

71
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“ADECUACION DE UN METODO ANALITICO PARA
LA DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS EN
FORMULAS INFANTILES”**

Memoria de Desempeño Profesional

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO URDAPILLETA FERNANDEZ

Asesor: QFB. María Esther Revuelta Miranda

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1990
7

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

PAGINACION VARIA

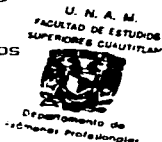
COMPLETA LA INFORMACION



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo

Memoria de desempeño profesional:

"Adecuación de un método analítico para la determinación de ácidos grasos en fórmulas infantiles"

que presenta el pasante: Ricardo Urdapilleta Fernández
con número de cuenta: 8352445-1 para obtener el TITULO de:
Químico farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx.. a 19 de septiembre de 1996.

PRESIDENTE	<u>IBQ. Francisco Montiel Sosa</u>	
VOCAL	<u>QFB. Susana Patricia Miranda Castro</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
1er. SUPLENTE	<u>QBP. Ma. Elena Mondragón Esquivel</u>	
2do. SUPLENTE	<u>QFB. Norma Laura Delgado Buenrostro</u>	

Agradezco a Wyeth, S. A. de C. V. y en especial

a la I. A. Nora Alicia Domínguez Zambrano

por las facilidades otorgadas para la elaboración de este trabajo.

A ti Señor, te doy las gracias

por permitirme llegar hasta aquí.

*A mi padres Lauro y Elena por su apoyo,
comprensión, fuerza, cariño y amor
permitiéndome con ello llegar hasta aquí.*

*A mis hermanos Juan, Lauro, Carlos,
Elena, Laura, Teresa, Sonia,
Patricia y Cuauhtemoc por su amor,
motivación y preocupación
por todo lo que he realizado.*

Gracias César por todo lo que me has dado:

amistad, afecto, comprensión, apoyo,

seguridad, motivación, coraje, en fin,

no puedo pedir más de alguien como tú.

*A mis queridísimas amigas Ana Carolina Rutz,
Maribel López y Guadalupe Bouchan.*

*A mis sobrinos, esperando que este trabajo
les motive a ir obteniendo metas en su vida.*

*A la QFB M^c. Esther Revuelta Miranda,
por su apoyo, motivación, asesoría y ayuda
incondicional para la realización de este trabajo.*

*A Beatriz Carolina Pérez García por su amistad
tan invaluable y por su valiosa ayuda
en la redacción de este trabajo.*

*A Gabriel Jaime Hernández,
Mario René Arenas, Genaro Pérez
y Fermín Cabrera por ser muy buenos amigos.*

*A Esteban Rosas y familia por su apoyo,
cariño y motivación en todo momento
que le he necesitado.*

*En fin le doy gracias a todas las personas
que tuvieron que ver por la realización de éste trabajo.*

INDICE.

I) OBJETIVO GENERAL.....	(5)
II) OBJETIVOS PARTICULARES.....	(5)
III) ANTECEDENTES.....	(6)
1) Introducción.....	(6)
2) Leche.....	(8)
2.1) Definición.....	(8)
2.2) Composición química.....	(9)
2.3) Clasificación de las leches y sus derivados.....	(13)
2.3.1) Clasificación de acuerdo al número de halopro-	
teínas y caseína.....	(13)
2.3.2) Clasificación de acuerdo a la Cámara de Pro-	
ductos Alimenticios Elaborados con Leche.....	(14)
2.4) Leche en polvo.....	(15)
2.4.1) Comportamiento de la leche sometida a un pro-	
ceso de desecación.....	(15)
2.4.2) Diferentes tipos de leche en polvo.....	(17)
2.5) Leche maternizada ó humanizada.....	(19)
2.5.1) Introducción.....	(19)
2.5.2) Definición y generalidades.....	(20)
2.5.3) Comparación de la leche materna y la de vaca.....	(21)
2.5.4) Requerimientos nutricionales del bebé.....	(27)
2.5.5) Justificación del uso de leches maternizadas.....	(29)
3) Lípidos.....	(30)
3.1) Definición.....	(30)
3.2) Clasificación.....	(31)

3.3) Ácidos grasos.....	(31)
3.3.1) Definición y composición.....	(31)
3.3.2) Clasificación.....	(32)
3.3.3) Importancia de los lípidos en las leches maternizadas.....	(35)
3.3.4) Lipólisis.....	(38)
3.3.5) Métodos de extracción de ácidos grasos libres.....	(38)
3.3.5.1) Aislamiento de los lípidos.....	(39)
3.3.6) Determinación global de los ácidos grasos libres.....	(40)
3.3.7) Métodos para la determinación, particular de cada uno de los ácidos grasos libres presentes en fórmulas infantiles.....	(41)
3.3.7.1) Extracción de los lípidos.....	(42)
3.3.7.2) Separación de los ácidos grasos libres de los triglicéridos.....	(42)
3.3.8) Métodos cromatográficos para cuantificar ácidos grasos libres.....	(43)
4) Cromatografía de gases.....	(46)
4.1) Generalidades de la cromatografía.....	(46)
4.2) Características y componentes de un cromatógrafo de gases.....	(48)
4.2.1) Fuente de gas transportador.....	(49)
4.2.2) Sistema de inyección de la muestra.....	(50)
4.2.3) Columnas.....	(51)
4.2.4) Sistema de detección.....	(57)
4.2.4.1) Detector de conductividad térmica.....	(57)
4.2.4.2) Detector de ionización de flama.....	(59)

4.2.4.3) Detector de captura de electrones.....	(61)
4.2.5) Registrador de la señal ó Integrador.....	(62)
4.3) Información obtenida de un cromatograma.....	(63)
4.4) Cromatografía como análisis cuantitativo.....	(63)
4.4.1) Calibración con estándares externos.....	(65)
4.4.2) Calibración con estándar interno.....	(65)
4.4.3) Calibración por normalización.....	(66)
IV) METODOLOGÍA.....	(67)
1) Generalidades.....	(67)
2) Precauciones especiales.....	(67)
3) Material y equipo.....	(67)
4) Reactivos.....	(68)
5) Preparación de estándar interno.....	(68)
6) Preparación de la mezcla de metil ésteres de ácidos grasos.....	(68)
7) Esterificación de ácidos grasos en muestras.....	(69)
8) Extracción de los metil ésteres de ácido graso.....	(69)
9) Procedimiento en el cromatógrafo de gases.....	(70)
V) RESULTADOS.....	(65)
VI) ANALISIS DE RESULTADOS.....	(66)
VII) CONCLUSIONES.....	(67)
VIII) BIBLIOGRAFÍA.....	(68)

I) OBJETIVO GENERAL.

Optimizar un método analítico para la determinación de ácidos grasos en fórmulas infantiles.

II) OBJETIVOS PARTICULARES.

- *Mediante una serie de determinaciones demostrar que no hay variación entre los resultados obtenidos inyectando muestras de metil ésteres de ácidos grasos en forma manual y automáticamente.*
- *Disminuir el problema de la volatilidad del n-pentano utilizado para extraer los metil ésteres de ácidos grasos.*
- *Disminuir el tiempo en el análisis.*
- *Implementar la inyección automática en vez de la inyección manual para la determinación de ácidos grasos en fórmulas infantiles.*

III) ANTECEDENTES.

1) INTRODUCCION

La nutrición de los infantes es un tópicó de gran importancia y relevancia para las áreas médica, biológica, farmacéutica y alimentaria.

Específicamente en la industria alimentaria existe un gran reto e interés en el planteamiento y formulación de nuevas alternativas de alimentos para los infantes tomando en cuenta su edad.

La era moderna de fórmulas únicas de composición conocida, empleadas como alimentos completos para lactantes, inició en 1915 cuando Gerstenberg y sus colaboradores crearon una fórmula artificial en la que el contenido lipídico se había adaptado para simular el de la leche materna. Cuatro años más tarde ésta fórmula se había administrado a algunos lactantes. Muchos de los productos disponibles actualmente son variaciones de ésta fórmula original. (Lab. Wyeth, 1994)

Antes de 1915, cuando todavía no existían las fórmulas infantiles preparadas, se conocía muy poco con respecto a los requisitos nutricionales de los lactantes.

Las madres que no podían o no deseaban alimentar con leche materna a sus criaturas se enfrentaban a un problema difícil tratando de encontrar un sustituto adecuado. (Lab. Wyeth, 1994; Anderson et al, 1992; Tomarelli et al, 1962).

En 1961 se logró un avance de gran importancia en el cual mediante un singular proceso de electrodiálisis se alteró la proteína del suero para proporcionar una relación 60:40 entre suero y caseína, la misma proporción de la leche materna. (Lab. Wyeth, 1994; Market Corporation, 1992).

Con el advenimiento del suero electrodiálizado se obtuvieron otros beneficios; tales como el contenido mineral se redujo a valores similares a los de la leche materna y el contenido de citrino se acercó más a los valores similares de la leche materna que el de cualquier otra fórmula infantil.

La investigación en los laboratorios Wyeth produjo, en 1971, una combinación

lipídica más fisiológica. Los cambios en la combinación lipídica se obtuvieron mediante el empleo de una nueva combinación de aceites vegetales, rica en ácido oléico de fácil absorción y pobre en ácido esteárico de difícil absorción. La característica más importante de ésta combinación lipídica es que proporciona los mismos porcentajes de lípidos saturados e insaturados que los encontrados en la leche materna. Además el ácido linoléico es suministrado a niveles fisiológicos, en lugar de los niveles superiores a los de la leche materna, que anteriormente se requerían para asegurar la adecuada absorción de lípidos. (Lab. Wyeth, 1994; Anderson et al., 1982; Barnes et al., 1974; Tomarelli et al., 1962; Woodruff, 1978)

Este trabajo se enfocará más hacia la cuantificación de ácidos grasos en mezclas de grasas empleadas para la fabricación de fórmulas infantiles, en relación a tomando en cuenta el desempeño profesional que he realizado al respecto.

Para la realización de éste trabajo, es conveniente mencionar, que es gracias a los Laboratorios Wyeth S.A. de C.V., lugar en donde me he desarrollado profesionalmente los últimos 4 años.

2) Leche.

2.1 Definición. Desde principios de siglo se ha definido a la leche de distintas maneras siendo algunas de ellas las siguientes :

- **Definición adoptada por el I Congreso Internacional para la Represión de los Fraudes en los Alimentos...** que tuvo lugar en Ginebra en 1903. "La leche es el producto íntegro del ordeno completo e interrumpido de una hembra lechera sana, bien alimentada y no fatigada. Debe ser recogida higiénicamente y no debe tener calor". (Bosch, 1993; Benavides, 1996)
- **En Francia...** en el decreto del 25 de marzo de 1924, se define legalmente a la leche y a los productos lácteos en los siguientes artículos:

Artículo primero. La denominación de leche en indicación de la especie animal de procedencia, se reserva a la leche de vaca. Toda la leche que proceda de una hembra lechera que no sea la vaca, deberá designarse por la denominación de leche seguida por la indicación de la especie animal de la que procede: leche de cabra, leche de oveja, etc.

Artículo segundo. No puede considerarse como leche apta para el consumo humano:

- La leche que proceda de animales afectados por enfermedades.
- La leche coloreada, mal oliente ó sucia.
- La leche que proceda de un ordeno efectuado, durante los primeros siete días después del parto y en general la leche que contenga calor.
- La leche que proceda de animales mal nutridos y muy fatigados.

Artículo 3.º Se prohíbe guardar sin motivos legítimos, exponer, ó vender para el consumo humano leche sucia u obtenida por mezcla de leche sucia y leche apta para el consumo. Leche obtenida por ordeno incompleto y leche que haya obtenido un desnatado, incluso si éste es parcial.

- La leche se define en el Milk Ordinance and Code, recomendado por the United States Public Health Service, como: "La secreción láctea prácticamente libre de calostro obtenida por el ordeño completo de una ó más vacas sanas la cual contiene no menos del 8 1/4% de sólidos de leche no grasos y no menos del 3 1/4% de grasa de leche". (Vesseyra, 1980, Alois, 1985)

En general y a través de estas definiciones, se puede concluir que la leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría, este producto debe estar libre de calostro y debe provenir del ordeño completo de animales sanos y no fatigados.

Este líquido tiene una composición completa, es blanco, opaco, de sabor dulce y de pH cercano a la neutralidad.

La función natural de la leche es la de ser el alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento, cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituida por otros alimentos.

2.2 Composición Química. La composición química de la leche varía considerablemente entre unas especies animales y otras.

Se tiene un gran interés en la comparación de la leche de mujer con las de especies animales, debido a que estas son susceptibles de sustituirse en la alimentación de los lactantes.

Existen en la leche cuatro tipos de componentes importantes: grasas + proteínas (caseína y albuminadas) + lactosa + sales. A ellos se añaden otros componentes presentes en cantidades mínimas: lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases disueltos, etc. (Vesseyra, 1980, Alois, 1985)

La composición de la leche varía en el transcurso del ciclo de la lactación.

En la época del nacimiento, la mama segrega el calostro, líquido que se diferencia principalmente de la leche en sus partes proteica y sólida.

La leche es un producto que se altera muy fácilmente, especialmente bajo la acción del calor. Numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, en especial aquellos que degradan la lactosa con producción de ácido, ocasionando así, la floculación de una parte de las proteínas.

Las diferentes especies de mamíferos producen leche que, de una forma general, tienen una composición semejante pero pueden presentar diferencias importantes en su composición centesimal y tener, como consecuencia, propiedades muy diferentes.

En general, los leches son un tanto más ricas, principalmente en materias nitrogenadas y en sales, cuanto menos completo sea el desarrollo in-útero y el crecimiento de la cría sea más rápido. El contenido en lactosa sigue un orden inverso, pero paralelo, al desarrollo del cerebro; los tejidos nerviosos son ricos en galactósidos. (Veitseyra, 1980).

La materia grasa es un alimento energético, se encuentra en proporción elevada en la leche de los mamíferos de las regiones frías y de las océanos. (Alais, 1980).

La leche humana es la más rica en lactosa, pero es relativamente pobre en elementos nutritivos, lo mismo ocurre con los équidos.

La leche de los ruminantes se distingue, no sóicamente por una elevada proporción de caseína en el contenido total nitrogenado, sino también por una proporción elevada en la grasa de ácidos orgánicos de bajo peso molecular.

A continuación se presenta, en la tabla #1, un cuadro comparativo de la composición de algunos de los principales leches; y en la tabla # 2 se presenta la composición típica de la leche de vaca en forma particular.

Tabla #1

Composición de las principales leches.(g/l).

Origen	Extracto seco total	Grasa	Azúcares	Caseína	Albumina y globulina	Salas
Mujer	117-120	32-35	65-70	10-12	5-6	2-3
Vaca	125-130	35-40	47-52	27-30	4-5	9-9.5
Yegua	95-100	9-15	60-65	10-12	7-8	3-4
Burra	95-105	10-12	60-70	8-12	7-9	4-5
Cabra	125-145	35-50	40-50	30-32	5-7	7-9
Oveja	170-185	55-70	43-50	45-50	8-10	9-10

Fuente: R. Veisseyre - Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. - Acribia, España - 1980 - pág. 69

TABLA # 2

Composición típica de la leche de vaca.

COMPONENTES	COMPOSICIÓN (g/l)	ESTADO FÍSICO DE LOS COMPONENTES
AGUA	882	Agua libre (disolv.) + Agua ligada (3.7%)
Glucidos: lactosa	49	Solución verdadera
LÍPIDOS	35	
Materia grasa propiamente dicha	34	Emulsión de los globulos grasos (3.5 micras)
Lecitina (fosfolípidos)	0.5	
Parte insignificante (esteroles, carotenos, tocoferoles)	0.5	
PROTEÍDOS	34	Suspensión micelar de fosfocaseinato de Ca.
Caseína	27	
Proteidos "solubles" (globulina, albumina)	5.5	Solución coloidal
Sustancias nitrogenadas no proteicas	1.5	Solución verdadera
SALES	9	Solución o estado coloidal
del ac. cítrico (en acido)	2	Fósforo y calcio
del ac. fosfónico (PROS)	2.5	Salas de K, Ca, Na, Mg, etc.
del acido clorhídrico	1.7	
COMPONENTES DIVERSOS		
Vitaminas, enzimas, gases disueltos	Trazas	
EXTRACTO SECO TOTAL	12.7	
EXTRACTO SECO DESENGRASADO	8.2	

Fisicoquímicamente, la leche es un sistema que presenta 3 fases: a) solución, b) suspensión y c) emulsión. Del 85% - 87% de la leche es agua, en esta agua se encuentran los componentes en diferentes formas de solución, las sales y la lactosa se encuentran disueltos en el agua formando una solución verdadera. La mayoría de las sustancias proteínicas no son solubles y forman conjuntos de varias moléculas, sin embargo, estas conjuntos son tan pequeñas, que la mezcla tiene aproximadamente las mismas características que una solución verdadera. Este tipo de solución se le conoce como solución coloidal. La grasa es insoluble en el agua y por esto se encuentra en la leche en forma de glóbulos grasos formando una emulsión. Una emulsión es una mezcla de pequeñas gotas de un líquido en otro líquido sin que lleguen a disolverse. (Veisseyra, 1980 y Alais, 1985).

2.3.-Clasificación de las leches y sus derivados.

2.3.1.- Clasificación de acuerdo al contenido de haloproteínas y caseína.

Los leches pueden clasificarse en dos categorías:

- Leches albuminosas. (Mujer, yegua y cebra), cuyo contenido en albúmina y globulina está bastante próximo a su contenido en caseína.
- Leches caseínicas. (Vaca, cabra y oveja), cuyo contenido en albúmina y globulina es muy inferior a su contenido en caseína.

Este hecho es de gran importancia desde el punto de vista alimenticio. Ya que, en el estómago de las lactantes las haloproteínas no se coagulan formando una masa compacta como la hace la caseína, sino en forma de pequeños grumos que facilitan su digestión. Por ésta razón el niño digiere mejor la leche de mujer que la de vaca. (Veisseyra, 1980; Alais, 1985; Baes, 1993, y Benavides, 1986).

2.3.2. Clasificación de acuerdo a la Cámara de Productos Alimenticios Elaborados con Leche (CPAEL).

La leche y sus derivados se clasifican en:

- 1. **Leche branca.**- Es la leche que se obtiene inmediatamente después del ordeño de las vacas y que por lo tanto no ha sufrido modificación alguna en sus componentes, es denominada también como leche fresca.
- 2. **Leche lúida.**- Es la que ha sufrido una modificación mínima en su composición y en su estado físico a través de la acción de un cambio brusco de temperaturas, la cual es realizada como una medida de control ante la descomposición biológica y bacteriana, dejándola casi en la misma proporción ó relación de todos los componentes de la leche fresca incluyendo el agua. (Leche pasteurizada y leche rehidratada)
- 3. **Leche industrializada.**- Es la que se ve modificada drásticamente en su composición química, a través de la acción del calor, regulada por factores como la temperatura, presión, vacío, densidad, etc; para llegar a obtener la conservación del producto por grandes períodos de tiempo. (Leche en polvo, leche evaporada, leche condensada).
- 4. **Derivados lácteos.**- Son los productos obtenidos a partir de la leche que es sujeta a diferentes transformaciones que provocan un cambio de la misma para dar origen a nuevos y variados productos con características y propiedades similares (Queso, crema, mantequilla y yogurth). (Baes, 1993; y Benavides, 1986).

2.4.- Leche en polvo.

La fabricación de la leche deshidratada ó leche en polvo fue intentada por vez primera en 1805 por Parmentier, pero fue Grunwald, en 1855, quien realizó los primeros ensayos industriales. Sin embargo hubo que esperar a los primeros años del siglo XX para que se instalara en los diversos países, especialmente en los Estados Unidos, una poderosa industria de la leche en polvo. La guerra en 1939 favoreció considerablemente su desarrollo y las entregas de la leche en polvo norteamericana paliaron la gran penuria de productos lácteos que afectó a Europa en los años siguientes al fin de las hostilidades.

La leche en polvo presenta un interés considerable, porque permite el almacenamiento y el transporte económico de grandes cantidades de extracto seco de la leche.

Se distinguen muchas categorías de la leche en polvo: leche entera, semidesnatada y desnatada.

El problema dominante de las leches en polvo es el de la solubilidad del producto acabado. En efecto, es necesario que la leche, en el curso de su desecación, no sufra modificaciones profundas que impidan su disolución total en agua cuando se reconstituye la leche finalmente.

2.4.1.- Comportamiento de la leche sometida a un proceso de desecación.

Tras la desecación, la leche se presenta como un polvo cuyo aspecto, composición y estructura fisicoquímica son variables dependiendo de las condiciones a que ha sido sometida durante su preparación.

La lactosa es el componente mayoritario de la leche en polvo. En general se encuentra en forma de lactosa amorfa ó vítrea constituyendo una fase continua a través de las partículas en polvo. La lactosa amorfa es muy higroscópica. Cuando la atmósfera que rodea al producto está cargada de humedad, se observa la

cristalización del azúcar en forma de lactosa alfa-monohidrato. Estos cristales en principio son de tamaño pequeño pero después crecen pudiendo perturbar la estructura de los granos de polvo, lo cual dificulta la reconstitución. Por lo tanto, una conservación en condiciones adecuadas debe impedir la cristalización.

El estado de las proteínas tras la desecación, juega un importante papel desde el punto de vista de la reconstitución de la leche.

Las proteínas solubles se desnaturalizan en mayor ó menor grado según la intensidad y duración de los tratamientos térmicos que la materia prima sufre a lo largo de la fabricación. En los leches en polvo, llamadas de baja temperatura, la desnaturalización no afecta a más de un 10% de las proteínas solubles. En los leches de alta temperatura se trata de desnaturalizar totalmente a las proteínas hidrosolubles mediante tratamientos térmicos adecuados. Al mismo tiempo, el polvo se enriquece en grupos reductores sulfhídrico capaces de proteger a la materia grasa contra la oxidación. La caseína es poco sensible al calor, en cambio las micelas de fosfocaseinato si lo son. Por eso es conveniente utilizar bajas temperaturas para preparar un polvo de buena reconstitución.

El estado de la materia grasa en el polvo es un factor muy importante para apreciar la calidad del producto.

Es necesario evitar cualquier alteración del glóbulo graso que conduzca a la liberación de la grasa libre.

Tras la reconstitución se forma una capa de aceite cuando la ruptura ha tenido lugar. Por otra parte, la grasa liberada puede sufrir una rápida auto-oxidación.

Debe destacarse que estas condiciones de almacenamiento pueden contribuir al enriquecimiento del polvo en grasa libre. Así, la cristalización de la lactosa puede alterar la membrana del glóbulo graso y favorecer la salida de los lípidos del interior.

La materia grasa libre es un obstáculo para la estabilización de la leche en polvo, ya que humedece los gránulos.

Por último, la cantidad de agua que permanece en el polvo es un factor

Tabla #3

Composición porcentual de la leche en polvo.

Componentes	Parcialmente descremada	Entera en polvo
Agua	35-40	20-40
Grasas	10-15	26
Lactosa	50.0-52.0	35
Materia nitrogenada	34.0-37.0	27.0-29.0
Sales minerales	11.0-16.0	7.5-8.0
Extracto seco magro	94.5-95.5	70.0-72.0

Fuente: Dr. R. Veisseyre - Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche - Acribia España.- 1980.- pag 258

En esta tabla se compara la composición porcentual de los leches en polvo, entera y parcialmente descremada, tomando como punto de partida para la leche en polvo entera sólo un 26% de grasa, cantidad que se acostumbra en la mayoría de las formulaciones comerciales, por ser este el porcentaje ideal para trabajarse por dispersión.

2.5 Leche maternizada ó humanizada.

2.5.1. Introducción.

A partir de la Revolución Industrial, la mujer se empezó a integrar de manera formal al trabajo remunerado fuera del hogar. Este cambio, que acarrea múltiples transformaciones económicas y sociales, condujo también al abandono de la práctica de amamantamiento.

Décadas más tarde, durante la primera mitad del siglo XX, en la mayoría de los países industrializados se produjo un notable descenso en las tasas de mortalidad infantil, lo que fue erróneamente interpretado como una evidencia de que el mejor método para alimentar a los recién nacidos era el biberón. A tal grado se difundió esa creencia equivocada, que la industria empezó a producir fórmulas sustitutas de la leche materna así como utensilios para prepararlas y administrarlas (biberones, chupones, esterilizadores, etc.), adquiriendo gran popularidad y propiciando un abandono aún más acentuado de la lactancia al seno materno. El fenómeno rebasó las fronteras de los países industrializados e hizo acto de presencia en las naciones en vías de desarrollo, con fatales consecuencias.

En 1960, el inglés Aykroyd y sus colaboradores, señalaron: "a partir de la década de los años cincuenta, los contrastes entre clases sociales, y específicamente entre las sociedades industrializadas y las no industrializadas, puso en evidencia que la disminución de la mortalidad infantil en las primeras se debió a los avances económicos y sociales; mientras que en las últimas el abandono de la lactancia materna contribuyó en forma creciente a mayor morbilidad y mortalidad infantil por el

sinergismo " desnutrición-infecciones".

Después de un análisis más cauto y detallado, se comprobó que las mejoras en las condiciones sanitarias de las viviendas, la introducción del drenaje, el agua potable y los servicios de salud maternoinfantil, fueron los responsables verdaderos de la disminución en las tasas de mortalidad infantil en Inglaterra y no los leches industrializadas administradas en biberón, como al principio se presumió.

2.5.2.- Definición y generalidades.

Los leches maternizadas son leches cuya composición se modifica para que sean lo más semejante posible a la leche materna, también son conocidas como "leches para lactantes" ó "leches modificadas".

La leche de vaca, cruda, fresca ó modificada en alguna forma, es la base de la mayoría de las mezclas lácteas. Sin embargo, existen algunos sustitutos de la leche para lactantes hipersensibles a la leche de vaca.

El proceso de obtención de éstas leches (que varía, según sea el proceso de pasteurización, homogeneización y evaporación comercial) ha alterado tanto la caseína que se llegan a formar cuajos, pequeños y de fácil digestión en el estómago, eliminando con ésto la principal causa de la indigestibilidad de la proteína de la leche de vaca].

El cambio de patrones culturales y sociales ha contribuido en gran manera al aumento de confianza en la lactancia artificial.

La superioridad de la leche materna sobre los actuales preparados artificiales derivados de la leche de vaca, se ha hecho menos aparente al conocerse mejor los procedimientos de preparación de la leche y la química de la alimentación.

Hace sólo algunas décadas aparecieron las leches modificadas, con una composición más semejante a la humana, que cuando se preparan con la concentración correcta y la asepsia necesaria; estas fórmulas proveen las proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua con las características y en las

cantidades adecuadas como para que el niño alcance un crecimiento y desarrollo semejantes al de los que han sido alimentados con leche materna, aun sin sus beneficios inmunológicos. El contacto afectivo puede no verse afectado.

2.5.3. Comparación de la leche materna y la de vaca.

En la tabla # 4 se indica la composición media de la leche materna y la de vaca. Ambos tipos de leche varían en las diferentes fases de la lactancia; además, en ambos tipos de leche existen diferencias individuales muy marcadas.

Tabla # 4

Comparación de las leches materna y de vaca. *

Componentes %	Humana	Vaca
Agua	87.6	87.3
Sólidos totales	12.4	12.7
Lactosa	1.2	3.3
Caseína	0.4	2.3
Suero	0.6	0.6
Lactoalbumina	0.3	0.4
Lactoglobulina	0.2	0.2
Lactoferrina	7	4.0
Glicógeno	3.5	3.7
Minerales (cenizas)	0.21	0.72
Minerales (por litro)		
Sodio (mEq)	7	25
Potasio (mEq)	14	35
Cloro (mEq)	12	29
Calcio (mEq)	330	1250
Fósforo (mg)	150	960
Magnesio (mg)	4.0	12.0
Azufre (mg)	14.0	30.0
Hierro (mg)	1.5	1
Zinc (mg)	1.2	3.0
Cobre (mg)	0.4	0.3
Yodo (mg)	0.07	0.21
Vitaminas (por litro)		
A (mcg)	540	370
C (mg)	4.0	2.0
E (mg)	6.6	0.6
K (mg)	0.15	0.6
B1 (mg)	0.15	0.4
B2 (mg)	0.47	1.53
B6 (mg)	0.11	0.40
Niacina (mg)	1.7	0.8
Ac. Pantotémico (mg)	2	3.5
Biotina (mcg)	4	35
Ac. Fólico (mcg)	2.2	2.9
Calorías por lt. (aprox.)	710	690

Fuente: A.E. Bender.- Nutrition and Dietetic Foods.-
The P. Press.- Great Britain - 1973 - pag.81

* Valor promedio entre las razas: Holstein, Suiza café y
Gernsey.

Tabla # 5

Composición de ácidos grasos en leche materna y de vaca (%).

Ácidos grasos	Leche materna	Leche de vaca
Saturados		
C 4 (Butírico)	0.1	3
C 6 (Caproico)	0.1	1
C 8 (Caprílico)	0.1	1
C 10 (Caprílico)	1.6	3
C 12 (Láurico)	7	4
C 14 (Mirístico)	8.8	12
C 15 (Pentadecanóico)	0.5	1.1
C 16 (Palmitico)	2.1	28
C 17 (Heptadecanóico)	0.5	0.7
C 18 (Estearico)	7.2	11
C 20 (Araquidico y superiores)	2.2	1.4
Total saturados	49.1	66.2
Insaturados		
C 14:1 (Miristoléico)	0.2	2
C 16:1 (Palmitoléico)	2.2	3
C 18:1 (Oleico)	35.8	24
Otros ac. monoinsaturados	1.4	1
C 18:2 (Linoléico)	7.5	2
C 18:3 (Linolenico)	0.8	0.5
C 20:4 (Araquidónico)	0.6	0.3
Otros C 20 y superiores	2.4	1
Total insaturados	50.9	33.8

Fuente: Composition of foods. Dairy and Egg Product Raw-Processed-Prepared Agriculture Handbook # 8-1 U.S. Dept. of Agriculture Washington, D.C. 1976.

El contenido mineral en la leche de mujer es mucho menor que el de la de vaca: 0.15-0.25% en la leche de mujer y 0.70- 0.75 en la de vaca a excepción del hierro y del cobre. La leche de vaca llega a tener una cantidad considerablemente mayor de todos los minerales que la leche de mujer. Ninguna de las dos leches contiene una cantidad suficiente de hierro; en el caso de los 4 a 6 meses de vida de los lactantes, el déficit de este mineral es compensado por las reservas fetales de hierro (Veisseyra, 1980, y Baes, 1993).

Referente al contenido de vitaminas de la leche materna y la de vaca, esta varía de acuerdo a la ingesta materna de alimentos. Ambas poseen cantidades suficientes de Vitamina A e insuficientes de Vitaminas C y D para cubrir los requerimientos nutricionales del lactante en los primeros meses de vida. Cabe aclarar que la leche de la mujer tiene mayor contenido de Vitamina C que la de vaca, mientras que esta contiene más Tiamina y Riboflavina que la de la mujer y, el contenido de Niacina es igual en ambas leches. (Veisseyra, 1980, Baes, 1993)

Aunque existen ligeras variaciones en los valores energéticos de cada tipo de leche, en la práctica cabe suponer que ambas equivalen a 20 Kcal/30g ó 0.67 Kcal/ml.

La leche de mujer se encuentra prácticamente libre de contaminación bacteriana, pero tanto como los bacilos de la tuberculosis como los *Mycobacterium* pueden hallarse a veces en la leche de mujer infectada por estos gérmenes. La leche de vaca puede estar contaminada, en la mayoría de los casos las bacterias presentes no son muy nocivas para el hombre, aunque por su composición es un muy buen medio de cultivo para bacterias patógenas, infecciones asépticas y ecdérmicas. Entre estas infecciones se encuentran las enfermedades estreptocócicas, la difteria, la fiebre tifoidea, la salmonelosis, la tubercuosis y la brucelosis. Por esta razón se aconseja hervir la leche antes de preparar la mezcla láctea para el niño.

En relación al tiempo de digestión de las leches, esta es más rápida con la leche de mujer que con la de vaca. El tamaño del coágulo de la leche de vaca puede

reducirse algo por la ebullición y se vuelve mucho menor gracias a la acción del calor requerido para la elaboración de la leche evaporada, por adición de ácido ó alcali ó por homogenización. En contraste, el cuajo de la leche materna es fino, flocuiento y es fácilmente desdoblado en el estómago del lactante. La grasa de la leche de vaca es más difícil de digerir que la de la mujer. (Vessey, 1980; Atlas, 1985; y Benavides, 1986).

2.5.4 Requerimientos nutricionales del bebé.

Los requerimientos del bebé son bien conocidos. La leche materna es designada como el alimento esencial del bebé; los nutrimentos presentes en ésta y en las cantidades normalmente consumidas son aceptados como los niveles óptimos a seguir. Sin embargo, cuando se emplea leche de vaca, los bebés presentan más calcio en las huesos y un porcentaje mayor de proteína. Debido a los altos niveles de estos nutrimentos en la misma, traen como consecuencia un crecimiento muy acelerado, que si no es benéfico simplemente es de un modo diferente.

Los requerimientos de energía, de los Infantes, son aceptados como 130 Kcal /Kg al nacer, disminuyendo durante el primer año de vida a 100 Kcal/ Kg.

El niño necesita consumir cantidades mucho mayores de agua, por unidad de peso corporal que el adulto. El consumo de líquido en un niño sano equivale al 10 ó 15% de su peso corporal.

En relación con las proteínas, se sabe que son estructuras sólidas predominantes en el organismo y que la clase, número y disposición de los aminoácidos determinan los característicos de las mismas. Se han identificado 24 aminoácidos; 9 de ellos se consideran esenciales para los niños: treonina, valina, leucina, isoleucina, lisina, triptófano, fenilalanina, metionina e histidina (necesaria sólo por los niños pequeños). No es posible la formación de nuevos tejidos, a menos que todos los aminoácidos esenciales estén en la dieta. En la tabla # 6 se muestran las necesidades aproximadas, diarias, de calorías, proteínas y agua para niños. (Baes, 1993).

Tabla # 6

Necesidades diarias aproximadas de calorías, proteínas y agua en los niños.

Edad (años)	Calorías (por Kg)	Proteínas (g/Kg)	Agua (ml/Kg)
*Lactantes	110	2-2.5	150
1-3	100	2-2.5	125
4-6	90	3	100
7-9	80	2.8	75
10-12	70	2	75
13-15	60	1.7	50
16-19	50	1.5	50

Fuente: V.C. Vaughn R.J. McKay; W.E. Nelson.- Tratado de Pedatria -
 Salvat.- Mexico.- 1980.- pag.- 147.

La mayor parte de las necesidades calóricas del cuerpo son cubiertas por los carbohidratos. Los carbohidratos se almacenan principalmente en forma de glucógeno en el hígado y los músculos, pero no es probable que constituyan más del 1% del peso del cuerpo. Proporcionan una fuente de energía fácilmente disponible (cada célula y trabajo muscular). Se requieren para proporcionar suministros del 25 al 55% de las calorías. (Veisseyra, 1980; Baes, 1993)

2.5.5.- Justificación del uso de leches maternizadas.

Se sabe que la lactancia materna sigue teniendo ventajas prácticas y psicológicas sobre los preparados artificiales ó leches para lactantes; que la madre debe de tener en cuenta, cuando elige la manera de alimentar a su bebé. (Veisseyra, 1980; y Aiais, 1985).

Algunas de estas ventajas son:

- La leche materna está en todo momento fácilmente disponible a la temperatura adecuada, y en cualquier lugar en donde la madre se encuentre.
- No se requiere tiempo para su preparación.
- La leche es fresca y libre de contaminación bacteriana.
- La alergia y la intolerancia a la leche de vaca son los responsables de importantes alteraciones y problemas alimenticios que no se observan en lactantes maternos.
- Los lactantes alimentados a pecho son relativamente resistentes a la infección por virus atenuados de la vacuna poliomielítica de la madre. También se ha demostrado que el crecimiento de los virus de las paperas, influenza y de la encefalitis B japonesa, pueden ser inhibidos por sustancias existentes en la leche humana.

De este modo, se puede observar que no existe inconveniente alguno para alimentar con el pecho a un niño sano y normal, nacido durante el período normal de gestación. Pero, qué sucede cuando la madre es incapáz de criar a su hijo por algún

trastorno fisiológico, psicológico, social ó físico. Entonces es esencial la alimentación artificial, a través de un sustituto de la leche materna.

3) LIPIDOS.

3.1) Definición

Los lípidos son un grupo de compuestos de estructura heterogénea muy abundantes en la naturaleza, del que las grasas y los aceites son los representantes más importantes. Están formados por carbono, oxígeno e hidrógeno y en ciertos casos también pueden contener fósforo y nitrógeno. Dentro de los compuestos clasificados como lípidos existe una gran variedad de sustancias que presentan poca similitud en su estructura química, pero que todas tienen la particularidad de que son solubles en solventes orgánicos, e insolubles en agua, de hecho, esa es la definición de lípidos: compuestos solubles en éter, cloroformo y otras disolventes no polares, pero insolubles en agua. La distinción genérica que existe entre un aceite y una grasa es que los aceites son líquidos a temperatura ambiente, mientras que las grasas son sólidas a la misma temperatura. Normalmente los aceites son de origen vegetal (soya, algodón, cacahuete, cártamo, etc), mientras que las grasas son de origen animal (cerdo, oveja, etc). Las grasas y los aceites son nutrientes fundamentales en la dieta de los animales, ya que representan la forma más concentrada de calorías en los alimentos. Además de su valor nutritivo, los lípidos contribuyen en muchos aspectos a la textura de los alimentos, sirven como vehículo de las vitaminas liposolubles e influyen en el sabor de varios productos alimenticios. Las grasas son muy pobres conductores del calor y por ello el tejido adiposo sirve como aislante natural de los animales. (Badui, 1982).

3.2) Clasificación.

Los lípidos se clasifican de acuerdo a su estructura en:

- **Lípidos simples.** - Están formados por ésteres de ácidos grasos y alcoholes. Dentro de éste grupo se encuentran los grasos y los azitales (ésteres de glicerol con ácidos monocarboxílicos), y las ceras (ésteres de alcoholes monohidroxilados y ácidos grasos).
- **Lípidos compuestos.** - Son lípidos simples conjugados con moléculas no lípidos. Aquí se encuentran: fosfolípidos (ésteres que contienen ácido fosfórico en lugar de un ácido graso, combinado con una base de nitrógeno), glucolípidos (compuestos de carbohidratos, ácidos grasos y esfingosina, llamados también cerebrosídeos); y las lipoproteínas (compuestos de lípidos y proteínas).
- **Compuestos asociados.** - Aquí se encuentran: ácidos grasos (derivados de los lípidos simples); pigmentos, vitaminas liposolubles, esteroides e hidratos de carbono.

3.3 Ácidos grasos.

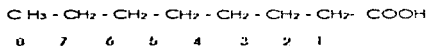
3.3.1) Definición y composición.

Los ácidos grasos son los componentes más abundantes de los lípidos, aunque generalmente no se encuentran en estado libre como tales, sino en forma esterificada como parte constituyente de los diferentes acilglicéridos. La presencia de los ácidos libres en los alimentos se utiliza como índice de una posible hidrólisis de los acilglicéridos; que según el sistema de que se trate, puede ser positiva o negativa para la calidad organoléptica de cada producto. El número de ácidos grasos conocidos que existe en la naturaleza es de aproximadamente 100.

Se han encontrado más de 60 ácidos grasos en la fase lipídica de la leche, que comprenden ácidos cíclicos, hidroxilados, ramificados, saturados e insaturados.

Su nombre identifica su tamaño al añadir la terminación "oico" a la raíz griega que indica el tamaño de la cadena de átomos de carbono.

De acuerdo con las recomendaciones de la Convención de Ginebra, la numeración de los átomos de carbono de una molécula de ácido graso se hace a partir del grupo carboxilo cuyo carbono corresponde al número 1.



La gran mayoría de los ácidos grasos de los alimentos son lineales y monocarboxilados, varían en la longitud de su cadena y grado de insaturación y contienen normalmente un número par de átomos de carbono ya que su metabolismo y aprovechamiento biológico se lleva a cabo a través de moléculas de carbonos pares, como es la acetilcoenzima A.

Los ácidos grasos se han dividido en dos grandes grupos: saturados e insaturados, dependiendo de la ausencia ó presencia de dobles ligaduras en su molécula.

3.3.2] Clasificación.

Los ácidos grasos se clasifican en:

- **SATURADOS.-** Los ácidos grasos saturados varían de C_4 a C_{26} , siendo los más comunes el ácido palmítico (C_{16}) y el ácido esteárico (C_{18}), aunque algunas grasas también contienen cantidades razonables de C_{20} y de ácidos de una cadena mayor. El punto de fusión del ácido graso saturado es directamente proporcional al tamaño de su cadena de átomos de carbono. Por otra parte, la solubilidad de los ácidos grasos disminuye a medida que aumentan la cadena en su longitud y el peso molecular de la molécula.
- **INSATURADOS.-** Los ácidos grasos insaturados tienen una mayor reactividad química que los saturados, debido a la presencia de dobles ligaduras. Estos ácidos predominan sobre los saturados, especialmente en los aceites vegetales y en las grasas de animales marinos que viven a bajas temperaturas. Su punto

de fusión disminuye a medida que aumenta el grado de insaturación y su sensibilidad a las reacciones de oxidación es mayor cuanto más insaturado está el ácido; su punto de fusión es menor que el de los saturados para una misma longitud de la cadena de átomos de carbono. Los ácidos grasos que contienen una sola ligadura doble se llaman monoinsaturados ó monoénicos, y a los de más de una se les denomina poliinsaturados ó poliénicos. La mayoría de los ácidos monoinsaturados presentan su doble ligadura entre los átomos de carbono 9 y 10, mientras que los poliinsaturados tienen una entre los carbonos 9 y 10 y las restantes están desplazadas hacia el extremo metileno terminal de la cadena.(Badui, 1982).

En la tabla # 7 podemos ver a los ácidos grasos más comunes.

Tabla # 7

Ácidos grasos saturados e insaturados más comunes.

Nombre trivial	Nombre científico	Fórmula	Punto de fusión (°C)
Saturados			
Butírico	Butanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-5.9
Capríico	Hexanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	-3.4
Capríico	Octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	16.7
Capríico	Decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	31.6
Láurico *	Dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2
Mirístico *	Tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	54.4
Palmitico *	Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63
Estearico *	Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.4
Arquidónico	Eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76
Insaturados			
Palmitoleico *	Hexadeca-9-enoico	$\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{COOH}$	
Oléico *	Octadeca-9-enoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$	
Linoléico *	Octadeca-9,12-dienoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$	
Linoléico *	Octadeca-9,12,15-trienoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{COOH}$	
Arquidónico *	Eicosa-5,8,11,14-tetraenoico	$\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{COOH}$	
Vaccénico *	Octadeca-11-enoico	$\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{COOH}$	

* Los más comunes en alimentos.

Ref: "Química de los alimentos". Salvador Badu Dergal. Ed. Alhambra. 1981. Pag. 163.

Debido a sus dobles ligaduras, los ácidos grasos insaturados presentan dos tipos de isomerismo: a) geométrico, *cis*, *trans*, y b) posicional, causado por la diferencia en la localización de las dobles ligaduras en la cadena de átomos de carbono. La mayoría de los ácidos grasos en la naturaleza son del tipo *cis*.

El símbolo se usa para denotar la localización de las dobles ligaduras en la molécula del ácido graso.

3.3.3.-Importancia de los lípidos en leches maternizadas.

En 1971 Laboratorios Wyeth fue la primera compañía en desarrollar una combinación fisiológica de lípidos, creada específicamente para una fórmula infantil.

Esta singular combinación de grasas contiene una gran cantidad de ácido oléico, de fácil digestión, y poca cantidad de ácidos esteárico y palmítico, de difícil digestión. La característica más importante de ésta combinación lipídica es que proporciona aproximadamente los mismos porcentajes de lípidos saturados e insaturados encontrados en la leche materna. Entre las ventajas que ofrece esta combinación están:

- Que la combinación lipídica contiene una composición fisiológica de ácidos grasos.
- Promueve una buena absorción de calcio. Varios estudios clínicos han demostrado que la mejor absorción de calcio y lípidos es proporcionada por fórmulas con una relación inoleato-oleato similar a la de la leche materna.
- Proporciona aproximadamente el 50% de la ingesta calórica del bebé.
- Ayuda a la absorción adecuada de vitaminas liposolubles (Wyeth, S-26, 1994).

Los ácidos grasos saturados, tales como el esteárico y palmítico, que se hayan presentes en grandes cantidades en la leche de vaca y en la leche en polvo ó evaporada, pueden unirse al calcio para formar jabones insolubles que son excretados, con lo que no todo el calcio presente en la fórmula puede ser absorbido ó asimilado.

Una ingestión inadecuada de calcio, fósforo y vitamina D ó una absorción

inapropiada de calcio puede interferir en el desarrollo adecuado de dientes y huesos fuertes, algo de mucha importancia durante este periodo de rápido desarrollo. Los ácidos grasos esenciales (linolénico y linoléico) deben suministrarse en la dieta del bebé porque no pueden ser sintetizados por el organismo. Estos dos ácidos grasos esenciales son necesarios para la síntesis de las prostaglandinas y además son parte constitutiva de la membrana de diferentes tejidos celulares; estos ácidos funcionan también como precursores en la síntesis del ácido araquidónico (tetransaturado), que se requiere para darle rigidez a la pared de la mitocondria de las células. Otras funciones biológicas incluyen la estimulación del crecimiento humano, el mantenimiento de la piel y el pelo, la regulación del metabolismo del colesterol, la actividad lipotrópica y el mantenimiento del sistema reproductivo (1 y 30). En la tabla anterior, #8, podemos conocer la composición (%) y las propiedades de algunos de los lípidos más usados en la industria alimentaria.

Tabla #8

Composición y propiedades de algunos lípidos usados en la industria alimentaria.

Propiedad	Mantequilla	Coco	Maiz	Algodón	Cerdo	Palma	Cacahuete	Sorgo	Soya	Oliva
Ac. graso										
Bufínico	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Capríico	3	7	0	0	0	0	0	0	0	0
Láurico	4	48	0	0	0	0	0	0	0	0
Mirístico	12	18	0.2	0.9	3	1	0.1	0	0	0
Palmitico	25	8.5	12	23.5	23	46	11	12	11	14
Estearico	9	23	2.2	2.5	13	4	3	1	4	2.5
Oléico	32	6	27	18	46	38	48	31	25	68
Linoléico	0	2	57	54	14	10	31	53	50	13
Arquíduico	1		0.3	0.3	0.2	0.4	1.5	0.1	0.4	0.4
Linolénico	0	0	1	0.3	1	0.3	1	2	8	0.7
Gardínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Balénico	0	0	0	0	0	0	3.5	0	0.3	0.2
Índice de Iodo	30	9	125	110	73	50	98	115	130	85
Ind. saponificación	228	258	190	195	184	198	187	191	190	192
Punto de fusión C	28-35	25				31-43	40-43			

Fuente: Salvador Badui Dergal. "Bioquímica de los alimentos" Ed. Universidad Alhambra. México, D.F. 1984. Pág. 164

3.3.4) Lipólisis.

La lipólisis es la hidrólisis enzimática de los triglicéridos, reacción que en la leche y en los productos lácteos es responsable de la aparición de sabores y olores desagradables. Algunos de los olores y sabores que desencadenan la lipólisis se deben directamente a la liberación de ácidos grasos de cadena corta y media (C₄ a C₁₇), otros sin embargo, son debidos a productos derivados de ácidos grasos libres (AGL) por autooxidación, beta-oxidación y otras reacciones. (De la Fuente, 1993).

La lipólisis, cuantitativamente más importante, en leche de buena calidad es provocada por la lipasa de la leche.

La lipólisis que tiene lugar después del tratamiento térmico, está causada por enzimas ajenas a la leche, entre las que cabe diferenciar enzimas extracelulares termorresistentes producidos por bacterias psicótrofas, que crecen durante la refrigeración de la leche cruda, lipasas fúngicas presentes en los quesos azules y otras enzimas que se añaden tras la pasteurización para la elaboración de distintos productos lácteos.

Los AGL resultado de la lipólisis se concentran en la fase grasa, aunque una cierta proporción de los de cadena corta pueden pasar a la fase acuosa.

3.3.5) Métodos de extracción de ácidos grasos libres. (A.G.L.)

Los métodos basados en la separación mecánica de la grasa sólomente miden los ácidos solubles en esa fase y estiman por defecto el contenido total. Los métodos basados en la extracción con disolventes determinan una gran parte total de los AGL, sin embargo, cuando la proporción de los ácidos de cadena corta es alta, también existe la posibilidad de que se extraiga el ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Los procedimientos que implican una adsorción en una fase sólida son laboriosos y, se utilizan como procedimientos de referencia.

Teóricamente, los métodos que permiten la extracción de la totalidad de los ácidos y el análisis individualizado de los AGL por técnicas cromatográficas son los ideales. (De la Fuente, 1993).

Los métodos para inhibir la acción de la lipasa de la leche son variados e incluyen la inhibición físico-química y la inactivación térmica. La primera se basa en el empleo de conservadores como el dicromato potásico o el agua oxigenada o la utilización de carragenatos. La lipasa de la leche se inactiva a bajo pH. La actividad lipásica también puede ser destruida por inactivación térmica de la lipoproteína lipasa láctea. (De la Fuente, 1993).

3.3.4.1) Aislamiento de los lípidos.

- = **Separación mecánica.** Por medios físicos ó mecánicos podrían determinarse los ácidos grasos libres (AGL) que se encuentren en la fase grasa. El método más conocido se refiere a la acción combinada de una mezcla de detergenes (Tritón 100 y tetrafosfato sódico), el calor y la agitación, seguida o no de centrifugación, provoca la desnaturalización de la membrana del glóbulo de grasa, con la consiguiente separación de la misma y los AGL.
- = **Extracción por medio de disolventes.** Los ácidos grasos de la fase acuosa así como los de la fase orgánica se pueden extraer por medio de disolventes. La eficacia de la extracción viene determinada por su polaridad.

Se han estudiado diferentes tipos de disolventes. Uno de los primeros consistió en una extracción simple de una mezcla de leche, etanol y NaCl, con éter etílico y éter de petróleo. Si bien se lograron recuperaciones aceptables de los diferentes ácidos, la extracción de los lípidos y de ácido láctico lo hacen desaconsejable por la posible aparición de interferencias. Otros autores utilizan otras mezclas como heptano, isopropanol y ácido sulfúrico en diferentes concentraciones para extraer de forma rápida y sencilla la grasa de la leche.

Una alternativa utilizada con éxito en la etapa de extracción es la adsorción sobre ácido silícico. La mezcla puede ser transferida a una columna cromatográfica

donde los AGL y el resto de la grasa pueden ser eluidos con un disolvente adecuado.

Una mezcla de cloroformo y butanol como eluyente, obteniendo la separación de todos los ácidos grasos de leche incluyendo el Ca.

Rellenando la sección inferior de una columna cromatográfica con gel de sílice alcalinizado con KOH se consigue la retención de los AGL y su separación de los triglicéridos. Los primeros se eluyen posteriormente con una solución de ácido fórmico en éter etílico.

Un disolvente fuertemente polar como el acetonitrilo, consigieron en un solo paso la extracción de los AGL y su aislamiento de los triglicéridos en muestras de leche. (G. Duncombe, 1963; Palette et al, 1992; Miwa et al, 1990. Hivnak et al, 1967; De la Fuente, 1993; y Colmenares, 1981).

3.3.6) Determinación global de los ácidos grasos libres.(A.G.L).

La determinación global de los AGL se puede realizar con el uso de algún indicador, potenciométricamente ó midiendo, la formación de compuestos coloreados, por espectrofotometría visible

Para hacer la determinación por valoración se puede aplicar la grasa aislada disuelta en un disolvente apropiado a una alícuota de la fase orgánica de la muestra extraída.

Este procedimiento es el más empleado para determinar la acidez de la grasa de distintos productos lácteos.

Para la determinación espectrofotométrica, el cambio de color de un indicador (rojo de fenol) producido por la presencia de AGL fue empleado por Dale Meinertz (1960) y por Deeth en 1975 en leche.

En éste procedimiento la muestra se mezcla con un disolvente de extracción acidificado (isopropanol, heptano y ácido sulfúrico) que permite detener la actividad de las enzimas lipolíticas y extraer los AGL de la fase acuosa, incluso los que están en forma de sales. Después de la agitación y de la sedimentación, los ácidos grasos se

mezclan con una solución tampón-indicador (rojo de fenol y dietilbarbiturato sódico) en atmósfera libre de dióxido de carbono. Los ácidos grasos liberan ácido dietilbarbitúrico que convierte el rojo fenol desde la forma alcalina (rojo) a la forma ácida (amarillo).

Mediante una curva de calibración, utilizando ácido palmítico como patrón, es posible realizar la determinación cuantitativa midiendo la absorción a 570 nm. Otro procedimiento muy utilizado se basa en la transferencia selectiva de las sales de cobre de los ácidos grasos en cloroformo.

El método consiste en la adición, a la leche, del disolvente de extracción (cloroformo, heptano, ó metanol) a pH de 2.5. Los ácidos grasos liberados se transforman en sales de cobre al añadir una mezcla que contiene nitrato de cobre. El complejo coloreado se mide a 440 nm. Este método presenta ciertas interferencias que provienen de los fosfolípidos y en menor grado del beta-caroteno.

Considerando la diversidad de métodos propuestos, las mayores dificultades están asociadas a una incompleta extracción de algunos ácidos de cadena corta y la extracción de ácidos como el láctico y cítrico que da lugar a resultados erróneos (De la Fuente, 1993)

3.3.7) Métodos para la determinación particular de cada uno de los posibles ácidos grasos libres presentes en fórmulas infantiles.

Los métodos globales de determinación de ácidos grasos libres sólaamente permiten estimar el grado de lipólisis. Sin embargo, como se ha indicado, para establecer la clasificación de la muestra sobre la base de la percepción organoléptica, es necesario estimar las cantidades de los ácidos grasos individualmente. Un método ideal de referencia debe ser aplicable a diferentes productos, presentar un alto porcentaje de recuperación de todos los ácidos grasos en el intervalo de concentraciones que se encuentran en las muestras y permitir la extracción de los ácidos grasos en el intervalo de concentraciones en que se encuentran en las muestras y permitir la extracción de los ácidos grasos, de forma que puedan ser cuantificados

en ausencia de compuestos que interfieran en la determinación final.

Las tres etapas clave para los diferentes métodos son: extracción de los lípidos, separación de los AGL de los triglicéridos y la cuantificación de los AGL individualmente. (De la Fuente, 1993).

3.3.7.1) Extracción de los lípidos.

En la extracción, la mayor dificultad radica en aislar de forma simultánea los ácidos de cadena corta, media y larga.

Cuando un alcohol está presente en la mezcla de extracción, una gran proporción de ácidos de cadena corta pasan a la fase polar, disminuyendo su contenido de la no polar, que es la que posteriormente se utiliza para el análisis final.

Diferentes autores han empleado éter etílico acidificado con ácido clorhídrico ó ácido sulfúrico, ó mezclas de éter de petróleo/éter etílico y éter/heptano, respectivamente, como disolventes de extracción acidificando con ácido sulfúrico (De la Fuente, 1993).

3.3.7.2) Separación de los ácidos grasos libres de los triglicéridos.

El requisito esencial para obtener una buena separación es evitar la hidrólisis de la grasa. Esta lipólisis incrementaría los AGL y conduciría a errores, por exceso, en la determinación.

Aunque se ha realizado la separación de los triglicéridos por cristalización a baja temperatura ó cromatografía en capa fina la mayoría de los trabajos emplean columnas cromatográficas ó resinas de intercambio iónico. Las condiciones de fraccionamiento pueden también modificar los contenidos de AGL de la muestra. Se puede favorecer su aumento por la hidrólisis de la grasa durante su paso a través de la columna o por contacto con la resina intercambiadora. Las concentraciones pueden disminuirse si se producen adsorciones de los AGL sobre las resinas.

La utilización de resinas intercambiadoras aniónicas es antigua, pero la dificultad del empleo con disolventes orgánicos polares y la baja recuperación para los AGL de

cadena corta la hicieron desaconsejable. En los últimos años este método se ha aplicado con éxito.

En 1983, Needs y coautores, separaron los AGL de los triglicéridos de leche por agitación con la resina aniónica Ambertyst 26, que servía para concentrar la muestra sin pérdida de los ácidos de cadena corta. Los AGL enlazados en la resina se metían y se cuantifican con patrones internos.

Posteriormente desarrollaron columnas de ácido silícico alcalinizado con KOH como soporte adsorbente de los AGL en productos lácteos, sin embargo, estos soportes producían lipólisis de los triglicéridos que daba lugar a una sobrevaloración de la concentración de AGL.

Otro método de aislamiento de los ácidos grasos del resto de la grasa es por valoración con NaOH etanólica. Después de la separación de las sales de los AGL de la grasa mediante sucesivas lavadas con agua destilada, para analizarse en su perfil de ácidos grasos. (De la Fuente, 1993; Palette, et al, 1992; Miwa et al, 1990; Hrivak et al, 1967; y Firestone, 1994).

3.3.8) Métodos cromatográficos para cuantificar AGL.

La técnica instrumental más empleada para el análisis y cuantificación de los AGL es la cromatografía de gases (CG). Inicialmente, los análisis se realizaban con columnas empaquetadas; actualmente, el desarrollo de la CG de alta resolución con columnas capilares ha abierto nuevas perspectivas en el análisis de estas compuestas.

Los AGL, una vez extraídos y aislados del resto de la grasa, pueden ser inyectados como tales, ó derivatizados para mejorar las condiciones de análisis en la columna cromatográfica. Algunos autores han utilizado la inyección directa de los ácidos sin derivatizar, pero, los problemas surgen por la posible adsorción de los ácidos en los puntos activos de la columna. Esto provoca malas separaciones (picos irregulares y con colas) y en las inyecciones posteriores se eluyen los ácidos retenidos anteriormente, inutilizando la determinación.

Se han ensayado modificaciones de la fase líquida, del soporte y del gas acarreador, para salvar las dificultades de la inyección directa de los AGL.

La adición de un ácido no volátil a la fase líquida, como el ácido fórmico, permite obtener mejores separaciones; sin embargo, al inyectar soluciones acuosas de ácidos de cadena corta, aparecen efectos repetidos y colas. Otra solución consiste en burbujear el gas portador a través de ácido fórmico concentrado, lo que da resultados más positivos.

El ácido fórmico no responde al detector de ionización de flama y debido a que su constante de disociación es mayor que la de los otros ácidos monocarboxílicos se enlaza a los puntos activos de la columna y previene las adsorciones de los ácidos C₂-C₆.

Un método de análisis de AGL para productos lácteos en que los ácidos se disaban como sales potásicas, para evitar pérdidas por volatilización, se inyectaban como sales, transformándose en ácidos libre por medio del ácido fórmico que saturaba el gas portador.

Los procedimientos de derivatización descritos en la bibliografía son muy variados. La mayoría de los autores se inclinan por la formación de ésteres metílicos. No obstante existen otro tipo de derivados: ésteres etílicos y ésteres butílicos, estos últimos preparados para disminuir su volatilidad y evitar la pérdida de los AGL de cadena corta.

Metcalf y Wang (1982) propusieron un método para conseguir en un sólo paso y en fases separadas los ésteres metílicos de los AGL y de los glicéridos en diferentes tipos de grasas, empleando hidróxido de tetrametilamonio (HTMA) en metanol, como catalizador. Al tratarse el HTMA de una base fuerte, los glicéridos se transesterificaban a temperatura ambiente rápidamente, mientras los AGL se convierten en jabones de tetrametilamonio (jabones TMA) que en el inyector del cromatógrafo se pirrolizan a ésteres metílicos y trimetilamina.

Las posibilidades de la cromatografía líquida (CL) para hacer determinación de

AGL, derivatizando previamente, pueden ser de interés cuando se trate de determinar ácidos de cadena corta, no obstante, en el método y momento actual faltan trabajos de normalización del procedimiento de se preparación de derivados que ya constituye una rutina en el análisis por CG.

Bush et al (1979) determinaron los ácidos del acético al isovalerónico con una columna de Bondapack C-18, usando un detector UV, a 210 nm. La preparación de un derivado previo al análisis (tenacil ó para bromotenacil ésteres) mejoraba la sensibilidad de detección. Sin embargo, las separaciones tienen el problema de solapamiento de los pares críticos de ácidos grasos por lo que algunos autores proponen el empleo de la cromatografía líquida preparativa junto con la determinación cuantitativa final de los AGL por CG.

Miwa y Yamamoto (1990) han desarrollado recientemente un procedimiento de determinación de los AGL por HPLC que permite medir las concentraciones de estos desde C₂ hasta el C₂₂ aplicándolo con éxito a una gran variedad de productos lácteos. El método se basa en la reacción de los ácidos con el reactivo 2nitrofenilhidrazina acidificada con HCl. Los ácidos grasos libres derivatizados se separan previamente en dos grupos (C₂-C₆ y C₆-C₂₂) e y posteriormente se analizan cada una de las fracciones en condiciones isocráticas en el cromatógrafo de líquidos.

Emplean una columna de fase reversa (C₁₈) con partículas de 5 micrómetros y un detector UV-visible a 400 nm, consiguiendo una buena precisión (0.4 - 4.5%) y excelentes recuperaciones (95 -102%) para los diferentes ácidos grasos, así como la resolución de numerosas pares críticos. (W. Lee, 1987; Polette et al, 1992; Metcalfe et al, 1981; T. Tanner et al, 1993; G. Ackman et al, 1963; Alonso, 1981; Camenares, 1981; Torres, 1973; Ramos, 1983; De la Riva, 1968. Baes, 1993; Benavides, 1986).

4) Cromatografía de gases.

4.1 Generalidades de la cromatografía.

El método más general para tratar una interferencia, consiste en la separación física del analito. Entre los métodos bien conocidos para llevar a cabo estas separaciones se incluyen, la destilación, la cristalización, la extracción con disolventes, y la preparación química ó electrolytica. No cabe duda, sin embargo, que el método más utilizado para eliminar interferencias en la cromatografía, el cual es un procedimiento de separación que ha encontrado aplicación en todas las ramas de la ciencia. La cromatografía fue inventada y denominada como tal por el botánico ruso Mikhail Tswet a principios de éste siglo. Este autor utilizó la técnica para separar diferentes pigmentos vegetales como las clorofilas y las xantófilas, pasando una solución que contenía estas compuestas a través de una columna de vidrio empacada con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas sobre la columna, lo que explica el nombre de ésta técnica. (D.A. Skoog, 1989).

La cromatografía abarca un grupo variado e importante de métodos de separación, que permiten al químico separar, aislar e identificar componentes estrechamente relacionados presentes en mezclas complejas, muchas de estas separaciones son imposibles por otras técnicas.

La palabra cromatografía es difícil de definir en forma rigurosa debido a la gran variedad de sistemas y técnicas a las cuales se ha aplicado esta denominación. En todos estos métodos, sin embargo, se emplea una fase estacionaria y una fase móvil.

Los componentes de una mezcla se transportan a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil que fluye; las separaciones se basan en las diferencias de velocidad de migración entre los componentes de la muestra. (D.A. Skoog, 1989; A.B. Littlewood, 1970; F. Walton, 1973; M. Miller, 1989)

En la cromatografía, los componentes que se desean separar deben ser solubles en la fase móvil. Deben ser capaces de interactuar con la fase estacionaria ya sea

disolviéndose en ella, adsorbiéndose, ó reaccionando con ella en forma química.

Como consecuencia, durante la separación los componentes se distribuyen entre ambas fases.

En algunas circunstancias, la fase estacionaria es un sólido finamente dividido, sostenido en un estrecho tubo de vidrio o un metal. La fase móvil, que puede ser un líquido ó un gas, se obliga a pasar sobre ó a través del sólido bajo presión o bien se deja percolar a través de él por efecto de la gravedad. Este tipo de método se denomina cromatografía en columna.

En la cromatografía plana, la fase estacionaria puede ser un papel poroso ó un sólido finamente dividido que se aplica sobre una placa de vidrio. En este caso la fase móvil se desplaza a través del sólido ya sea por acción capilar o bajo la influencia de la gravedad. La fase estacionaria puede ser también un líquido inmovilizado, inmisible con la fase móvil. Se emplean diferentes procedimientos para fijar en su lugar la fase estacionaria líquida.

Por lo general, un polvo finamente dividido recubierto por una delgada capa de líquido puede colocarse en un tubo de vidrio ó metal, y a través de éste se deja fluir ó percolar la fase móvil. Por lo general, el sólido no tiene una función directa en la separación y actúa sólo para sostener en su lugar la fase estacionaria por medio de la adsorción. Otro procedimiento consiste en recubrir las paredes internas de un tubo capilar con una delgada capa de líquido y hacer pasar entonces, una fase móvil gaseosa a través del tubo. Finalmente la fase líquida estacionaria puede sostenerse en su lugar sobre fibras de papel ó sobre la superficie de partículas aplicadas sobre una placa de vidrio (D.A. Skoog, 1989; A.B. Littlewood, 1970; F. Walton, 1993; M. Miller, 1988).

4.2) Características y componentes de un cromatógrafo de gases.

En principio, la cromatografía de partición gas-líquido y líquido-líquido difieren únicamente en el detalle de que la fase móvil de la primera es un gas, en vez de un líquido. La muestra se introduce como un gas, en la cabeza de la columna; los componentes que tienen una solubilidad finita en la fase líquida estacionaria se distribuyen entre esta fase y la fase gaseosa, según la ley del equilibrio. Se logra entonces la elución forzando un gas inerte, como nitrógeno ó helio a través de la columna. La velocidad de los distintos componentes a lo largo de la columna depende de su tendencia a disolverse en la fase estacionaria líquida. Un coeficiente de distribución que favorezca al disolvente dá por resultado una baja velocidad; por el contrario, aquellos componentes cuya solubilidad en la fase líquida es despreciable se desplazan rápidamente por la columna. Teóricamente, se obtienen curvas de elución en forma de campana de Gauss.

Existen diferentes cromatógrafos de gases de diferente grado de complejidad. Los componentes básicos de estos instrumentos se muestran en la figura # 1.

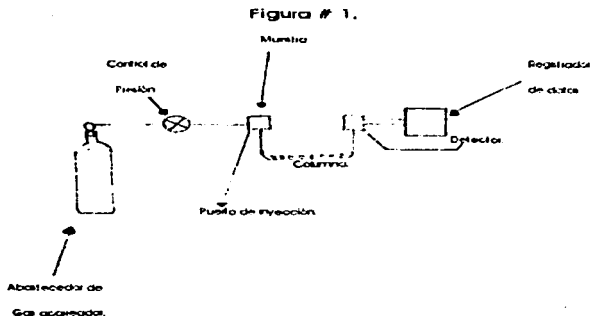


Figura # 1. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases.

A continuación se hace una descripción de cada componente.

4.2.1) Fuente de gas transportador.

Los gases transportadores, que deben ser químicamente inertes, comprenden el helio, el argón, el nitrógeno y el hidrógeno: el helio es el más utilizado. Todos estos gases se pueden adquirir en el comercio en tanques a presión. Junto con el tanque de gas, se utilizan reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo. Además, el sistema de transporte de gas contiene a menudo un filtro molecular para retener el agua y otras impurezas.

Las velocidades de flujo se controlan por medio de un regulador de presión. Se pueden establecer las velocidades de flujo con un simple medidor de burbujas de jabón colocado en el extremo de la columna. (Figura # 2).

Figura # 2.

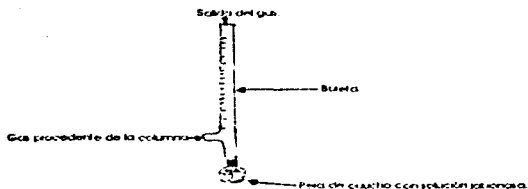


Figura # 2. Medidor de flujo.

4.2.2) Sistema de inyección de la muestra.

La eficiencia de la columna que la muestra sea de un tamaño adecuado y se introduzca como un "tapón" de vapor, la inyección lenta o las muestras de excesivo tamaño producen ensanchamiento en las bandas y empobrecen la resolución. Se utiliza una microjeringa para inyectar las muestras a través de un **datagrama** de caucho o de silicona dentro de una entrada para muestras previamente calentada, en la cabeza de la columna (la entrada está por lo general a 50 C por encima del punto de ebullición del analito). En las columnas analíticas comunes, los tamaños de las muestras varían desde unas pocas décimas de microlitro hasta 10 microlitros. En las columnas capilares se utilizan muestras mucho más pequeñas (0.001 microlitros); en este caso se utiliza un sistema divisor de muestra para liberar hacia la cabeza de la columna, sólo una pequeña fracción de la muestra inyectada mientras que se desecha el resto.

Las muestras de gas se introducen mejor a través de una válvula de muestreo.

Las muestras sólidas se introducen como soluciones, o bien, se colocan **ampolletas selladas** de pared delgada, que se insertan en la cabeza de la columna

y se rompen desde afuera. (D.A. Skoog, 1989; A.B. Littewood, 1970; F. Walton, 1973; M. Miller, 1988).

4.2.3) Columnas.

En la cromatografía gás-líquido se utilizan dos tipos de columnas. Uno de ellos se fabrica con tubos capilares (de diámetro interno de 0.3 a 0.5 mm), cuya cavidad está cubierta con una película muy delgada (1 μ m) de fase líquida. Las columnas capilares presentan una caída de presión despreciable, y por éste motivo pueden tener una gran longitud y debido a esto su eficiencia es mayor. Se han descrito columnas de varios cientos de números de platos teóricos. Sin embargo, estas columnas poseen una capacidad para muestras sumamente baja (0.01 microlitros). Se puede aumentar la capacidad para las columnas capilares recubriendo la parte interior del tubo con un material poroso como el grafito, un óxido metálico o un silicato. La superficie agregada aumenta la cantidad de líquido retenido por el tubo, y por consiguiente sucede lo mismo con la capacidad de la columna. (Ver tabla # 9, en la cual se muestran las fases estacionarias de uso común).

Tabla # 9

Fases estacionarias de uso común.

Nombre	Composición química	Temp. C	Polaridad	Tipo de separación
Escualeno	C ₃₀ H ₆₂	150	No polar	Hidrocarburo
OV-1	Polimetilsiloxano	350	No polar	No polar de uso general
DC 710	Polimetil fenilsiloxano	360	No polar	Aromáticos
QF-1	Politrifluoropropil metil siloxano	250	Polar	Ampliación: esteroides y compuestos nitrogenados
XE-30	Policianometil siloxano	275	Polar	Alcaloides y compuestos halogenados
Carbowax 20 M	Polietilenglicol	250	Polar	Alcoholes, ésteres y aceites esenciales.
Adipato de DEG	Adipato de dietilenglicol	200	Semipolar	Ácidos grasos y ésteres
	Ftalato de dinitro	150	Semipolar	Cetonas, ésteres y compuestos de azufre

Ref. "Análisis instrumental". D.A. Skoog and D.M. West. Ed McGraw-Hill. Segunda edición, 1980.
México, D.F. pág. 756

Las columnas empacadas se construyen con tubos metálicos o de vidrio de 1 a 8 mm de diámetro interno; fueron diseñadas para sostener empaques sólidos desde 2 hasta 20 m de longitud. Los tubos por lo general están plegados o enrollados de modo que se puedan acomodar en forma adecuada dentro de un termostato.

Las columnas mejor empacadas poseen un total de 20 000 platos teóricos ó más. A continuación presento unas de las fases estacionarias de uso común.

Los empaques más comunes, empleados, en cromatografía de gases se muestran en la tabla #10.

Tabla # 10

Empaques para cromatografía de gases.

Nombre	Área Superficial m ² /g	Densidad Empacada g/cm	Tamaño de poro.	% Máximo de fase líquida.
Tierra de Diatomeáceas				
Chromosorb P	4	0.47	0.4-2	30
Chromosorb W	1	0.24	8-9	15
Chromosorb G	0.5	0.58	No disponible	5
Chromosorb A	2.7	0.49	No disponible	25
Polímeros de fluorocarbono.				
Teflón T-6	7.6	0.49	Ninguno	10
Vidrio				
Microcristales	0.01	1.4	Ninguno	3
Cristales texturizados	0.04	1.35	No disponible	0.5

Ref. "Chromatography: Concepts and contrasts".

James M. Miller. A Wiley-Interscience Publication N.Y. U.S.A. 1969.

El soporte sólido para las columnas empacadas consistiría en partículas esféricas, pequeñas y uniformes, con buena resistencia mecánica y un área superficial específica de por lo menos 1 metro cuadrado por gramo. Además, el material deberá ser inerte a temperaturas elevadas y humedecerse con facilidad en la fase líquida para producir un recubrimiento uniforme. No se dispone todavía de ninguna sustancia que reúna a la perfección todos estos criterios; los soportes más comunes provienen de las tierras de infusorios. Existen dos tipos de materiales de este tipo, el polvo de ladrillo refractario, que se vende con los nombres comerciales de Chromasorb P, C 22 y Serchamal, y que posee la mejor resistencia mecánica y la mayor superficie específica (4 metros cuadrados por gramo), su desventaja consiste en que es muy activo y en consecuencia no puede emplearse con compuestos polares. La tierra sílica (Kieselguhr) es más frágil y tienen una superficie específica menor (1 metro cuadrado por gramo) pero es menos reactiva y se vende con los nombres comerciales de Chromasorb W, Celite, Embacel y Celatom.

Las propiedades deseables para la fase líquida en una columna cromatográfica gas-líquido son:

- Baja volatilidad; idealmente, su punto de ebullición debe ser por lo menos 200 grados superior a la temperatura máxima de operación para la columna.
- Estabilidad térmica.
- Inercia química.
- Características de disolvente de tal manera que los valores para los solutos que han de resolverse, se encuentran dentro de los límites apropiados.

Ningún líquido satisface todos estos requisitos, en particular el último. Como consecuencia, es práctica común disponer de varias columnas intercambiables, cada una de ellas con una diferente fase estacionaria. La elección entre estas, se realiza por lo general por ensayo y error, si bien existen algunas guías cualitativas.

En la preparación de la columna, el material de soporte se pasa por un cedazo

para limitar el tamaño de partícula. luego se prepara una suspensión con un disolvente volátil que contiene una cantidad del líquido estacionario calculada para producir una delgada capa (5 -10 μ m) sobre todas las partículas. Después de la evaporación del disolvente las partículas aparecen secas y fluyen libremente.

Las columnas se fabrican de vidrio, acero inoxidable, cobre ó aluminio. Se llenan vertiendo lentamente el soporte revestido en el tubo recto con suaves golpes o agitando para proporcionar un relleno uniforme. Debe evitarse la canalización.

Después de llena la columna, esta se dobla o enrolla en forma apropiada para que quepa en el horno. Una columna bien preparada puede emplearse para varios cientos de análisis. Se pueden obtener comercialmente diferentes tipos de columnas empacadas.

También debemos termostatar las columnas. La temperatura de la columna es una variable importante que se debe controlar dentro de unas pocas décimas de grado en el trabajo de precisión. En consecuencia, la columna está alojada por lo general dentro de un horno termostaticado.

La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido.

Aproximadamente, una temperatura igual o ligeramente superior al punto de ebullición de la muestra provoca un período de elución de duración razonable (2 a 30 minutos). Para muestras con una amplia escala de ebullición es conveniente, a menudo, aumentar la temperatura de la columna, continuamente o por pasos a medida que avanza la separación.

En general, la resolución óptima se asocia con la temperatura mínima; pero el costo de producir la temperatura es un aumento en el tiempo de elución y, por consiguiente del tiempo requerido para terminar un análisis. (D.A. Skoog, 1989).

4.2.4) Sistema de detección.

Los aparatos de detección de un cromatógrafo gas-líquido deben responder rápida y reproduciblemente a las bajas concentraciones de los solutos emitidos por la columna. La concentración del soluto en un gas portador en cualquier instante es sólo una de las pocas partes por mil, como máximo; frecuentemente, se pide al detector que responda a concentraciones de uno o dos órdenes de magnitud menores (ó más).

Además, el intervalo durante el cual un pico pasa por el detector suele ser de un segundo o menos; el detector debe de ser capaz de presentar una respuesta completa durante este breve período. Otras propiedades convenientes del detector son: respuesta lineal, buena estabilidad en períodos prolongados y respuesta uniforme a una gran variedad de compuestos. Ningún detector satisface todos estos requisitos, aunque se han propuesto más de una docena de tipos. A continuación describiré los de uso más constante y frecuente. (D.A. Skoog, 1989; A.B. Litewood, 1970; Kenneth A. Connors, 1979; James M. Miller, 1988).

4.2.4.1) Detector de conductividad térmica.

Un sistema de detección relativamente sencillo y de gran aplicación se basa en cambios en la conductividad térmica de la corriente de gas; un instrumento empleado para este objeto es el catarómetro. El elemento sensitivo de éste aparato es una fuente calentada eléctricamente cuya temperatura, a energía eléctrica constante, depende de la conductividad térmica del gas circulante. El elemento calentado puede ser un alambre fino de platino o tungsteno ó bien un termistor semiconductor. La resistencia del alambre o del termistor da una medida de la conductividad térmica del gas; en contraste con el detector de alambre, el termistor tiene un coeficiente de temperatura negativo.

En aplicaciones cromatográficas se emplea siempre un detector doble, colocando un elemento en la corriente de gas delante de la cámara de inyección de la muestra y el otro inmediatamente después de la columna.

De este modo, se anula la conductividad térmica del gas portador y se reducen al mínimo los efectos de la variación de la velocidad de flujo y la presión de la columna, así como de la energía eléctrica. Las resistencias de los detectores gemelos se suelen comparar incorporándolas a dos brazos de un circuito sencillo puente de Wheatstone.

Las conductividades térmicas del hidrógeno y del helio son más o menos de 6 a 10 veces mayores que las de la mayoría de los compuestos orgánicos. Así, aun la presencia de pequeñas cantidades de materiales orgánicos provoca una reducción relativamente grande de la conductividad térmica del efuyente de la columna; el detector experimenta una marcada elevación de la temperatura como resultado de ello.

Las conductividades del nitrógeno y del óxido de carbono se parecen más a las de los constituyentes orgánicos; así, la detección por conductividad térmica es menos sensible cuando estas sustancias se usan como gases portadores.

Los detectores de conductividad térmica son sencillos, fuertes, baratos, no selectivos, precisos y no destruyen la muestra. Pero no son tan sensibles como otros detectores. Ver figura # 3. (D. A. Skoog, 1939; James M. Miller, 1938)

Figura # 3.

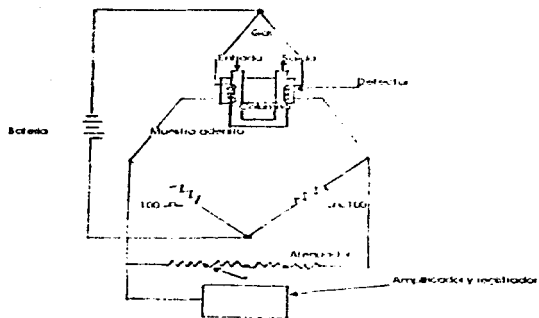


Figura # 3. Detector de conductividad térmica.

4.2.4.2) Detectores de ionización de flama.

Este detector tiene una alta sensibilidad, amplio intervalo y gran confiabilidad.

Consiste de una pequeña flama de hidrogeno quemándose en un exceso de aire y rodeado por un campo electrostático

En la figura # 4 presento un esquema de él.

Figura # 4.

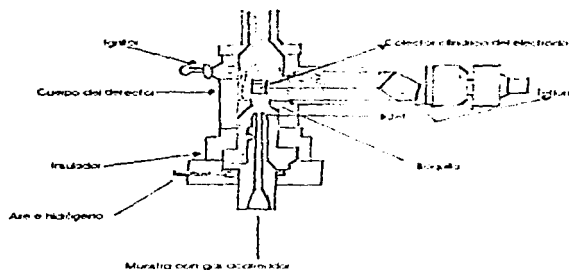


Figura # 4. Detector de ionización de flama

El efuyente de la columna entra a la base del quemador a través de un filtro milipore y se mezcla con el hidrógeno. Los componentes orgánicos que salen de la columna se queman durante la combustión formando fragmentos iónicos y electrones libres; estos se coeclan produciendo una corriente eléctrica proporcional a la velocidad de entrada de la muestra a la flama. Existen muchos tipos de diseño de estos detectores; algunos modelos añaden gas de reposición al efuyente de la columna, para aumentar la velocidad del gas y arrastrar el efuyente de la columna a través del volumen muestra entre la salida de la misma y la entrada del detector lo cual reduce al mínimo la dispersión de las bandas.

Este detector sólo responde a átomos de carbono oxidables y el número de iones que se produce es proporcional al número de átomos de carbono reducidos en la flama. Los grupos funcionales como el carbonilo, los grupos alcoxil y amino producen

pocos iones ó alguno.

El detector de flama de hidrógeno actualmente es uno de los detectores más conocidos y sensibles. Es más complicado y más costoso que el de conductividad térmica, pero posee la ventaja de su mayor sensibilidad. Además tiene un ancho de respuesta lineal. Por supuesto destruye la muestra. (D. A. Skoog, 1989; James M. Miller, 1988).

4.2.4.3) Detector de captura de electrones.

Funciona en forma muy semejante a un contador proporcional para la medida de rayos X. En éste caso, el eluyente de la columna pasa sobre un emisor, como por ejemplo níquel-63 ó tritio, (adsorbidos sobre una lámina de platino ó titanio). Un electrón del emisor produce la ionización del gas transportador (por lo general nitrógeno) y la producción de una avalancha de electrones. Como consecuencia de este proceso de ionización en ausencia de especies orgánicas, se obtiene una corriente estable y constante entre un par de electrodos. Sin embargo en presencia de moléculas orgánicas que tienden a capturar electrones, la respuesta no es lineal a menos que el potencial a través del detector sea pulsante.

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva y altamente sensible frente a los grupos funcionales electronegativos como halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro. Es insensible a los compuestos como los aminos, alcoholes e hidrocarburos. Una importante aplicación de este detector consiste en la detección y cuantificación de los insecticidas clorados. Estos detectores son muy sensibles y poseen la ventaja de no alterar en forma significativa la muestra. Ver figura # 5.

(James M. Miller, 1988)

Figura # 5.

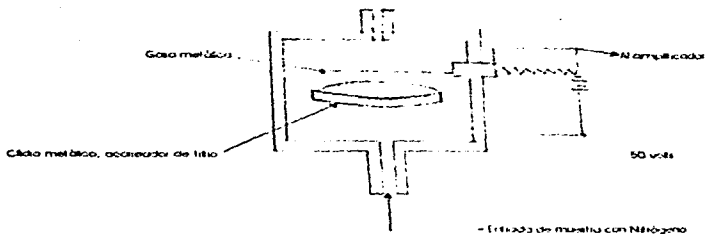


Figura # 5. Detector de captura de electrones.

4.2.5) Registrador de la señal o integrador.

Es un aparato de medida eléctrica que transforma la señal en el desplazamiento de una plumilla que graba sobre la banda de un papel. Tal desplazamiento es transversal, es decir, perpendicular a la dirección de avance de la banda de papel y su magnitud depende de la intensidad de la señal que lo origina.

La banda de papel avanza longitudinalmente por la acción de un mecanismo de relojería, pudiéndose variar la velocidad de avance.

La dirección longitudinal del registro es un eje de tiempo y el conjunto de ambos, el cromatograma, que es una representación gráfica de la intensidad de la señal frente al tiempo. (D.A. Skoog, 1939).

4.3) Información obtenida de un cromatograma.

De un cromatograma se puede obtener la siguiente información:

- Línea base.
 - Picos de todos los componentes que se hayan podido detectar.
 - Tiempo de retención de cada componente detectado.
 - Número de corrida.
 - Número de muestra.
 - Fecha de análisis, incluyendo la hora.
 - Inicio y fin de la integración de un pico.
 - Tipo de integración empleado.
 - Área ó altura encontrada para cada componente.
 - Relación área/altura de cada pico.
 - % Área ó de altura para cada pico.
 - Área total.
 - Factor de dilución ó multiplicación.
 - La información que puede contener alguna opción de trabajo.
- También podemos pedir las condiciones de integración tales como: Zero, atenuación, velocidad de corte, umbral de ruido, ventana de integración de cada pico y el área de rechazo para la corrida.

4.4) Cromatografía como análisis cuantitativo.

La cromatografía cuantitativa se basa en una comparación ya sea de la altura o del área de los picos de interés, producidos por los analitos en comparación con uno o más patrones. Si las condiciones están perfectamente controladas, ambos parámetros varían linealmente con la concentración. Para efectuar esta cuantificación se puede trabajar con las áreas o las alturas de los compuestos de interés.

La altura de un pico cromatográfico se obtiene conectando la línea base de

cada lado del pico por medio de una línea recta y midiendo la distancia perpendicularmente a esta línea y al pico. Esta medición puede tomarse generalmente con una precisión razonablemente grande y proporciona buenos resultados siempre que las variaciones en las condiciones de la columna no alteren el ancho de los picos durante el período necesario para obtener los cromatogramas de la muestra y los patrones. Los factores que se deben controlar cuidadosamente son la temperatura de la columna, la velocidad de flujo del eluyente, y la velocidad de inyección de la muestra.

Además es necesario tener cuidado con evitar la sobrecarga de la columna.

El efecto de la velocidad de inyección de la muestra es particularmente crítico para los picos iniciales de un cromatograma. En estos casos los errores relativos de 5 a 10% no son raros en los casos en que se utiliza una jeringa.

Ahora hablaré de la acción de trabajar con las áreas, las áreas de los picos son independientes de los efectos de ensanchamiento debido a las variaciones mencionadas anteriormente. Por tanto, desde este punto de vista, las áreas de los picos constituyen un parámetro analítico mucho más satisfactorio que sus alturas. Por otra parte, la altura de los picos se mide con mucha más facilidad y en el caso de los picos estrechos se obtiene una mayor precisión.

Aunque los integradores actuales ya proporcionan el área o la altura. Cuando no se dispone de estos integradores debe hacerse una estimación manual. Un método simple que funciona muy bien para los picos simétricos de un ancho razonable es la multiplicación de la altura del pico con su ancho o la mitad de la altura. Otro método consiste en usar un planímetro o recortar el pico y establecer su peso en relación con el de una superficie conocida de papel de registro. (D.A. Skoog, 1939; K.A. Connors, 1979; A.B. Littlewood, 1970)

4.4.1) Calibración con estándares externos.

Consiste en la preparación de una serie de soluciones patrón cuya composición se aproxima a la del problema. Se realizan los cromatogramas para los patrones y se grafican las alturas de las áreas de los picos en función de la concentración. Una gráfica de estos datos debe proporcionar una línea recta que pasa a través del origen, los análisis se basan en esta gráfica. Para lograr la máxima precisión es necesario repetir con frecuencia las calibraciones.

Una variación de éste método es preparar un estándar a las mismas diluciones que la muestra, e inyectarlo unas 5 veces, determinando para las 5 inyecciones el coeficiente de variación, el cual deberá ser menor de 2%.

Posteriormente se inyectará la muestra y se realizarán los cálculos necesarios para obtener la composición de la muestra.

La fuente de error en los análisis realizados por el método que se acaba de describir, es por lo general, la incertidumbre en el volumen de inyección, en algunos casos la velocidad de inyección también es un problema.

Por lo general, las muestras son pequeñas (1 microlitro), y las incertidumbres relacionadas con la inyección de un volumen reproducible de éste tamaño con una jeringa, pueden llegar a constituir un error relativo de varias unidades por ciento.

Esta situación está exacerbada en la cromatografía gas-líquido en la que la muestra debe inyectarse en una entrada calentada; en esta, la evaporación en la punta de la jeringa puede producir grandes variaciones de volumen. Esto se reduce con el uso de válvulas inyectoras. (D.A. Skoog, 1989; K.A. Connors, 1979; A.B. Littlewood, 1970).

4.4.2) Calibración con estándar interno.

En cromatografía cuantitativa, se obtiene la mayor precisión cuando se utiliza un patrón interno debido a que en esta forma se evitan las incertidumbres causadas por la inyección de la muestra. Pero esto es posible después de que se haya calibrado.

Para realizar este método, se introduce una cantidad cuidadosamente medida de una sustancia que actúa como patrón interno tanto en las muestras patrón como en las muestras problema y se utiliza como parámetro analítico el cociente entre el área ó altura de los picos del analito sobre la del patrón interno. Para que esto tenga éxito es necesario que el pico del patrón interno esté bien separado de los picos de los demás componentes de la mezcla problema. (K.A. Connors, 1979)

4.4.3) Calibración por normalización del área.

Otro enfoque que evita las incertidumbres relacionadas con la inyección de la muestra es este método. Para utilizarlo es necesario elegir completamente todos los componentes de la muestra lo cual es una restricción que ha limitado este procedimiento a la cromatografía gas-líquido. En el método de la normalización se calculan las áreas ó las alturas de todos los picos eluidos; después de corregir todas estas áreas ó alturas para tener en cuenta las diferencias en las respuestas del detector a los diferentes tipos de compuestos, la concentración del analito se calcula a partir de la relación entre el área de su pico con respecto al área total de todos los picos. (D.A. Skoog, 1989).

V) Metodología.

1) Generalidades.

Los ácidos grasos libres son esterificados empleando trifluoruro de boro en metanol, obteniéndose con ello los metil ésteres correspondientes.

Los ácidos grasos metilados son separados por cromatografía de gases en una columna de ciano propilsilicona; y además son cuantificados usando un detector de ionización de flama.

2) Precauciones especiales.

- Se debe tener cuidado en la adición del trifluoruro de boro en metanol.
- Cuidar el manejo de los cilindros de cada uno de los gases.
- Se debe tener un cuidado muy especial en el encendido del detector.

3) Material y equipo.

- Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama. HP 5890.
- Automuestreador modelo HP 7673.
- Integrador modelo HP 3392A.
- Columna de vidrio, empacada con 10% SP2330 sobre Chromosorb WAW, malla 100/200, de 10 pies de largo por 2 mm de diámetro interno.
- Condensadores y matríz boca de fondo plano con capacidad de 100ml y boca 24/40.
- Tubos de centrifuga de 50ml con rosca.
- Pipetas volumétricas de 3,4 y 10 ml, pipetas graduadas de 10 ml, matríces volumétricas de 25 ml, perlas de ebullición y mantillas de seguridad de +/- 100 C.
- Jeringas para automuestreador.

4) Reactivos.

- 4.1) Metanol R.A.
- 4.2) Hidróxido de potasio R.A. en lentejas.
- 4.3) Trifluoruro de boro en metanol.
- 4.4) Iso-octano grado H.P.L.C.
- 4.5) Pentano grado H.P.L.C.
- 4.6) Agua destilada.
- 4.7) Helio ultrapuro, grado cromatográfico.
- 4.8) Hidrógeno ultrapuro, grado cromatográfico.
- 4.9) Aire comprimido, extraseco.

4.10) Estándares primarios de los siguientes metilésteres:

metil undecanoato. Metil laurato, metil miristato, metil palmitato, metil estearato. Metil oleato y metil linoleato. (Todos estos estándares son de marca SIGMA).

5) Preparación de estándar interno.

Pesar aproximadamente 300 mg de metil undecanoato en un matríz volumétrico de 25 ml.

Añadir solvente grado cromatográfico (1.5 ml) y diluir. Llevar a volúmen con el mismo solvente.

Esta solución es S-1.

6) Preparación de mezcla de metil ésteres de ácidos grasos estándar.

- 6.1) Se pesan las siguientes cantidades de metil ésteres en matraces

Independientes de 25 ml.

- Laurato.....310 mg.
- Miristato....190 mg.
- Palmitato...300 mg.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

69

Esterarato... 135 mg.

Oleato.....390 mg.

Linooleato....390 mg.

Disolver cada metil éster con aproximadamente 15 ml de solvente grado cromatográfico. Llevar a volumen (25 ml) con el mismo solvente.

6.2) De cada metil éster tomar una alícuota de 3 ml y llevarla a un sólo matríz volumétrico de 25 ml, a esta mezcla de estándares adicionarse 4 ml de la solución S-1 y llevar a volumen.

Esta preparación está lista para inyectarse. Esta solución es S-2.

7) Esterilización de ácidos grasos (Muestras).

- 7.1) En un matríz volumétrico de fondo plano con capacidad para 100 ml pesar aproximadamente 0.1000 g de muestra. Adicionar 10 ml de metanol R.A., una lenteja de KOH y 2-3 perlas de ebullición.
- 7.2) Mantener en reflujo por 15 minutos usando mantilla de seguridad.
- 7.3) Con una pipeta adicionar con mucho cuidado y por la salida del refrigerante 10 ml de trifluoruro de boro en metanol y dejar reflujiendo otros 15 minutos.
- 7.4) Entrar a temperatura ambiente y transferir el contenido del matríz bola a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se lava el matríz con 10 ml de agua destilada y el lavado se adiciona al mismo tubo de centrifuga.

8) Extracción de metil ésteres de ácidos grasos.

- 8.1) Se lava el matríz bola con 10 ml de solvente de extracción grado cromatográfico y se adiciona este lavado al correspondiente tubo de centrifuga.

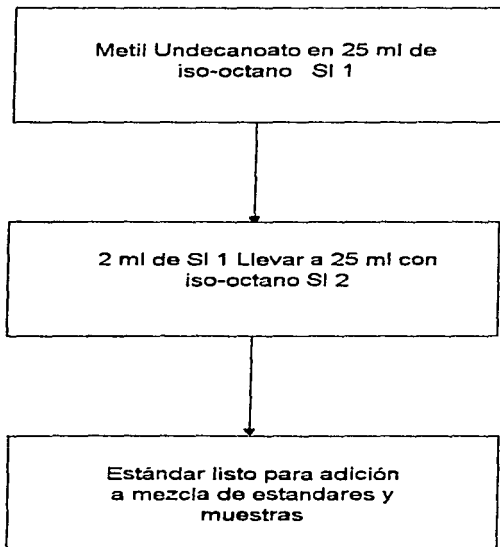
- 8.2) Se procede a extraer por 5 minutos y después se centrifuga la muestra a 1000 r.p.m durante 5 minutos.
- 8.3) La fase orgánica se extrae con pipeta pasteur ó con un bulbo y se transfiere a un matríz volumétrico de 25 ml, que previamente contiene 4 ml de la solución S-1.
- 8.4) Se repiten los pasos 8.1 a 8.3 transfiriendo éste segundo extracto al mismo matríz volumétrico del punto 5.7.7.

Esta es la muestra lista para inyección.

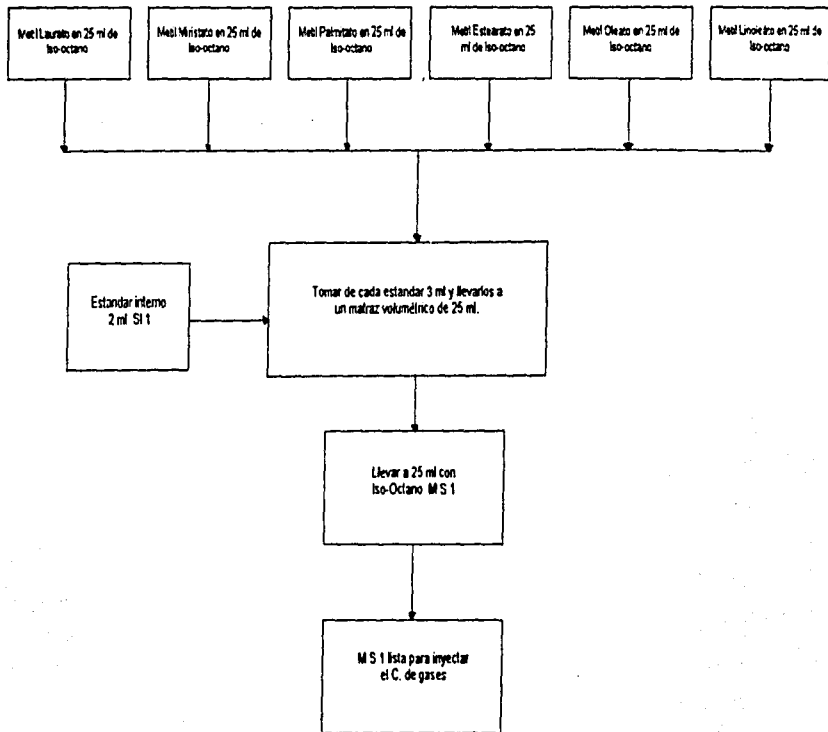
9) Procedimiento en el cromatógrafo de gases:

- 9.1) Encender el equipo y medir el flujo de gases, chequeando previamente que no haya fugas en las conexiones.
 - Aire 400-405 ml/min, aproximadamente.
 - Helio 30-35 ml/min, aproximadamente.
 - Hidrógeno 30-35 ml/min, aproximadamente.
- 9.2) Introducir las siguientes condiciones en el equipo:
 - Temperatura del horno: 160 C.
 - Tiempo inicial: 2 minutos.
 - Rampa: 4 C/ min.
 - Temperatura final: 210 C.
 - Temperatura del inyector y del detector: 265 C.
- 9.3) Encender la señal del equipo, y dejar estabilizar por 30-45 minutos.
- 9.4) Dar las condiciones adecuadas de integración.
- 9.5) Inyectar 1 ml de la solución S-2 hasta obtener un C.V. \leq 2.0% entre cada estándar.
- 9.6) Se calibra por la opción de estándar interno.
- 9.7) Ya hecha la calibración se procede a inyectar la muestra y se hace uso de las opciones para reporte que maneje el integrador y que además sean los deseados para reportar.

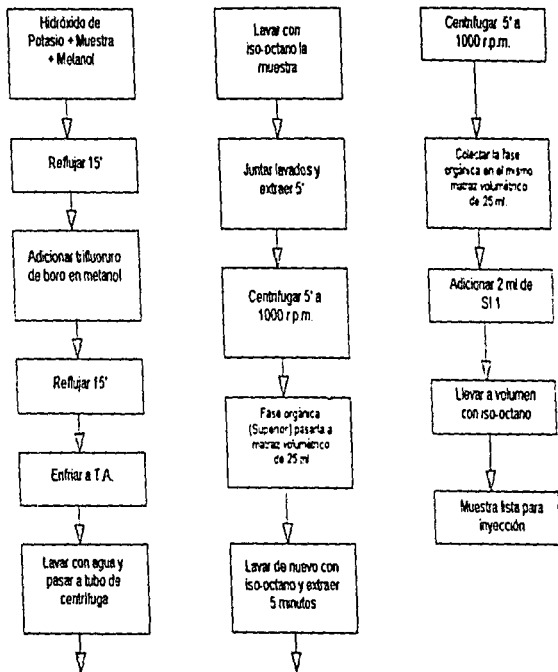
PREPARACION DE ESTANDAR INTERNO



PREPARACION DE MEZCLA DE ESTANDARES



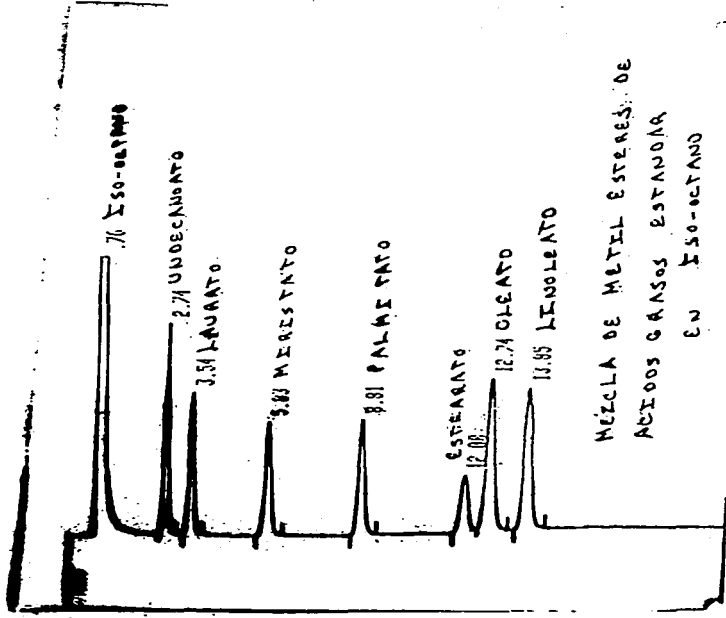
PREPARACION DE MUESTRAS



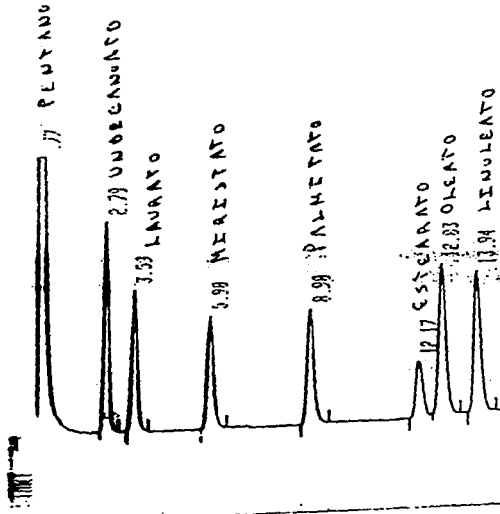
V) Tabla de resultados (mg/g).

Estadística Smp#	Ac. Laurico Op.125.4		Ac. Místico Op.57.5		Ac. Palmítico Op.89.8		Ac. Estérico Op.29.6		Ac. Deca Op.128.1		Ac. Undeca Op.241.2	
	so-octano	Pentano	so-octano	Pentano	so-octano	Pentano	so-octano	Pentano	so-octano	Pentano	so-octano	Pentano
	169.49	163.57	69.40	67.38	91.16	91.80	34.33	36.53	152.94	153.60	328.15	313.86
171	167.58	66.56	66.74	91.60	95.43	34.31	36.82	154.65	157.77	312.26	322.08	
169.95	160.82	66.50	65.97	91.14	91.89	34.19	35.18	154.00	165.13	311.26	313.44	
170.32	159.63	67.06	65.65	92.32	99.70	34.67	34.10	154.97	152.39	329.71	310.41	
170.12	163.07	68.65	67.65	91.23	92.27	34.71	34.45	154.56	153.17	328.81	314.92	
158.72	165.77	66.81	67.90	90.49	94.98	34.26	35.44	152.76	159.14	339.76	323.75	
169.21	162.50	68.39	67.23	89.90	90.19	33.82	33.09	153.45	160.33	329.99	302.63	
179.4	161.23	67.29	67.33	91.84	94.07	34.69	35.21	155.37	161.39	312.65	325.88	
169.23	161.76	66.59	66.30	92.01	93.97	34.21	39.19	154.03	169.23	310.21	324.04	
167.7		68.81		91.46		34.08		154.75		312.26		
Des. m. x 33	0.72	1.67	1.06	0.78	0.72	1.26	0.29	1.51	0.77	3.73	1.67	7.71
Medio	169.7	162.42	67.64	65.91	91.32	91.89	34.32	35.78	154.25	155.82	310.44	316.78
Des. m. x 33	0.46	1.03	1.57	1.17	0.78	2	0.84	6.65	0.5	2.32	0.54	2.44

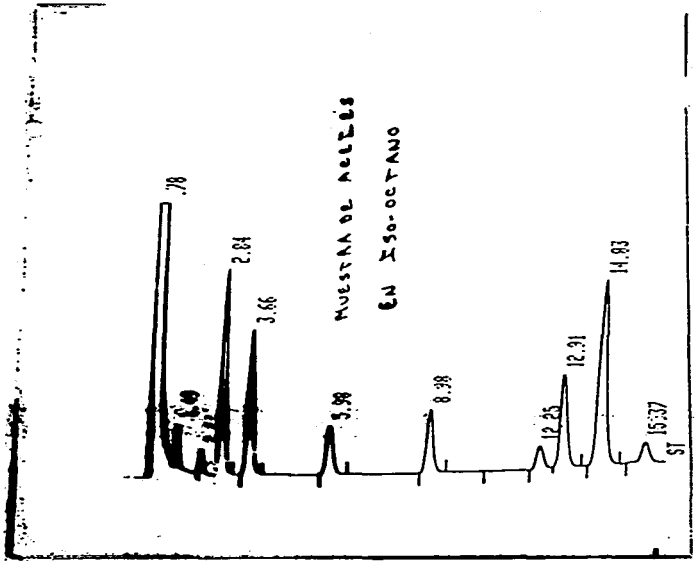
Las muestras usadas son preparadas del mismo lote

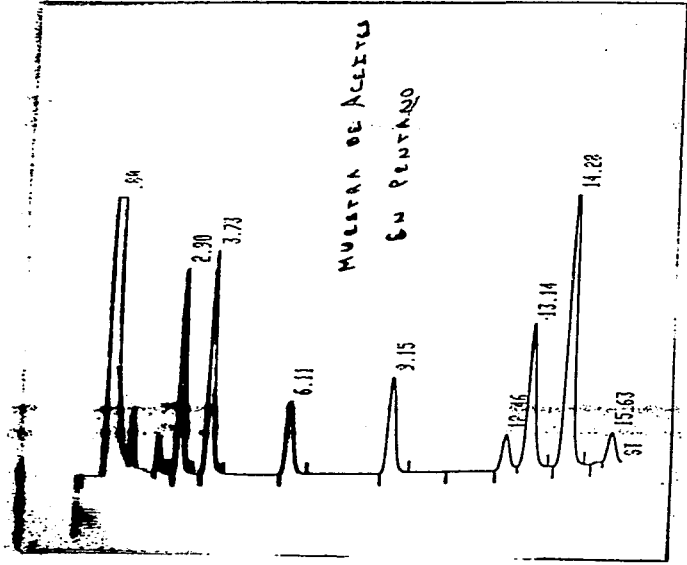


MEZCLA DE METIL ESTERES DE
ACIDOS GRASOS ESTANOICA
EN ISO-OCTANO



MEZCLA DE ESTEROS DE METIL-ESTERES
DE ACIDOS GROSOS EN PENTANO





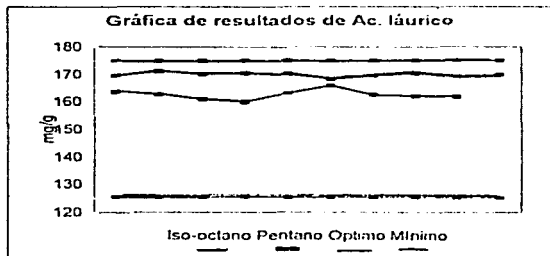
V a) Tabla de resultados de ácido láurico. (mg/g).

Valor óptimo: 175.0

Especificación: Mínimo 125.2

Estadística simple	Con Iso-octano	Con n-pentano
		169.49
	171	162.68
	169.95	160.82
	170.32	159.93
	170.12	163.07
	168.12	165.77
	169.11	162.5
	170.4	161.93
	169.23	161.76
	169.7	
Desviación estándar	0.76	1.67
Media	169.7	162.44
Coefficiente de variación	0.46	1.03

Las muestras usadas son preparadas del mismo lote.

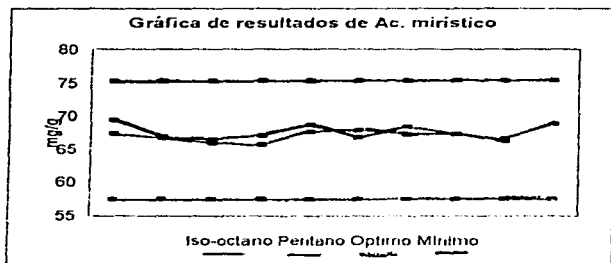


V b) Tabla de resultados de ácido mirístico.

Valor óptimo: 75.4
Especificación: Mínimo: 57.5

Estadística simple	Con iso-octano	Con n-pentano
	69.4	67.38
	66.86	66.74
	66.5	65.97
	67.06	65.65
	68.65	67.65
	66.81	67.9
	68.39	67.23
	67.29	67.33
	66.59	66.3
	68.81	
Desviación estándar	1.06	0.78
Media	67.64	66.91
Coefficiente de variación	1.57	1.17

Las muestras son preparadas del mismo lote.

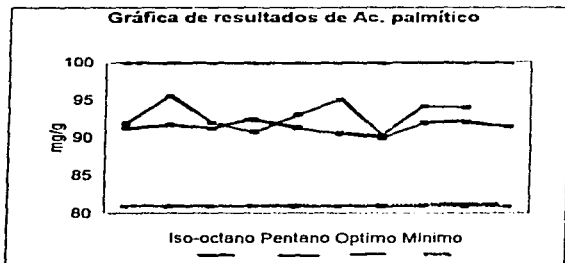


V c) Tabla de resultados de ácido palmítico. (mg/g).

Valor óptimo: 100.0
Especificación: Mínimo 80.8

estadística simple	Con Iso-octano	Con n-pentano
	91.16	91.8
	91.6	95.43
	91.14	91.89
	92.32	90.7
	91.23	92.97
	90.49	94.98
	89.9	90.19
	91.84	94.07
	92.01	93.97
	91.46	
Desviación estándar	0.72	1.86
Media	91.32	92.89
Coefficiente de variación	0.78	2

Las muestras son preparadas del mismo lote.



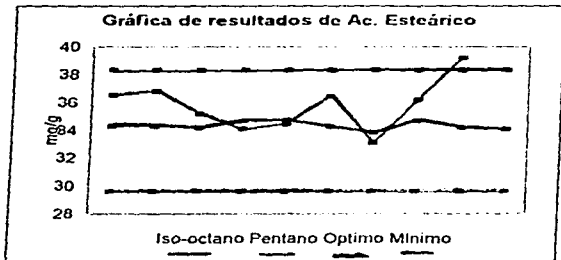
V d) Tabla de resultados de ácido esteárico. (mg/g).

Valor óptimo: 36.3

Especificación: Mínimo 29.6

Estadística simple	Con iso-octano	Con n-pentano
	34.33	36.53
	34.31	36.82
	34.19	35.18
	34.67	34.1
	34.71	34.45
	34.26	36.44
	33.82	33.09
	34.69	36.21
	34.21	39.19
	34.08	
Desviación estándar	0.29	1.81
Media	34.33	35.78
Coefficiente de variación	0.84	5.05

Las muestras usadas son preparadas del mismo lote.



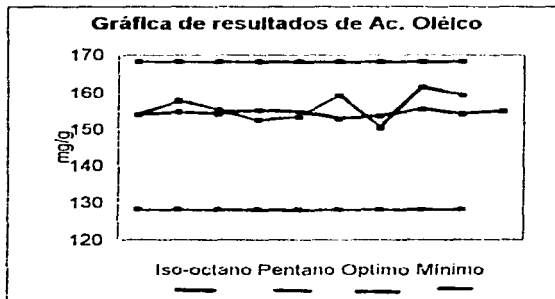
V e) Tabla de resultados de ácido oléico. (mg/g).

Valor óptimo: 168.2

Especificación: Mínimo 128.1

Estadística simple	Con iso-octano	Con n-pentano
	153.94	153.8
	154.65	157.77
	154	155.13
	154.97	152.38
	154.56	153.17
	152.76	159.14
	153.45	150.33
	155.37	161.39
	154.03	159.23
	154.75	
Desviación estándar	0.75	3.73
Media	154.25	155.82
Coefficiente de variación	0.5	2.39

Las muestras usadas son preparadas del mismo lote

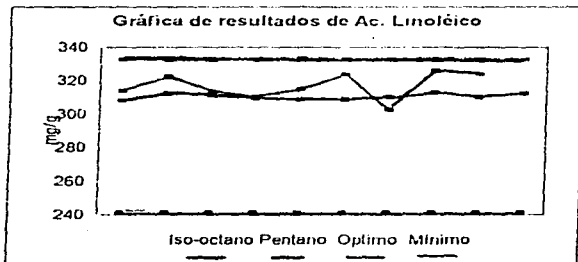


V f) Tabla de resultados de ácido linoléico.

Valor óptimo: 332.5
Especificación: Mínimo 241.2

Estadística simple	Con Iso-octano	Con n- Pentano
	308.15	313.06
	312.26	322.08
	311.26	313.44
	309.71	310.41
	308.81	314.92
	308.76	323.75
	309.98	302.63
	312.96	325.88
	310.21	324.04
	312.26	
Desviación estándar	1.67	7.71
Media	310.44	316.78
Coefficiente de variación	0.54	2.44

Las muestras usadas son preparadas del mismo lote.



VI) ANALISIS DE RESULTADOS.

- a. En el cromatograma de la mezcla de estándares se pueden observar 8 picos cromatográficos en el siguiente orden de salida:
- Solvente (n-pentano o iso-octano).
 - Metil undecanoato.
 - Metil laurato.
 - Metil miristato.
 - Metil palmitato.
 - Metil estearato.
 - Metil oleato.
 - Metil linoleato.
- b. En el cromatograma de las muestras se cotejaron los tiempos de retención con respecto a los estándares para poder identificar a cada metil éster de ácido graso y así poder cuantificarlo.
- c. Se eligió el trabajar con áreas en lugar de alturas porque es más representativo hacerlo.
- d. Fue necesario manejar algunas opciones en el integrador para así facilitarse el trabajo tanto en el cálculo de la cantidad de cada metil éster como en el manejo de la muestra.
- e. Podemos observar que las variaciones, en cuanto a resultados, en las determinaciones con los distintos solventes son mínimas; aunque por los valores de desviación estándar obtenidos para cada solvente, encontramos que las muestras extraídas con iso-octano son más reproducibles entre sí que las muestras

trabajadas con n- pentano.

- f. La disminución en el tiempo de análisis consistió, en que, al hacerse las inyecciones en forma automática, y no manual, ya no es necesario estar presente al final de cada corrida para inyectar la siguiente muestra y se puede ocupar ése tiempo en otro análisis.
- g. El costo de ambos solventes es muy similar, así que ésto no se pudo mejorar.
- h. El hecho de manejar n-pentano implica muchas dificultades en el manejo de la muestra, tomando en cuenta que la temperatura ambiente del lugar de trabajo es cercana al punto de ebullición de éste solvente.
Estas dificultades son:
 - a) Evaporación durante el tratamiento de la muestra
 - b) Dificultad para extraer la fase orgánica de los tubos de centrifuga.
 - c) Problemas en la toma de muestra para inyección.

VII) CONCLUSIONES.

1) El iso-octano resolvió todos los problemas que presentaba el uso de n-pentano en el manejo de la muestra.

2) Las mejoras fueron:

- ▶ Disminución en el tiempo de análisis.
- ▶ Eliminación de los problemas de volatilidad del n-pentano. Esta volatilidad era muy elevada ya que el n-pentano tiene un punto de ebullición de 36 C y el iso-octano lo tiene a 99 C con lo cual se solucionaba éste problema.
- ▶ La toma de muestra para inyección fue más homogénea: cuando se trabajaba con n-pentano se debía agitar muy bien la solución para inyección, ya que las moléculas más pesadas se asentaban en la solución y no se tomaba la muestra adecuadamente.
- ▶ También se logró una eliminación sustancial de los cálculos matemáticos, de tal forma, que el equipo realizara la mayor parte de ellos.

3) En general, podemos establecer, que la metodología ha sufrido cambios que la han beneficiado, evidentemente desde el punto de vista humano y financiero, y que además se continúan realizando cambios, ante ellos el uso, en un futuro próximo de una columna capilar.

VIII) BIBLIOGRAFIA.

- 1). Manual profesional de la salud. S-26.
Lab. Wyeth. México, D.F. Segunda edición. 1994. Pag: 1-2.
- 2). Manual profesional de la salud. Promil.
Lab. Wyeth. México, D.F. Segunda edición. 1994. Pag: 7.
- 3). "History and current status of infant formulas".
Anderson S.A.; Chinn H.L.; Fisher K.D.
Am. J. Clin. Nutr. 1982; Vol: 35; Pag: 381-397.
- 4). "Calcium and fat absorption from infant formulas with different fat blends"
Barnes L.A.; Morrow G.; Silverio J.; y colaboradores.
Pediatrics. 1974; Vol: 54; Pag: 217-221.
- 5). "Biological assay of milk and whey compositions for infant feeding"
Tornarelli R.M.; Bernhart F.W.
J. Nutr. 1962; Vol: 78; # 1; Pag: 44.
- 6). "The science of infant nutrition and the art of infant feeding"
Woodruff. C.W.
JAMA. 1978; Vol: 240; # 7; Pag: 657-661.
- 7). "Análisis instrumental"
D.A. Skoog; D.M. West.
Ed. McGraw Hill. México, D.F. 1989. Pag: 697-717; 747-765.

- 8). "Gas chromatography"
A.B. Littlewood.
Academic Press N.Y. U.S.A. 1970. Pag: 1-15; 122-141; 162-163; 280-296; 297-379;
454- 465.
- 9). "Química de los alimentos"
Salvador Baadú Dergal.
Editorial Alhambra. México, D.F. 1982. Pag: 63, 67-68, 161-167.
- 10). "Quantitative determination of linolóic ácid In Infant fórmulas"
Theresa W. Lee.
J. A.O.A.C. 1987. Vol. 70. #4. Pag: 702-705.
- 11). " A textbook of pharmaceutical analysis"
K.A. Connors.
A Wiley-Interscience Publication. Barcelona, España. 1979. Pag: 415-433.
- 12). "Lactología técnica"
Veisseyra, Roger.
Segunda edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1980. Pag: 257-261; 291.
- 13). "Ciencia de la leche"
Alais Charles.
Editorial Reverté. Barcelona. España. 1985. Pag: 16-21; 31; 35-37.
- 14). "The colorimétric micro-determination of long-chain fatty acids".
W.G. Duncombe.
Biochem. J. 1963. Vol: 88. Pag: 7-10.

15). "Revisión: Determinación de ácidos grasos libres en productos lácteos"

M.A. de la Fuente; M. Juárez.

Revista española de ciencia y tecnología de alimentos 1993. Vol: 33. #3.

Pag: 247-269.

16). "A method for specific analysis of free fatty acids in biological samples by capillary gas chromatography"

A. Palette, P. Durand, B. Floccard, and D. Blache.

Analytical Biochemistry. 1992. Vol: 206. Pag. 241-245.

17). "Liquid chromatographic determination of free and total fatty acids in milk and milk products as their 2-nitrophenylhydrazides"

Hishochi Miwa and Maseboei Yamamoto.

Journal of chromatography. 1990. Vol: 523. Pag: 235-246.

18). "Separation of C2-C18 free fatty acids in dairy products by dual column

P.T.G.C."

J. Hrivnak and V. Palo

J. of G.C. June 1967. Pag: 325-330.

19). "Gas chromatographic determination of mono and diglicérides in fats and oil: summary of collaborative study".

David Firestone.

Journal of the A.O.A.C. International. 1994. Vol: 77. #3. Pag: 677-680.

20). "Making infant fórmula more like mom"

Market corporation.

Food Engineering. 1992. Vol: 64. #5. Pag: 30.

21). "Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalyzed transesterification".

L.D. Metcalfe and C.N. Wang

Journal of Chromatographic Science. 1981. Vol: 19. Pag: 530-535.

22). "Comparison of methylation methods for the quantitation of conjugated linoleic acid isomers".

Nalur Chandrasekaran Shantha, Eric Andrew Decker and Bernhard Henning.

Journal of A.O.A.C. International. 1993. Vol: 76. #3. Pag: 644,649.

23). "Analysis of milk based infant formula. Phase IV. Iodide, Linoleic acid, Vitamins D and K. U.S. Food and Drug."

Journal of A.O.A.C. International. 1993. Vol. 76. #5. Pag: 1342-1343; 1045-1046.

24). "Quantitative gas-liquid chromatographic estimation of volatile fatty acids in aqueous media".

R.G. Ackman and R.D. Burgher.

Analytical Chemistry 1963 Vol:35 #6 Pag: 647-652

25). "Determinación de ácidos grasos del líquido amniótico por C.G."

Tesis Q.F.B. Daniel Alonso Cortés.

Facultad de Química.UNAM, México. 1982. Pag: 28-34.

26). "Aplicaciones de la C.G. en la industria alimenticia"

Tesis Q.F.B. Francisco Germán Coimenes Gutiérrez.

Facultad de Química.UNAM, México. 1981. Pag. 12-15.

27). "Cromatografía en fase vapor de ácidos grasos diméricos"

Tesis Química María Guadalupe Torres Zepeda.

Facultad de Química UNAM, México. 1973. Pag. 18-19.

28). "Limitaciones de la C.G. en la caracterización de grasas en leche"

Tesis Química Silvia Rocalía Ramos Cataño.

Facultad de Química UNAM, México. 1983. Pag. 5-19.

29). "Cromatografía gaseosa de la fracción grasa de quesos mexicanos"

Tesis Q.F.B. María de la Riva Pinal.

Facultad de Química. UNAM, México. 1969. Pag. 13, 22.

30). "Estudio comparativo de leches en polvo para lactantes"

Tesis Q.F.B. José de Jesús Baos Oliva.

Facultad de Química. UNAM, México. 1993. Pag. 6-25; 36-37; 39-40; 52-65; 67-68.

31). "Determinación por C.G. de los niveles de ácidos grasos en leche en polvo comercial"

Tesis Q.F.B. Raúl Antonio Benavides González.

Facultad de Química. UNAM, México. 1986. Pag. 1-4; 6-42; 50-57.

32). "Modern Chemical Analysis and Instrumentation"

Harold F. Walton and Jorge Reyes.

Ed. Marcel Dekkers Inc. Nueva York, U.S.A. 1973. Pag. 240-259; 310-337.

33). "Chromatography. Concepts and Contrasts"

James M. Miller.

A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. N.Y., U.S.A. 1988. Pag. 109-153.