periodos de 0-5 meses y 12 meses.

En lo que se refiere al Índice de peróxidos, podemos ver que la concentración de éstos en las fórmulas seleccionadas aumenta conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración, pero su formación es mayor cuando se almacena a temperatura ambiente.

Como sabemos, los peróxidos son productos intermedios de una serie de reacciones y en determinadas condiciones se descomponen rápidamente tras su formación por lo que su empleo en un estudio de estabilidad es poco relativo.

En lo que se refiere a los valores de acidez la variación de éstos al someterlos a diferentes condiciones de almacenamiento es casi insignificante, pero a pesar de esto se puede observar que la acidez aumenta conforme aumenta la temperatura y tiempo de almacenamiento. Lo anterior es lógico ya que en los aceites a medida que envejecen, se liberan ácidos grasos y esta liberación se favorece en condiciones de luz, calor y humedad.

En cuanto al pH, éste se mantiene prácticamente constante a las diferentes condiciones de almacenamiento, el cual nos confirma la estabilidad de las fórmulas.

Tabla No. 10

En la tabla No. 10 se presentan los resultados de las pruebas microbiológicas de las fórmulas seleccionadas.

En lo que se refiere a la cuenta de Mesófilos aerobios se observa que la mezcla de P-HMN es más alta que el valor especificado en la Norma del IMSS, mientras que la cuenta obtenida en la mezcla de P-A se encuentra abajo del valor máximo especificado de la Norma.

La cuenta alta de Mesófilos aerobios en la fórmula de P-HMN nos puede indicar una posible presencia de microorganismos patógenos; sin embargo al realizarse las demás pruebas se comprobó la ausencia de éstos; por lo anterior, esta alta concentración posiblemente se deba a un mal manejo de la fórmula durante su preparación.

Con respecto a la cuenta de Hongos y Levaduras ambas fórmulas presentaron una cuenta inferior al valor máximo permitido en la Norma.

TABLA No 1
Análisis Proximal de las fórmulas: Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado
(P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	% Humedad	% Proteína	% Cenizas	% Grasa C	% Fibra C.	% Carbohidratos.
P-HMN (50:50)	1.68±0.62	13.37±0.74	1.66±0.07	21.19±0.29	1.18±0.08	60.92
P-A (50:50)	3.25±1.4	8.6±0.27	0.95±0.02	16.42±0.29	1.30±0.09	69.48
ISOMIL	2.2	14.0	3.33	25.0	0.57	54.9

TABLA No 2
Contenido de Proteína de las Fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN) y Pollo Arroz (P-A)
preparadas en biberones antes y después de su esterilización
en una concentración de 10g/ 100 ml.

Fórmula	Contenido de Proteína antes de esterilizar (mg/100ml)	Contenido de proteína después de su esterilización (mg/100ml)
P-HMN (50:50)	836±0.004	854±0.07
P-A (50:50)	609±0.01	632±0.02

TABLA No 3
Análisis Físicos de las Fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	Densidad Aparente (g/ml)	% Humedad
P-HMN (50:50)	0.5726±0.01	1.68±0.62
P-A (50:50)	0.5251±0.01	3.25±1.4
ISOMIL	0.6576	2.2

TABLA No 4
Valor Calórico de las fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	Valor Calórico (kcal/100 g)
P-HMN (50:50)	523.14±1.79
P-A (50:50)	436.05±17.79
ISOMIL	505.23±3.15

TABLA No 5
Pruebas de Reconstitución de las Fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	Volumen de Sedimentación	Solubilidad (%)	Humectabilidad (min)
P-HMN (50:50)	0.90±0.08	30.06±4.4	29.52±7.4
P-A (50:50)	0.97±0.03	*	73.6±11.75
ISOMIL	0.99±0.0	50.56±0.03	1.3±0.07

* Debido a que durante la determinación de solubilidad de la fórmula P:A no hubo separación de fases en la centrifugación, se considero que la muestra es soluble 100%

TABLA No. 6
Pruebas Reológicas y de Reconstitución de las fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN) y Pollo-Arroz (P-A)
usando gomas Guar y Xantana como estabilizantes

Muestra	Velocidad de flujo (g/s)		Volumen de Sedimentación		Solubilidad (%)	
	Goma Guar	Goma Xantana	Goma Guar	Goma Xantana	Goma Guar	Goma Xantana
Mezcla P-HMN (50:50)	0.912	0.339	0.76	0.90	25.78	35.24
Mezcla P-A (50:50)	0.121	0.309	0.92	0.97	*	*

* Debido a que durante la determinación de Solubilidad de la mezcla P-A no hubo separación de fases en la centrifugación, se considera que la muestra es soluble 100%.

TABLA No 7
Pruebas Reológicas de las fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	Angulo de reposo	Velocidad de flujo (g/s)
P-HMN (50:50)	42.55±1.9	0.339±0.03
P-A (50:50)	37.69±0.93	0.302±0.02
ISOMIL	40.29±0.8	0.6204±0.03

TABLA No 8
Pruebas de Estabilidad al calor de las fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN), Pollo-Arroz (P-A) e Isomil

Fórmula	Estabilidad al calor
P-HMN (50:50)	Estable
P-A (50:50)	Estable
ISOMIL	Estable

TABLA No 9
Pruebas de estabilidad de las Fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz nixtamalizado (P-HMN) y Pollo-Arroz (P-A).

Fórmula	Temp. de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	Ind de Peróxidos (%)	Acidez (% ac. oleico)	pH
P-HMN (50:50)	Temp. ambiente	0 - 5 12	0.338±0.06 1.68±0.04	0.42±0.02 0.508±0.02	6.4±0.03 6.3±0.02
	Temp. de refrigeración	0 - 5 12	0.166±0.03 0.35±0.02	.389±0.02 0.406±0.02	6.4±0.03 6.4±0.03
P-A (50:50)	Temp. ambiente	0 - 5 12	0.24±0.03 0.9±0.3	0.41±0.02 0.61±0.01	6.4±0.03 6.3±0.02
	Temp de refrigeración	0 - 5 12	0.11±0.01 0.2±0.01	0.301±0.01 0.44±0.00.02	6.4±0.03 6.4±0.03

TABLA No 10
Pruebas Microbiológicas de las fórmulas:
Pollo-Harina de Maíz Nixtamalizado (P-HMN) y Pollo-Arroz (P-A)

Fórmula	Mesófilos aerobios (UFC/g)*	Coliformes (NMP/g)*	E. coli	Salmonella	S. aureus	Hongos (UFC/g)*	Levaduras (UFC/g)*
P-HMN (50:50)	22,000	11	Ausente en 10g de muestra	Ausente en 10g de muestra	Ausente en 10g de muestra	< 10	< 10
P-A (50:50)	3,200	- 3.0	Ausente en 10g de muestra	Ausente en 10g de muestra	Ausente en 10g de muestra	< 10	< 10

*UFC/g = Unidades formadoras de colonias por gramo de alimento

*NMP/g = Número más probable por gramo de alimento

CONCLUSIONES

- Ambas fórmulas presentan un alto valor nutricional pero su contenido de minerales es bajo.

- La fórmula P-HMN (50:50) presentó mejor composición química según las normas.

- Las fórmulas seleccionadas cubren las necesidades energéticas de los lactantes.

- Las propiedades físicas y de reconstitución de ambos polvos están por debajo de los valores ideales, lo cual se puede mejorar controlando las condiciones de secado.

- Los polvos de las fórmulas seleccionadas no cuentan con las características de instantaneidad, ya que los tiempos de humectabilidad son altos, para lograr una completa reconstitución de los polvos se recomienda realizar una aglomeración.

- Las dispersiones formadas de las fórmulas seleccionadas se consideran estables aún después de una esterilización en autoclave

- Ambos polvos fluyen ligeramente lo cual puede dificultar su manejo en el proceso del envasado.

- En lo que se refiere a la pruebas de estabilidad, podemos concluir que las fórmulas seleccionadas son químicamente estables.

- De las fórmulas seleccionadas únicamente la mezcla de P-A (50:50) cumple con las especificaciones de la Norma del IMSS en lo que se refiere a la cuenta de Mesófilos aerobios; sin embargo, se puede considerar que ambas mezclas estudiadas presentan una buena calidad sanitaria ya que no hubo presencia de microorganismos patógenos y la cuenta de Hongos y Levaduras fué mínima.

RECOMENDACIONES

Para mejorar el valor nutricional de la fórmula P-A (50:50) cuyo contenido de proteína es inferior a lo especificado en la Norma del IMSS se recomienda aumentar la concentración de pollo en la formulación y disminuir la concentración de grasa teniendo cuidado de no obtener menos del 9%.

De igual forma, es necesario realizar un análisis de minerales y vitaminas para conocer cual de estos nutrientes están escasos en las fórmulas y ver la manera como se pueden adicionar a éstas.

En lo que se refiere a las propiedades físicas, reológicas de los polvos, se recomienda tener un mejor control en la temperatura de salida durante el secado para evitar que los polvos se apelmacen y pierdan fluibilidad

Se recomienda someter a las mezclas seleccionadas a un proceso de aglomeración para mejorar sus propiedades de reconstitución.

Para asegurar que las fórmulas no presentan ningún riesgo sanitario al ser consumidas y cumplan con lo especificado en las Normas, es recomendable una esterilización posterior al secado.

BIBLIOGRAFIA

1. Sotelo A., Arenas L., Hernández M., Utilización del garbanzo en fórmulas no lácteas I Composición química y calidad nutritiva del garbanzo y su comparación con fórmulas infantiles comerciales, Arch. Lat. Nutr., 37 : 551 - 559, (1987).
2. UNICEF, Estado mundial de la infancia, España, p.p. 1 - 3, (1991).
3. Comejo Barrera L. , Desarrollo de una fórmula no láctea para niños con intolerancia a la lactosa, Tesis Universidad Iberoamericana , México, (1989).
4. Sotelo A., Hernández M., Larracilla J., Arenas L., Palapa E., Utilización del garbanzo en fórmulas no lácteas II Balance de nitrógeno en niños con intolerancia a la lactosa alimentados con una fórmula a base de garbanzo y un producto comercial de soya, Arch. Lat. Nutr., 37 : 468 - 479, (1987).
5. Sotelo A., Hernández M., Frenk S., Evaluación biológica en ratas y humanos de un producto lácteo sin lactosa y de una fórmula proteínica de soya para uso en la desnutrición proteínico - energética; 34(2), Junio, p.p. 333-342, (1984).
6. A. R. del Angel, Sotelo A., Nutritive value of mixtures using chick - peas with wheat, triticale, normal and opaque - 2 corns, J. Nutr., 112 : 1474 - 1480, (1982).
7. Appendini E. , Elaboración y evaluación nutricional de un alimento para niños con intolerancia a la lactosa. Tesis de Licenciatura. UNAM. México, (1992).

8. Bejar M., Icaza J., Nutrición, Ed. Interamericana, México, p.p. 138 -144, (1972).
9. Lowenbery E., Wilson H., Todhuter W., Los alimentos y el hombre, Ed. Limusa, México, p.p. 191 -195, (1985).
10. Cano S. D., Alimentación infantil, Ind, Alim., 12 (26), Nov. - Dic., p.p. 3 -10, (1990).
11. Valiente S., Abala C., Avila B., Monckeberg F., Patología nutricional en América Latina y el Caribe, Arch. Lat. Nutr., 38 (3) : 445 - 468, (1988).
12. Mason J., La situación alimentaria y el niño, Alim. y Nutr., 1 (4), (1979).
13. Murray R. K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., Bioquímica de Harper, Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V., México D.F., p. 570, (1988).
14. Mitchell, Rynbergen, Anderson, Dibble, Nutrición y Dieta de Cooper, 15ª edición, Edit. Interamericana, México, p.p. 50 -51, 186 - 190, 240 -242, (1968).
15. Lehninger, Bioquímica, Ciencia por una Educación Popular, Tomos I y II, p.p. 284 - 285, 419, 686,765 -767, (1990).
16. Burton B., Human Nutrition, Ed. Mc. Graw Hill Book, E.U.A., p.p. 241 - 261, (1976).

17. WHO / UNICEF, The management of diarrhoea and use of oral rehydration therapy, Génova, p. 6, (1983).
18. Cuéllar R., Alimentación del lactante, Soc. Mex. Ped., México, p.p. 220 - 225, (1985).
19. Ramos Galván R., Alimentación normal en niños y adolescentes, Ed. El Manual Moderno, México, p.p. 123 - 350, (1985).
20. FAO / OMS, Informe de un comité especial mixto, FAO / OMS de expertos en necesidades de energía y proteínas, Roma, p. p. 34 - 64, (1973).
21. Fomon J.S., Nutrición infantil, 2ª edición, Ed. Interamericana, México, p. 458, (1976).
22. Wilson H., Intestinal Absortion, W.B. Saundes, Filadelfia, p.p. 69 -77, (1962).
23. Carnblath M., Schwartz R., Disorders of carbohydrates metabolism in infancy, W.B. Saunders, Filadelfia, p.p. 5 - 9, (1966).
24. Cuéllar R., Luengas B., Alejandro I., Benitez S., Frek S., La actividad de las disacaridasas intestinales en el niño desnutrido, Rev. Mex. Ped., No.especial, Tomo XXXVII, p. 122, (1968).
25. David S. Robinson, Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos, Ed. Acribia S.A.,Zaragoza (España), p.p. 40, 50, (1991).

26. Badui Dergal S., Química de los alimentos, Ed. Alhambra Mex., p.p. 54, 123, 145, 162, 185 - 189, 197, 243 - 244, 263 - 264, (1981).
27. Kleinman R.E., Bell E.F., Hatch T.F., Klish W.J., Kretzmer N., Tolia V., Udall J.J., Practical Significance of Lactose Intolerance in Children: Supplement: Committee on Nutrition., Pedr., 86 (4) October p.p. 643 - 644, (1990).
28. Kretchmer H., "Lactosa y lactasa ", Sci. Amer., Madrid, 17 : 45, (1972).
29. Laracilla A., García M., Valencia C. Peñaloza S., Solorzano S., Intolerancia a la lactosa, Generalidades sobre el Diagnóstico y tratamiento, Salud Pública Mex., 26 : 163 - 169, (1984).
30. Anonymous, Lactose malabsorption and lactose intolerance, The Lancet, 10 : 831 - 832, (1979).
31. Scrimshaw N.S., Murray E., Tolerancia a la lactosa y el consumo de leche: mitos y realidades, Arch. Lat. Nutr., 38 (3) Septiembre, p.p. 543 - 561, (1988).
32. Informe de un grupo mixto FAO/OMS de expertos, Necesidades de proteínas Organización Mundial de la Salud, Ginebra, No. 301, (1966).
33. FAO/WHO Protein Requirements: Report of a Joint FAO/WHO Expert Group: WH, Technical Report Series 30 WHO, Ginebra, (1965).
34. Productos Alimenticios para uso humano: Cereales lacteados, NOM-F-421 Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial, (1982).

35. Sara Alatorre, José Lopéz Andrade y Miriam Rudoy. Dieta sana cuerpo sano, Guía práctica de Nutrición, Edit. Readers Digest S.A. de C.V., 2ª. edición, p.p. 12, 259, (1992).
36. Hajiev S., Kerimov K., Hajieva F., Ignat yeu V., Advances in experimental thermochemistry (A modern bomb calorimeter), J. Chem. Thermodynamics, 12 : 509 - 519, (1980).
37. Hemminger W., Historische notizen zur colorimetric, Termoquímica Acta, 40 : 40 - 62, (1980).
38. Manual for the Gallenkamp ballistic bomb calorimeter, Gallenkamp & Co. Ltd., U.K., p.p. 1 - 11, (1982).
39. Sigurd N., Manual de Nutrición, Ed. CECSA, México, p. 19, (1984).
40. OMS, Código Internacional de Comercialización de los sucedáneos de la leche materna, Ginebra, (1981).
41. ESPGAN, comite on nutrition, Guidelines on infant nutrition recomendation for the composition of an adapted formula, Act. Pediatrica Scandinava suplement, p. 262, (1977).
42. Ramos R., Fórmulas Lácteas en la alimentación del niño en el primer año de edad, Simposio Internacional. Conceptos actuales sobre nutrición del lactante. Academia Mexicana de Pediatría. México. (1984).

43. Herrera E.- Anaya, Vega L.- Franco, Estudios de balance en niños desnutridos convalescientes de diarrea, empleando tres fórmulas dietéticas, Bol. Med. Hosp. Infantil, México, 44 (4) Abril p.p. 207, 211, (1987).

44.- O'Donnell A.M., Alimentación del Niño en América Latina; Arch. Lat. Nutr. Argentina, Buenos Aires, 3 (3) 685 - 700, (1988).

45. Del Valle F.R., Villanueva H., Reses-Govea J., Escobedo M. Bourges H; Ponce J., Muñoz M.J., "Development evaluation and Industrial Production of a Powdered Soy-Oals infant Formula using a low cost extruder. J. Food Sc. 46 : 192 - 196, (1981).

46. Sánchez A.- Marroquin, Del Valle T.R., Escobedo M., Avitia R., Maya S., Vega M., Evaluation of whole Amaranth (*amarathus cruentus*) Flour, its Air-classified Fractions, and blends of these with wheat and oats as posible componentes for infant formulas0, J. Food Sc., 51 (5), (1986).

47. Ivanovic D., Ballester D., Yañez E., Formulación y valor nutritivo de dos sustitutos lácteos en base de lupino dulce, Arch. Lat. Nutr., 33 (3), Sep. p.p. 621-628, (1983).

48. Diccionario de especialidades farmacéuticas, PLM, 34ª edición, México, p.p. 1073, 1077, 1078, 1080, (1988).

49. Hérnadez M., Sotelo A., Protein quality of masa and tortillas supplemented with chikpea, Nutr. Report. Inter., 36 (1) 213-221, (1987).

50. Cañedo C., El cultivo del maíz, su origen, importancia y usos, Ciclos de Seminarios, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México, (1974).
51. Norman W. Desrosier, Elementos de la Tecnología de alimentos, Edit. Continental.SA de CV. México, p.p. 156 - 167,250 y 360, (1986).
52. Inglett G., Gorn : Cultur, processing and products, AVI, USA, (1980).
53. John Hawthon, Fundamentos de Ciencias de los alimentos, Edit. Acribia, España, p.p. 63 - 64, (1983).
54. Chang C., Lee C., Brown G., Production and Nutritional and Evaluation of high-protein rice flour, Journal of Food Sc., 51 : 2:2 464 - 467, (1986).
55. Gastañaduy A., Cardono A., Graham G., Acceptability tolerance and nutritional value of rice-based infant formula, Ped. Gast. Nutr., 11 : 240 - 246, (1990).
56. Sathanakrishnan R., Sankaranarayanan D. , Rice water solution in diarrheal dehydration. India J. Pediatric 52:479-482, (1985).
57. Norman N., Potter, Ph. D., La Ciencia de los alimentos, Edutex S.A., México, p.p. 450 y 456, (1978).
58. Frazier W.C., Microbiología de Alimentos, 3ª edición española, Edit Acribia S.A., Zaragoza (España), p.p. 139, 141, 148, (1985).

59. Mossel D.A.A., *Microbiología de los Alimentos*, 1ª edición española, Edit. Acribia S.A., Zaragoza (España), p.p. 192 - 193, 195, (1981).
60. Jean-Claude Cheffel, *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos*, Edit. Acribia, Zaragoza (España), 2: 229-230, (1989).
61. Key R. B., *Introduction to Industrial Drying Operations*, Edit. Pergamar Pres. p. 5, (1978).
62. Masters K., "Spray Drying Techniques for By-Product Recovery", *Process Biochemistry*, January. p.p. 3 y 4, (1978).
63. James M. Jay, *Microbiología Moderna de los alimentos*, Edit. Acribia, Zaragoza, España 2ª Edición española, p.p. 300, 301, 309, 331 - 334, (1989).
64. Fernández Escartin E; *Microbiología Sanitaria*, Edit. EDUG, México, 1 : 601 (1981).
65. *Diagnostica Merck Control Microbiológico de Calidad de productos farmacéuticos y materias primas 2ª parte* (1970).
66. John T., Nickerson-Anthony J., Sinkey, *Microbiología de los alimentos y sus procesos de elaboración*, España, (1978).
67. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, p.p. 201 - 211, (1989).

68. Normas del IMSS de leche entera en polvo"

- Cuenta total microbiana 01/M5.709 / Agosto / 1988

Mésofilos aerobios

- Identificación de microorganismos patógenos 01/M5.733 / Agosto / 1988

69. J. Pelczar M. Jr., Roger D. Reid., E.C.S. Chan, Microbiología, Edit. Mc. Graw Hill, 4ª edición p.p. 248, 254, 255, 271, 527, 528, (1977).

70. Norma de IMSS de fórmula no láctea. en polvo Junio / 1990.

71. Hart F., Análisis moderno de los alimentos, Edit. Acribia, España, p.247 - 250, (1971).

72. Pearson D., The Chemical Analysisi of Foods, Churchil Livigtone, New York, p.p. 13 - 40, 479, (1979).

73. Wayne B., Arlene K., Mark M., Nutritional requeriments of the elderly, Food Tech., 2 : 1 - 67, (1986).

74. Jamicson M., Jobber P., Manejo de los alimentos, Técnicas de conservación de su calidad, Edit. Pax-México, México D.F., Vol. 2, (1975).

75. Moreyra R., Fundamentos y Aplicaciones de propiedades físicas de alimentos en polvo, Tech. de Alim., México, 17 (3).

76. Vagn N., "Milk Powder Technology Evaporation and Spray Drying A/S", Niro Atomizer 2nd edition, Copenhagen Den Mark, (1982).

77. Areson, S.W., "Products: Their Formulation, Processing, Quality Control", Food Engineering p.p. 77 - 79, (1969).
78. Veisseyre R., "Lactología Técnica.", 2ª edición, Edit. Acribia, Zaragoza España, (1980).
79. Arnold H.J., Martín S.P., Encyclopedia of Food Technology and Food Science series, Vol. 2, The AVI Publishing Company Inc. Westport, Connecticut, (1974).
80. Atlas Chemical Industry, General Characteristic of Atlas surfactants, Wilmington Delaware, (1963,1989).
81. Hard Egan, Renald, S. Kirk, Renal Sawyer, Analisis Químico de Alimentos de Pearson, Cía. Edit. Continental S.A. de C.V., México, p.p. 25,26, (1988).
82. Remigton, Farmacia, Edit. Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, 17ª edición, Tomo 2, p.p. 423, 424, 439, 441, 442, (1987).
83. Herber A., Lieberman Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker INC., Vol. 2, New York, p. 226 - 231, (1981).
84. Eugene L. Parrot, Ph. D., Pharmaceutical Technology. Fundamental Pharmaceutics, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minn., p. 18, (1970).
85. Charles Alais, Ciencia de la leche, Principios de Técnica Lechera, Cía. Edit. Continental, S.A. de C.V. (CECSA), México, 7ª impresión, p.p. 193, 194, (1988).

86. Manual de laboratorio "Análisis de Alimentos", Prácticas de laboratorio, Depto. Tecnología de Alimentos, División Ingeniería, Fac. de Química, UNAM. (1991)

87. Association of Official Analytical Chemist, Official methods of analysis, 15th Edition, Published by A.O.A.C., Inc., E.U.A., (1990).

88. Winton L., Winton B., Analisis de alimentos, Edit. Continental S.A., México, p.p. 64 - 81, (1967).

89. Subsecretaría de Salubridad y Asistencia, Técnicas generales para análisis microbiológico de alimentos S.S.A., Dir. Gral. de Lab. de Salud Pública, México, p.p. 18,19,28,37 - 40, (1978).

90. Maraver M., López del Valle, Métodos oficiales de análisis, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Dir. Gral. Pol. Alim., Madrid, Tomo 1 : 84, (1986).

91. M.V.Z. Eliseo Alcántara S., Lic. Nutri. Patricia Calderón, Q.F.B. Ma Carranco de Llaguno Manual de técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos, Depto. de Ciencia y Tecnología de Alimentos, División de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos, INNSZ, Publicación L - 63, México, p.p. 72 - 73, 101, (1984).