

31
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**"DETERMINACION DE TRIGLICERIDOS EN LOS
PRINCIPALES QUESOS MEXICANOS POR
CROMATOGRAFIA DE GASES CAPILAR A ALTA
TEMPERATURA (CGC-AT)"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LAURA ANDREINA NEVAREZ DOMINGUEZ



MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267797



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.

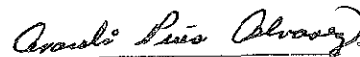
JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:

Presidente	Prof. CAPELLA VIZCAINO SANTIAGO.
Vocal	Prof. NIETO VILLALOBOS ZOILA.
Secretario	Prof. PEÑA ALVAREZ ARACELI PATRICIA.
1 ^{er} . suplente	Prof. CORNEJO BARRERA LUCIA.
2do . suplente	Prof. FARRES GONZALEZ SARAVIA AMELIA MA. DE GPE.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 101 de Cromatografía. Departamento de Química Analítica
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR:



Dra. Araceli Patricia Peña Alvarez

SUSTENTANTE:



Laura Andreina Nevárez Domínguez

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 LÍPIDOS.	2
1.2 EL QUESO Y SUS LÍPIDOS.	4
1.3 EL MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA EL ANÁLISIS DE LÍPIDOS.	9
2. PARTE EXPERIMENTAL	11
2.1 REACTIVOS Y MUESTRAS.	11
2.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	12
2.3 PROCEDIMIENTO	13
2.3.1 Extracción de Lípidos.	13
2.3.1.1 Selección del disolvente de extracción.	13
2.3.1.2 Métodos de extracción.	13
2.3.1.2.1 Extracción Mecánica.	13
2.3.1.2.2 Extracción con Agitación Vortex.	13
2.3.1.2.3 Extracción con Ultrasonido.	14
2.3.1.3 Extracción Exhaustiva.	14
2.3.2 Identificación de TG en queso.	14
2.3.2.1 Comparación de los perfiles de TG de leche de vaca, queso no comercial, queso comercial y 5 diferentes aceites vegetales.	15
2.3.3 Cuantificación de TG.	15
2.3.3.1 Determinación de TG en los diferentes quesos en estudio.	16
2.3.4 Influencia de la polaridad de la columna en el análisis de TG.	16

2.3.5 Determinación de TG en Queso bajo condiciones de Presión Constante, Flujo Constante y Programa de Presión.	17
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	17
3.1 EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.	17
3.1.1 Selección del disolvente de extracción.	17
3.1.2 Métodos de extracción.	19
3.1.3 Extracción exhaustiva.	21
3.2 IDENTIFICACION DE TG EN QUESOS.	21
3.2.1 Comparación de los perfiles de TG de leche de vaca, queso no comercial, queso comercial y cinco diferentes aceites vegetales.	35
3.3 CUANTIFICACIÓN DE TG.	41
3.3.1 Determinación de TG en los diferentes quesos en estudio	42
3.4 INFLUENCIA DE LA POLARIDAD DE LA COLUMNA EN EL ANÁLISIS DE TG.	47
3.5 DETERMINACION DE TG EN QUESO BAJO CONDICIONES DE PRESIÓN CONSTANTE, FLUJO CONSTANTE Y PROGRAMA DE PRESION .	50
4. CONCLUSIONES	55
5. BIBLIOGRAFÍA	57

Introducción

Los análisis de lípidos en alimentos y otras matrices biológicas son típicamente consumidores de tiempo y susceptibles de crear resultados artificiales (1), por lo que a nivel internacional se han realizado estudios para desarrollar metodologías sencillas y rápidas que generen resultados confiables. Las técnicas cromatográficas, son muy conocidas y utilizadas para el análisis de lípidos como ácidos grasos libres y ácidos grasos totales en alimentos sin embargo, no se ha reportado en la literatura, una metodología específica para la caracterización de triglicéridos (TG) como especies moleculares en algunos productos alimenticios, siendo que estas especies lipídicas forman la mayor parte de las grasas y aceites naturales.

México no tiene una gran tradición en producción y consumo de queso como algunos países europeos sin embargo, la presencia del queso en la cocina mexicana es indiscutible (2). Se esperaría que los quesos mexicanos, así como cualquier otro queso, tuviera un perfil lipídico similar al de su materia prima (generalmente, leche de vaca), sin embargo, al existir diferentes calidades de leche y la posibilidad de adulteraciones con aceites vegetales, este perfil se ve alterado.

La presente contribución tiene como objetivo primordial proponer una metodología sencilla, rápida, selectiva y confiable por Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura (CGC-AT) para el análisis de TG en quesos. Se presenta el perfil de TG de los quesos Panela y tipos Manchego, Chihuahua y Oaxaca (siendo éstos algunos de los de mayor consumo en el país) además de mostrarse conjuntamente la aplicabilidad del método propuesto en la evaluación de la calidad del queso y en la detección de una posible adulteración de la grasa con aceites vegetales.

1. Antecedentes

1.1 Lípidos.

El término *lipido* se ha usado tradicionalmente para describir una amplia variedad de compuestos naturales que tienen en común el ser solubles en disolventes orgánicos como dietiléter, hexano, benceno, cloroformo, metanol, etc. (3) y por su relativa baja solubilidad en agua (4). Esta hidrofobicidad sirve de base para su fácil separación de las proteínas y de los carbohidratos en matrices complejas (5). En general, los lípidos constan de ácidos grasos, es decir, largas cadenas alifáticas de ácidos monocarboxílicos que pueden encontrarse unidos por un enlace éster a un alcohol, principalmente glicerol, o por enlaces amida. También pueden contener ácido fosfórico, bases orgánicas, azúcares y componentes más complejos que pueden ser liberados por varios procedimientos hidrolíticos (3).

De acuerdo a Christie (3) “los lípidos son un grupo de compuestos que incluyen a los ácidos grasos, sus derivados y sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente a éstos”. Los lípidos pueden dividirse en dos clases principales: los lípidos simples (Figura 1), que son aquellos que al hidrolizarse dan uno o dos diferentes tipos de producto por mol y los lípidos complejos (Figura 2), que dan tres o más productos de hidrólisis por mol. Entre los de la primera clase se encuentran los triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides y ésteres de esteroles. Los lípidos complejos más importantes son los fosfolípidos, que varían dependiendo del grupo que se encuentre enlazado a la cadena fosfato, así se tienen, Fosfatidil Colina, Fosfatidil Etanol Amina, Fosfatidil Inositol , Fosfatidil Serina, etc.

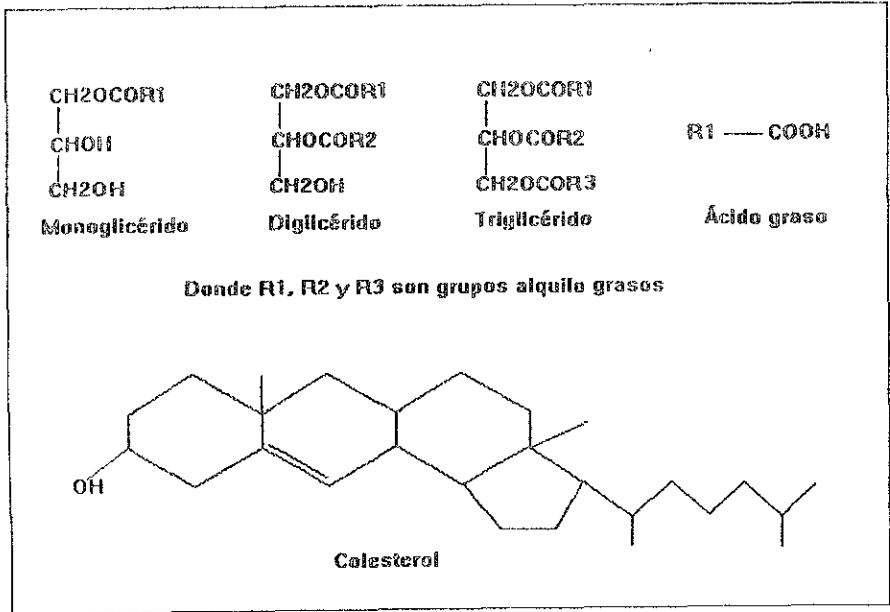


Figura 1. Lípidos Simples (6)

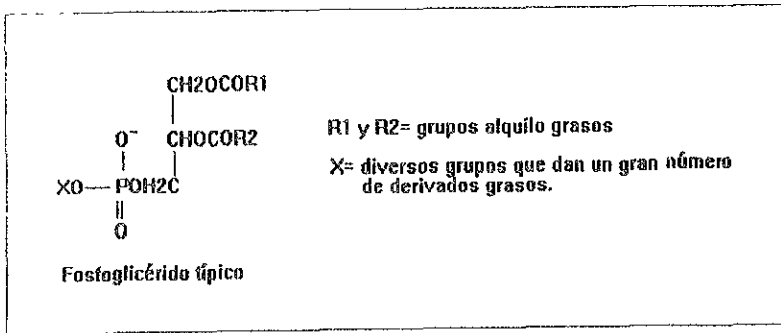


Figura 2. Lípidos complejos (7).

Los TG o triacilgliceroles, de acuerdo a la nomenclatura IUPAC, son los componentes mayoritarios presentes en la fracción lipídica de grasas y aceites (4). Su análisis es de relevante importancia en la industria de alimentos porque permite identificar adulteraciones o mezclas de diferentes grasas o aceites (8) y caracterizarlos, además de ser una buena herramienta en el estudio del metabolismo de lípidos y en la identificación y/o caracterización de bacterias y hongos (9). La presencia de lípidos en alimentos merece particular atención debido principalmente a su importancia como moléculas energéticas (39 KJ/gramo de TG), fuente de ácidos grasos, de vitaminas esenciales, y por su utilidad como emulsificantes y colorantes en algunos alimentos (5).

1.2 El Queso y sus Lípidos.

Existen muchas y muy diversas definiciones de *queso*, entre las de mayor importancia se encuentran las siguientes:

1. Para Kosikowski (10), un queso es el resultado de la concentración selectiva de los componentes insolubles de la leche, en la cual intervienen el calor, la acidez, la sal y las bacterias lácticas, pudiéndose obtener un alimento fresco y aceptable, o bien uno madurado, por la acción de microorganismos y enzimas específicas.
2. Para la FAO/WHO (10) el queso es el producto fresco o madurado, obtenido después de la coagulación y separación del suero de la leche entera parcialmente descremada.
3. García Garibay y colaboradores (11) definen al queso como un alimento lácteo obtenido por la coagulación enzimática de la leche con la subsecuente separación del suero; esta definición,

como remarcan sus autores, no incluye al queso coitage, queso crema, ricotta y requesón ya que éstos se obtienen por precipitación ácida y no por coagulación enzimática, además de que los últimos dos quesos se elaboran a partir del suero de leche.

4. Las Normas mexicanas (10) describen al queso como el producto hecho de la cuajada obtenida de la leche entera, semidescremada o descremada, de vaca o de otra especie de animales, con adición de crema o sin ella, por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos u otra enzima apropiada con o sin tratamiento posterior de la propia cuajada por calentamiento, presión o por medio de los fermentos de maduración, mohos especiales o sazónamiento.

Puede decirse que el queso es uno de los alimentos más complejos que existen, siendo la fracción lipídica uno de sus principales constituyentes. De acuerdo a Nájera, Barrón y Barrina (12), la importancia de la grasa en el queso puede considerarse desde varios puntos de vista: por su aporte nutricional, por su influencia en las características estructurales y reológicas del queso y por su participación en la formación de aroma.

Desde el punto de vista nutricional, la función de la grasa del queso es determinada fundamentalmente por el aporte energético de la grasa de la leche de partida, su composición en ácidos grasos y triglicéridos, así como por su papel disolvente de vitaminas liposolubles.

En cuanto a la influencia de la grasa sobre las características estructurales y reológicas del queso, deben considerarse diferentes aspectos. Primero, aunque la firmeza del queso viene determinada fundamentalmente por el contenido de proteínas, también se ve afectada por el intervalo de fusión de la grasa, ya que algunos autores han observado que diferencias en la proporción del índice de grasa sólida parecen afectar a las propiedades reológicas del queso. Segundo, cabe considerar la influencia de la grasa del queso en la elasticidad del mismo, debido a la interacción

existente entre la membrana superficial del glóbulo graso y la matriz de proteínas, aunque el impacto de este hecho parece disminuir en el queso madurado ya que, en este caso, la membrana del glóbulo graso aparece generalmente rota. Tercero, varios autores han puesto de manifiesto que la grasa del queso favorece su adhesividad, mejorando la homogeneidad de la pasta y confiriendo un aspecto cremoso, observándose además, que altos contenidos de grasa proporcionan menor firmeza y un aumento de la elasticidad. No obstante, otros autores, aún considerando la influencia que la grasa puede tener en la textura del queso, afirman que es mínima, comparada con la ejercida por otros componentes del queso, como lo son las proteínas, el cloruro de sodio y el agua.

Finalmente, en cuanto a la participación de la grasa en la formación del aroma del queso, debe tenerse en cuenta previamente que la grasa de la leche de la que se partió para su elaboración se caracteriza por presentar una elevada concentración de ácidos grasos de cadena corta, que pueden ser liberados en el transcurso de la maduración del queso, condicionando fuertemente su aroma.

La grasa butírica representa una de las mezclas más ricas en cuanto a lípidos se refiere, y dentro de esta fracción, los TG constituyen aproximadamente el 98% del material extraíble con disolventes no polares.

Los TG son compuestos que están formados por moléculas de glicerol unidas por enlaces éster a ácidos grasos. El glicerol como un poliol, puede formar triésteres con uno, dos o tres diferentes ácidos grasos. En el primer caso, un triéster se forma con tres residuos iguales (p. ej. tripalmitina), mientras que ésteres mezclados involucran dos o tres residuos acil diferentes, por ejemplo el TG dipalmito-oleín y palmito-oleo-linoleín. La regla para esta designación es que el ácido con la cadena más corta o, en el caso de un número de carbonos o NC

(NC= número total de átomos de carbono en la cadena acil del TG) igual en la cadena, la cadena con menos dobles ligaduras, se menciona primero. En la Figura 3 se muestra el parámetro Z que da las combinaciones de TG que pueden existir en una grasa o aceite considerando isómeros de posición, y el parámetro Z' (número de isómeros de posición en un TG) que sólo considera el número de isómeros de posición posibles en la molécula (5).

$$Z = (n^3 + n^2) \div 2$$

$$Z' = n^3 + 3n^2 + 2n + 6$$

Figura 3. Combinaciones de TG posibles en una matriz con un número n de ácidos grasos diferentes en una distribución al azar.

Los ácidos grasos componentes de los TG lácteos son muy variados y complejos, se encuentran saturados, insaturados, con número par e impar de átomos de carbono, hidroxilados y ramificados, desde cero a seis dobles enlaces, e isómeros cis y trans (13). Por otro lado, los ácidos grasos saturados de la leche contienen desde 4 a 18 carbonos con un ácido graso insaturado en proporciones apreciables (18 carbonos con una insaturación), por lo que las combinaciones posibles para la formación de TG son múltiples (14). En grasa de leche se han llegado a identificar hasta un total de 400 ácidos grasos diferentes (15) y 116 especies moleculares de TG (16). Esta complejidad, aunada a la baja volatilidad de éstos, hacen sumamente complejo su análisis (17).

De acuerdo a Nájera, Barrón y Barrina (12), la mayor parte de los trabajos que estudian la grasa del queso se han dedicado a su composición en ácidos grasos libres y ácidos grasos totales, no habiéndose encontrado en la bibliografía, ningún trabajo que describa la fracción triglicéridica del

queso, a excepción de algunos autores que han cuantificado fracciones de glicéridos parciales en estudios de maduración y actividad lipolítica.

Evidentemente los requerimientos de control de calidad en la industria del queso en los países europeos y E.U. son diferentes a los requerimientos de la industria en México. En México es posible detectar principalmente dos problemas comunes que alteran el perfil de lípidos en el queso y que probablemente repercuten en la calidad de este producto. El primero, es la calidad de la leche como materia prima, siendo éste un problema común debido a diferentes factores entre los que se encuentran contaminaciones post-ordeña o su mal almacenamiento. El segundo problema es la posibilidad de una adulteración de la grasa con aceites vegetales.

De acuerdo a Trejo Delarbre (2) en México, las grasas vegetales son los ingredientes que se emplean con mayor frecuencia para adulterar quesos y entre ellas, la de coco y la de algodón son las que se usan con mayor frecuencia. Al utilizar estas grasas vegetales, los productores obtienen grandes ahorros. Por ejemplo, la grasa de coco de mayor calidad cuesta menos de la mitad del costo de la grasa butírica, por lo que algunos productores le quitan a la leche parte de su grasa para venderla en forma de crema y a su vez, sustituyen la grasa que extraen con grasa vegetal, bajando de manera considerable los costos con lo que pueden vender sus productos a precios más bajos. Además de todo esto, no existe una garantía de sanidad o limpieza acerca de estos adulterantes en la leche que nos proporcione seguridad en el producto terminado (18).

1.3 El Método Cromatográfico para el Análisis de Lípidos.

Llevando a cabo una revisión bibliográfica de los temas relacionados con este trabajo, se encontraron distintos estudios, de los cuales se mencionan a continuación los de mayor importancia.

En la literatura se reportan trabajos donde se determinó la fracción volátil de diferentes quesos de gran importancia comercial en diferentes países con el fin de clasificarlos (19) o para la obtención de referencias sobre los compuestos que dan su sabor y aroma característicos (20). Además, se reportan otros estudios encaminados a mostrar nuevas técnicas y métodos cromatográficos para la caracterización de lípidos en productos lácteos, entre las que se encontraron la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y la cromatografía de gases capilar (CGC) para la determinación de ácidos grasos libres y sus derivados (21-25), además de procedimientos de extracción y purificación de la muestra (26), formación de derivados directa (12,27), el uso de columnas capilares con fases estacionarias específicas (28), diferentes sistemas de inyección (29-31), y el uso de cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) (32,1,33).

Para la determinación de TG tanto la CLAE, la CGC y la CFS pueden ser aplicadas, pero la eficiencia y la rapidez del análisis obtenido por CGC es superior a cualquiera de las técnicas antes mencionadas (9).

La cromatografía de gases ha hecho una contribución importante al análisis de lípidos con la formación de ésteres metílicos de los ácidos grasos, siendo esta aplicación una de las mayores en esta técnica. Muchos lípidos requieren de la formación de un derivado antes del análisis cromatográfico debido a su baja volatilidad o su poca estabilidad térmica, pero existen lípidos como los TG, que pueden ser analizados sin llevar a cabo alguna reacción de formación de

derivados evitando así, reacciones de derivatización incompletas (4). Reyes Garcés (34) como conclusión a su investigación con ácidos grasos en aceites vegetales, sugiere el análisis directo de TG en lugar de la hidrólisis a ácidos grasos y su posterior formación de derivados metil-éster para evitar alterar las posibilidades de identificación de la fracción grasa. La CGC es el método de mayor eficiencia y selectividad que se pueda encontrar para el análisis de matrices complejas, tales como muestras ambientales, petroquímicos y alimentos (31). El desarrollo de columnas capilares de sílice fundida (vidrio de alta pureza) evita la reactividad química que poseían las columnas de acero o vidrio antes usadas (35). La alta eficiencia de la CGC se logra debido a tres factores principalmente: al diámetro pequeño de la columna capilar, a su gran longitud, y a la delgada película de la fase estacionaria en la sílice fundida que permite eluir compuestos pesados y poco volátiles, como los TG, a una temperatura tal que ni la fase estacionaria ni estos compuestos se descomponen. Tal separación no podría efectuarse tan eficientemente en una columna empacada, de hecho, existen innumerables reportes de problemas en análisis cuantitativos con este tipo de columnas, debidos a adsorción irreversible y polimerización de la muestra (36). La eficiencia del análisis no puede aumentarse por el uso de columnas más largas (37), ni con rampas de calentamiento mayores (38) porque el tiempo total de análisis se volvería extremadamente largo. La CGC además de su alta eficiencia, y rapidez de análisis, tiene la ventaja de trabajar con detectores universales y específicos así como con técnicas espectroscópicas acopladas (33). El detector de ionización de flama (DIF) es usado como detector en la mayoría de los análisis de lípidos, ya que estas moléculas contienen solamente por lo general carbono, hidrógeno y oxígeno (4) y la respuesta de este detector es proporcional al contenido de carbono unido a hidrógeno en la molécula (39).

Debido a que los TG poseen un amplio rango de pesos moleculares (desde NC 24 a NC 56), se requirió un programa de temperaturas para el análisis cromatográfico, evitando así tiempos de retención demasiado largos, eluciones incompletas de los TG más pesados, picos anchos que provocarían una cuantificación incorrecta y baja resolución de isómeros con mismo NC (40).

Debido a las características de los TG (baja volatilidad y alto peso molecular), se necesita para el análisis cromatográfico columnas cortas y temperaturas elevadas, por lo que la cromatografía de gases capilar a alta temperatura (CGC-AT) ofrece una excelente opción para el análisis de estos compuestos (4). Esta técnica es relativamente nueva, sin embargo, ya existen en la literatura un gran número de aplicaciones mostrando su gran potencial (37). Algunos ejemplos de esto son el análisis de TG, hidrocarburos de hasta 120 carbonos, ceras, ésteres de esterol, diterpenos y sus ésteres, azúcares, poliglicérols, emulsificantes, etc. (9).

2. Parte Experimental

2.1 Reactivos y Muestras.

Hexano, éter etílico e isooctano, grado reactivo analítico Baker Analyzed (J.T. Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, México). Cloroformo, diclorometano y metanol, grado reactivo analítico (Mallinckrodt, Inc. Paris, Kentucky 40361). Tricaprilina (C24), tricaprina (C30), trilaurina (C36), trimiristina (C42), tripalmitina (C48), triestearina (C54), trioleína (C54:1) y estearato de metilo SIGMA grado cromatográfico 99% de pureza (Sigma Chemical Co. P.O. Box 14508 St. Louis. MO 63178 USA.).

Se analizaron cuatro tipos de queso de diferente marca comercial (Tabla 1).

Debido a que los TG poseen un amplio rango de pesos moleculares (desde NC 24 a NC 56), se requirió un programa de temperaturas para el análisis cromatográfico, evitando así tiempos de retención demasiado largos, eluciones incompletas de los TG más pesados, picos anchos que provocarían una cuantificación incorrecta y baja resolución de isómeros con mismo NC (40).

Debido a las características de los TG (baja volatilidad y alto peso molecular), se necesita para el análisis cromatográfico columnas cortas y temperaturas elevadas, por lo que la cromatografía de gases capilar a alta temperatura (CGC-AT) ofrece una excelente opción para el análisis de estos compuestos (4). Esta técnica es relativamente nueva, sin embargo, ya existen en la literatura un gran número de aplicaciones mostrando su gran potencial (37). Algunos ejemplos de esto son el análisis de TG, hidrocarburos de hasta 120 carbonos, ceras, ésteres de esteroles, diterpenos y sus ésteres, azúcares, poliglicérols, emulsificantes, etc. (9).

2. Parte Experimental

2.1 Reactivos y Muestras.

Hexano, éter etílico e isooctano, grado reactivo analítico Baker Analyzed (J.T. Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, México). Cloroformo, diclorometano y metanol, grado reactivo analítico (Mallinckrodt, Inc. Paris, Kentucky 40361). Tricaprilina (C24), tricaprina (C30), trilaurina (C36), trimiristina (C42), tripalmitina (C48), triestearina (C54), trioleína (C54:1) y estearato de metilo SIGMA grado cromatográfico 99% de pureza (Sigma Chemical Co. P.O. Box 14508 St. Louis. MO 63178 USA.).

Se analizaron cuatro tipos de queso de diferente marca comercial (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de queso en estudio.

Marca Comercial	Tipo de queso			Manchego
	Panela	Oaxaca	Chihuahua	
Los Volcanes	X	X	X	X
Nochebuena	X	X		X
Bonanza	X	X	X	
Covadonga	X			
Caperucita			X	
Chambourcy				X

2.2 Condiciones Cromatográficas.

El análisis se llevó a cabo en dos cromatógrafos de gases con las siguientes condiciones:

1. Cromatógrafo de gases HP modelo 5890 Series II acoplado con un sistema de inyección en columna (On-column), un detector de Ionización de flama (DIF) y un integrador modelo HP3396A. Se trabajó a presión constante de 5 psi/min. Se utilizaron dos columnas: Columna No Polar de poli (5% difenil-95% dimetil siloxano) de 10 m X 0.25 mm D.I. X 0.25 μ m de película; y una columna Polar de poli (50% difenil-50% dimetil siloxano) de 10 m X 0.25 mm D.I. X 0.25 μ m de película. Programa de temperatura: temperatura inicial 60°C, incrementándose 20°C/min hasta alcanzar 360°C, manteniéndose durante 10 minutos. Temperatura del inyector: 3°C arriba de la temperatura del horno (Oven Track on). Temperatura del detector: 360°C.
2. Cromatógrafo de gases HP 5890 Series II Plus acoplado con un sistema de control electrónico de presión, un sistema de inyección en columna (On-column), un detector DIF y una base de datos modelo HP3365 ChemStations (Serie dos). Se emplearon las columnas: No Polar y Polar anteriormente descritas. Programa de temperatura: temperatura inicial de 60°C durante 1min, incrementándose 20°C/min hasta 360°C manteniéndose durante 15min. Temperatura del inyector: 3°C arriba de la temperatura del horno (Oven Track on). Temperatura del detector: 360°C. Se

trabajó a presión constante de 5psi, a flujo constante de 1.98 ml/min y también a un programa de presión (presión inicial 5 psi incrementándose 2 psi/min hasta 40 psi manteniéndose por 15 min).

2.3 Procedimiento

2.3.1 Extracción de lípidos.

2.3.1.1 Selección del disolvente de extracción.

Se realizaron varias pruebas de extracción empleando distintos disolventes con el objetivo de elegir el de mayor eficiencia en la extracción. Se utilizaron hexano, cloroformo/metanol (2:1 v/v) y éter etílico/hexano (1:1 v/v). La extracción con estos disolventes se efectuó utilizando una extracción mecánica como se describe a continuación.

2.3.1.2 Métodos de extracción.

2.3.1.2.1 Extracción mecánica.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de queso y se colocaron en un mortero. Se adicionaron 5 ml de hexano y se estrujó el queso con un pistilo durante 3 minutos. El extracto se separó de la muestra por medio de una pipeta Pasteur y se transfirió a un matraz aforado de vidrio limpio y seco de 10 ml, llevándose al aforo con hexano. Se inyectó 1 μ l del extracto en el cromatógrafo.

2.3.1.2.2 Extracción con agitación Vortex.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de queso cortándose en pequeños trozos y transfiriéndolos a un tubo de precipitado. Se adicionaron 5 ml de hexano. La muestra se sometió a una fuerte agitación utilizando un agitador vortex durante 3 minutos. El extracto se aforó a 10 ml con hexano y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo.

2.3.1.2.3 Extracción con Ultrasonido.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de queso cortándose en pequeños trozos y transfiriéndolos a un tubo de precipitado. Se adicionaron 5 ml de hexano. Se sometió la muestra a una agitación con ultrasonido durante 3 minutos. Se aforó el extracto a 10 ml con hexano y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo.

2.3.1.3 Extracción exhaustiva.

Con el fin de comprobar que la extracción de lípidos se llevó a cabo de manera cuantitativa, se realizaron 2 extracciones mecánicas sucesivas con hexano de la misma muestra, utilizando el procedimiento de extracción mecánica descrito en 2.3.1.2.1. Se pesaron aproximadamente 10 mg de queso Chihuahua, a los que se les agregaron 5 ml de hexano. Se estrujó la muestra con hexano durante 3 minutos y se aforó a 10 ml con este disolvente. Se separó este primer extracto de la muestra y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo. Se adicionaron otros 5 ml de hexano a la misma muestra para efectuar la segunda extracción y 1 μ l del segundo extracto también se inyectó al cromatógrafo.

2.3.2 Identificación de TG en queso.

La identificación y asignación de los TG de las muestras en estudio (Tabla 1) se realizó comparando sus tiempos de retención con los obtenidos de una mezcla estándar conteniendo TG con NC de 30, 36, 42, 48 y 54 en hexano a una concentración de 0.02 mg/ml y NC de 24 a 0.007 mg/ml.

2.3.2.1 Comparación de los perfiles de TG de leche de vaca, queso no comercial, queso comercial y cinco diferentes aceites vegetales.

Con el propósito de establecer una comparación entre el perfil de TG de leche de vaca, un queso no comercial (elaborado en el laboratorio) y un queso comercial, se prepararon varias muestras y se inyectaron al cromatógrafo.

La extracción lipídica de la leche se realizó tomando 2 ml de leche pasteurizada y homogeneizada (Lala), adicionando 10 ml de hexano y agitando magnéticamente durante 30 minutos.

La extracción de los lípidos del queso se realizó con el método mecánico descrito en el punto 2.3.1.2.1. Se inyectaron muestras de aceite de maíz, coco, algodón, cártamo y girasol con el fin de obtener los perfiles de TG de posibles adulterantes de la grasa butírica. Las muestras se prepararon adicionando 40 ml de hexano a 15 mg de aceite. Se agitó la solución con un agitador Vortex durante 2 minutos aproximadamente y de cada muestra se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo.

2.3.3 Cuantificación de TG.

El análisis cuantitativo se realizó por el método de Estandarización Interna, calculando los factores de respuesta relativos (Fr) de una mezcla estándar de TG con NC 24, 30, 36, 42, 48 y 54 respecto al estearato de metilo que actúa como Estándar Interno (E.I.).

Se realizaron 5 inyecciones de esta solución y se calculó la media aritmética (\bar{X}) y el porcentaje del coeficiente de variación (%C.V.) para cada uno de los TG estándar, de los Fr encontrados.

Las muestras de queso se analizaron en las mismas condiciones cromatográficas que la mezcla estándar, tomando en cuenta, para el cálculo de concentración final, el Fr calculado de uno de los estándares de TG.

El contenido de TG en queso se reporta como los miligramos totales de TG encontrados por gramo de muestra.

2.3.3.1 Determinación de TG en los diferentes quesos en estudio.

Las muestras (Tabla 1) se prepararon adicionando 0.4 ml de E.I. (0.97 mg/ml) antes de comenzar la extracción mecánica descrita en 2.3.1.2.1.

Se realizaron 3 extracciones de cada uno de los diferentes tipos de queso, así como de las distintas marcas comerciales. De cada una de las extracciones se hicieron inicialmente 3 inyecciones, es decir, 9 inyecciones por cada queso de la misma marca en estudio. Se observó que no había diferencia significativa entre inyección e inyección de una misma extracción, por lo que se decidió hacer sólo una inyección por cada extracción que se llevara a cabo.

Con los datos obtenidos se determinó los mg de TG por gramo de muestra y se calcularon la X, la desviación estándar (D.E.) y el %C.V. de estos datos.

2.3.4 Influencia de la polaridad de la columna en el análisis de TG.

Con el objeto de observar la influencia de la polaridad de la Columna en el análisis de TG, se realizó la determinación de éstos en una columna No Polar y una columna Polar. Se analizaron muestras de queso Los Volcanes tipo Oaxaca, Chihuahua y Manchego, y de queso Panela Bonanza.

La preparación de las muestras se realizó utilizando la extracción mecánica con hexano descrita en el punto 2.3.1.2.

2.3.5 Determinación de TG en Queso bajo condiciones de Presión Constante, Flujo Constante y Programa de Presión.

Las muestras que se analizaron fueron las mismas del inciso 2.3.4 y se prepararon de la misma manera. Estas muestras se inyectaron a Flujo constante, Presión constante, y bajo un Programa de presiones con el objeto de ver la influencia del flujo y la presión en la resolución y eficiencia del análisis cromatográfico de TG.

3. Resultados y Análisis de Resultados

3.1 Extracción de lípidos.

3.1.1 Selección del disolvente de extracción.

Las extracciones con hexano y las dos mezclas de disolventes que se utilizaron se eligieron en base a los reportes encontrados en la literatura para la extracción de TG en lácteos. El análisis de la extracción de lípidos con hexano, cloroformo/ metanol y éter etílico/ hexano se muestra en la Figura 4.

2.3.5 Determinación de TG en Queso bajo condiciones de Presión Constante, Flujo Constante y Programa de Presión.

Las muestras que se analizaron fueron las mismas del inciso 2.3.4 y se prepararon de la misma manera. Estas muestras se inyectaron a Flujo constante, Presión constante, y bajo un Programa de presiones con el objeto de ver la influencia del flujo y la presión en la resolución y eficiencia del análisis cromatográfico de TG.

3. Resultados y Análisis de Resultados

3.1 Extracción de lípidos.

3.1.1 Selección del disolvente de extracción.

Las extracciones con hexano y las dos mezclas de disolventes que se utilizaron se eligieron en base a los reportes encontrados en la literatura para la extracción de TG en lácteos. El análisis de la extracción de lípidos con hexano, cloroformo/ metanol y éter etílico/ hexano se muestra en la Figura 4.

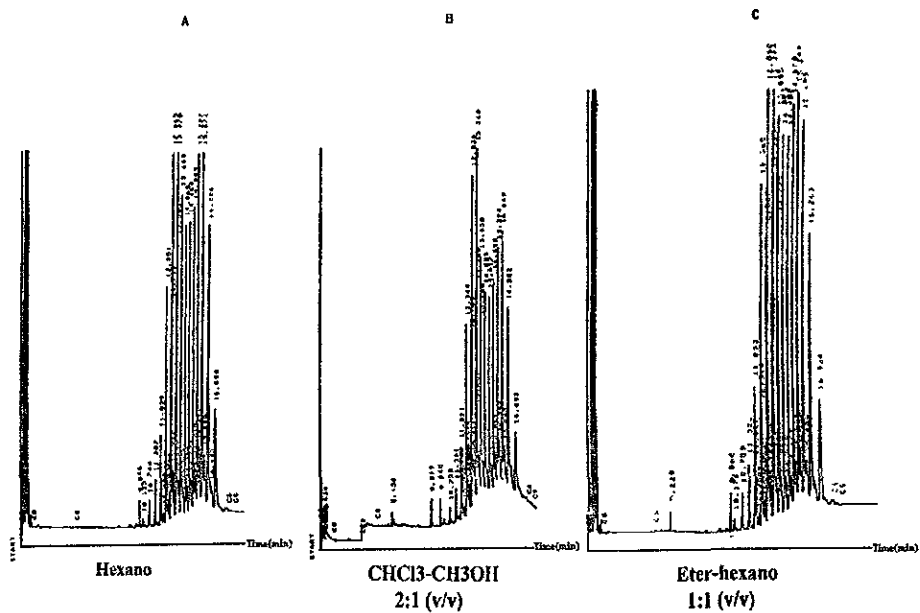


Figura 4. Perfil cromatográfico de las extracciones de lípidos en queso tipo Manchego con diferentes disolventes.

Condiciones cromatográficas:

Columna no Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25µm. Poli (5%difenil-95%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C durante 10 minutos.

Presión de 5 psi (constante), H₂ (gas acarreador).

Como se observa en los tres cromatogramas de la Figura 4 (A, B, y C) se obtuvieron índices de extracción similares, sin embargo, cada uno de estos sistemas de extracción presentaron algunas desventajas en la parte práctica.

Con la mezcla cloroformo-metanol, la muestra parcialmente desengrasada flotaba en el extracto y quedaba tan fina y dispersa, que su separación del extracto resultaba muy difícil. Por otra parte, el éter etílico (de la mezcla éter etílico-hexano) posee una presión de vapor muy alta que provoca su volatilización rápida a temperatura ambiente (15-18°C) y aunque el proceso de extracción se efectuara en forma rápida, el extracto perdía disolvente. Usando solamente hexano para la extracción, la muestra desengrasada se separaba fácilmente del extracto, además de que la presión de vapor relativamente baja del hexano dió el tiempo suficiente para lograr la extracción de forma completa sin pérdidas notables de este disolvente. El hexano se escogió como mejor disolvente de extracción debido al fácil manejo tanto de la muestra parcialmente desengrasada, como del propio disolvente, además de poseer éste una relativa baja toxicidad.

3.1.2 Métodos de extracción.

De los tres métodos de extracción estudiados el que proporcionó mayor rendimiento de la extracción (Figura 5), así como mayor facilidad en la manipulación de la muestra, fue la extracción mecánica. Por lo que este método se utilizó para la extracción de lípidos de las muestras en estudio.

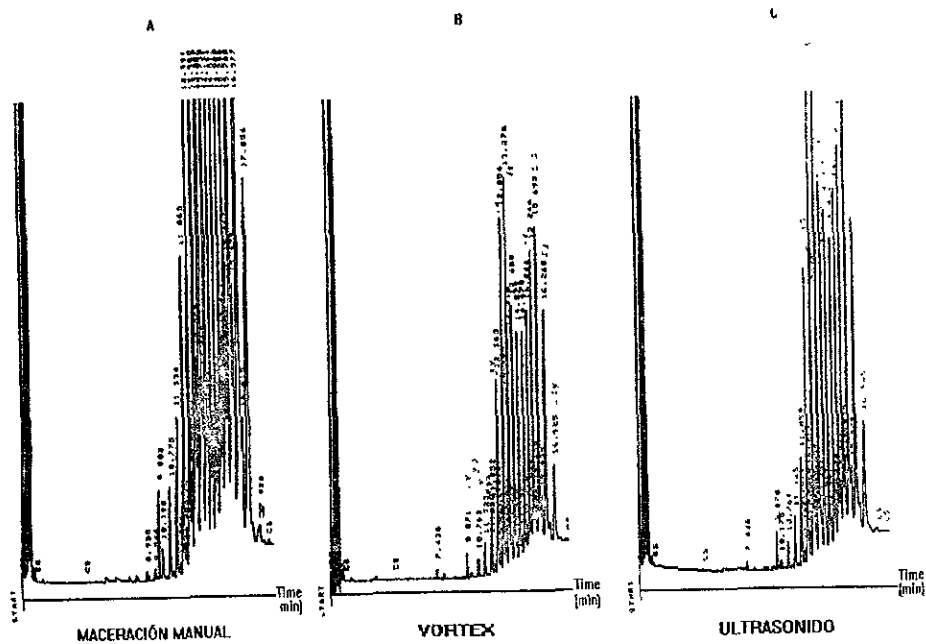


Figura 5. Perfil cromatográfico de las diferentes técnicas de extracción probadas en queso tipo Oaxaca.
 Condiciones cromatográficas:
 Columna no Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25µm. Poli (5%difenil-95%dimetil siloxano).
 Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C durante 10 minutos.
 Presión de 5 psi (constante), H₂ (gas acarreador).

3.1.3 Extracción exhaustiva.

Al realizar las extracciones mecánicas sucesivas antes descritas de la misma muestra, se encontró que con una sola extracción de 5 ml de hexano, se lograba extraer cuantitativamente la mayor parte del material lipídico de una muestra de 10 mg de queso (Figura 6).

3.2 Identificación de TG en quesos.

El perfil cromatográfico obtenido de la mezcla estándar de TG (NC 24, 30, 36, 42, 48 y 54) se muestra en la Figura 7. Este perfil permitió identificar el perfil de TG en las muestras analizadas bajo el siguiente criterio:

La distancia entre cada grupo de picos correspondientes a un grupo de TG con un mismo NC no es constante en un programa isotérmico debido al alto peso molecular de los TG más pesados. El programa de temperaturas usado en el presente estudio trata de que las distancias entre un grupo de TG y otro no varíe considerablemente y se pueda efectuar la asignación de los NC de cada grupo de TG y que esta asignación sea confiable. Los NC asignados a los picos mayoritarios en cada grupo son números pares debido a que en la naturaleza los ácidos grasos que forman los TG tienen generalmente un número par de carbonos.

De la Figura 8 a la 11 se muestra el análisis de TG en los quesos tipo Oaxaca, Manchego, Chihuahua y Panela (Los Volcanes) respectivamente. La asignación de los TG se realizó en base al perfil de TG de la mezcla estándar. Como puede verse en estos cromatogramas, aparece un pico principal en cada grupo de TG con un mismo NC, y a la derecha e izquierda de éste, aparecen picos más pequeños indicando la presencia de TG de igual NC pero con diferente

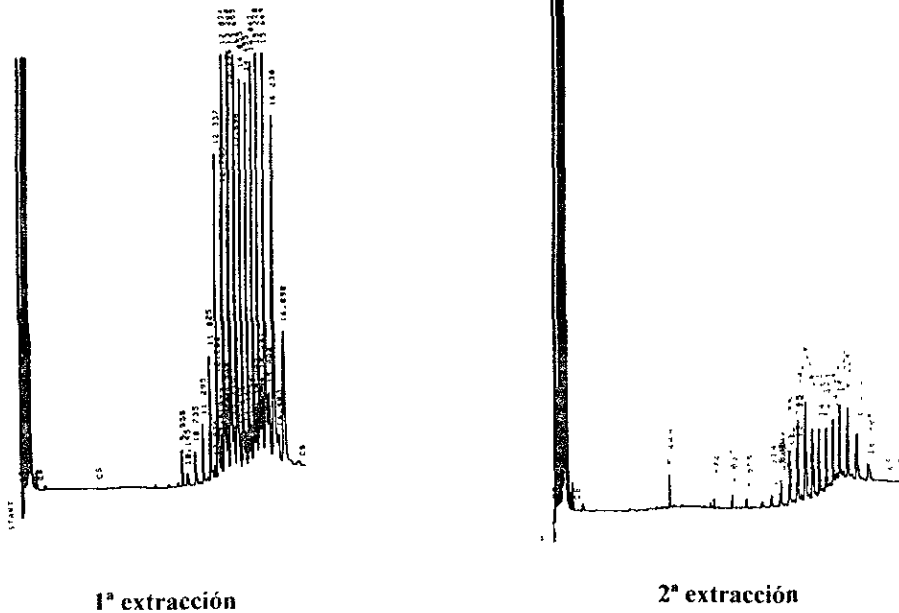


Figura 6. Perfil cromatográfico que muestra la cuantitatividad de la extracción de lípidos en queso tipo Oaxaca.

Condiciones cromatográficas:

Columna no Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25µm. Poli (5%difenil-95%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C durante 10 minutos.

Presión de 5 psi (constante), H₂ (gas acarreador).

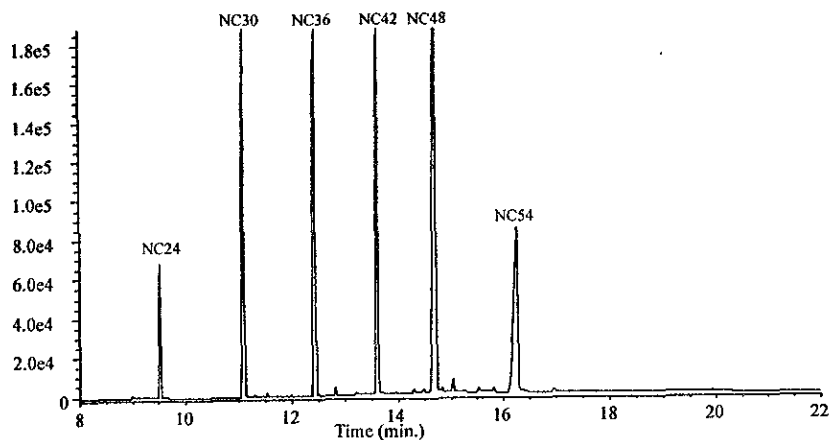


Figura 7. Perfil cromatográfico de una mezcla estándar de TG.

Condiciones cromatográficas:

Columna Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25 μ m. Poli (50%difenil-50%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C durante 10 minutos.

Flujo: 1.98 ml/min (constante), H₂ (gas acarreador).

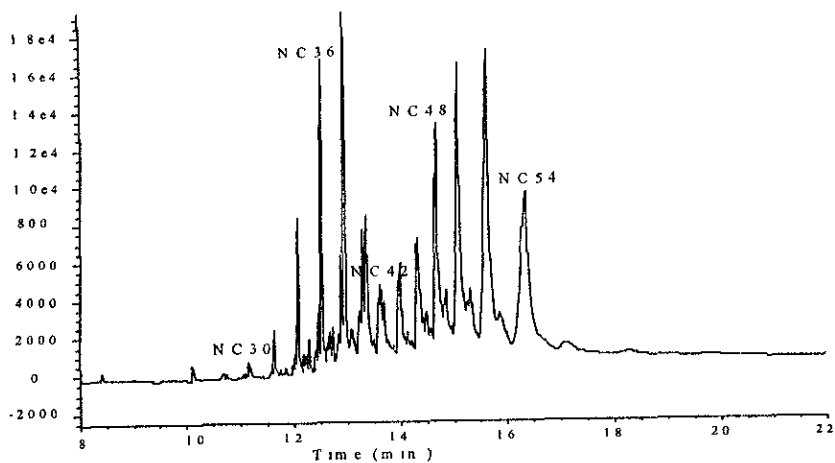


Figura 8. Perfil cromatográfico del queso tipo Oaxaca Los Volcanes.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

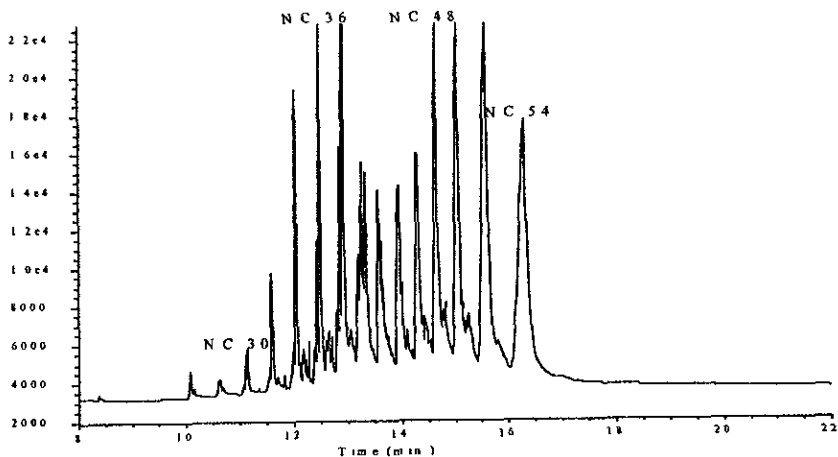


Figura 9. Perfil cromatográfico del queso tipo Manchego Los Volcanes
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

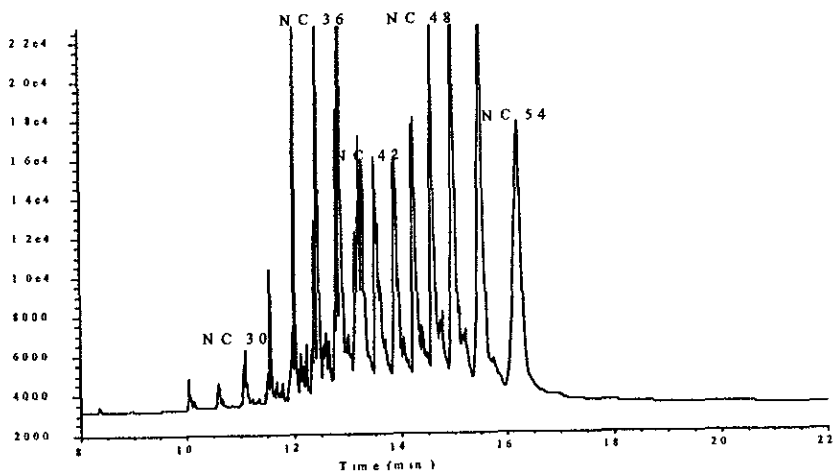


Figura 10. Perfil cromatográfico del queso tipo Chihuahua Los Volcanes.
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

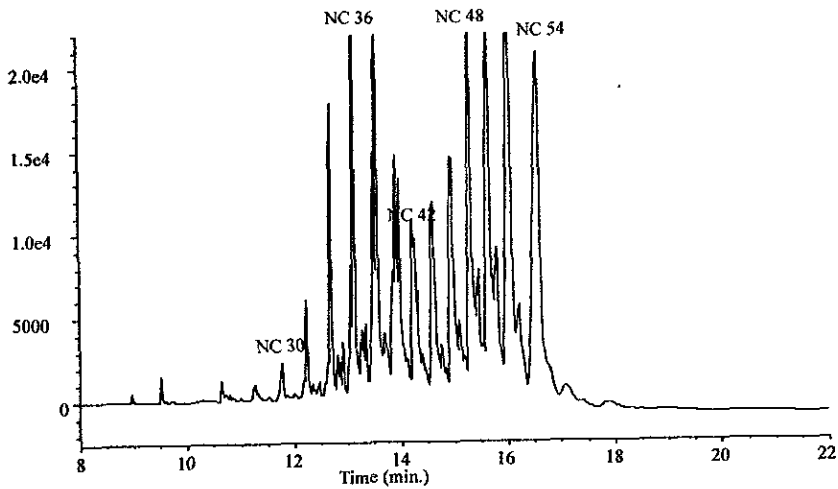


Figura 11. Perfil cromatográfico del queso Panela Los Volcanes.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

combinación de ácidos grasos (diferente longitud de cadena y grado de insaturación) además de una distribución en el esqueleto del glicerol distinta.

La Figura 12 muestra el perfil del Porcentaje Relativo (% R) de TG en los quesos Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego Los Volcanes. Debido a las diferencias en el procedimiento de elaboración del queso (tiempo y temperatura de calentamiento, tiempo de maduración, grado de salado, tipo de microorganismos, materias primas de partida, origen del cuajo, etc.) se esperaba obtener un % R distinto de TG para cada tipo de queso. Sin embargo, el % R de cada TG en las muestras, fue muy similar variando únicamente la proporción total de éstos, es decir, la cantidad total de TG en cada tipo de queso. El perfil de TG obtenido en todas las muestras, como ya se mencionó, es casi idéntico, por lo que podría suponerse que las 4 muestras analizadas parten de

una misma materia prima, sin poder asegurar aún que los perfiles cromatográficos corresponden a un perfil de leche de vaca.

Por otro lado, en las 4 variedades de queso analizadas, los TG de NC 30 a NC 50, tienen % R casi idénticos, mientras que a partir del TG con NC 52, el % R varía. Probablemente esta variación se deba a alguna descomposición de los TG de mayor peso molecular que están más expuestos a altas temperaturas (arriba de 320°C) y, que permanecen mayor tiempo dentro de la columna. También se puede pensar en una polimerización con la fase estacionaria debido a una posible mayor proporción de ácidos grasos insaturados en estos últimos TG (9).

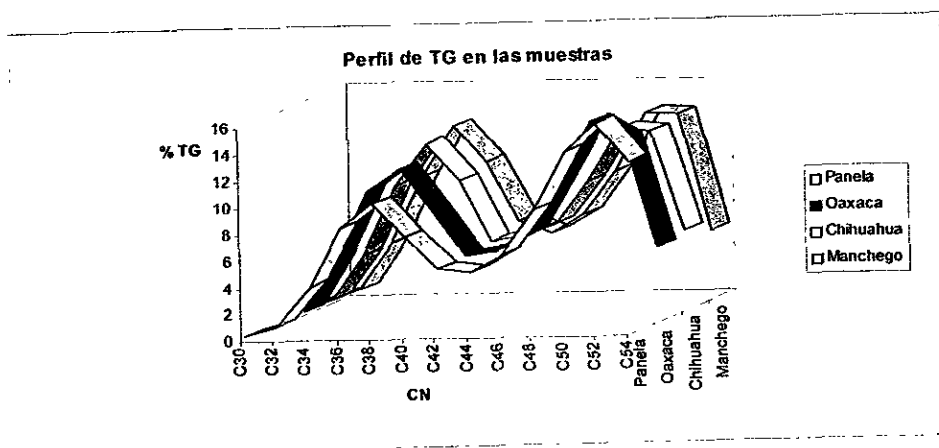


Figura 12. % R de TG vs. NC de los 4 tipos de queso Los Volcanes.

Por otra parte, se esperaba que en el queso Panela el % R de todos sus TG fuera menor con respecto a las otras variedades de queso debido a que su contenido de grasa total es menor, sin embargo, como se muestra en la Tabla 2, el contenido de TG con NC 52 y 54 es mayor que el resto de las muestras, (15.88% y 12.93% respectivamente). Esta variación posiblemente se podría explicar considerando que a un queso fresco, como lo es el Panela, no se le adicionan cultivos

lácteos para su preparación, lo que pudiera ocasionar que no se lleve a cabo ningún tipo de lipólisis de los TG más pesados resultando un mayor % R de estos TG.

Tabla 2. % R de TG encontrados en los 4 tipos de queso analizados de la marca Los Volcanes.

NC	% R de TG.			
	Panela	Oaxaca	Chihuahua	Manchego
30	0.2841		0.4903	0.43790
32	0.9793	1.219	1.235	1.14700
34	3.9005	4.9749	4.5546	4.49120
36	8.2667	10.269	9.6864	9.53920
38	10.1382	11.8459	12.8588	13.3537
40	7.4811	8.7013	10.0352	10.6131
42	5.101	5.175	5.4237	6.0302
44	4.7821	5.4989	5.7879	5.11300
46	6.0803	6.7424	6.7151	6.5035
48	9.4481	10.8549	9.8451	9.6884
50	13.7986	15.2119	13.7584	14.0455
52	15.8846	13.808	13.5434	13.9775
54	12.9317	5.5514	6.066	5.0595

Se hizo el análisis de todas las muestras mencionadas en la Tabla 1 y se encontraron diferencias en el perfil de TG del queso Panela y del queso tipo Chihuahua marca Bonanza con respecto a las demás marcas estudiadas.

La Figura 13 ilustra el análisis cromatográfico del queso Panela Bonanza observándose una diferencia significativa en el perfil de TG comparado con las muestras anteriormente presentadas. En este perfil no se encontraron los TG con NC de 30, 32 y 34, y el tiempo de retención de los TG con NC de 36, 38, 40 y 42 no corresponde a tiempos de retención de los estándares y de las otras muestras de queso panela de las marcas comerciales estudiadas. Una posible explicación es que puede tratarse de TG con igual NC pero con diferente distribución de ácidos grasos que los conforman, lo que indica posiblemente que se trata de TG de una naturaleza distinta a la láctea, por lo que podría suponerse la adición de grasa o aceite vegetal.

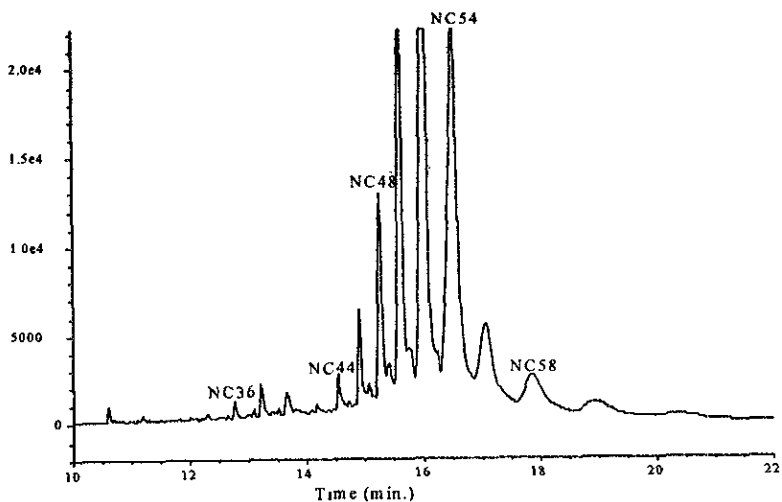


Figura 13. Perfil cromatográfico de TG del queso Panela Bonanza.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

La diferencia entre los perfiles de TG del queso Panela Bonanza y otros quesos Panela, se presenta con mayor claridad en la Figura 14. El perfil de TG del queso Panela Bonanza tiene % R muy pequeños (menores de 1%) desde los TG con NC 34 hasta NC 44 mientras que los TG con NC 52 y NC 54 tienen unos valores extremadamente altos (de 30.37% y 26.89% respectivamente) (Tabla 3) comparados con los de otras marcas comerciales. Con respecto al perfil y al % R de TG de las marcas restantes, se observa que el Panela Los Volcanes y Covadonga son muy similares entre sí, mientras que el Panela Nochebuena muestra algunas diferencias en su % R de TG siendo sus % mayores a los de las otras dos marcas de NC 30 a NC 50 y porcentos de TG mucho menores en NC 52 y NC 54.

Panela Volcanes y Covadonga

Panela Nochebuena

NC 52; 16.1 % R promedio de TG

> 13.1%; NC52

NC54; 14.0 % R promedio

> 4.8%; NC54

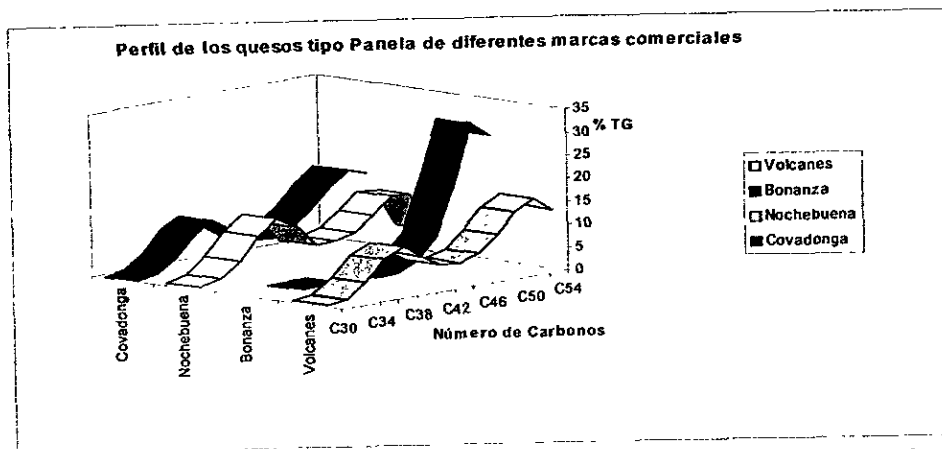


Figura 14. Perfil del %R de TG del queso Panela de las 4 marcas comerciales estudiadas.

Tabla 3. % R de TG del queso Panela de 4 diferentes marcas comerciales.

NC	% R de TG.				X	D.E.	%C.V.
	Volcanes	Bonanza	Nochebuena	Covadonga			
30	0.2841		0.6593	0.2897	0.4110	0.2150	52.313
32	0.9793		1.8145	0.9012	1.2316	0.5063	41.103
34	3.9005	0.3270	4.9216	3.7670	3.2290	2.0022	62.007
36	8.2667	0.6660	9.6466	8.3368	6.7290	4.0915	60.804
38	10.138	0.5643	12.862	10.475	8.5100	5.4341	63.855
40	7.4811		10.125	7.6006	8.4023	1.4932	17.771
42	5.1010	0.1580	5.4815	4.7560	3.8741	2.4951	64.403
44	4.7821	0.6314	5.6889	4.5582	3.9151	2.2431	57.292
46	6.0603	2.5948	7.0016	5.7290	5.3464	1.9120	35.762
48	9.4481	7.0474	9.8865	8.9610	8.8357	1.2507	14.155
50	13.799	17.513	13.468	13.241	14.505	2.0184	13.915
52	15.885	30.375	13.118	16.269	18.912	7.7702	41.087
54	12.932	26.893	4.8090	15.115	14.937	9.1210	61.063

La Figura 15 muestra el % R de los TG del queso tipo Oaxaca de las diferentes marcas comerciales estudiadas. Como se puede observar, estos perfiles son muy similares, aún cuando se obtuvieron %C.V. muy altos correspondientes a los TG con NC de 30, 32 y 34 (Tabla 4). Valores más homogéneos para TG con NC mayor de 36 fueron obtenidos. Estas variaciones en los %C.V. en el queso tipo Oaxaca pueden deberse a tres razones principales: 1) no existe homogeneidad en la elaboración de estos quesos y, al tener tiempos y temperaturas diferentes para los procesos de cada marca comercial, se pierden distintas cantidades de los TG más pequeños, que son los más volátiles y más polares; 2) son muy pequeños los valores encontrados en estas muestras y la variación es debida a la sensibilidad del equipo; y 3) se puede tener una lipólisis no controlada debida a cultivos lácteos agregados para lograr la elasticidad en la fundición característica de estos quesos.

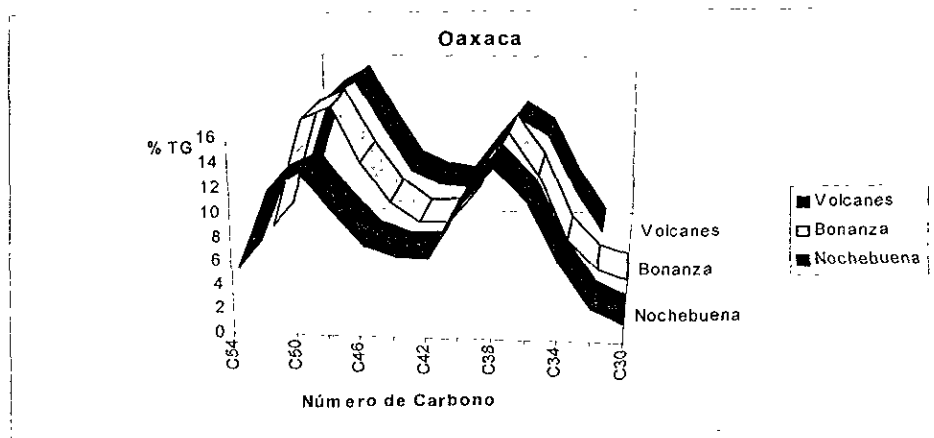


Figura 15. Perfiles de TG del queso tipo Oaxaca de las marcas comerciales estudiadas.

Tabla 4. % R de TG del queso tipo Oaxaca de 3 diferentes marcas comerciales.

NC	% R de TG.			X	D.E.	%C.V.
	Volcanes	Bonanza	Nochebuena			
30		0.4262	0.6589	0.54255	0.16454	30.3278
32	1.219	1.2429	1.8391	1.43367	0.35132	24.5049
34	4.9749	3.9002	5.5863	4.82047	0.85359	17.7077
36	10.269	9.6312	10.7803	10.2268	0.57571	5.62940
38	11.8459	13.3728	13.4135	12.8774	0.89354	6.93880
40	8.7013	8.5718	10.5509	9.27467	1.10715	11.9373
42	5.175	5.3407	5.8662	5.46063	0.36087	6.60858
44	5.4989	5.3168	5.8286	5.54810	0.25942	4.67589
46	6.7424	7.0947	6.7241	6.85373	0.20888	3.04774
48	10.8549	10.581	9.5533	10.3297	0.68622	6.64311
50	15.2119	15.437	12.6829	14.4439	1.52925	10.5875
52	13.808	14.3743	11.3966	13.1930	1.58126	11.9856
54	5.5514	4.7106	4.6842	4.98207	0.49323	9.90018

El queso tipo Chihuahua Bonanza, al igual que el queso Panela Bonanza, presentó un perfil de TG diferente al encontrado en las otras marcas del mismo queso (Figura 16).

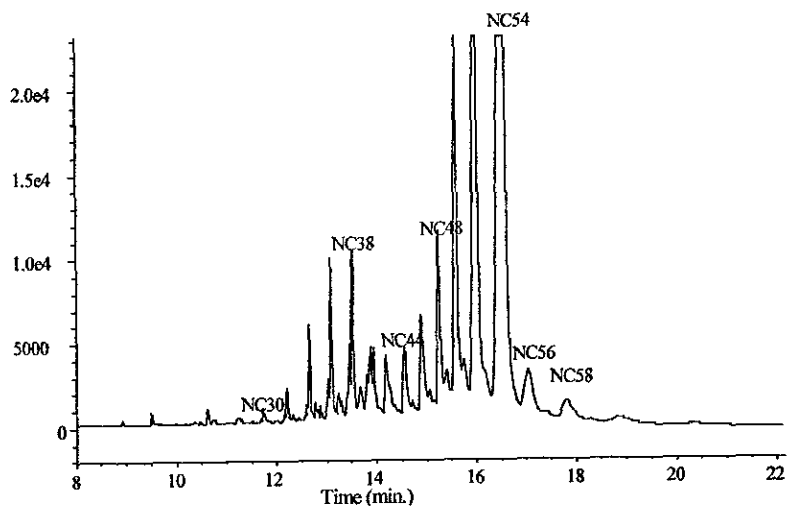


Figura 16. Perfil cromatográfico de los TG del queso tipo Chihuahua Bonanza

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

Se podría pensar que estas variaciones pudieran deberse a factores normales que afectan la cantidad de grasa en la leche de vaca, por ejemplo la estación del año, hora de ordeña, alimentación de las vacas, etc., sin embargo, la recolección de muestras para realizar este trabajo, se hizo durante todo un año, y no se encontró variación similar en el perfil de TG de las demás muestras.

La Figura 17 ilustra la diferencia entre los perfiles de TG de los quesos tipo Chihuahua Bonanza, Los Volcanes y Caperucita. Como puede observarse, el perfil de TG del queso Chihuahua Bonanza es totalmente diferente al de las otras marcas comerciales, mientras que el queso tipo Chihuahua Los Volcanes y Caperucita presentaron perfiles muy similares entre sí.

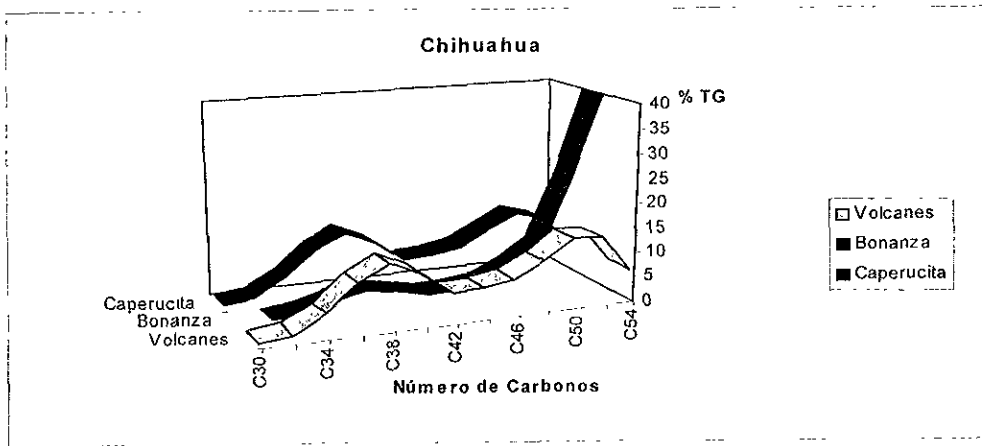


Figura 17. Perfil del %R de TG del queso tipo Chihuahua de las 3 marcas comerciales estudiadas.

Por otro lado, como era de esperarse, se encontró una variación importante en el cálculo del %C.V. en el % R de los TG de las tres marcas comerciales estudiadas, debido a que en los cálculos estadísticos se incluyeron los resultados del queso Bonanza (Tabla 5).

Tabla 5. % R de TG del queso tipo Chihuahua de las diferentes marcas comerciales estudiadas.

NC	% R de TG.			X	D.E.	%C.V.
	Volcanes	Bonanza	Caperucita			
30	0.4903		0.6449	0.5676	0.1093	19.2598
32	1.2350	0.3819	1.3919	1.0029	0.5435	54.1932
34	4.5546	1.0179	4.9529	3.5085	2.1661	61.7383
36	9.6864	2.9176	10.0396	7.5479	4.0138	53.178
38	12.8588	4.0755	12.6979	9.8774	5.0252	50.876
40	10.0352	2.9912	10.1729	7.7331	4.1072	53.1117
42	5.4237	1.7685	5.8673	4.3532	2.2493	51.6716
44	5.7879	1.9429	6.2313	4.65402	2.3583	50.6733
46	6.7151	2.6955	7.1406	5.5171	2.4528	44.4583
48	9.8451	5.5833	10.345	8.5911	2.6168	30.4596
50	13.7584	9.5828	13.2919	12.211	2.2880	18.7374
52	13.5434	22.8488	11.6953	16.029	5.9778	37.2934
54	6.0660	39.9539	5.5268	17.182	19.723	114.785

En la Figura 18 se muestran los % R de TG del queso tipo Manchego correspondientes a las 3 marcas comerciales estudiadas. Estos perfiles son muy similares y los %C.V. que se ilustran en la Tabla 6 son menores al 9.5 %, a excepción del TG con NC 30 que tiene un %C.V. de 16.149.

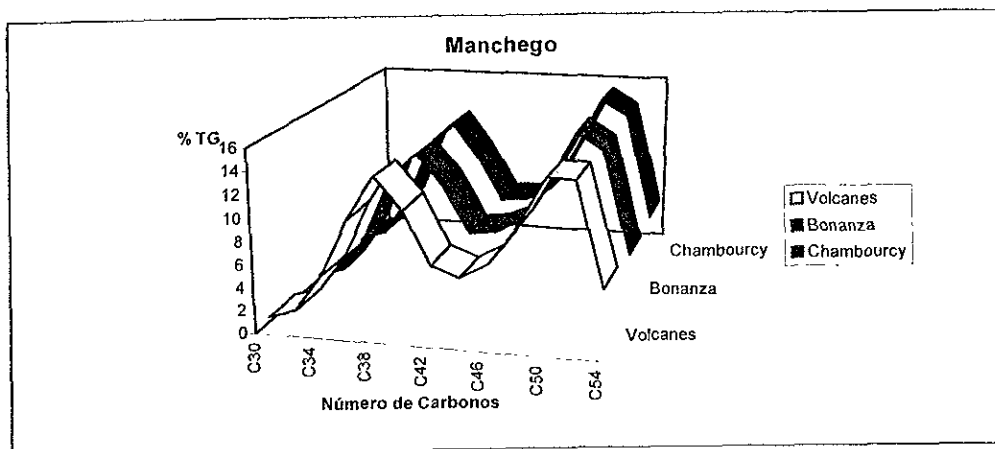


Figura 18. Perfil del %R de TG del queso tipo Manchego de las 3 marcas comerciales estudiadas.

Tabla 6. % R de TG del queso tipo Manchego de 3 diferentes marcas comerciales

NC	% R de TG.			X	D.E	%C.V.
	Volcanes	Bonanza	Chambourcy			
30	0.4379	0.3393	0.3305	0.3692	0.0596	16.1496
32	1.147	1.1309	1.1055	1.1278	0.0209	1.8552
34	4.4912	4.8704	4.6208	4.6608	0.1927	4.1353
36	9.5392	10.4405	10.2857	10.0885	0.4819	4.7771
38	13.3537	12.3911	12.537	12.7606	0.5188	4.0656
40	10.6131	9.5542	9.3957	9.8543	0.6619	6.7166
42	6.0302	5.3797	5.2486	5.5528	0.4186	7.5381
44	5.113	5.6311	5.3737	5.3726	0.2590	4.8217
46	6.5035	6.7333	6.5758	6.6042	0.1175	1.7792
48	9.6884	10.6447	10.671	10.3347	0.5599	5.4173
50	14.0455	15.035	15.4383	14.8396	0.7167	4.8294
52	13.9775	13.588	14.0483	13.8713	0.2479	1.7868
54	5.0595	4.2609	4.3691	4.5632	0.4332	9.4940

Comparando los 2 perfiles de TG diferentes encontrados en las muestras estudiadas, se puede decir que en el perfil de TG del queso Chihuahua Bonanza (Figura 16) se obtuvieron picos cromatográficos bien definidos de los TG con NC de 30 a 58, mientras que en el perfil de TG del queso Panela Bonanza no (Figura 13). Otra diferencia entre estos perfiles fue la relación entre los

TG NC52 y NC54, es decir, para el queso tipo Chihuahua se obtuvo una relación 2:1 para estos TG, mientras que para el queso Panela la relación fue de 1:1. Esto permite pensar que probablemente ambas muestras hayan sido adulteradas con distintos aceites o grasas, y que, como resultado de esto, no se observen TG de la misma naturaleza y se tengan tiempos de retención (tr) y perfiles totalmente distintos para cada uno de ellos.

3.2.1 Comparación de los perfiles de TG de leche de vaca, queso no comercial, queso comercial y cinco diferentes aceites vegetales.

Con el objeto de tener el perfil de TG característico de la grasa butírica, se analizó leche de diferentes marcas comerciales, encontrándose un perfil de TG muy similar al mostrado en la Figura 19. Sólo en una muestra de leche (Boreal) se encontró un perfil distinto a las otras muestras, como se presenta en la Figura 20. Este perfil de TG comparado con el de las otras muestras de leche, difiere principalmente en una mayor proporción de los TG con NC 50, 52 y 54.

El perfil de TG de leche Boreal (Figura 20) presenta similitud con el perfil de TG obtenido del queso tipo Chihuahua Bonanza (Figura 16). Esta similitud podría explicarse suponiendo que haya sido adicionado algo en común a ambas muestras o que se hubiera elaborado el queso tipo Chihuahua Bonanza a partir de la leche marca Boreal.

Comparando el perfil de leche (Figura 19) y el de un queso elaborado en el laboratorio (Figura 21), se observa gran similitud entre ambos perfiles. Una pequeña variación en la proporción de los

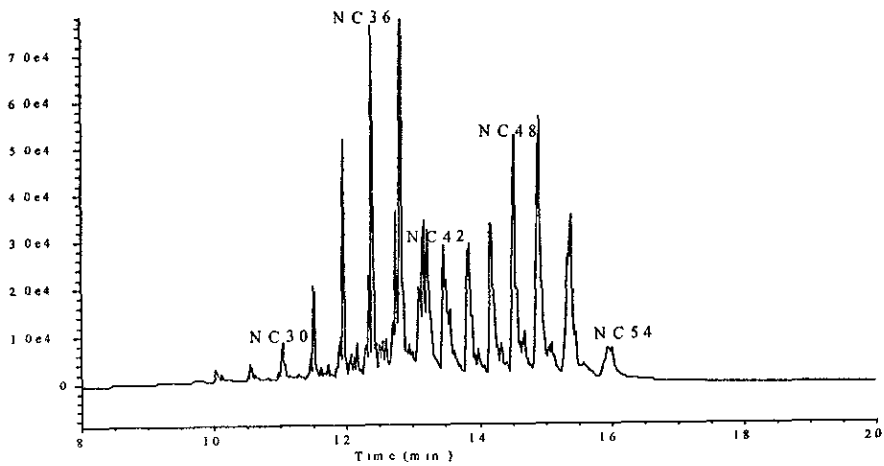


Figura 19. Cromatograma del análisis de TG de leche pasteurizada de vaca Lala.
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

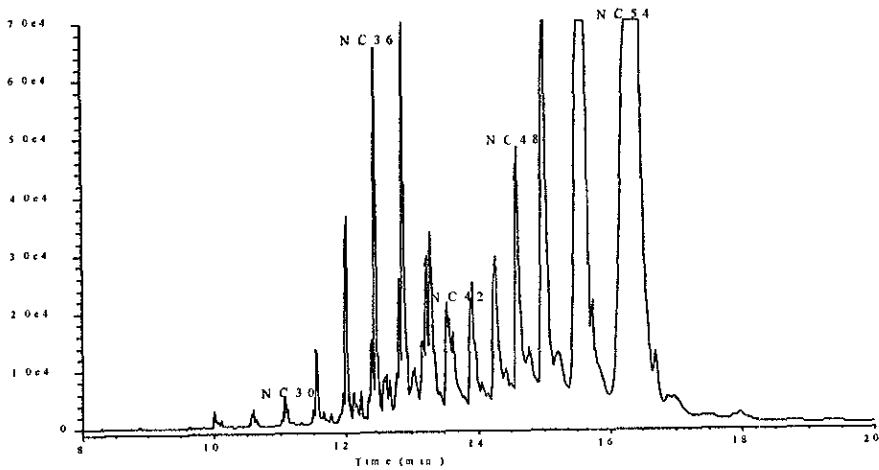


Figura 20. Cromatograma del análisis de leche pasteurizada Boreal.
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

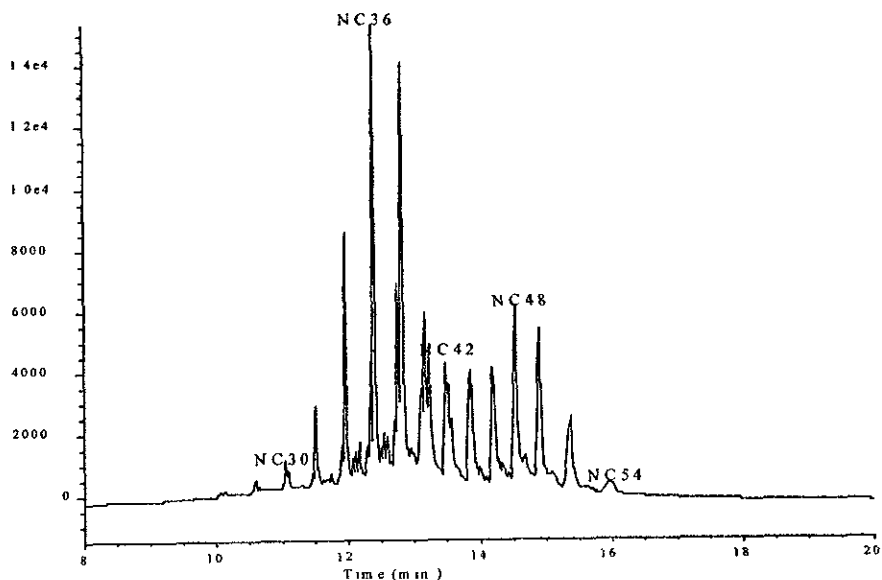


Figura 21. Cromatograma del análisis de TG del queso fresco elaborado en laboratorio a partir de leche bronca de la zona de Xochimilco.
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

TG 34, 36 y 38 se observa, encontrándose que esta variación sí fue observada durante este estudio y puede deberse a fluctuaciones normales de la grasa butírica.

Con respecto a los aceites vegetales analizados (maíz, coco, algodón, cártamo y girasol) se obtuvieron los perfiles de TG mostrados en las Figuras 22 a 26.

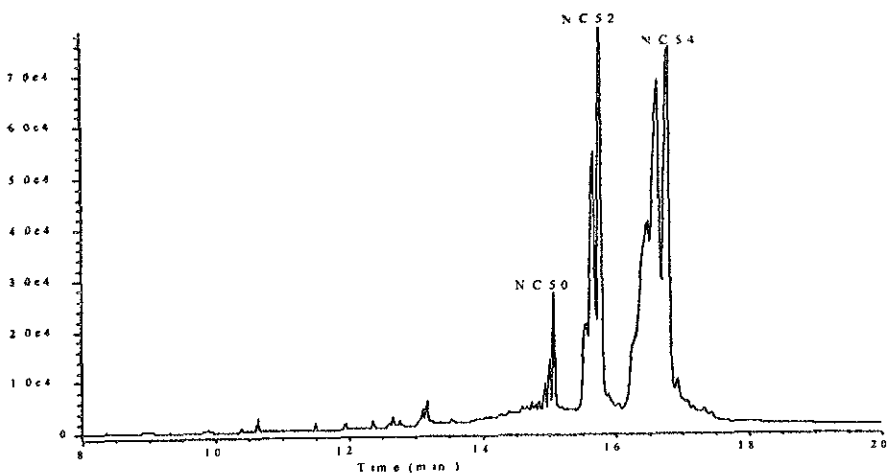


Figura 22. Cromatograma del análisis de aceite comercial 100% de maíz.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

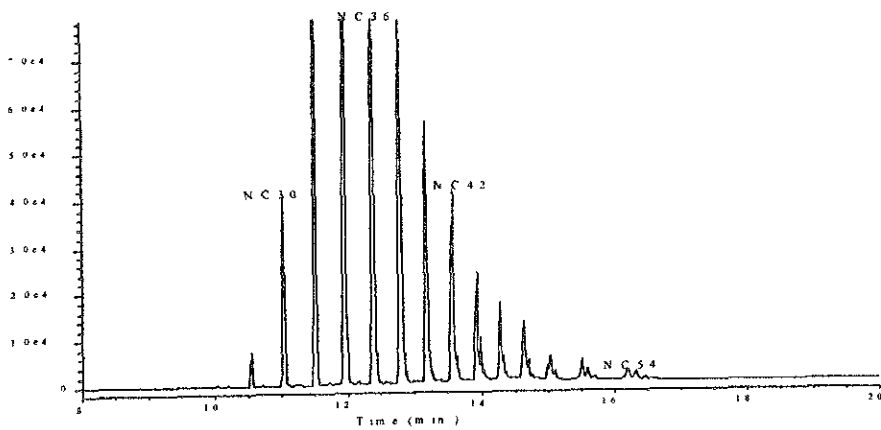


Figura 23. Cromatograma del análisis de aceite de coco variedad *Orbygnia guacuyule*.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

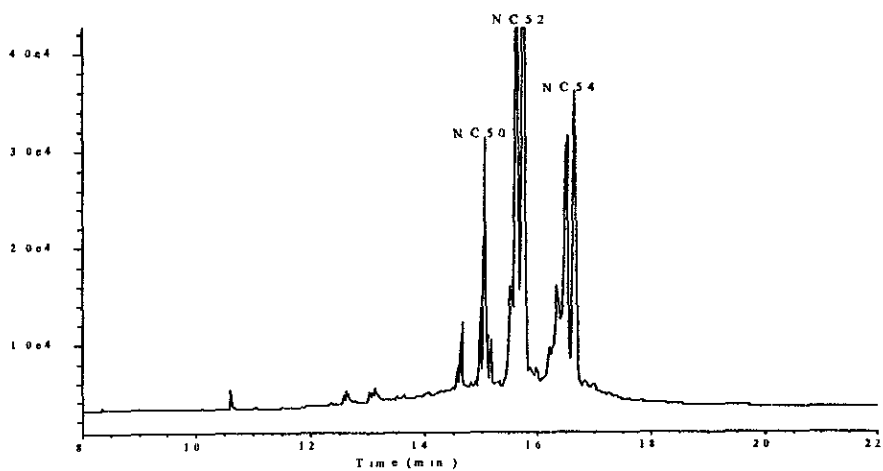


Figura 24. Cromatograma del análisis de aceite de algodón.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

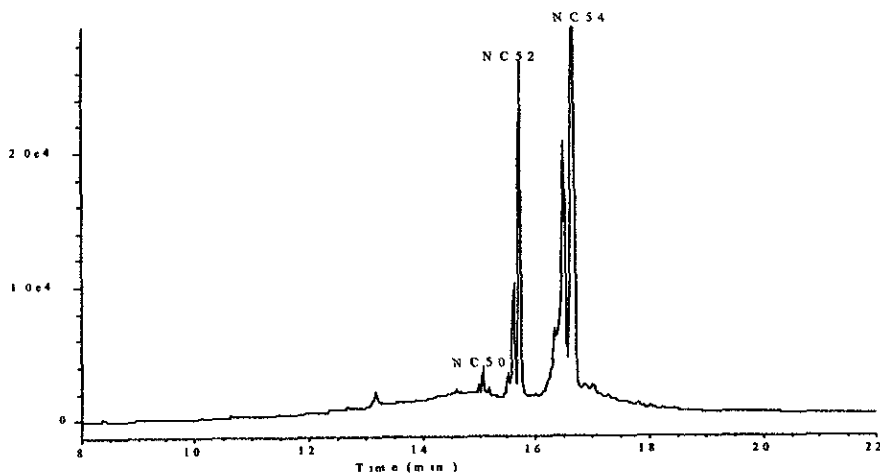


Figura 25. Cromatograma del análisis de aceite de la semilla de cártamo.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

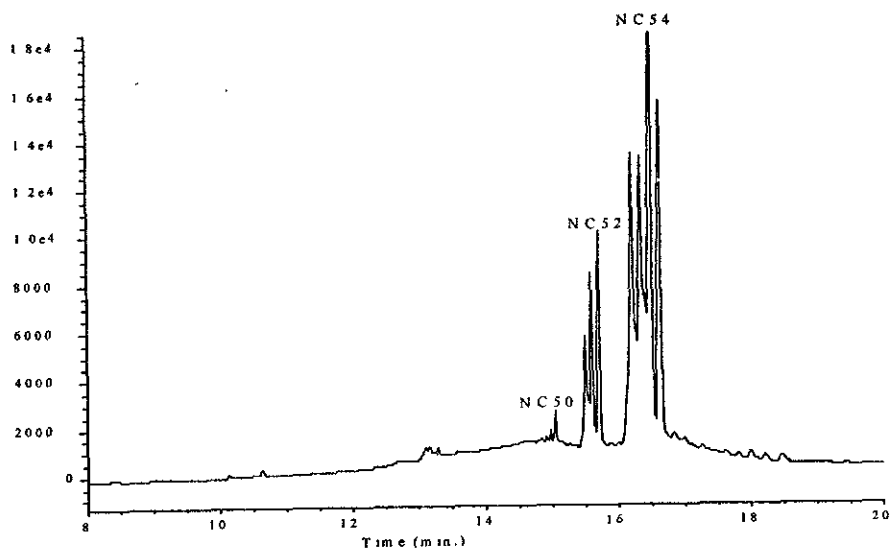


Figura 26. Cromatograma del análisis del aceite de semilla de girasol.

Condiciones cromatográficas:

Las mismas descritas en la Figura 7.

Al observar los perfiles cromatográficos anteriores podemos decir que las posibles adulteraciones en las muestras de leche Boreal y en los quesos tipo Chihuahua y Panela Bonanza que hubiera incrementado los picos de los TG con NC 50, 52 y 54, podría deberse a la posible adición de algún aceite vegetal como el aceite de cártamo, de algodón, de maíz y/o girasol, sin poder confirmar lo anterior con los resultados obtenidos en este estudio.

3.3 Cuantificación de TG.

Para determinar los Fr, como ya se mencionó, se utilizó una mezcla de estándares de TG con NC de 24, 30, 36, 42, 48, 54, y estearato de metilo como E.I (Figura 27). La concentración de cada estándar es igual, a excepción del TG con NC 24 que tiene una concentración 3 veces menor, de ahí que su respuesta sea diferente a los demás estándares. La respuesta del TG con NC de 54 es mucho menor a los TG estándar de su misma concentración debido a que, además de ser el TG más pesado y que de él se obtiene un pico cromatográfico ligeramente ensanchado, pudo sufrir por las altas temperaturas a las que eluye, una descomposición parcial; también puede pensarse en que pudo haber interaccionado con la fase estacionaria de la columna de manera irreversible, pero esto es poco probable debido a que se trata de un TG totalmente saturado (tristearina).

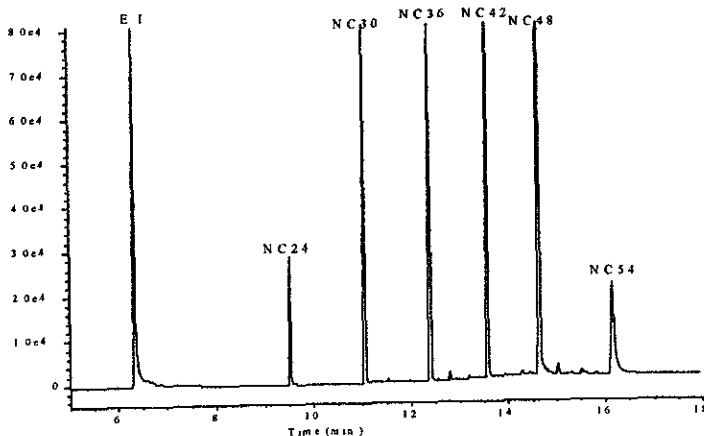


Figura 27. Análisis cromatográfico de la mezcla estándar de TG.

Condiciones cromatográficas:
Las mismas descritas en la Figura 7.

EST. UNIV. DE LA
SALIN DE LA BIBLIOTECA
BIBLIOTECA DE LA SALIN DE LA
DEBE EN

Los Fr de los TG estándar se muestran en la Tabla 7 destacándose un %C.V. muy alto (15.775) del TG NC54 con respecto a los demás TG estándar. Esta variación podría explicarse considerando que las causas por las que este TG tiene una respuesta menor a los demás TG y que se mencionaron anteriormente, no pueden ser controlados en esta metodología y probablemente esta variación en la respuesta se obtendrá de manera "natural" al efectuarse su análisis a estas condiciones.

El Fr elegido para efectuar los cálculos cuantitativos, fue el relativo a la tripalmitina (NC 48) debido a que es de los TG saturados que eluyen en la parte central de los cromatogramas de las muestras, tiene un %C.V. bajo y se encuentra cerca de los TG de mayor peso molecular (PM) y mayor variación en los datos encontrados.

Tabla 7. Factores de respuesta.

NC	Factores de respuesta					Estadística	
	1	2	3	4	5	X	%C.V.
24	0.9066	0.8809	0.8433	0.9143	0.9143	0.8916	3.0234
30	0.9968	0.9436	0.8964	0.9725	0.9701	0.9559	3.5758
36	1.0325	0.98	0.9253	1.0252	1.0114	0.9949	3.9369
42	1.0561	1.0325	1.0219	1.0703	1.0434	1.0448	1.633
48	1.0035	1.0293	0.9944	1.0513	1.0374	1.0232	2.0714
54	0.5215	0.8382	0.634	0.7589	0.6731	0.6851	15.775

3.3.1 Determinación de TG en los diferentes quesos en estudio.

En las Tablas 8 a 11 se muestran los miligramos de TG encontrados por gramo de queso Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego en las diferentes marcas comerciales estudiadas.

Cada valor reportado corresponde a la X de tres extracciones de esa muestra y su % C.V. Como se observa en estas Tablas, el total de TG encontrados para los diferentes quesos de las marcas comerciales en estudio, fue muy parecido entre sí, por lo que si se analizan TG totales o grasa total por los métodos convencionales, no se sabría que estos perfiles y las concentraciones individuales

de cada grupo de TG, son muy diferentes para el mismo tipo de queso de marca comercial diferente. De acuerdo a lo anterior, se podría pensar que estos productos cumplen con las normas mexicanas correspondientes, lo que resulta dudoso al evidenciarse en los perfiles cromatográficos antes vistos, una posible adulteración.

Tabla 8. Concentración de TG del queso Panela en las diferentes marcas comerciales analizadas.

NC	Queso Panela (mg TG/g queso)							
	Los Volcanes		Bonanza		Nochebuena		Covadonga	
	X	%C.V.	X	%C.V.	X	%C.V.	X	%C.V.
30	0.4882	5.3543	****	****	1.4116	25.4737	0.5375	6.3344
32	1.683	16.1674	****	****	3.8846	6.0656	1.6721	10.0455
34	6.7032	5.578	0.6613	1.0077	10.5367	5.9647	6.9893	5.2893
36	14.2067	4.5739	1.3466	1.8134	20.6522	5.9102	15.4682	4.9364
38	17.4229	7.6009	1.141	0.6083	27.5359	5.6843	19.4362	6.3612
40	12.8565	3.9186	****	****	21.6768	5.5274	14.1022	3.8886
42	8.7663	3.8365	0.3194	17.091	11.7352	5.3709	8.8243	10.676
44	8.2182	3.5724	1.2768	61.8496	12.1793	5.2779	8.4573	4.1142
46	10.4148	9.5717	5.2468	21.5188	14.9896	5.3808	10.6296	9.3292
48	16.2369	3.3752	14.2499	10.701	21.1658	5.3854	16.6263	3.5851
50	23.7134	3.4702	35.412	4.5377	28.8335	5.5911	24.5673	3.0969
52	27.2984	3.7298	61.4187	2.7021	28.0837	6.3017	30.1858	3.4332
54	22.2236	4.1994	54.3778	2.7534	10.2955	5.3556	28.0436	3.3782
Total	171.8539	4.6455	202.2001	4.1167	214.0888	5.8609	185.5401	4.5529

Tabla 9. Concentración de TG del queso tipo Oaxaca en las diferentes marcas comerciales analizadas.

NC	Queso Oaxaca (mg TG/g queso)					
	Los Volcanes		Bonanza		Nochebuena	
	X	%C.V.	X	%C.V.	X	%C.V.
30			0.6616	10.6795	0.9486	11.477
32	1.729	11.0331	1.9296	7.3428	2.6476	11.7778
34	7.0564	11.026	6.0548	11.1265	8.042	4.8692
36	14.5656	10.9207	14.9519	7.8147	15.5192	1.3952
38	16.8022	10.8485	20.7606	14.5486	19.31	1.3999
40	12.342	10.5603	13.3073	6.9544	15.1889	1.5398
42	7.3403	10.2962	8.2912	7.095	8.4449	1.2766
44	7.7996	9.5016	8.2541	10.3375	8.3908	1.112
46	9.5635	9.1799	11.0142	10.575	9.68	1.5993
48	15.3966	8.8995	16.4264	8.4694	13.7529	2.0874
50	21.5766	8.8931	23.9651	9.7387	18.2581	3.7275
52	19.5853	8.1739	22.3154	10.5271	16.4064	2.8379
54	7.8741	15.08	7.313	10.6581	6.7433	2.024
Total	141.8403	9.2566	155.2449	9.2758	143.9589	1.8319

Tabla 10. Concentración de TG del queso tipo Chihuahua en las diferentes marcas comerciales analizadas.

NC	Queso Chihuahua (mg TG/ g queso)					
	Los Volcanes		Bonanza		Caperucita	
	X	%C.V.	X	%C.V.	X	%C.V.
30	1.1536	9.9573	****	****	1.3308	13.157
32	2.9055	6.0178	1.0289	18.9975	2.8722	12.8124
34	10.7154	4.9457	2.7421	16.1732	10.2202	11.8112
36	22.7888	3.6683	7.8594	7.2325	20.7165	11.8356
38	30.2524	3.241	10.9786	7.5838	26.202	11.687
40	23.6095	1.0416	8.0577	4.3046	20.9916	11.5892
42	12.7602	3.3397	4.764	3.5139	12.1071	11.1057
44	13.617	4.593	5.2337	16.2714	12.8582	9.851
46	15.7984	5.2198	7.2611	18.1435	14.7345	10.0604
48	23.1623	4.1205	15.0404	5.4928	21.3468	10.2662
50	32.3689	4.3068	25.8141	4.5873	27.4277	10.5252
52	31.8632	4.0487	61.5499	4.9369	24.1332	17.4181
54	14.2714	4.2426	107.6277	5.7646	11.4045	13.2228
Total	235.2666	3.6311	269.3795	5.0757	206.3486	11.276

Tabla 11. Concentración de TG del queso tipo Manchego en las diferentes marcas comerciales analizadas.

NC	Queso Manchego (mg TG/g queso)					
	Los Volcanes		Bonanza		Chambourcy	
	X	%C.V.	X	%C.V.	X	%C.V.
30	0.9016	12.5729	0.716	2.9739	0.699	2.2118
32	2.3617	9.1501	2.3867	1.4939	2.3379	3.4289
34	9.2475	4.7734	10.2788	2.6691	9.7717	3.466
36	19.6413	6.6388	22.0344	3.3423	21.7513	2.7775
38	27.4953	8.9804	26.151	3.5181	26.5122	3.9927
40	21.8524	8.9396	20.1639	3.5279	19.8692	2.7261
42	12.4163	7.9248	11.3537	3.5665	11.0993	2.7844
44	10.5277	10.7354	11.8843	3.4871	11.3638	2.6641
46	13.3908	6.7598	14.2104	3.4405	13.906	2.541
48	19.9485	8.5447	22.4654	3.3356	22.566	2.3912
50	28.9198	8.8727	31.7309	3.1468	32.6476	2.5117
52	28.7797	9.2559	28.6771	3.1934	29.708	2.6489
54	10.4176	10.1363	8.9925	3.047	9.2394	3.3214
Total	205.9002	8.2886	211.0469	3.1787	211.471	2.815

De los datos de las Tablas anteriores podemos discutir varios aspectos:

Para los quesos Panela Los Volcanes y Covadonga (Tabla 8), se encontraron concentraciones promedio de cada grupo de TG y % C.V. similares. Lo mismo se puede observar en los quesos Oaxaca Los Volcanes y Bonanza (Tabla 9) y los quesos Manchego Bonanza y Chambourcy (Tabla 11). Se podría pensar que para los productos antes mencionados, se tiene algún control en común tanto de las materias primas como de los procesos de elaboración, dando como resultado cierta homogeneidad en el producto terminado.

En el caso de los quesos Panela Nochebuena (Tabla 8), Oaxaca Nochebuena (Tabla 9), Chihuahua Los Volcanes y Caperucita (Tabla 10), y el queso Manchego Los Volcanes (Tabla 11), se tienen concentraciones de TG individuales y TG totales casi idénticos entre quesos del mismo tipo de diferente marca comercial, encontrándose variaciones altas en los %C.V.

Los %C.V. de los quesos Panela y Oaxaca Nochebuena no variaron significativamente entre ellos, ya que los %C.V. obtenidos fueron bajos y homogéneos, lo que nos podría reflejar controles de calidad más estrictos, probablemente relacionados con una estandarización previa de la grasa butírica y un producto final homogéneo en su composición grasa.

De los quesos Chihuahua Los Volcanes y Caperucita y del queso Manchego Los Volcanes, se encontró mayor variación en el %C.V., esto puede deberse a parámetros de calidad muy variables dando como resultado la falta de homogeneidad en el producto terminado. Por último, los quesos Panela y Chihuahua Bonanza mostraron perfiles de TG totalmente distintos y %C.V. muy variables con respecto a las otras marcas comerciales en estudio.

En las Tablas 12 a 15 se presenta el por ciento (%) mínimo de grasa declarado en la etiqueta, el % TG calculado teóricamente (considerando que la grasa láctea corresponde al 97% de TG de

su grasa total), y el % de TG calculado con el método propuesto (CGC-AT) para cada uno de los quesos en estudio. Como puede observarse en los valores obtenidos por CGC-AT, unicamente los quesos Panela Nochebuena (Tabla 12) y Chihuahua Bonanza (Tabla 14) cumplirían con los valores del % de TG mínimo declarado en su etiqueta. Se puede pensar que probablemente se tengan pérdidas de TG en el análisis por CGC-AT debido a una posible discriminación de los TG más pesados y menos volátiles quedándose éstos en la jeringa (41), descomposición térmica de los TG por las altas temperaturas, posiblemente catalizadas por residuos metálicos procedentes del émbolo de la jeringa y/o a polimerización de los TG más insaturados y pesados con la fase estacionaria de la columna.

Tabla 12. Datos obtenidos para el queso Panela en tres marcas comerciales analizadas.

Marcas Comerciales:	Los Volcanes	Bonanza	Nochebuena	Covadonga
%mín de grasa en etiqueta	20	25	21	22
%TG supuesto en etiqueta	19.4	24.3	20.4	21.3
%TG por CGC-AT	17.18	20.22	21.41	18.55

Tabla 13. Datos obtenidos para el queso tipo Oaxaca en tres marcas comerciales analizadas.

Marcas Comerciales:	Los Volcanes	Bonanza	Nochebuena
%mín de grasa en etiqueta	18	18	22
%TG supuesto en etiqueta	17.46	17.46	21.34
%TG por CGC-AT	14.18	15.52	14.39

Tabla 14. Datos obtenidos para el queso tipo Chihuahua en tres marcas comerciales analizadas.

Marcas Comerciales:	Los Volcanes	Bonanza	Caperucita
%mín de grasa en etiqueta	29	26	25
%TG supuesto en etiqueta	28.13	25.22	26.93
%TG por CGC-AT	23.52	26.93	20.34

Tabla 15. Datos obtenidos para el queso tipo Manchego en tres marcas comerciales analizadas.

Marcas Comerciales:	Los Volcanes	Bonanza	Chambourcy
%mín de grasa en etiqueta	30	30	25
%TG supuesto en etiqueta	29.10	29.10	24.25
%TG por CGC-AT	20.59	21.10	21.24

3.4 Influencia de la polaridad de la columna en el análisis de TG.

El perfil cromatográfico de TG obtenido en una columna No Polar es diferente al obtenido en una columna Polar bajo las mismas condiciones cromatográficas, como se ejemplifica en las Figuras 28 y 29 con el queso Panela Bonanza. Además de presentarse diferentes perfiles de TG, también se presentan diferencias cuantitativas (Tabla 16). Las concentraciones de TG con NC de 34 a 52, obtenidos con la columna Polar, son ligeramente mayores a las obtenidas con la columna No Polar; en cambio, la concentración de TG con NC 54 obtenida en esta última columna es significativamente mayor a la obtenida en la columna Polar. Finalmente se observa que la cantidad de TG totales de cada muestra es menor en la columna No Polar que en la Polar.

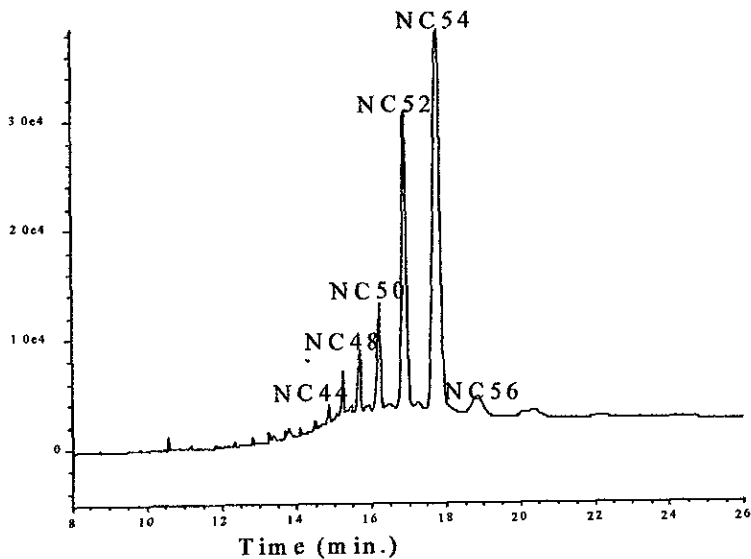


Figura 28. Perfil cromatográfico del queso Panela Bonanza en una columna no polar.

Condiciones cromatográficas:

Columna No Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25µm. Poli (95%difenil-5%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C por 10 min.

Flujo: 1.98 ml/min (constante), H₂ (gas acarreador).

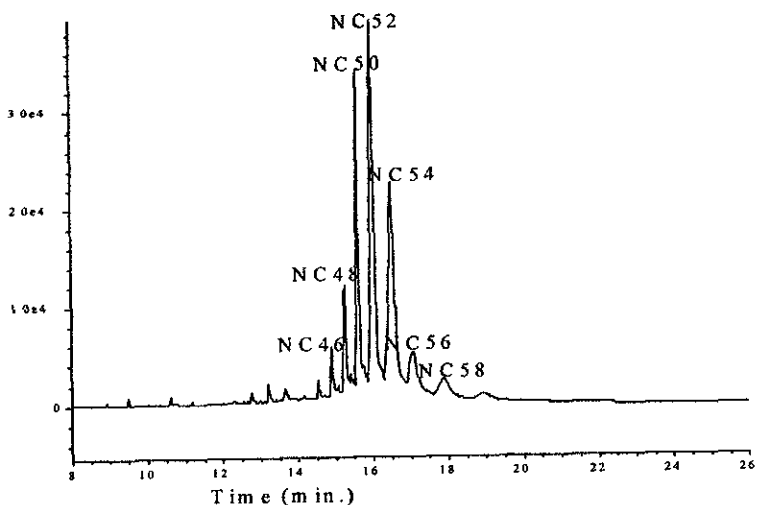


Figura 29. Perfil cromatográfico del queso Panela Bonanza en una columna polar.
 Condiciones cromatográficas:
 Las mismas descritas en la Figura 7.

Mientras que la selectividad de la fase Apolar de metil silicón es dictada por las diferencias en la presión de vapor de los solutos y los componentes de la muestra se distribuyen por su diferencia en pesos moleculares, en las columnas Polares de fenil-metil silicón, las insaturaciones contribuyen al tiempo de retención de los compuestos (42). Las diferencias cuantitativas encontradas en este trabajo pueden deberse principalmente a una posible polimerización de TG altamente insaturados en la columna Polar a las temperaturas de trabajo, (33,9) especialmente cuando se trabaja a flujos bajos del gas acarreador (40), esto es, si en la columna Polar utilizada se corrió una muestra que contenía TG con NC 54 muy insaturados, éstos pudieron haber llevado a cabo fuertes interacciones con la fase estacionaria de la

columna polar que provocaron esta polimerización y por lo tanto pérdida de parte de la muestra.

Tabla 16. Comparación de los mg de TG/ g de queso obtenidos entre las dos columnas utilizadas en los 4 tipos de queso en estudio.

NC	Paneta		Oaxaca		Chihuahua		Manchego	
	No polar	Polar	No polar	Polar	No polar	Polar	No polar	Polar
30	****	****	0.48080	****	1.23290	1.15360	1.10880	0.90160
32	****	****	0.98440	1.72900	3.58450	2.90550	3.15160	2.36170
34	0.2255	0.6613	3.41540	7.05640	6.91920	10.7154	6.46830	9.24750
36	0.4017	1.3466	9.14630	14.5656	16.0503	22.7888	15.3945	19.6413
38	1.2403	1.141	12.9886	16.8022	22.1137	30.2524	20.1047	27.4953
40	0.2022	****	10.1649	12.3420	19.0847	23.6095	17.4736	21.8524
42	0.3781	0.3194	5.46750	7.34030	12.8980	12.7602	10.5572	12.4163
44	1.8974	1.2768	5.37830	7.79960	12.6431	13.6170	10.2160	10.5277
46	4.2211	5.2468	9.16410	9.56350	14.9176	15.7984	11.9933	13.3908
48	6.6208	14.2499	12.41800	15.3966	18.5470	23.1623	16.2083	19.9485
50	13.4341	35.412	18.1802	21.5766	24.2996	32.3689	22.5402	28.9198
52	44.6715	61.4187	20.8757	19.5853	29.3683	31.8632	28.9968	28.7797
54	93.4946	54.3778	23.3507	7.87410	33.1644	14.2714	30.9230	10.4176
56	6.664	17.2529	****	****	****	****	****	****
TOTAL	173.8998	202.2001	132.015	141.840	214.823	235.267	189.312	205.900

3.5 Determinación de TG en queso bajo condiciones de Presión constante, Flujo constante y Programa de presión .

Optimización de la metodología de CGC-AT implica la selección, entre otras cosas, del gas acarreador más eficiente, esto es, seleccionar un gas acarreador con propiedades de difusión rápida puede reducir significativamente el tiempo de análisis o ampliar la aplicabilidad de esta metodología. Recientemente los sistemas de suministro del gas acarreador permiten operar a Presión constante, Flujo constante o Programa de presión. El uso de un control electrónico de presión (CEP) permite que el flujo de la columna se mantenga o cambie durante una corrida con programa de temperatura para obtener temperaturas de operación y tiempos de análisis

más bajos y esto es ejemplificado con el análisis de TG del queso tipo Oaxaca Los Volcanes bajo condiciones de Presión constante, Flujo constante y un Programa de presión.

La Figura 30 muestra el perfil cromatográfico del análisis de TG del queso tipo Oaxaca Los Volcanes bajo condiciones isobáricas (5 psi), observándose picos cromatográficos bien definidos, con buena resolución y selectividad. Sin embargo, no es posible eluir TG con NC mayor a 54 debido a que el flujo durante el análisis disminuye de 1.98 ml/min (60°C) a un valor de 0.703 ml/min (350°C).

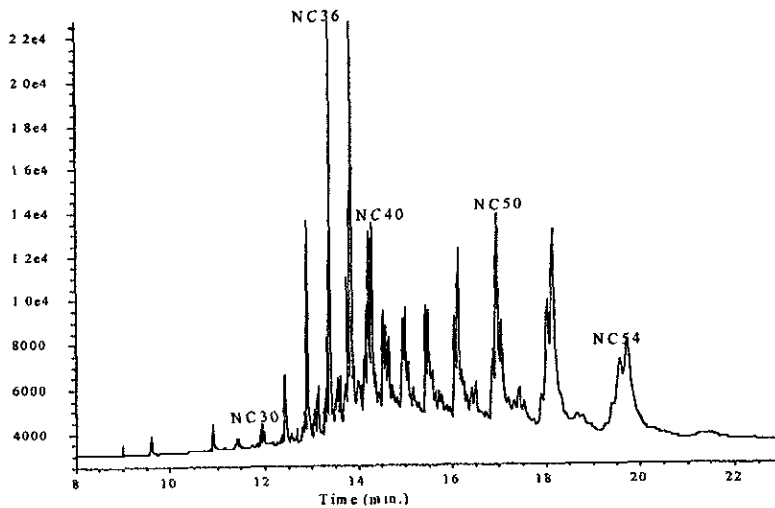


Figura 30. Cromatograma del queso tipo Oaxaca Los Volcanes analizado a presión cte.

Condiciones cromatográficas:

Columna Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25 μ m. Poli (50%difenil-50%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C por 10 min.

Presión: 5 psi (constante), H₂ (gas acarreador).

El cromatograma de la Figura 31 ilustra el análisis de la misma muestra bajo condiciones de Flujo constante (1.98 ml/min) observándose buena resolución (no mejor que a presión constante), buena eficiencia, menor tiempo de análisis y consecuentemente una menor temperatura de elución para todos los TG.

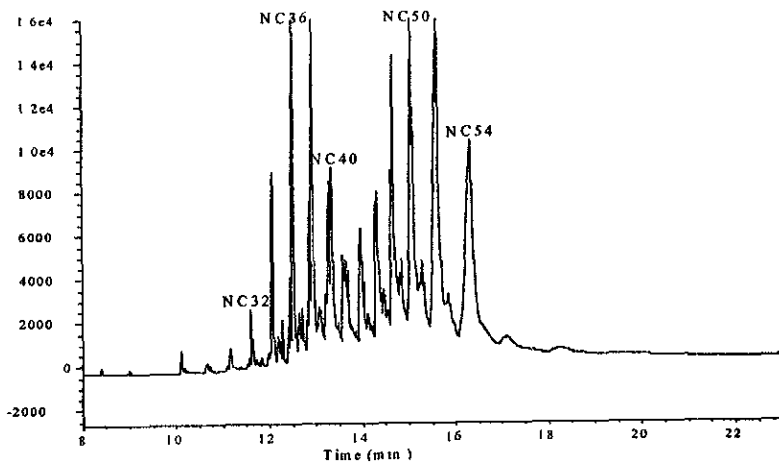


Figura 31. Cromatograma de el queso tipo Oaxaca Los Volcanes analizado a flujo constante.

Condiciones cromatográficas:

Columna Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25µm. Poli (50%difenil-50%dimetil siloxano).

Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C por 10 min.

Flujo: 1.98 ml/min (constante), H₂ (gas acarreador).

Finalmente la Figura 32 muestra el análisis de la misma muestra bajo Programa de presión, observándose que la forma de los picos y la resolución no son mejores que a Presión constante y Flujo constante, sin embargo, el Programa de presión permite la elución de TG con un NC mayor de 54 a menor temperatura y menor tiempo de análisis.

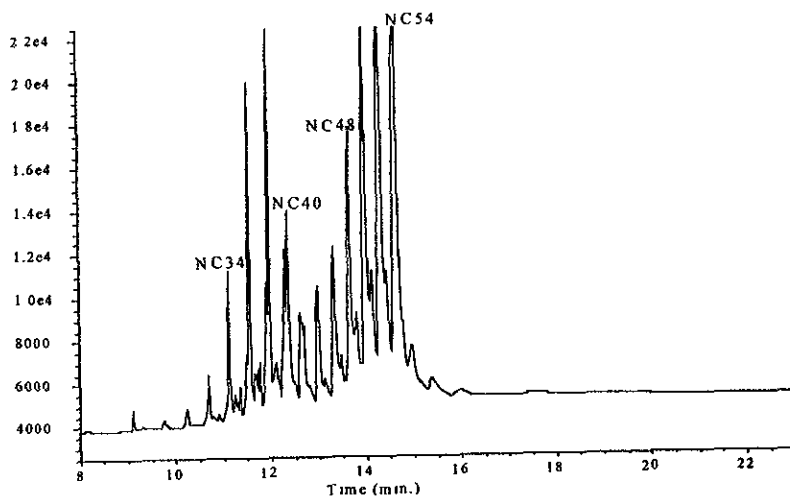


Figura 32. Cromatograma de el queso tipo Oaxaca Los Volcanes analizado con un programa de presión.
 Condiciones cromatográficas:
 Columna Polar: 10mX0.25mm D.I.X0.25 μ m. Poli (50% difenil-50% dimetil siloxano).
 Temperatura: 60°C con un aumento de 20°C/min hasta 360°C por 10 min.
 Programa de presiones: 5psi con un aumento de 2 psi/min hasta 40 psi por 15 minutos. H₂ (gas acarreador).

La Figura 33 y la Tabla 17 muestran los resultados del análisis cuantitativo de los 4 tipos de queso bajo las condiciones en estudio. Como se puede observar, la cantidad de TG de cada tipo de queso es ligeramente diferente en cada una de las condiciones de análisis. A presión constante (5psi) los quesos tipo Oaxaca, Manchego y Chihuahua presentaron el más alto valor de TG. Este fenómeno se podría explicar considerando la mayor interacción de los TG con la fase estacionaria debida a la disminución del flujo durante el incremento de la temperatura durante el análisis, causando un ensanchamiento de picos que contribuyen a una mayor área del mismo dando una concentración mayor.

El comportamiento mencionado acerca de las concentraciones de TG calculadas, sólo se observó en tres de las cuatro muestras analizadas, siendo el queso panela Bonanza (la muestra posiblemente adulterada) la única excepción. Este hecho puede deberse a posibles diferencias en los grados de insaturación de los ácidos grasos que componen sus TG, interaccionando éstos de manera distinta con la fase estacionaria mostrando un comportamiento no comparable al resto de las muestras estudiadas.

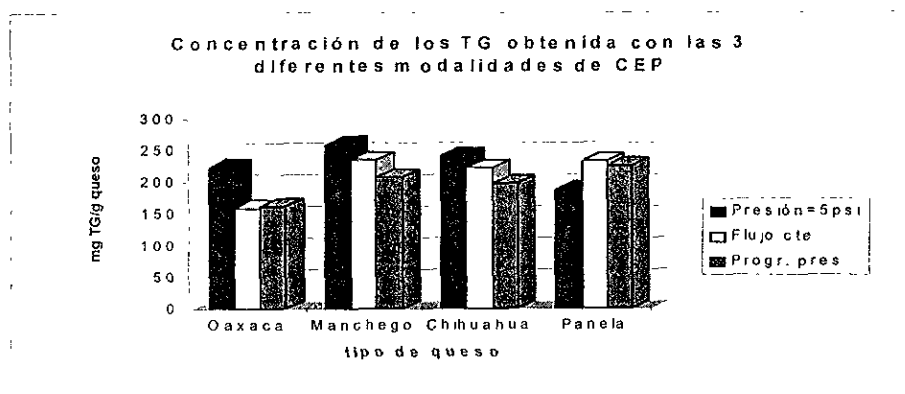


Figura 33. Gráfica que muestra las concentraciones de TG obtenidas bajo las diferentes modalidades de flujo y presión.

Tabla 17. Comparación de la concentración total de TG en los 4 tipos de queso en estudio a diferentes modalidades de flujo y presión.

Queso	Concentración total (mgTG/g queso)		
	Presión cte.	Flujo cte.	Progr. pres
Oaxaca	224.4	159.6	161.9
Manchego	259.5	235.1	207.9
Chihuahua	242.5	222.8	198.01
Panela	188.6	234.2	225.9

En la elección del análisis cromatográfico cuantitativo adecuado para un análisis, deben cuidarse algunos aspectos. Debe escogerse el método que proporcione picos cromatográficos finos y con una distribución considerablemente simétrica, evitando errores en la integración de sus áreas, además de buscarse que la elución de todos los componentes se obtenga a tiempos de análisis bajos y se logre una buena resolución.

El análisis de las muestras de queso con un CEP pueden optimizarse de acuerdo a la resolución, selectividad, eficiencia o tiempo de análisis que se requiera, dependiendo del tipo de matriz y del análisis. Las condiciones utilizadas en este trabajo no se optimizaron, seleccionándose éstas solamente para mostrar las posibilidades del uso del CEP en el análisis cromatográfico.

4. CONCLUSIONES

1. Se propone un método por CGC-AT sencillo, rápido y con buena repetibilidad para la identificación y cuantificación de TG en quesos.
2. La metodología propuesta evita problemas en los métodos de formación de derivados incompleta y sistemas de detección inespecíficos.
3. Se presenta el perfil de TG del queso tipo Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego de 6 marcas comerciales que se encuentran actualmente en el mercado.

En la elección del análisis cromatográfico cuantitativo adecuado para un análisis, deben cuidarse algunos aspectos. Debe escogerse el método que proporcione picos cromatográficos finos y con una distribución considerablemente simétrica, evitando errores en la integración de sus áreas, además de buscarse que la elución de todos los componentes se obtenga a tiempos de análisis bajos y se logre una buena resolución.

El análisis de las muestras de queso con un CEP pueden optimizarse de acuerdo a la resolución, selectividad, eficiencia o tiempo de análisis que se requiera, dependiendo del tipo de matriz y del análisis. Las condiciones utilizadas en este trabajo no se optimizaron, seleccionándose éstas solamente para mostrar las posibilidades del uso del CEP en el análisis cromatográfico.

4. CONCLUSIONES

1. Se propone un método por CGC-AT sencillo, rápido y con buena repetibilidad para la identificación y cuantificación de TG en quesos.
2. La metodología propuesta evita problemas en los métodos de formación de derivados incompleta y sistemas de detección inespecíficos.
3. Se presenta el perfil de TG del queso tipo Panela, Oaxaca, Chihuahua y Manchego de 6 marcas comerciales que se encuentran actualmente en el mercado.

4. El TG con menor NC identificado en las muestras de queso analizadas fue el TG con NC 24. De acuerdo a la literatura, TG con NC menor a 26 se encuentran en trazas , por lo que podemos decir que, además de rápido, sencillo y reproducible, se tiene un método sensible.
5. Se encontraron alteraciones en el perfil de TG (Fig. 13 y 16), así como en la concentración de éstos (Tabla 8 y 10), en los quesos Panela y Chihuahua Bonanza.
6. Los TG con NC 52 y 54 presentaron un Fr mas bajo que el resto de los TG en estudio, probablemente debido a discriminación por reacciones irreversibles con la columna (polimerización) o a descomposición por altas temperaturas.
7. De las muestras analizadas, sólo se encontró que el queso Panela Nochebuena y el queso Chihuahua Bonanza cumplieron con el % mínimo de grasa declarado en su etiqueta.
8. La polaridad de la columna para la determinación de TG en grasa butírica, dió resultados distintos y posiblemente complementarios para definir el perfil real de estos lípidos.
9. Para efectuar el análisis cualitativo de TG en quesos, se recomienda el análisis a presión constante por su buena resolución y selectividad, mientras que para un análisis de tipo cuantitativo, la mejor opción es el uso de un programa de presión ya que éste nos proporciona mejor poder de elución, menor ancho de pico y menor tiempo de análisis; el análisis a flujo constante ofrece una opción intermedia entre las modalidades antes mencionadas.
10. No se habían reportado, hasta ahora, datos acerca de la composición de TG en la grasa de quesos mexicanos, por lo que estos resultados podrían dar pie para el comienzo del establecimiento de una Norma de composición de este tipo de productos.

11. Se recomienda, para trabajos posteriores acerca del tema, establecer relaciones numéricas entre cantidades de algunos TG con el fin de obtener una aproximación del grado de adulteración de una muestra de queso.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Kallio, P. Laakso, R. Huopalahti y R. Linko, *Anal. Chem.* 61 (1989) 698.
- [2] B. Trejo Delarbre, *Cuadernos de Nutrición* 4 (1986) 3.
- [3] W. W. Christie, "Lipid Analysis". Pergamon Press 2nd ed., UK (1987).
- [4] M. Gordon, "Principles and applications of Gas Chromatography in Food analysis". Ellis Horwood, England (1990).
- [5] H.D. Belitz y W. Grosch, "Food Chemistry". Springer Verlag (Heidelberg) 1a.ed, Germany (1987).
- [6] L.G. Wade, Jr., "Química Orgánica". Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 2a. ed., México (1993).
- [7] D. Chapman, "Lípidos". Alhambra 1a. ed., España (1973).
- [8] J.Gresti, M.Bugaut, C.Manguioni y J.Bezard, *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 1850.
- [9] M.Termonia, F.Munari y P. Sandra, *J.H.R.C.& C.C.* 10-May (1987) 263.
- [10] J. J. Resendiz Espinoza de Los Monteros y A. Roa Hernández, "Aspectos técnicos y fisicoquímicos en la elaboración de quesos". Trabajo monográfico de actualización mancomunado. Facultad de Química, UNAM (1990).

11. Se recomienda, para trabajos posteriores acerca del tema, establecer relaciones numéricas entre cantidades de algunos TG con el fin de obtener una aproximación del grado de adulteración de una muestra de queso.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Kallio, P. Laakso, R. Huopalahti y R. Linko, *Anal. Chem.* 61 (1989) 698.
- [2] B. Trejo Delarbre, *Cuadernos de Nutrición* 4 (1986) 3.
- [3] W. W. Christie, "Lipid Analysis". Pergamon Press 2nd ed., UK (1987).
- [4] M. Gordon, "Principles and applications of Gas Chromatography in Food analysis". Ellis Horwood, England (1990).
- [5] H.D. Belitz y W. Grosch, "Food Chemistry". Springer Verlag (Heidelberg) 1a.ed, Germany (1987).
- [6] L.G. Wade, Jr., "Química Orgánica". Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A. 2a. ed., México (1993).
- [7] D. Chapman, "Lípidos". Alhambra 1a. ed., España (1973).
- [8] J.Gresti, M.Bugaut, C.Manguioni y J.Bezard, *J. Dairy Sci.* 76 (1993) 1850.
- [9] M.Termonia, F.Munari y P. Sandra, *J.H.R.C.& C.C.* 10-May (1987) 263.
- [10] J. J. Resendiz Espinoza de Los Monteros y A. Roa Hernández, "Aspectos técnicos y fisicoquímicos en la elaboración de quesos". Trabajo monográfico de actualización mancomunado. Facultad de Química, UNAM (1990).

- [11] M. García Garibay, R. Quintero Ramirez y A. López Munguía Canales, "Biotecnología Alimentaria". LIMUSA, México (1993).
- [12] A.I.Nájera, L.J.Barrón y Y.Barrina, *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33-4 (1993) 345.
- [13] S. Baduá, "Química de los Alimentos". Alhambra Mexicana quinta reimpresión, México (1989).
- [14] W. Banks, W. Christie, J. Clapperton y A. Girdler, *J. Sci. Food Agric.* 39 (1987) 303.
- [15] R.G. Jensen, "Fatty Acids in Foods and their health implications". Edited by Kuang Chow, Marcel Dekker, Inc. USA (1992).
- [16] L.J.R. Barron, M. Teresa, G. Hierro y G. Santa-María, *Journal of Dairy Research* 57 (1990) 517.
- [17] J. Blazquez Solana, *Grasas y Aceites* 41-1 (1990) 6.
- [18] J. L. Iverson y A. J. Sheppard, *J. Dairy Sci* 72 (1989) 1707.
- [19] T. Aishima y S. Nakai, *J. Food Science* 52 (1987) 939.
- [20] G. Barbieri, L. Bolzoni, M. Careri y A. Mangia, *J. Agric. Food Chem* 42 (1994) 1170.
- [21] J.M. Elliott, B. de Haan y K.L. Parkin, *J. Dairy Sci.* 72 (1989) 2478.
- [22] C. Maniongui, J. Gresti, M. Bugaut, S. Gauthier y J. Bezar, *J. Chromatography* 543 (1991) 81.
- [23] L. Matter, *J. H.R.C. & C.C.* 15 (1992) 514.
- [24] A. H. Woo, S. Kollodge y R.C. Lindsay, *J. Dairy Science* 67 (1984) 874.
- [25] M.C. Martín Hdz., L. Alonso, M. Juárez y J. Fontecha, *Chromatographia* 25 (1984) 87.
- [26] C. de Jong y H.T. Badings, *J. H.R.C.&C.C.* 13 (1990) 94
- [27] A.R. Longs, S.J. Massie y W.J. Tyznik, *J. Food Science* 53 (1988) 940.
- [28] H. Miwa y M. Yamamoto, *J. Chromatography* 523 (1990) 235.
- [29] L. Ceccon, *J. Chromatography* 519 (1990) 369.
- [30] L. Alonso, *Chromatographia* 35 (1993) 649.

- [31] C.P.R. Jennison y J. Jennison, "High performance On-column sample introduction for capillary GC". Reprinted from *American Laboratory* November (1990).
- [32] R.E. Majors, *LC-GC-Internacional* 4 (1991) 16.
- [33] P. Sandra y F. David, "Basic Principles and role of SFC in lipid analysis". Personal paper, Faculty of Science. Gent University, Belgium (1993).
- [34] A. Reyes Garces "Caracterización de aceites de semillas oleaginosas por sistema acoplado CG/EM", Universidad Autónoma de Puebla (1993).
- [35] N.C. Shantha y G.E. Napolitano, *Journal of Chromatography* 624 (1992) 37.
- [36] P. Kalo, K. Vaara y M. Antila, *Journal of Chromatography* 368 (1986) 145.
- [37] L. Matter, D. Schenker, H. Husmann y G. Schomburg, *Chromatographia* 27-1/2 (1987) January.
- [38] J. Molkentin y D. Precht, *Chromatographia* 39- 5/6 (1994) September.
- [39] G. Schomburg, "Gas Chromatography. A Practical Course". Ed.VCH., FRG. (1990).
- [40] P. Mares y P. Husek, *Journal of Chromatography* 350 (1985) 87.
- [41] K. Grob, "Classical Split and Splitless Injection in Capillary GC", *Chromatographic Methods*, 2nd. Ed.Huethig (1988).
- [42] E. Geeraert, "Polar Capillary GLC of intact natural diacyl and triacylglycerols" *Chromatography of lipids in biomedical Research and clinical diagnosis* by A. Kuksis, *J. Chromatography library* 37.