

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ DESARROLLO Y VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA POR
CROMATOGRAFIA DE GASES PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS
GRASOS TRANS EN SNACKS SALADOS, COBERTURA DE CHOCOLATE Y
SUS PROBABLES COMPONENTES – AREQUIPA 2014”**

Tesis Presentada por la bachiller en farmacia
y bioquímica:

TIFFANNY LYNNE TRUJILLO LOZANO

ASESOR: QF. MOCITA DE LA FUENTE

Para optar por el título profesional de:

QUIMICO FARMACEUTICO

AREQUIPA-PERU

2015

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser mi guía y fortaleza durante toda mi vida.

A mis padres y abuelos Liliann Lozano, Bernard Vincent, Manuel Lozano, Pascuala Sejuro y Andree Vincent; porque a pesar de la distancia no se cansan de apoyarme.

A mis amigos, a mi enamorado y compañeros del laboratorio de Control de Calidad por hacer el trabajo más ameno y a todos aquellos docentes que hicieron posible la realización de esta meta.

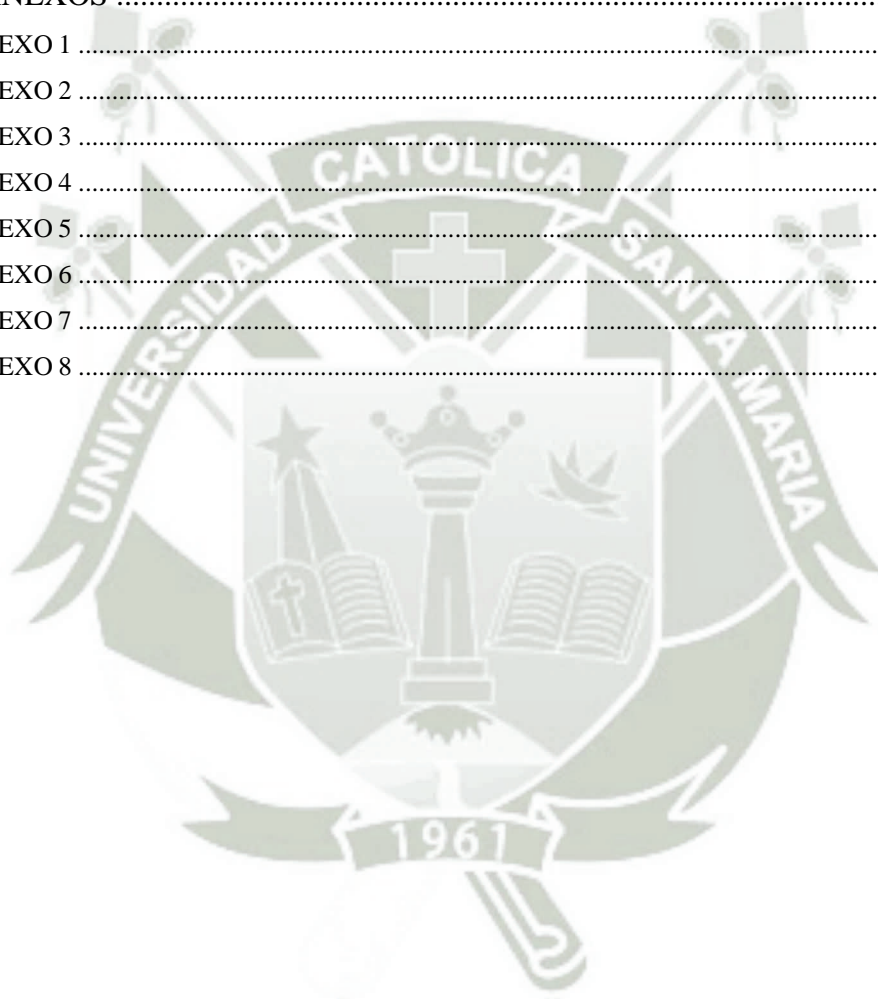


INDICE

GENERALIDADES	10
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
INTRODUCCION	14
OBJETIVOS	15
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	15
<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS</i>	15
HIPOTESIS	16
CAPITULO I MARCO TEORICO.....	17
1.1. ACEITES Y GRASAS.....	17
1.2. ACIDOS GRASOS SATURADOS	18
1.3. ACIDOS GRASOS TRANS	18
1.3.1. <i>QUIMICA DEL ENLACE TRANS</i>	20
1.3.2. <i>CARACTERISTICAS DE LOS ACIDOS GRASOS TRANS</i>	22
1.3.3. <i>CONSECUENCIAS EN LA SALUD POR CONSUMO DE ACIDOS GRASOS TRANS</i> ..	22
1.3.4. <i>FUENTES DE ACIDOS GRASOS TRANS</i>	23
1.3.5. <i>CONSUMO DE ACIDOS GRASOS TRANS</i>	24
1.3.6. <i>NORMATIVIDAD PARA LOS ACIDOS GRASOS TRANS</i>	25
1.4. <i>METODOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS TRANS</i>	25
1.4.1. CROMATOGRAFIA DE GASES.....	26
1.4.2. <i>DESCRIPCION GENERAL DEL EQUIPO</i>	26
1.4.3. <i>SISTEMA DE INYECCION DE LA MUESTRA</i>	27
1.4.4. <i>TIPOS DE INYECTORES PARA COLUMNAS CAPILARES</i>	27
1.4.5. <i>TIPOS DE INYECCION DE MUESTRA</i>	28
1.4.6. <i>TIPO DE DETECTORES</i>	30
1.5. MATRICES DE ESTUDIO	32
1.5.1. <i>DESCRIPCION GENERAL</i>	32
1.5.2. <i>SNACKS</i>	32
1.5.3. <i>PASTA DE CACAO Y CHOCOLATE</i>	35
1.5.4. <i>CREMA DE LECHE</i>	37
1.5.5. <i>MANTECA HIDROGENADA</i>	38
1.5.6. <i>MARGARINA</i>	39
1.6. PROCESOS INDUSTRIALES DE FORMACION DE GRASAS TRANS	40

1.6.1.	<i>HIDROGENACION</i>	41
1.7.	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: DERIVATIZACION	42
1.7.1.	<i>APLICACIONES GENERALES</i>	43
1.7.2.	<i>TIPOS DE DERIVATIZACION</i>	43
1.7.3.	<i>TRIFLORURO DE BORO</i>	44
1.8.	VALIDACION	46
1.8.1.	<i>DEFINICION</i>	47
1.8.2.	<i>LINEALIDAD</i>	47
1.8.3.	<i>SENSIBILIDAD</i>	48
1.8.4.	<i>PRECISION</i>	49
1.8.5.	<i>EXACTITUD</i>	50
	CAPITULO II MATERIALES Y METODOS	51
2.1.	MUESTRAS DE ESTUDIO	51
2.2.	MATERIALES	52
2.3.	REACTIVOS.....	52
2.4.	EQUIPOS	52
2.5.	METODO	55
2.5.1.	<i>EXTRACCION DE MUESTRA</i>	55
2.5.2.	<i>DERIVATIZACION DE MUESTRA</i>	57
2.5.3.	<i>ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES</i>	57
2.6.	VALIDACION	58
2.6.1.	<i>LINEALIDAD</i>	58
2.6.2.	<i>SENSIBILIDAD</i>	62
2.6.3.	<i>PRECISION</i>	63
2.6.4.	<i>EXACTITUD</i>	64
	CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
3.1	LINEALIDAD RESULTADOS.....	66
3.2	SENSIBILIDAD RESULTADOS	70
3.3.	PRECISION RESULTADOS	72
3.4.	EXACTITUD.....	74
3.5.	PRESENTACION DE LAS MATRICES ANALIZADAS	75
3.5.2	<i>RESULTADOS SNACK SALADOS</i>	76
3.5.3	<i>RESULTADOS EN COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO</i>	77
3.5.4	<i>RESULTADOS COBERTURA DE CHOCOLATE</i>	79
3.5.5	<i>PASTA DE CACAO</i>	80

3.5.6	<i>CREMA DE LECHE</i>	81
3.5.7	<i>MANTECA HIDROGENADA RESULTADOS</i>	82
3.5.8	<i>MARGARINA RESULTADOS</i>	83
3.5.9	<i>COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LAS MUESTRAS</i>	85
	CONCLUSIONES	89
	RECOMENDACIONES	90
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	91
	ANEXOS	94
ANEXO 1	94
ANEXO 2	98
ANEXO 3	99
ANEXO 4	100
ANEXO 5	101
ANEXO 6	102
ANEXO 7	116
ANEXO 8	118



INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Acido palmítico ⁶	18
Figura 2.2 Acido esteárico ⁶	18
Figura 2.3 Disposición geométrica de los enlaces cis y trans ⁹	19
Figura 2.4 Acido trans-octadecanoico (elaidico) ⁸	20
Figura 2.5 Acido trans-linoleaidico ⁸	20
Figura 2.6 2-buteno ¹⁰	21
Figura 2.7 Representación de la formación de la isomería cis-trans ¹⁰	21
Figura 2.8 Esquema de un cromatógrafo de gases ²⁰	27
Figura 2.9 Formato de un inyector SPLIT ²¹	29
Figura 2.10 Descripción de detector FID ²¹	31
Figura 2.11 Representación de un espectro de masas ²¹	31
Figura 2.12 Crecimiento estimado del mercado de snaks para el año 2012	33
Figura 2.13 Mapa mundial del porcentaje de frecuencia de consumo de snacks	34
Figura 2.14 Formación de grasas trans en la hidrogenación.	42
Figura 2.15 Reacción de Silación.	43
Figura 2.16 Reacción de Acilación.	44
Figura 2.17 Reacción de alquilación.....	44
Figura 2.18 Proceso de formación del orbital sp ²	45
Figura 2.19 Explicación de la acidez de Lewis del BF ₃	46
Figura 2.20 Reacción del BF ₃ como catalizador	46
Figura 2.21 Representación de la sensibilidad.....	48
Figura 39 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico) en cobertura de chocolate	106
Figura 40 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en cobertura de chocolate.....	107
Figura 41 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en Chocolate para cobertura.....	109

Figura 42 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en pasta pura cacao..... 111

Figura 43 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en manteca hidrogenada..... 113

Figura 44 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en crema de leche..... 115



INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Contenido de grasas trans en alimentos ¹²	23
Tabla 1.2 Parámetros fisicoquímicos para bocaditos	34
Tabla 1.3 Tipos de chocolate y sus componentes	36
Tabla 1.4 Límites permisibles de ácidos grasos para mantecas ³¹	38
Tabla 1.5 Factores esenciales de composición y calidad de la margarina ³²	39
Tabla 2.1 Intervalos en la curva de calibración.....	57
Tabla 3.1 Valores expresados en área de ácido-linoleaidico	65
Tabla 3.2 ANOVA ácido graso trans linoleaidico	66
Tabla 3.3 Análisis de varianza ácido trans-octadecanoico (elaidico)	67
Tabla 3.4 Promedio de los resultados - repetibilidad.....	70
Tabla 3.5 Promedio de resultados- precisión intermedia.....	71
Tabla 3.6 Promedio de resultados – exactitud	72
Tabla 3.7 Promedio- Snack analizados	74
Tabla 3.8 Perfil de ácidos grasos muestra C	75
Tabla 3.9 Perfil de ácidos grasos muestra D	76
Tabla 3.10 Perfil ácidos grasos marca E	77
Tabla 3.11 Perfil de ácidos grasos muestra F.....	77
Tabla 3.12 Perfil de ácidos grasos- pasta pura de cacao	78
Tabla 3.13 Perfil de ácidos grasos muestra crema de leche	79
Tabla 3.14 Perfil de ácidos grasos manteca hidrogenada	80
Tabla 3.15 Perfil de ácidos grasos muestra margarina.....	81
Tabla 3.16 Matrices que presentan ácido trans linoleaidico	82
Tabla 3.17 ANOVA para Trans linoleaidico por muestra	82
Tabla 3.18 Matrices que presentan ácido trans octadecanoico (elaidico).....	84
Tabla 3.19 ANOVA para Trans octadecanoico (elaidico) por muestra	84
Tabla 28 Concentracion y área obtenida para la curva de calibración del ácido trans- octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico).....	92

Tabla 29 Concentración y área obtenida para la curva de calibración del ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12	92
Tabla 30 Prueba T de Student para ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12.....	93
Tabla 31 Prueba T de Student para el ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico)	94
Tabla 32 Cantidad en µl usada para cada punto.....	95
Tabla 33 Muestras de cobertura de chocolate para determinar la repetibilidad.....	96
Tabla 34 Muestras de cobertura de chocolate para determinar la precisión intermedia.....	97
Tabla 35 Muestras los valores obtenidos para el trabajo de la exactitud.....	98
Tabla 36 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico) en cobertura de chocolate.....	99
Tabla 37 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en cobertura de chocolate.....	100
Tabla 38 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 Chocolate para cobertura	101
Tabla 39 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en pasta pura de caca.....	102
Tabla 40 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en manteca hidrogenada.....	103
Tabla 41 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en crema de leche	104
Tabla 42 Resultados de la frecuencia de venta de helados clasificados según sus aditivos	109
Tabla 43 Resultados de la cantidad aproximada de venta de helados con cobertura de chocolate solida	122

GENERALIDADES

RESUMEN

Se desarrolló y validó una técnica analítica para la determinación de ácidos grasos trans linoleídico C18:2 (trans-9,12) y trans-octadecanoico (elaidico) C18:1(trans-9) para ser utilizada en el control de calidad de alimentos por cromatografía de gases usando Detector de Ionización de Flama GC/FID y el estándar Restek #35077, para la determinación en las matrices de estudio de snacks salados, cobertura de chocolate para helado y probables componentes utilizados en esta cobertura. Se tomó como referencia los parámetros de la ICH (Harmonised Tripartite Guideline) como: linealidad de la técnica, sensibilidad expresada como: límite de detección y límite de cuantificación, exactitud y precisión declarada en sus dos formas: repetibilidad y precisión intermedia.

Se demostró mediante el diseño experimental, con la evaluación estadística de los resultados experimentales y teniendo como base los criterios de aceptación permitidos, que la técnica analítica es lineal (r^2 0,9977 linealidad del ácido graso trans linoleídico C18:2 (trans-9,12) y r^2 0,998 linealidad del ácido graso trans-octadecanoico (elaidico) C18:1(trans-9)), precisa (CV<2%), exacta (Error determinado < 1%) en las concentraciones estudiadas. Se obtuvo el límite de

cuantificación 1,343 mg/ml para el ácido graso trans-octadecanoico (elaidico) C18:1(trans-9) y de 3,842 mg/ml para el ácido graso trans linoleaidico C18:2 (trans-9,12) y el límite de detección 1,063 mg/ml para el ácido graso trans-octadecanoico (elaidico) C18:1(trans-9) y 3,842 mg/ml para el ácido graso trans linoleaidico C18:2 (trans-9,12).

Se encontró como resultados lo siguiente: la matriz de snacks salados no presenta ácidos grasos trans en su composición, las matrices de cobertura de helado C y D presentan 42,94% y 30,66% de ácido trans linoleaidico respectivamente. Y estas mismas matrices también poseen 10,14% y 8,33% de ácido trans octadecanoico (elaidico). Por otro lado las matrices de chocolate E y F contienen 7,75% y 5,66% de ácido trans linoleaidico, en la pasta de cacao se encontró 20,94% de ácido trans linoleaidico, la matriz de crema de leche y manteca hidrogenada 0,01% y 0,25% de ácido trans linoleaidico correspondientemente. Además la matriz de margarina presentó 2,09% de ácido trans octadecanoico (elaidico).

De esta forma mediante los estudios realizados se establece que las características de desempeño analítico cumplen con los requisitos para la aplicación analítica propuesta siendo confiable para ser utilizado dentro de los ensayos de calidad.

ABSTRACT

The validation of the method was performed to determine trans linoleaidic acid C18: 2 (trans-9,12) and trans -octadecenoic acid (elaidic) C18: 1 (trans-9) for use in control of quality of food. In this paper we described and developed the validation process for the determination of trans fatty acids by gas chromatography using Ionization Flame Detector GC/FID and the standard Restek #35077 for the determination matrices study of salty snacks, chocolate coverage for ice cream and his probable components. Was taken as reference the parameters of ICH (Harmonised Tripartite Guideline) as linearity of the technique, sensitivity expressed as: LOD and LOQ, accuracy and declared precision declared in its two forms: repeatability and intermediate precision.

Demonstrated by experimental design, the statistical evaluation of experimental results and on the basis allowed acceptance criteria, the analytical technique is linear (r^2 0.9977 linearity for linoleaidic trans fatty acid C18: 2 (trans-9, 12) and r^2 0.998 linearity of trans-octadecenoic fatty acid (elaidic) C18: 1 (trans-9)), precise (CV <2%), accurate (given error <1%) at the concentrations studied. 1 (trans-9) and 3.842 mg / ml for linoleaidico trans fatty acid C18: the LOQ 1,343 mg / ml for trans-octadecenoic fatty acid (elaidic) 2 was obtained C18 (trans-9,12) detection limit and 1,063 mg / ml for the trans-octadecenoic fatty acid (elaidic) C18: 1 (trans-9) and 3.842 mg / ml for linoleaidico trans fatty acid C18: 2 (trans-9,12).

The followings results for the samples were: the matrix of snacks has not Trans fatty acids in its composition, ice coverage matrices C and D have 4,94% and 30,66% of trans linoleaidic respectively. And these same matrices also have 10.14% and 8.33% of trans-octadecenoic (elaidic). Furthermore chocolate matrices E and F were containing 7,75% and 5,66% of linoleaidic trans acid, cocoa paste has 20,94% of linoleaidic trans acid, in the matrix of cream and hydrogenated lard were found

0,01% and 0,25% trans acid linoleaidico correspondingly. Furthermore margarine matrix provided 2,09% of trans-octadecenoic (elaidic).

These studies are conducted by states that analytical performance characteristic qualifies for the proposed analytical application being reliable to be used in quality testing.



INTRODUCCION

Las grasas son esenciales dentro de la alimentación humana, y están clasificadas en saturadas e insaturadas.

El consumo exagerado de grasas saturadas, genera una influencia negativa sobre la salud cardiovascular, por tanto las investigaciones científicas y la industria alimentaria encontraron como alternativa saludable, las grasas insaturadas. Sin embargo estas grasas por su estructura molecular poseen tendencia a la rancidez y como consecuencia a un menor tiempo de vida útil.

Debido a esta desventaja, se propició la hidrogenación de las grasas insaturadas, haciéndolas de esta manera, más estables y prolongando su periodo de conservación. Sin embargo se logró que una parte de las grasas presentes en estos productos tomaran la configuración trans; siendo estas tan perjudiciales como las grasas saturadas.

Con la evolución de la ciencia y la tecnología se descubrió que no solo por hidrogenación se daba lugar a la formación de ácidos grasos trans, sino también en la naturaleza una pequeña cantidad de la grasa animal en los rumiantes toma la configuración trans.

En la actualidad, la exigencia laboral nos demanda el consumo de alimentos rápidos, como golosinas o comida chatarra, que generalmente son ricos en contenido de grasas saturadas y grasas trans. Un ejemplo de estos alimentos es el chocolate en sus diferentes variedades.

El chocolate contiene una variedad de diferentes compuestos tales como grasa, polifenoles, esteroides, diterpenos, triterpenos, alcoholes y las metilxantinas (Knight, 2000)² alifáticos saturados. Debido a su alto contenido de grasa saturada, el chocolate es a menudo postulado para tener un efecto hipercolesterolémico. Además recientes investigaciones (Kamak Y.S, 2010)³ y (Aftab,2012)⁴, han demostrado la presencia de ácidos grasos trans en cantidades significativas en esta muestra.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar una técnica analítica usando derivatización con trifluoruro de boro y cromatografía de gases con detección FID, aplicable para cualquiera de las matrices de estudio. Para la determinación de ácido trans linoleídico y trans octadecanoico (elaidico).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Desarrollar la técnica analítica para la determinación de ácidos grasos trans.
2. Validar la técnica analítica para la determinación de ácidos grasos trans.
3. Determinar si los ácidos grasos trans de estudio están presentes en las matrices de trabajo.
4. Contrastar los valores hallados en las muestras analizadas frente a la normatividad permisible (FAO, FDA y NTP)
5. Comparar los valores encontrados de grasas trans en las diferentes matrices.

HIPOTESIS

Dado que los ácidos grasos trans son perjudiciales para la salud y son de difícil cuantificación, es probable que se pueda desarrollar y validar una técnica para la cuantificación de estos, usando derivatización con trifloruro de boro y cromatografía de gases con detección de flama (FID).



CAPITULO I MARCO TEORICO

1.1. ACEITES Y GRASAS

Las grasas incluyen una variedad de ácidos grasos. Las grasas derivadas de los animales terrestres (mantequillas y mantecas) en general contienen una alta composición de ácidos grasos saturados y son sólidas a la temperatura ambiente. Mientras que las grasas derivadas de los productos vegetales y animales marinos (nueces y aceites de hígado de bacalao) contienen más ácidos grasos no saturados y casi siempre son líquidas a la temperatura ambiente; se denominan como aceites (FAO, 2003)⁵.

Además de estos dos grupos existe un tercer grupo de lípidos de interés creciente, es el formado por mezclas de grasas y subproductos industriales cuya materia prima es la grasa (FEDNA, 2001)⁶.

En los últimos años los hábitos del consumidor han favorecido el uso de grasas vegetales parcialmente hidrogenadas (FEDNA, 2001)⁶. Estas nuevas grasas contienen de media un 20 a 25% de linoleídico en su composición y son de gran uso a pesar de su alto contenido de ácidos grasos trans (FEDNA, 2001)⁶.

1.2. ACIDOS GRASOS SATURADOS

Son aquellos con la cadena hidrocarbonada repleta de hidrógenos, por lo que todos los enlaces entre sus átomos de carbono son simples, sin ningún doble enlace, lo que se traduce en una estructura rectilínea de la molécula. Los ácidos grasos saturados son más comunes en los animales. Tienen un punto de fusión más elevado que sus homólogos insaturados por lo que son sólidos a temperatura ambiente. Algunos ejemplos de ácidos grasos pueden ser el ácido palmítico, el ácido esteárico (Encontrados en la muestras de snacks salados).

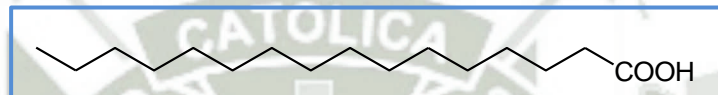


Figura 1.1 Acido palmítico⁶

Fuente: FEDNA. Aceites y Grasas.2001

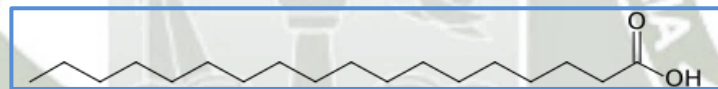


Figura 1.1 Acido esteárico⁶

Fuente: FEDNA. Aceites y Grasas.2001

1.3. ACIDOS GRASOS TRANS

Los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza como componentes de aceites y grasas, presentan sus dobles enlaces en forma de isómeros cis. La presencia de isómeros trans, se puede deber a causas naturales como la hidrogenación biológica (Pueyerton, 1999)⁷ que se produce en los animales rumiantes, o puede deberse a otras causas como la que ocurre en los aceites durante los procesos industriales, principalmente durante la hidrogenación.

Los ácidos grasos poliinsaturados en forma cis, no son estables y tienden a alterarse fácilmente (por ejemplo oxidándose). Por ello, su presencia en los alimentos hace que su conservación sea difícil. Para alargar la durabilidad de estos alimentos la industria utiliza la hidrogenación, que satura los ácidos grasos y se obtiene un producto más estable y de punto de fusión más alto. Sin embargo por la configuración cis del ácido graso hace que este sea más flexible y se dé el proceso de isomerización geométrica dando lugar a la formación de enlaces trans en los ácidos grasos.

Estos enlaces de isómeros trans son de estructura más rígida, al ser esta tridimensional similar a la de los ácidos grasos saturados (Tavella.)⁸

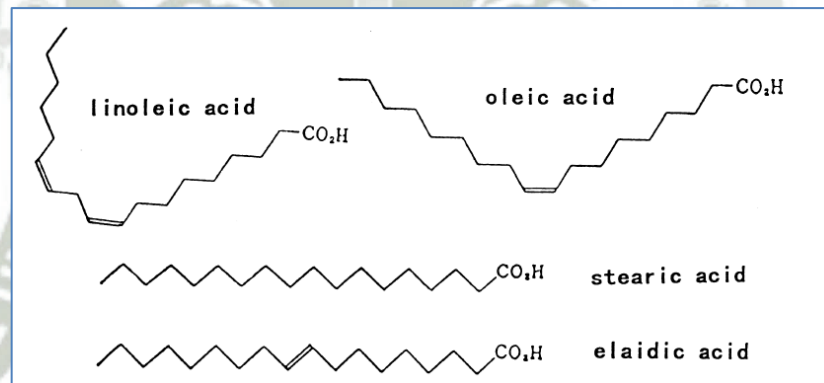


Figura 1.2 Disposición geométrica de los enlaces cis y trans⁹

Fuente: Semma, M. *Trans fatty acids: properties, benefits and risks*. Japan. 2001

Entre los ácidos grasos trans más frecuentemente formados después de una hidrogenación parcial de un aceite vegetal son el ácido elaídico (C18:1 trans 9), isómero trans del ácido oleico y el ácido trans linoleaídico (C18:2 trans 9,12), la configuración trans del ácido linoleico. También existen isómeros trans para el ácido linolénico, sin embargo en esta investigación nos avocaremos específicamente a los dos anteriormente mencionados, ya que son los presentes en el estándar FAME#35077.

Las propiedades físicas y químicas de estos ácidos grasos trans, son semejantes a sus isómeros geométricos cis, siendo su principal diferencia el valor de calor de hidrogenación, ya que en el caso de las grasas trans es menor al de las grasas cis.

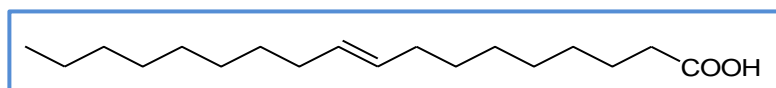


Figura 1.3 Acido trans-octadecanoico (elaidico)⁸

Fuente: Tavella, M. Ácidos grasos trans conceptos e implicancias clínicas

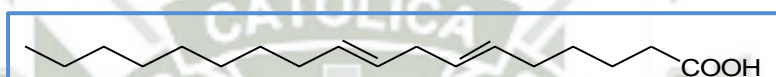


Figura 1.4 Acido trans-linoleaidico⁸

Fuente: Tavella, M. Ácidos grasos trans conceptos e implicancias clínicas

1.3.1. QUIMICA DEL ENLACE TRANS

Los enlaces cis y trans son estereoisómeros ya que son compuestos que poseen la misma fórmula molecular, los átomos enlazados de la misma forma, pero con diferente disposición espacial (ejemplo el 2-buteno que se ve a continuación)

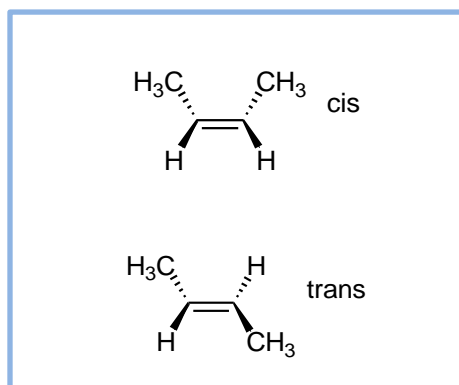


Figura 1.5 2-buteno¹⁰

Fuente: Universidad de Alcalá. Principios de la química, 1994.

Desde el punto de vista químico la clasificación específica para este tipo de enlaces es de isómeros geométricos; sin dejar de lado que cada isómero geométrico es una especie química diferente.

Estas dos moléculas generan compuestos diferentes porque el doble enlace impide la rotación de uno de los grupos entorno al otro, lo que produciría la conversión de un isómero en otro. Se debe considerar que para que se dé la rotación de cis a trans es necesario que los orbitales p que forman el enlace π se separen y se destruya el enlace.

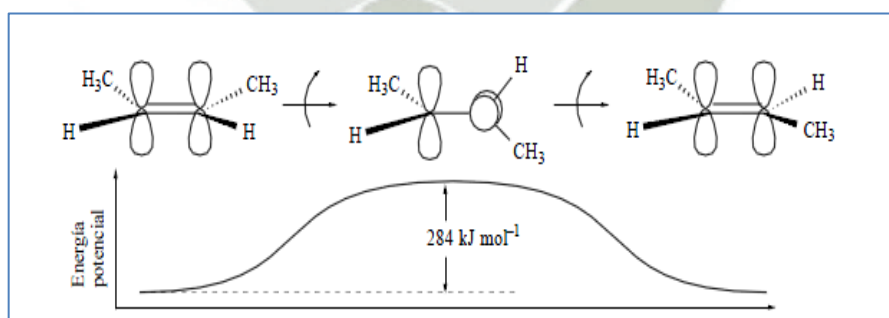


Figura 1.6 Representación de la formación de la isomería cis-trans¹⁰

Fuente: Principios de la química, 1994.

Por otra parte no se debe olvidar que la reactividad de un compuesto orgánico suele centrarse en aquellas partes de las moléculas donde hay instauraciones y/o enlaces polarizados, es decir en los grupos funcionales. Sin embargo en los hidrocarburos saturados, el carbono no tiene orbitales de baja energía vacíos (tiene el octeto completo), y los enlaces C-C y C-H se caracterizan por ser fuertes y tipo covalente (Principios de la química, 1994)¹⁰.

1.3.2. CARACTERISTICAS DE LOS ACIDOS GRASOS TRANS

Los ácidos grasos trans tienen la característica de ser estables al enranciamiento oxidativo, lo que les permite tener un tiempo prolongado de conservación, además tienen un punto de fusión intermedio entre las grasas saturadas y las insaturadas.

Por otra parte debido a la disposición geométrica del enlace trans (*ver 2.3.1*), este enlace es mucho más compacto y tiene la facultad de formar cristales, de manera que la grasa se encuentre en forma sólida; en este proceso se presenta el fenómeno de polimorfismo, las 3 formas principales encontradas en grasas son α , β' y β que tienen puntos de fusión y estabilidad creciente (Gunstone y Norris, 1982)¹¹.

Las investigaciones de Gunstone y Norris mostraron que la industria de las grasas hidrogenadas prefería la forma β' ya que esta da una apariencia más homogénea a la grasa, mientras que la forma β da una apariencia más granulosa.

1.3.3. CONSECUENCIAS EN LA SALUD POR CONSUMO DE ACIDOS GRASOS TRANS

Los ácidos grasos esenciales se consideran de esta manera, porque el organismo no puede sintetizarlos y por lo tanto deben provenir de los alimentos. Pero si estos ácidos grasos son sometidos a algún proceso de hidrogenación, su configuración puede alterarse y perder su función biológica. Por ejemplo se ha encontrado que los ácidos grasos trans pueden inhibir el proceso de elongación –desaturación de la enzima delta-6-desaturasa encargada de la síntesis de prostaglandinas (Tavella)⁸.

Por otra parte según las investigaciones de Castro M.¹² no se ha encontrado alteración significativa en la acción de la lipasa pancreática en comparación con las otras grasas; por lo tanto se dice que los ácidos grasos trans son tan dañinos a nivel cardiaco como los ácidos grasos saturados.

Se realizaron estudios utilizando animales experimentales sobre cáncer de mama y cáncer de colon y su relación con la ingesta de ácidos grasos trans. Y se obtuvo como conclusión que los ácidos grasos trans (18:1t) han mostrado tener un comportamiento similar a los cis (18:1) con respecto a la evolución del tumor. Por lo tanto parece ser que una alta ingesta de lípidos trans (a expensas de lípidos cis) no se consideraría riesgo de cáncer.

Se debe mencionar que se han realizado estudios de estos ácidos grasos en leche materna. El centro de estudios sobre nutrición infantil de Buenos Aires halló que el 2,5% de los ácidos grasos de la leche materna tienen configuración trans. Estas muestras fueron extraídas durante la primera semana de lactancia, de 20 mujeres aparentemente sanas. El principal ácido graso trans encontrado fue el ácido eláidico, el cual proviene de alimentos procesados.

1.3.4. FUENTES DE ACIDOS GRASOS TRANS

Las grasas trans pueden encontrarse en muchos de los mismos alimentos que contienen grasas saturadas, como grasas vegetales, algunas margarinas, galletas, caramelos, dulces, meriendas, alimentos fritos, productos horneados, y otros alimentos procesados hechos con grasas parcialmente hidrogenadas (FDA, 2006)¹³.

También se puede encontrar este tipo de grasas en algunos alimentos de origen animal como la leche, productos lácteos y carnes.

En la siguiente tabla se muestran alimentos consumo habitual, su contenido de grasas trans y su origen.

Tabla 1.1 Contenido de grasas trans en alimentos¹²

Alimento	AGT (g/100 g alimento)	Origen
Burritos	0.9	Industrial
Caldo de pollo en cubos	1.95 (0.05-3.85)	Industrial
Carne	1.0	Natural
Crema de cacahuete	1.9 (0.7-3.1)	Industrial
Croissant	3.0 (0.7-7.6)	Industrial
Dona	3.9 (0.5-7.8)	Industrial
Enchiladas	1.1	Industrial
Galletas	3.5 (0.3-8.1)	Industrial
Hamburguesa	3.0 (0.8-7.5)	Industrial
Leche entera	0.09 (0.07-0.1)	Natural
Mantequilla	3.9 (2.0-7.0)	Natural
Margarina dura	39.8 (31.1-44.6)	Industrial
Palomitas de microondas	3.0	Industrial
Papas a la francesa	2.1 (0.2-3.7)	Industrial
Papas fritas	1.4 (0.1-5.7)	Industrial
Pizza	7.2 (5.7-8.7)	Industrial

Fuente: Castro M. Ácidos grasos trans de la dieta y sus implicancias metabólicas¹²

1.3.5. CONSUMO DE ACIDOS GRASOS TRANS

La disponibilidad y consumo de los ácidos grasos trans ha venido en aumento con el paso del tiempo (Serra, 2006)¹⁴.

Los informes sobre su consumo en Estados Unidos han variado con los años. En 1984, Hunter y Applewhite¹⁵ estimaron en forma indirecta que la cantidad ingerida de ácidos grasos trans fue de 7.6 g/persona/día, mientras que para 1989 el consumo aumentó a 8,1 g/persona/día. En contraste, Enig y colaboradores estimaron un mayor consumo de ácidos grasos trans (12,5-15,2 g/persona/día). En 1999, la población estadounidense consumió en promedio 5,3 g de ácidos grasos trans /día, lo que equivale a 2,6 % del total de energía y a 7,4 % del total de las grasas ingeridas.

Se estima que en la actualidad el consumo de grasas trans se verá disminuido gracias a la disposición establecida por la FDA y la sugerencia de la FAO.

1.3.6. NORMATIVIDAD PARA LOS ACIDOS GRASOS TRANS

La Food and Drugs Administration (FDA, 2003)^{13,16} estableció el 1 de enero de 2006 en Estados Unidos que las etiquetas nutrimentales de todos los alimentos convencionales y suplementos deben indicar el contenido de los ácidos grasos trans. Por otro lado en el mismo año la organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO,2008)¹ recomendó que el consumo de ácidos grasos trans, esté por debajo del 1%.

En el año 2008 la FDA sugirió que valor de grasas trans en los alimentos este por debajo del 0,5%. Esto fue acatado por algunos estados de Norteamérica ya que es una decisión que debe ser impuesta por el gobierno.

En nuestro país se lanzó la norma técnica NTS N° 093 – 2012/MINSA¹⁷ la cual mencionaba que los productos de consumo alimentario debían indicar el valor de ácidos grasos trans en sus respectivas etiquetas (respetándose de esta manera las indicaciones de la FAO). Sin embargo debido a incongruencias presentadas en la norma esta se vio anulada a través de la R.M. N° 202 – 2012/MINSA¹⁸ de fecha 21 de marzo de 2012.

Con la anulación de la norma técnica para el etiquetado de los ácidos grasos trans, INDECOPI emitió el 11 de noviembre del mismo año la NTP209.655¹⁹ en la que se dictan los parámetros para el registro de los ácidos grasos trans.

1.4. METODOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS TRANS

Para la determinación de ácidos grasos trans se cuenta principalmente con tres técnicas: como son la cromatografía líquida HPLC, la espectroscopia infrarroja y la cromatografía de gases por detector FID.

Para esta investigación se escogió la cromatografía de gases con detector FID debido a la accesibilidad del equipo, los consumibles y a que la NTP209.655 recomienda el

uso de técnicas validadas de la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), en los cuales se trabaja por cromatografía de gases.

1.4.1. CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción.

1.4.2. DESCRIPCION GENERAL DEL EQUIPO

Un cromatógrafo de gases está compuesto fundamentalmente por una fuente de gas o mejor conocido como gas transportador, que suele ser un gas inerte (ejemplo helio). Un sistema de inyección, que es donde se encuentra el sistema de inyección automático o de no tenerse, por allí se introduce la jeringa con la muestra. Un horno y una columna, los cuales se emplean como medios para el inicio de la detección de la muestra, es en este punto se encuentra el electrodo colector y los gases de llama los cuales se enciende cuando se llega a la temperatura indicada por el operador. Posteriormente la muestra pasa al sistema de detección (amplificador) y luego al sistema de registro que es donde se evidencia el cromatograma. Finalmente el software reúne los datos del amplificador y del sistema de registro, otorgando al usuario el tratamiento de los datos.

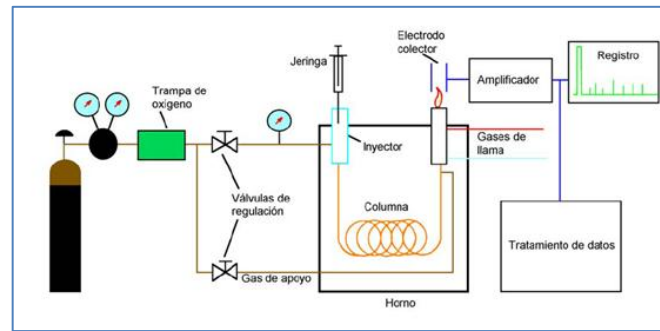


Figura 1.7 Esquema de un cromatógrafo de gases²⁰

Fuente: Ronald, A. Gas Chromatography

1.4.3. SISTEMA DE INYECCION DE LA MUESTRA

La muestra es inyectada con una jeringa hipodérmica a través de un septum de goma de silicona auto selladora, a un alineador de vidrio (glass insert) contenido en un bloque metálico, donde es vaporizada y barrida hacia la columna. El bloque se calienta a una temperatura que se fija en un valor suficientemente alto para convertir prácticamente en forma instantánea la muestra líquida en vapor.

1.4.4. TIPOS DE INYECTORES PARA COLUMNAS CAPILARES

Los sistemas de introducción de muestras utilizados para trabajar con columnas capilares²¹, están basados sobre los mismos principios de los inyectores utilizados para columnas empaquetadas (columnas de HPLC).

La diferencia fundamental entre los sistemas que utilizan columnas empaquetadas y los que utilizan columnas capilares, radica en que la cantidad de muestra que estas últimas pueden separar es mucho menor que en el primer caso; por otra parte, las columnas capilares son muy afectadas por los solventes, de forma que los volúmenes que se pueden inyectar son extremadamente bajos.

Por esta razón el mínimo volumen de inyección que se puede inyectar con precisión es 0,1µl. Los inyectores utilizados para este tipo de columna se encargan de dos

procesos: el primero de vaporizar la muestra y mezclarla con el gas portador y el segundo de introducir a la columna solo una alícuota de la muestra inyectada total.

1.4.5. TIPOS DE INYECCION DE MUESTRA

Como se mencionó anteriormente los inyectores de muestra para columnas capilares, introducen a esta solo una alícuota de la muestra total inyectada. Para realizar esta función existen dos técnicas que son la inyección en SPLIT y la inyección en SPLITLESS.

1.4.5.1. INYECCION EN SPLIT

Es la técnica más sencilla técnica empleado en cromatografía de gases. El inyector de “Split”, consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducción en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna.

El control de flujo de gas portador que pasa a través de la columna, se realiza en este tipo de sistemas manteniendo constante la precisión en la cámara de inyección, lo que permite que el caudal del gas que pasa a través del inyector pueda variar en función de que la válvula de “Split” este abierta o cerrada²².

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes; en primer lugar la división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas, por los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente a la hora de realizar el análisis de trazas. Por otra parte, los inyectores de “Split” pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.

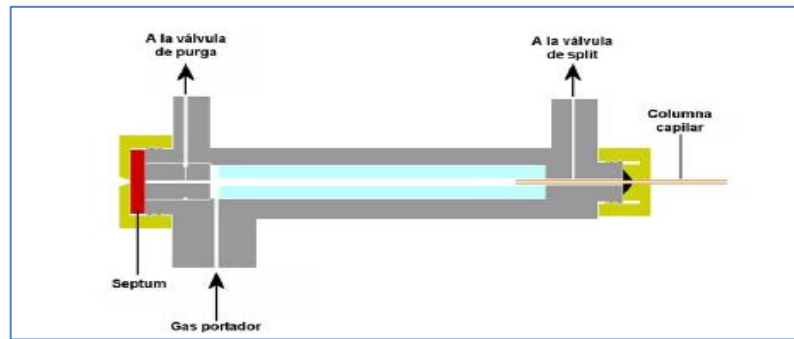


Figura 1.8 Formato de un inyector SPLIT²¹

Fuente: J.T. Gas Chromatography

1.4.5.2. INYECCION EN SPLITLESS

En esta técnica, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra es inyectada, la cual se condensa en la cabeza de la columna, actuando como disolvente condensando en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar. Transcurrido un tiempo adecuado, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el solvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector (J.T, 2005)²¹, al mismo tiempo se comienza con el calentamiento de la columna para realizar el análisis.

Las ventajas que supone es tipo de técnica son dos. En primer lugar, dado que no existe división entre la muestra, permite el aumento notable de la sensibilidad, por lo que es muy adecuada para el análisis de trazas. Por otra parte, la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menos importancia que en otras técnicas de inyección.

1.4.6. TIPO DE DETECTORES

Los detectores usados en cromatografía de gases, pueden dividirse de forma genérica en detectores universales y detectores específicos (Rodríguez, 2004)²²; los primeros ofrecen la ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto que pueda eluir una columna, no obstante, esta misma propiedad puede convertirse en un inconveniente cuando se procede al análisis de mezclas muy complejas; en este último caso, la utilización de detectores específicos resulta muy ventajosa ya que, al responder únicamente frente a un grupo de limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen, resultan ser muy simplificados.

1.4.6.1. DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA (FID)

Está basado en la relación directa que existe entre la conductividad eléctrica de un gas y la concentración de partículas cargadas (iones positivos, iones negativos y electrones) existentes en la muestra. Se utiliza una llama de hidrogeno como fuente de ionización de las moléculas orgánicas que fluyen a través del detector.

El detector dispone de un sistema de electrodos, situado el negativo en la base de la llama y el positivo en forma de cestilla o cilindro alrededor de la llama cargado con +300V (Dabrio, 1971)²³. La corriente gaseosa que sale de la columna se mezcla con una corriente de hidrogeno (combustible) y entra en el detector donde produce la combustión.

Para soportar la llama se introduce aire (puede usarse oxígeno) por la base del detector.

Durante la combustión producida al llegar un compuesto orgánico a la llama, se forman partículas cargadas que depende de la naturaleza y velocidad del flujo del soluto y por tanto, directamente relacionada con la cantidad del mismo.

Este detector responde a casi todo tipo de sustancias a excepción de: argón, agua, monóxido de carbono, dióxido de carbono, helio, etc (Jennings, 1987)²⁴.

El funcionamiento correcto de este detector depende de la elección adecuada de los tres flujos usados: gas portador, hidrogeno y aire.

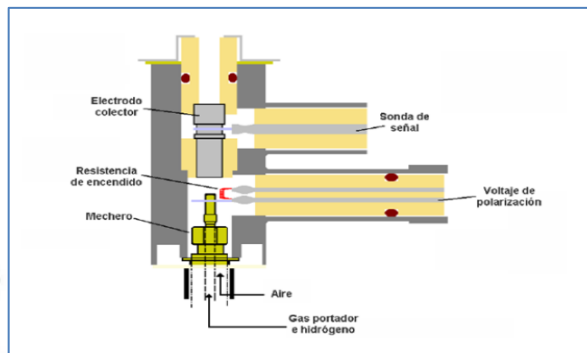


Figura 1.9 Descripción de detector FID²¹

Fuente: J.T. Gas Chromatography

1.4.6.2. DETECTOR DE MASAS

Su fundamento está basado en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente son detectados²¹.

Un espectro de masas será, un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

Los iones determinados por esta técnica son identificables a partir de su masa.

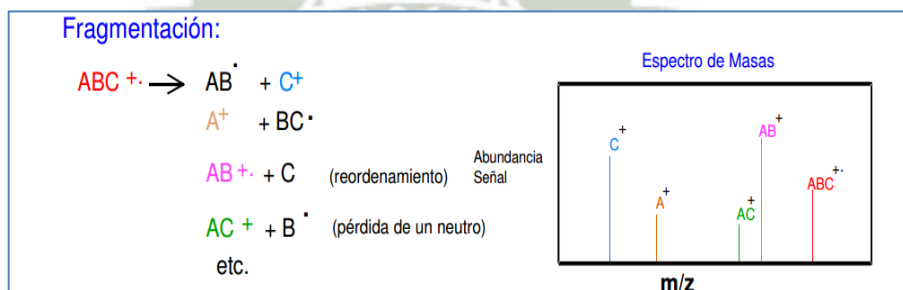


Figura 1.10 Representación de un espectro de masas²¹

Fuente: J.T. Gas Chromatography

1.5. MATRICES DE ESTUDIO

Las matrices de este estudio son de composición diversa, ya que uno de los objetivos de la investigación es que la técnica validada sea aplicable para diferentes tipos de muestras.

Las matrices analizadas fueron snacks salados de marcas comerciales, chocolate para cobertura, cobertura de chocolate para helado, crema de leche, margarina para untar, manteca hidrogenada y pasta de cacao.

1.5.1. DESCRIPCION GENERAL

Las muestras de estudios fueron escogidas en consideración a su alto contenido en grasas. Dentro de las matrices se trabajó muestras comerciales de reconocido posicionamiento en el mercado (snacks, crema de leche, margarina, manteca hidrogenada), como muestras de venta regional que no cuentan con tablas de valor nutricional en su etiquetado (cobertura de chocolate sólida para helado, pasta de cacao y snacks).

1.5.2. SNACKS

Snack es una porción de alimento a menudo más pequeña que una comida regular, generalmente ingerido entre las comidas. Ellos se comercializan en una variedad de formas, son de composición variada (envasados, procesados o hechos a partir de ingredientes frescos) y se pueden consumir con facilidad.

Los bocadillos envasados son ahora un negocio significativo. Los snacks son generalmente diseñados para ser portátiles, rápidos y de satisfactorio consumo. Los bocadillos procesados están diseñados para ser menos perecederos. A menudo contienen grandes cantidades de edulcorantes, conservantes e ingredientes atractivos como el chocolate, cacahuates, y sabores especialmente diseñados (por ejemplo, las papas fritas con sabor)

1.5.2.1. IMPORTANCIA EN EL MERCADO

Los mercados emergentes están siendo cada vez más importantes para estimular las ventas de este tipo de alimentos, tanto en valor como en volumen. Siendo las mejores perspectivas económicas, aquellas que posean consumidores con un estilo de vida, dieta y preferencias más occidentalizadas.

Los consumidores de todo el mundo tienen todavía un deseo por la “comida chatarra” a pesar de las condiciones económicas globales.

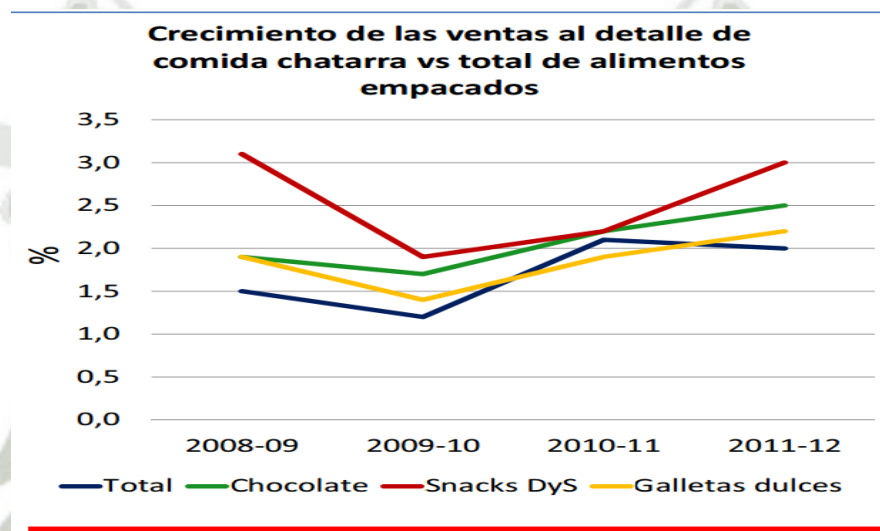


Figura 1.11 Crecimiento estimado del mercado de snaks para el año 2012

Fuente: Promotora PROCOMER-Costa Rica

Asia-Pacífico lidera el crecimiento en las ventas de snacks dulces y salados, especialmente China, India y Japón. A pesar de la austeridad y la mayor consciencia sobre la salud, las ventas en Europa Occidental siguen creciendo (460 millones de USD en 2011). Las distintas categorías crecen tanto en valor como en volumen, con excepción de los snacks de frutas y las nueces, cuyo incremento se da sobre todo en términos del valor.



Figura 1.12 Mapa mundial del porcentaje de frecuencia de consumo de snacks

Fuente: Euromonitor Internacional

1.5.2.2. NORMATIVIDAD

Los Snacks comerciales se encuentran caracterizados por la norma técnica peruana: NTP209.226²⁵. Estos mismos entran dentro de la clasificación de bocaditos extruidos (son aquellos que se obtienen de una mezcla de materias primas previamente tratadas y que sometidas a un proceso de extrusión). Los Snacks se encuentran clasificados por su sabor.

En cuanto a su elaboración, deben fabricarse a partir de sustancias exentas de toda impureza, de sustancias nocivas a la salud y que estén en perfecto estado de conservación.

Dentro de sus características organolépticas presentan olor, color, sabor y textura característicos al producto²⁵.

Los parámetros físicoquímicos básicos reglamentarios se encuentran detallados en la siguiente tabla:

Tabla 1.2 Parámetros físicoquímicos para bocaditos

<u>Característica</u>	<u>Fritos</u>	<u>Extruidos</u>
Humedad, máximo	3 %	6 %
Cenizas totales, máximo	4 %	4 %
Índice de peróxido, máximo	5 meq/kg	5 meq/kg
Índice de acidez, expresado en ácido oleico, máximo	0,30 %	0,30 %

Fuente: NTP209,226 Norma para bocaditos

1.5.3. PASTA DE CACAO Y CHOCOLATE

El chocolate es uno de los principales productos derivados del cacao, este se obtiene mediante la mezcla homogénea de cantidades variables de pasta de cacao o en cacao en polvo o descascarillado, manteca de cacao y azúcar en polvo (CODEX STAN 87, 2003)²⁶.

La composición de un chocolate puede ser variable, ya que según los ingredientes que se le agregue a la mezcla base varía en su composición.

Las adiciones en combinación se limitarán al 40% del peso total del producto terminado, con sujeción a las disposiciones de etiquetado.

Se debe considerar que los ácidos grasos trans presentes en este producto se forman durante la fase de conchado del chocolate, siendo en este punto en el que se agrega lecitina de soya y manteca de cacao (ambas ricas en grasas insaturadas) a la pasta de cacao en polvo. La cual posteriormente es sometida a calor y presión.

En el caso de la pasta de cacao su composición es 100% cacao crudo, es comúnmente utilizado para la elaboración del chocolate para taza. Sin embargo se debe considerar que los chocolates para taza que se venden en el mercado

especifican el nombre “con sabor a chocolate”, siendo esto un indicativo que la mayor parte de la composición son aditivos.

1.5.3.1. CHOCOLATE PARA COBERTURA

Corresponde a las barras de chocolate para repostería pre-cocido que contiene hasta un 45% de cacao en su composición. Dentro de esta categoría se encuentra el denominado chocolate bitter y el chocolate de leche.

1.5.3.2. COBERTURA DE CHOCOLATE

La cobertura de chocolate sólido es empleada en repostería como decoración y acompañante de helados, pasteles y tortas.

Es una la unión del chocolate para cobertura, con crema de leche y trozos de mantequilla o margarina. Esto en cantidades variables según cada receta, pero que normalmente oscilan entre 100:50:25g respectivamente.

1.5.3.3. NORMATIVIDAD

En la tabla que se muestra en la siguiente página, se encuentran los parámetros necesarios para cada tipo de chocolate según la norma del Codex Alimentarius.

Tabla 1.3 Tipos de chocolate y sus componentes

PRODUCTOS	COMPONENTES (%)						
	Manteca de cacao	Extracto seco magro de cacao	Total de extracto o seco de cacao	Materia grasa de la leche	Total de extracto o seco magro de la leche	Almidón / Harina	Avellanas
2.1 TIPOS DE CHOCOLATE (COMPOSICIÓN)							
2.1.1 Chocolate	≥18	≥14	≥35				
2.1.1.1 Chocolate a la taza	≥18	≥14	≥35			< 8	
2.1.2 Chocolate dulce/familiar	≥18	≥12	≥30				
2.1.2.1 Chocolate familiar a la taza	≥18	≥12	≥30			< 18	
2.1.3 Chocolate de cobertura	≥31	≥2,5	≥35				
2.1.5 Chocolate con leche familiar		≥2,5	≥20	≥5	≥20		
2.1.6 Chocolate de cobertura con leche		≥2,5	≥25	≥3,5	≥14		
2.1.7 Otros productos de chocolate							
2.1.7.1. Chocolate blanco	≥20			2,5-3,5	≥14		
2.1.7.2 Chocolate Gianduja		≥8	≥32				≥20 ≤40
2.1.7.3 Chocolate Gianduja con leche		≥2,5	≥25	2,5-3,5	≥10		≥15 ≤40
2.1.7.4 Chocolate para mesa							
2.1.7.4.1 Chocolate para mesa	≥ 11	≥ 9	≥ 20				

Fuente: Codex STAN87-1981-Rev2003

1.5.4. CREMA DE LECHE

La nata o crema de leche es el producto lácteo fluido comparativamente rico en grasas, en forma de una emulsión de grasa en leche desnatada (descremada), que es obtenida por la separación física de la leche. (Codex Alimentarius)²⁸.

1.5.4.1. NORMATIVIDAD

Se encuentran bajo la norma CODEX A.-FAO, 2006²⁹, todas las natas (cremas), o productos que se hallen bajo lo siguiente:

- Leche, que puede haber sido sometida a tratamientos mecánicos o físicos antes del procesamiento de la nata (crema).
- Las natas (cremas) elaboradas por reconstitución o recombinación: mantequilla, productos de grasa láctea, leche en polvo, nata (crema) en polvo y agua potable.

1.5.5. MANTECA HIDROGENADA

Las mantecas hidrogenadas se componen principalmente de aceites insaturados de origen animal (aceite de pescado principalmente) y vegetal de distintas fuentes que han sido hidrogenados por el proceso de hidrogenación.

1.5.5.1. NORMATIVIDAD

La siguiente tabla muestra el límite permisible de ácidos grasos en una manteca de cerdo, puesto que el Codex Alimentarius no presenta una norma específica para manteca hidrogenada.

Agrupada dentro de su norma CODEX STAN 211 (1999)³¹ a las mantecas animales y a las mantecas hidrogenadas animales o vegetales.

Tabla 1.4 Límites permisibles de ácidos grasos para mantecas³¹

	MANTECA DE CERDO GRASA DE CERDO FUNDIDA	PRIMEROS JUGOS, SEBO
C 6:0))
C 8:0))
C 10:0) < 0,5 en total) < 0,5 en total
C 12:0))
C 14:0	1,0-2,5	2-6
C 14:ISO	no detectado < 0,1	< 0,3
C 14:1	< 0,2	0,5-1,5
C 15:0	< 0,2	0,2-1,0
C 15:ISO	< 0,1) < 1,5 en total
C 15:ANTI ISO	< 0,1)
C 16:0	20-30	20-30
C 16:1	2,0-4,0	1-5
C 16:ISO	< 0,1	< 0,5
C 16:2	< 0,1	< 1,0
C 17:0	< 1	0,5-2,0
C 17:1	< 1	< 1,0
C 17:ISO	< 0,1) < 1,5 en total
C 17:ANTI ISO	< 0,1)
C 18:0	8-22	15-30
C 18:1	35-55	30-45
C 18:2	4-12	1-6
C 18:3	< 1,5	< 1,5
C 20:0	< 1,0	< 0,5
C 20:1	< 1,5	< 0,5
C 20:2	< 1,0	< 0,1
C 20:4	< 1,0	< 0,5
C 22:0	< 0,1	< 0,1
C 22:1	< 0,5	no detectado

Fuente: CODEX STAN 211 (1999)

1.5.6. MARGARINA

Según la legislación vigente del Codex Alimentarius (CODEX STAN 32, 1989)³², sólo se puede denominar margarina aquel producto que contenga entre un 80% y un 90% de grasa animal o vegetal y una pequeña cantidad de lácteos. Si no tienen este contenido en grasa se denominan de distintas formas:

- Margarina $\frac{3}{4}$ (si tiene entre un 60 y un 62% de grasa).
- Materia grasa para untar (si tiene entre un 42 y un 55% de grasa).
- Margarina grasa para untar enriquecida con vitaminas (A, D, E, B2), minerales (calcio), fibra o fitoesteroles. Para este estudio se utilizó margarina para untar.

1.5.6.1. NORMATIVIDAD

En la siguiente tabla se muestran los factores esenciales para la composición de las margarinas de consumo, se debe reparar en que esta norma no menciona el límite permisible de grasas trans.

Sin embargo la FAO sugiere como límite permisible un máximo de 1% y la FDA de 0,5%.

Tabla 1.5 Factores esenciales de composición y calidad de la margarina³²

Factores esenciales de composición y calidad			
Materia prima	Grasas y/o aceites comestibles, o sus mezclas, que hayan sido sometidos o no a un proceso de modificación.		
Contenido grasa	min	de	80 % m/m del producto
Contenido agua	min	de	16 % m/m del producto
Aditivos	Vitamina A y sus ésteres Vitamina D Vitamina E y sus ésteres Otras vitaminas		

Fuente: CODEX STAN 32-1981 (Rev1-1989)

1.6. PROCESOS INDUSTRIALES DE FORMACION DE GRASAS TRANS

La formación de ácidos grasos trans en alimentos se relaciona principalmente con dos procesos industriales, el freído y la hidrogenación.

En el caso del freído la formación de estas grasas se relaciona de manera directa con la temperatura de fritura y con el tiempo de uso del aceite.

Estudios experimentales llevados a cabo desde el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia³³ confirman tras evaluar los efectos de la temperatura en la formación de grasas trans en aceites de girasol, que el desarrollo de este tipo de ácidos grasos comenzó a partir de 150°C y fue mucho más importante a partir de 250°C. Tras calentar el aceite durante 20 minutos a 200°C, 250°C y 300°C, la concentración de isómeros trans se incrementó en 356,5%, 773,9% y 3.026,1%, respectivamente. A partir de éstas y otras comprobaciones similares, se ha determinado que la temperatura del aceite de fritura no debe exceder de 180°C.

Para el caso de la hidrogenación se debe entender que es el proceso por el cual se pasa de un aceite a una grasa sólida y en transcurso de este proceso se da la formación de los isómeros trans. Este proceso químico se describirá a detalle a continuación.

1.6.1. HIDROGENACION

La hidrogenación consiste en la adición química de hidrógeno a un hidrocarburo en presencia de un catalizador. La hidrogenación puede ser destructiva o no destructiva. En el primer caso, las cadenas de hidrocarburo se rompen (desagrupan) y se añade hidrógeno en los puntos de ruptura. En el segundo, se añade hidrógeno a una molécula no saturada en relación al hidrógeno. En ambos casos, las moléculas resultantes son extremadamente estables.

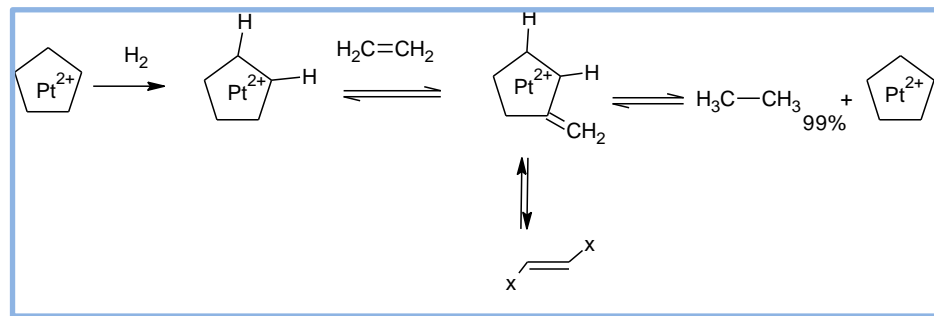


Figura 1.13 Formación de grasas trans en la hidrogenación.

Fuente: *Química culinaria*³⁴.

Con la hidrogenación, o adición directa de hidrógeno a los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados, se pretende modificar el comportamiento físico de los aceites y grasas. El objetivo de la hidrogenación es aumentar la estabilidad oxidativa y/o alterar las propiedades de fusión de los aceites mediante la reducción del grado de insaturación.

La hidrogenación es una reacción catalítica, que requiere el uso de un agente que actúe de esta manera, siendo normalmente los usados el platino o níquel. Como consecuencia de este proceso, los ácidos grasos pueden ser transformados en sus isómeros trans. Los habitualmente encontrados, son el ácido trans-octadecanoico (eláidico) (18:1 trans 9), los isómeros trans del ácido linoleico (18:2 trans 9, 12; 18:2 cis9, trans12 y 18:2 trans 9, cis12) y ocasionalmente, pueden aparecer otros isómeros trans.

1.7. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: DERIVATIZACION

La derivatización es la adecuación de un analito para su detección por medio de una técnica analítica, en este caso por cromatografía de gases. Para ello se modifica la funcionalidad del analítico con el fin de permitir la separación cromatográfica.

Un analito modificado en este caso será el producto, que se conoce como el derivado. El derivado puede tener similares o estar estrechamente relacionadas con la estructura inicial, pero no posee la misma composición química (Brata, 2012)³⁵

La finalidad de la derivatización en cromatografía de gases es mejorar la volatilidad, la estabilidad térmica y la detección del analito.

1.7.1. APLICACIONES GENERALES

Las aplicaciones usuales para las cuales se emplea la derivatización química en cromatografía de gases son:

- Transformación de compuestos no volátiles en volátiles
- Conversión de compuestos no detectables en productos apropiados
- Análisis de compuestos reactivos que presentan interacción con la fase estacionaria de la columna
- Incremento de la especificidad de la fragmentación del ion molecular para la estimación de estructuras

1.7.2. TIPOS DE DERIVATIZACION

- **Silación**

Reemplazo de un hidrogeno acido con un grupo alquilsililo.

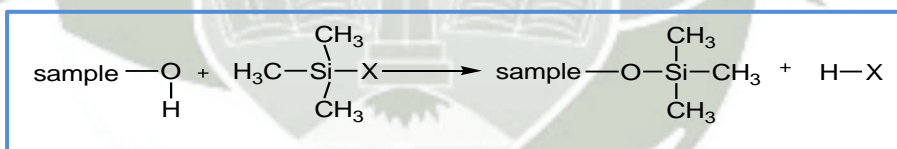


Figura 1.14 Reacción de Silación.

Fuente: Gracida, U., Derivatización de analitos³⁶.

- **Acilación**

Conversión de compuestos con hidrógenos activos como -OH, -SH y -NH en esterés, tioesterés y aminas respectivamente.

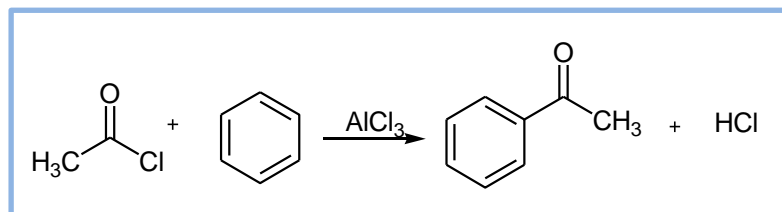


Figura 1.15 Reacción de Acilación.

Fuente: Gracida, U., *Derivatización de analitos*³⁶.

- **Alquilación**

Reemplazo de un hidrogeno activo en R-COOH, R-OH, R-SH, R-NH₂ con un grupo alquilo o arilo.

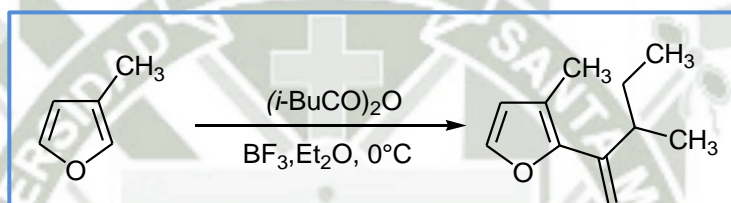


Figura 1.16 Reacción de alquilación

Fuente: Gracida, U., *Derivatización de analitos*³⁶.

1.7.3. TRIFLORURO DE BORO

El trifluoruro de boro BF₃ es un gas incoloro tóxico pungente, que forma humos blancos en el aire húmedo. Normalmente se comercializa formando un complejo con un solvente, comúnmente metanol. El usado en este caso, es una solución trifluoruro de boro-metanol al 20%.

La molécula de trifluoruro de boro tiene una geometría trigonal plana, es decir que los enlaces entre el boro y el flúor se encuentran al mismo plano formando entre ellos ángulos de 120°. Los tres enlaces que se forman entre boro y flúor son de carácter covalente, esto se debe a la hibridación sp² que se da durante la excitación del átomo de boro ya que durante esta etapa se produce un salto electrónico del orbital 2s y pasa al orbital 2p dejando de esta manera tres orbitales incompletos, los

cuales se combinan entre ellos y dan lugar a la hibridación sp^2 (Atkins et All, 2006)³⁷.

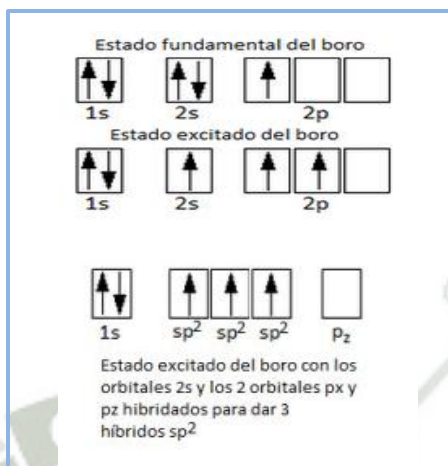


Figura 1.17 Proceso de formación del orbital sp^2

Fuente: Atkins et All. *Química Inorgánica*³⁷.

Los compuestos trivalentes de boro (BF_3) y aluminio constituyen, por sus aplicaciones una de las familias más importantes de los ácidos de Lewis. El orden experimental de acidez es opuesto a la electronegatividad de los sustituyentes: $BF_3 < BCl_3 < BBr_3$. Una explicación al orden inverso de acidez encontrada en los trihaluros de boro se encuentra en la consideración de que el átomo central de boro es un centro ácido mientras que los átomos halógenos terminales son centros básicos. Por tanto se puede asumir la existencia de una interacción parcial ácido-base π entre el átomo de boro y el flúor (Principios de la Química, 1994)¹⁰. A continuación se muestra gráficamente esta reacción:

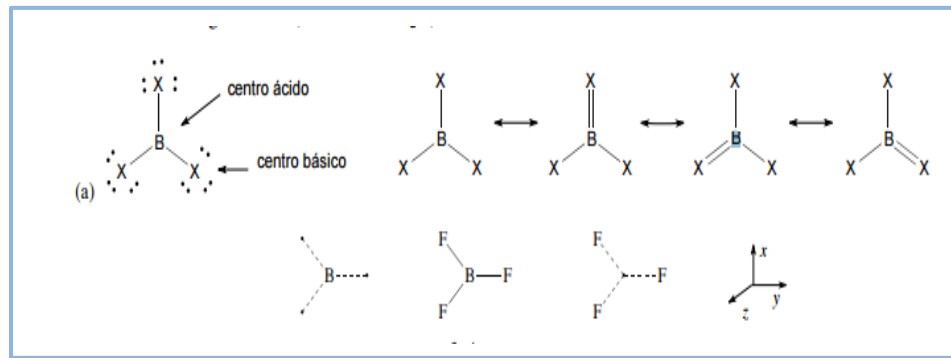


Figura 1.18 Explicación de la acidez de Lewis del BF_3

Fuente: Principios de la química ¹⁰

El trifluoruro de boro como ya se había mencionado tiene configuración trigonal plana, la cual gracias a su enlace π entre los átomos de boro y flúor favorece la estructura piramidal al reaccionar con otro compuesto. El uso industrial de esta molécula es como catalizador. Su papel consiste en remover las bases unidas al carbono para generar carbocationes.

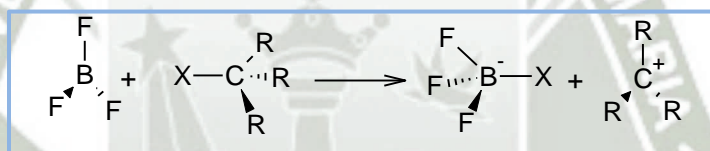
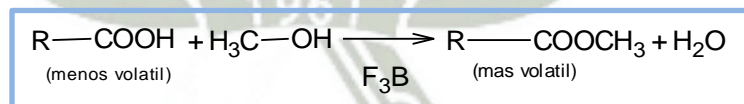


Figura 1.19 Reacción del BF_3 como catalizador

Fuente: Atkins et All. Química Inorgánica ³⁷.

La reacción del trifluoruro de boro en la derivatización de ácidos grasos, se describe en forma general a continuación:



1.8. VALIDACION

La validación de una técnica analítica es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicha técnica son confiables. Cuando se realiza la validación de un técnica por parte del laboratorio, lo que se busca es poder

determinar con fundamento estadístico que la técnica es adecuado para los fines previstos (Validación de técnicas analíticas, 2010)³⁸.

En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea. De manera que, la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación de cuáles son los requerimientos de la técnica para establecer el alcance de la validación. Es esencial, conocer la técnica a validar, su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración y la matriz (o matrices) en las cuales se desea utilizar.

1.8.1. DEFINICION

Según la ISO-15189³⁹ propone como definición de validación la siguiente:

“Confirmación mediante el examen y la obtención de evidencias objetivas que aseguren el cumplimiento de una serie de requerimientos particularmente definidos para aplicaciones concretas”

Dentro de los parámetros de calidad que se desarrollaran en esta tesis, serán: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

1.8.2. LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de una técnica de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio.

Para la determinación de la linealidad será necesario realizar una gráfica de calibración, la determinación del coeficiente de correlación r^2 y el análisis estadístico de varianza.

1.8.2.1. RANGO LINEAL

La determinación del rango va permitir encontrar el rango de los puntos de trabajo para la curva de calibración. Este se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta.

Se recomienda abarcar valores desde cercanos al cero y valores superiores al valor de interés.

1.8.3. SENSIBILIDAD

Se dice, que una técnica es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, visualiza cómo se comporta el instrumento.

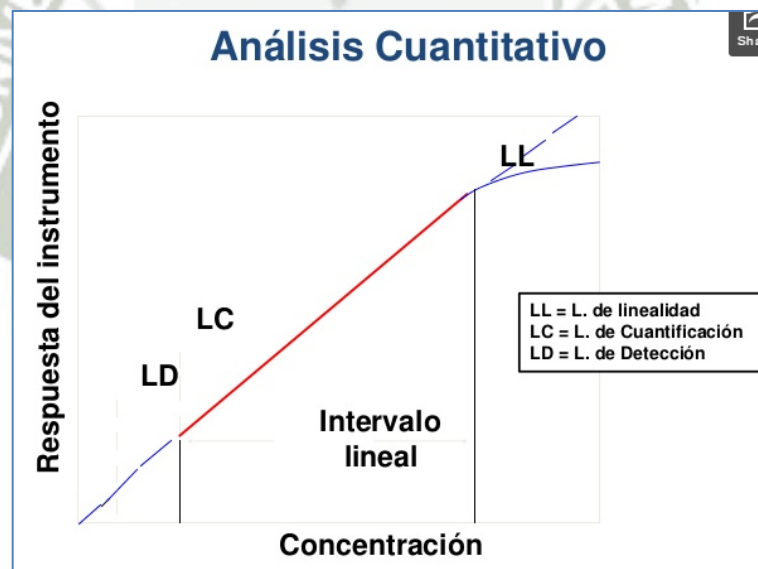


Figura 1.20 Representación de la sensibilidad

Fuente: Validación de técnicas analíticas⁴⁰

1.8.3.1. LIMITE DE DETECCION

Es la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado. Concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a un blanco.

1.8.3.2. LIMITE DE CUANTIFICACION

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración.

1.8.4. PRECISION

Es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de una serie repetida de análisis, sobre una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas (Norma ISO 3534).

1.8.4.1. REPETIBILIDAD

Es la medida de la precisión de una técnica efectuada en las mismas condiciones, sobre el mismo analito, con la misma técnica, mismo analista, haciendo uso del mismo instrumento de medida y durante un intervalo corto de tiempo (ejemplo: el mismo día).

1.8.4.2. PRECISION INTERMEDIA

Es la medida de la precisión de una técnica efectuada en las mismas condiciones, sobre el mismo analito, con el mismo técnica, mismo analista, haciendo uso del mismo instrumento de medida y durante un intervalo prolongado de tiempo (ejemplo: diferentes días de análisis).

1.8.5. EXACTITUD

Grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor aceptado o verdadero.

Los valores de la exactitud resultan de la suma de la precisión y la veracidad.



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1.MUESTRAS DE ESTUDIO

- 10 muestras por cada variedad de Snack salados, de las variedades chisitos y papas fritas en hojuelas naturales de dos marcas comerciales diferentes (A y B).
- 5 muestras de por cada variedad de Cobertura de chocolate solido de dos marcas comerciales de helados (C y D).
- 5 muestras por cada variedad de Chocolate para cobertura de dos marcas comerciales (E y F).
- 5 muestras de pasta de cacao
- 5 muestras de manteca hidrogenada comercial
- 5 muestras de crema de leche comercial al 50% de materia grasa
- 5 muestras de margarina vegetal comercial

2.2.MATERIALES

- Jeringa 1 μL para GC (SGE)
- Micropipetas adaptables 20 - 200 μL DRAGONlab Top Pipette
- Micropipeta de 100-1000 μl DRAGONlab Top Pipette
- Tubos tapa rosca 10 mL
- Matraces aforados 25 mL
- Viales ámbar para cromatografía de gases

2.3.REACTIVOS

- Acido pirogálico Seelse Hannover grado analítico
- Etanol comercial grado analítico
- Ácido clorhídrico Merck grado analítico
- Dietil éter Merck grado analítico
- Éter de petróleo Merck grado analítico
- Cloroformo Merck grado analítico
- Trifloruro de boro-metanol complejo (20% de solución-metanol) Merck
- Tolueno Merck grado analítico
- Agua destilada
- Hexano Macron para cromatografía de gases
- Reactivo estándar RESTEK #35077

2.4.EQUIPOS

Equipo para cromatografía de gases GC/MS-QP2010 ULTRA SHIMATSU con detector FID (software *GC Solution*) con columna capilar de sílice fundido de 100m de largo y 0.25mm de diámetro interior cubierto con una fase estacionaria de RT-2560, Bicianopropil polisiloxano 100% con un espesor 0.20 μm .

La imagen del equipo se muestra a continuación (*Ver figura. 2.1.*).



Figura 2.1 Cromatógrafo de gases GC/MS-QP2010

Fuente: Laboratorio control de calidad

Balanza analítica no automática de cinco dígitos OHAUS-Discovery DV215CD de 1-400mg (Ver figura 2.2).

La fecha de calibración de la balanza fue el 14-04-2014, esto se documenta con el certificado de calibración (Anexo 9)



Figura 2.2 Balanza analítica OHAUS-Discovery DV215-CD

Fuente: Laboratorio control de calidad

Bomba de vacío Millipore, para la volatilización de solventes:



Figura 2.3 Bomba de vacío millipore

Fuente: Laboratorio control de calidad

2.5.METODO

2.5.1. EXTRACCION DE MUESTRA

La técnica empleada para la extracción de las matrices de estudio (exceptuando los lácteos) pertenece a la AOAC 996.06⁴² para grasas en productos no lácteos, y no quesos.

Para la extracción de la muestra se procedió de la siguiente manera:

- Pesarse entre 100-200 mg de muestra homogenizada y agregar 100mg de ácido pirogálico, 2ml de etanol y mezclar
- Añadir 10ml de ácido clorhídrico 8.3M. y proceder a incubar la muestra, entre 70-80°C durante 40 minutos a baño maría. En la figura 2.4 se muestra dos tubos con muestra después de la digestión en baño maría.



Figura 2.4 Muestras después de la digestión en caliente

- Terminada la digestión, proceder a enfriar a temperatura ambiente y agregar 25ml de dietileter, centrifugar 5 minutos a 250 RPM, luego agregar 25ml de éter de petróleo y centrifugar 5 minutos a 250RPM. Repetir la centrifugación en caso la solución continúe turbia.

- Decantar el sobrenadante y proceder a la evaporación a sequedad usando el aire comprimido



Figura 2.5 Evaporación de solvente con aire comprimido

- Disolver la grasa extraída en 2ml de cloroformo y 2ml de dietil éter
- Evaporar a sequedad con aire comprimido y continuar hasta que se deje de percibir el olor a solvente.

En el caso de la muestra de crema de leche, el procedimiento empleado para la extracción pertenece a la AOAC 996.06 para productos lácteos. Y se procedió de la siguiente manera:

- Pesar entre 100 y 200mg de muestra y se agregar 100mg de ácido pirogálico, 2ml de etanol al 96°, 4ml de agua y 2ml hidróxido de amonio concentrado.
- Incubar en baño maría entre 70-80°C durante 40 minutos.
- Retirar los tubos de incubación y dejar enfriar al medio ambiente. Pasado este tiempo agregar gotas de fenolftaleína y observar si la solución vira un color rosáceo, de lo contrario agregar gotas de hidróxido de amonio.
- Mezclar con suavidad y continuar con la extracción como el método anterior.

2.5.2. DERIVATIZACION DE MUESTRA

Para la derivatización de las matrices de estudio se procedió de la siguiente manera:

- Al extracto seco obtenido, se agregó 2ml de trifloruro de boro y 1ml de tolueno grado GC.
- Incubar a 100°C durante 45 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente y agregar 5ml de agua destilada, 1ml de hexano.
- Agregar 1g de sulfato de sodio anhidro y esperar que la fase hexánica esté completamente límpida.
- Colocar el sobrenadante en un vial para cromatografía de gases y proceder al análisis.

2.5.3. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

El extracto de FAMES (Fatty Acid Methyl Ester) obtenido mediante la técnica de la AOAC, se coloca en un vial y se cuantifica mediante detector FID, haciendo uso de una columna de 100m de largo y 0.25mm de diámetro interior cubierto con una fase estacionaria de RT-2560, Bicianopropil polisiloxano 100% con un espesor 0.20µm.

Los parámetros empleados en el equipo para la detección y cuantificación de los FAMES fueron los siguientes:

- Volumen de inyección: 8µl
- Temperatura de inyección : 250 °C
- Modo: Split
- Split ratio: 100
- Presión: 279,3
- Flujo total: 137,4
- Flujo de la columna: 1,33
- Temperatura inicial de la columna: 100°C

- Temperatura de estabilización: 240°C

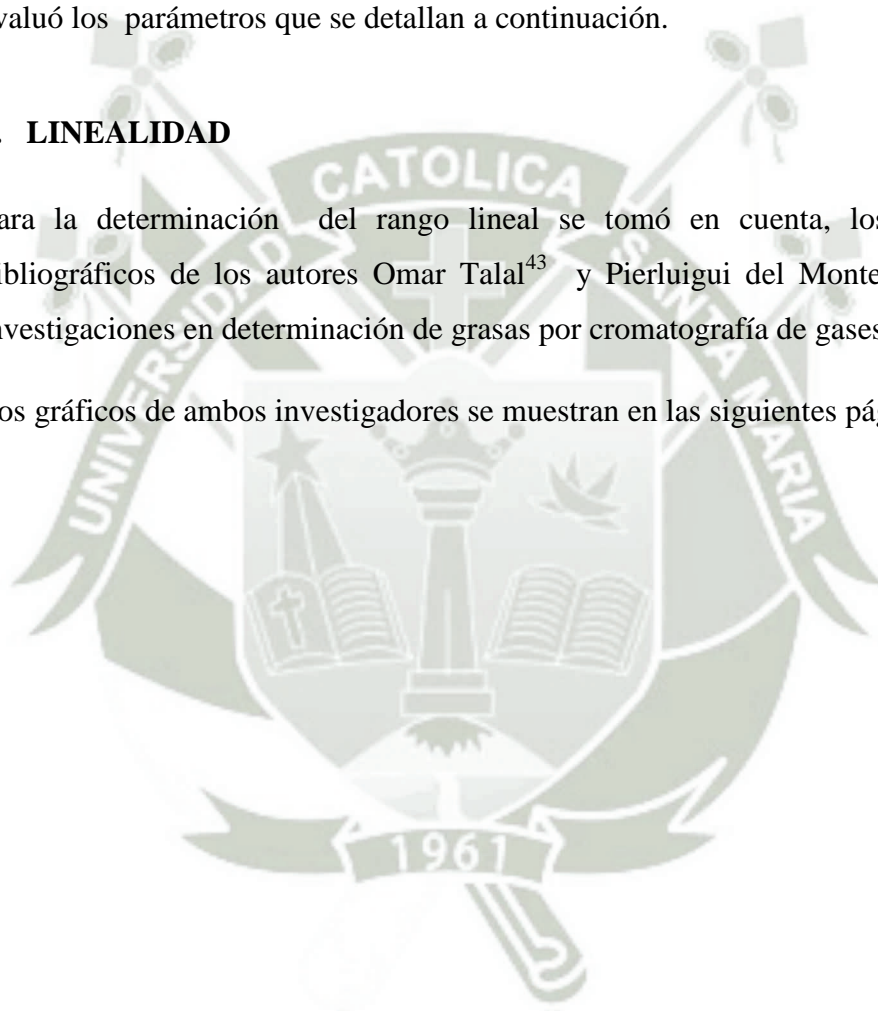
2.6.VALIDACION

Para realizar la validación de la técnica de cuantificación de ácidos grasos trans presentes en el estándar mix de FAMES #35077 de la marca RESTEK (Trans-octadecanoico (elaidico) C 18:1 trans-9 y Trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12) se evaluó los parámetros que se detallan a continuación.

2.6.1. LINEALIDAD

Para la determinación del rango lineal se tomó en cuenta, los antecedentes bibliográficos de los autores Omar Tala⁴³ y Pierluigui del Monte⁴⁴; ambos con investigaciones en determinación de grasas por cromatografía de gases.

Los gráficos de ambos investigadores se muestran en las siguientes páginas:



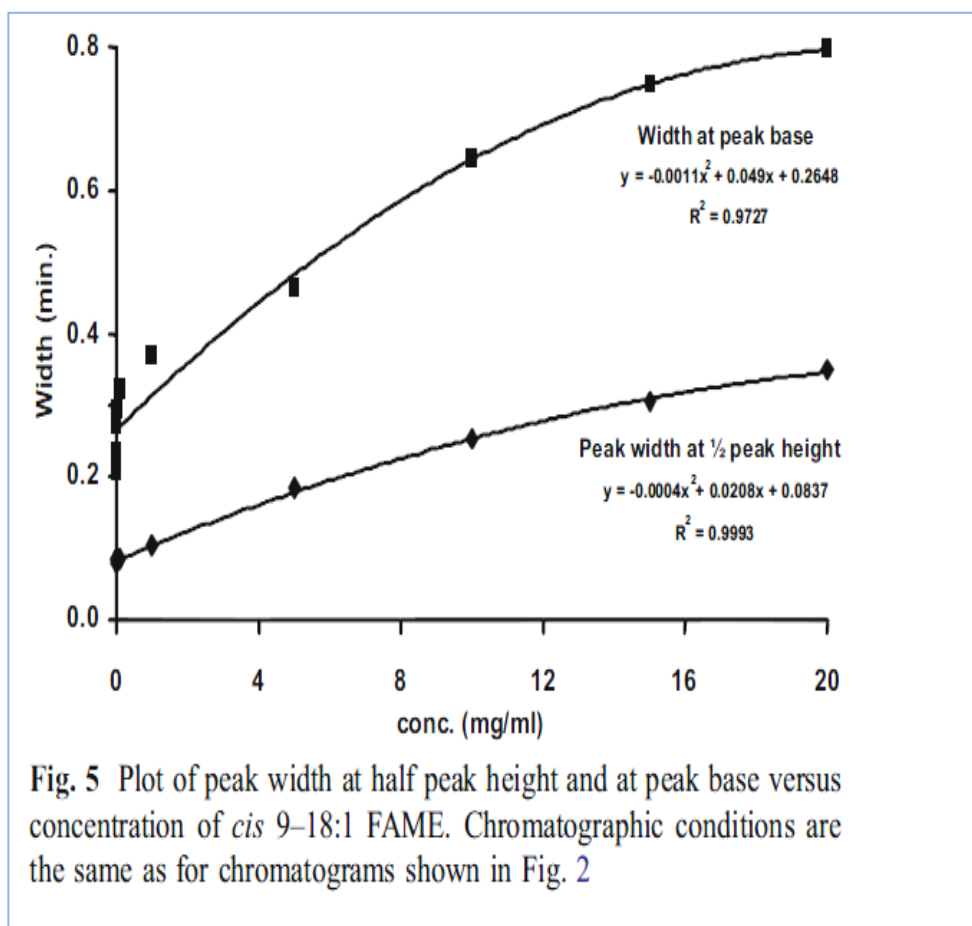


Figura 2.6 Aumento del tiempo de retención

Fuente: Del Monte P. Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of Trans fat.⁴⁴

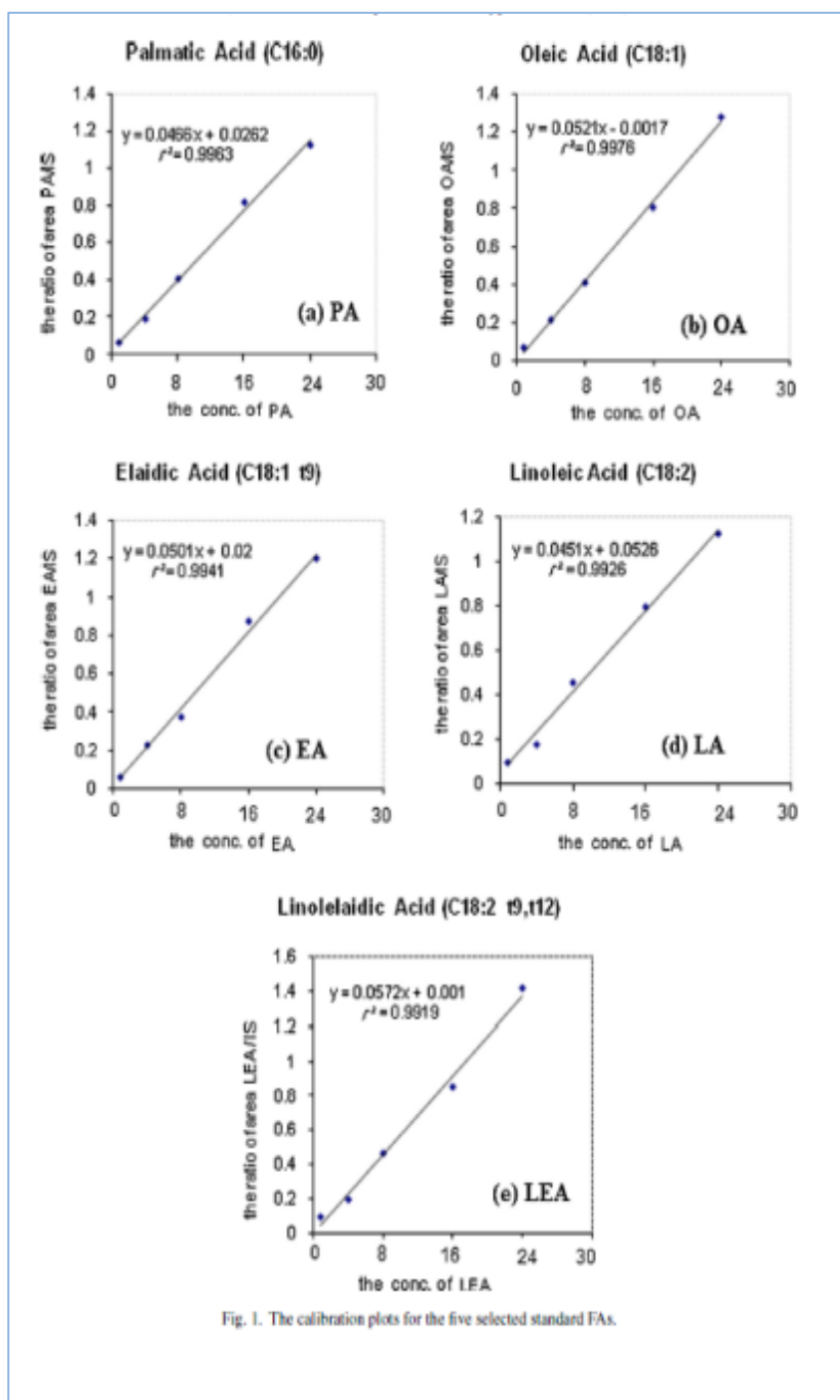


Figura 2.7 Respuesta lineal

Fuente: Talal O. Validation and application of a gas chromatographic method for determining fatty acids and trans fats in some bakery products.⁴³

Por esta razón se decidió tomar los puntos 1, 5, 10,15 y 20ppm. Para lo cual se elaboró una solución madre a partir del estándar de 200ppm, los volúmenes correspondientes para cada concentración de la gráfica de calibración se indican en la tabla 3.1.

Posteriormente a la obtención de los datos para la gráfica de linealidad, se procedió al tratamiento estadístico.

Tabla 2.1 Intervalos en la curva de calibración

Intervalos en la curva de calibración		
Unidad	ml	Aforo
1ppm	0,025	5ml
5ppm	0,125	5ml
10ppm	0,250	5ml
15ppm	0,375	5ml
20ppm	0,500	5ml

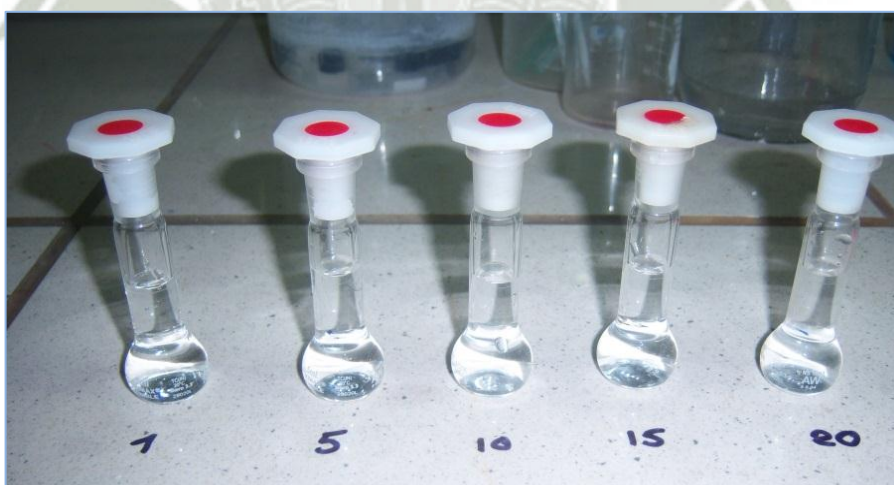


Figura 2.8 Intervalos para la gráfica de calibración

2.6.2. SENSIBILIDAD

La sensibilidad fue determinada mediante una gráfica de calibración, a partir de la cual se obtuvo los valores del límite de detección y el límite de cuantificación.

Para la formación de la gráfica de calibración se siguió el mismo proceso que para la linealidad y se tomaron las mismas concentraciones.

2.6.2.1. LIMITE DE DETECCION Y LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de detección corresponde a la concentración mínima que puede ser detectada por el instrumento usado en el análisis, y que arroja una señal cualitativa, mientras que el límite de cuantificación corresponde a la concentración mínima en que el instrumento puede producir una señal cuantificable.

El límite de detección y cuantificación de la técnica, se calculó para las señales correspondientes a los ácidos Trans-octadecanoico (elaidico) C 18:1 trans-9 y Trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12. El cálculo se realizó mediante la aplicación de fórmulas matemáticas de los resultados obtenidos de las curvas de calibración.

Las ecuaciones utilizadas para la determinación del límite de detección y de cuantificación son las siguientes:

$$LD = \frac{3\sigma \cdot b}{s}$$

Figura 2.9 Ecuación para determinar el límite de detección

Fuente: Bravo Y. Validación de técnicas analíticas⁴⁰.

$$LC = \frac{10\sigma \cdot b}{s}$$

Figura 2.10 Ecuación para determinar el límite de cuantificación

Fuente: Bravo Y. Validación de técnicas analíticas⁴⁰.

Dónde:

- LD= Concentración del límite de detección (mg/mL)
- LC= Concentración del límite de cuantificación (mg/mL)
- σ = Desviación estándar de la regresión (área).
- b = intercepto de la curva de calibración (área)
- S= pendiente de la curva de calibración (área* mL/mg).

2.6.3. PRECISION

Para la determinación de la precisión se realizaron las pruebas de repetibilidad y de precisión intermedia, ambos análisis se realizaron con la muestra matriz de estudio (cobertura de chocolate para helado).

La aceptabilidad de los resultados fue determinada mediante los valores obtenidos de la desviación estándar, el coeficiente de variación y la ecuación de Horwits modificada o ecuación de HoRrAT. En la cual para que el valor obtenido sea aceptado, debe ser menor o igual a dos (≤ 2) para este caso, puesto que valor es determinado en base a tablas.

$$HoRrat = \frac{RSD \text{ experimental}}{RSD \text{ ecuacion de Howits}} \rightarrow \frac{Sx}{\sigma H} \leq 2$$

Figura 2.11 Ecuación de HoRAT

Fuente: Bravo Y. Validación de técnicas analíticas 40.

Dónde:

- S_x : desviación estándar relativa expresada en porcentaje
- σH : coeficiente de variación de Horwits

Concentración de analito	CV de Horwitz
10 %	2.8 %
1 %	4.0 %
0.1 %	5.6 %
0.01 %	8.0 %
1 Ppm	16 %
1 Ppb	45 %

Figura 2.12 Tabla de coeficiente de variación de Horwitz

Fuente: Bravo Y. Validación de técnicas analíticas 40.

2.6.3.1. REPETIBILIDAD

La repetibilidad se determinó mediante el análisis de diez muestras, bajo el mismo tratamiento de análisis y derivatización, mismo equipo, mismos parámetros mismo analista y durante el mismo día.

2.6.3.2. PRECISIÓN INTERMEDIA

La precisión intermedia se determinó mediante el análisis de diez muestras, bajo el mismo tratamiento de análisis y derivatización, mismo equipo, mismos parámetros mismo analista pero durante diferentes días (analizando una muestra por día)

2.6.4. EXACTITUD

El termino exactitud indica la proximidad de la media de una serie de datos al valor que se acepta como verdadero. Por tanto para la determinación de la exactitud se tomó el promedio de los resultados analizados de 10 corridas del estándar a la misma concentración y se contrasto versus el valor indicado por el fabricante del estándar (Ver anexo 5).

Los datos se analizaron mediante la ecuación del porcentaje de error determinado, en la cual se estima la diferencia entre el valor aproximado y el valor verdadero. Señala la cercanía del resultado al valor real.

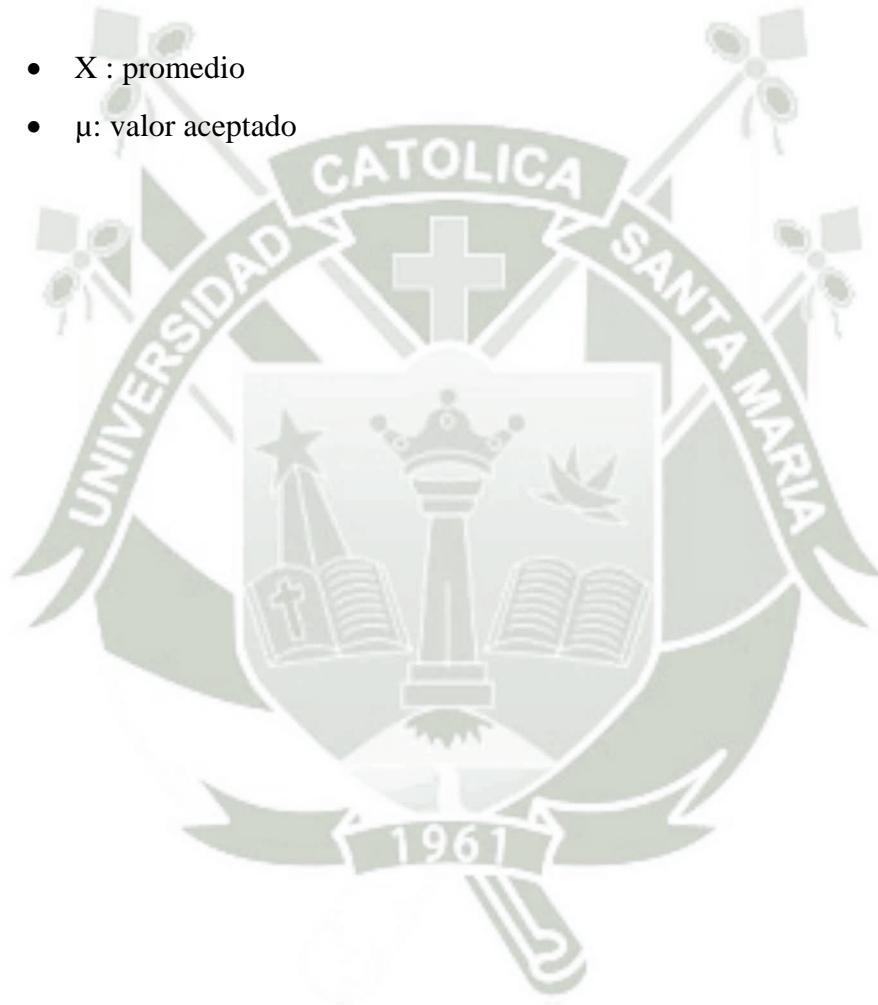
$$\text{porcentaje de Edet} = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100$$

Figura 2.13 Ecuación de porcentaje de error determinado

Fuente: Técnicas Numericos-estadistica45

Dónde:

- X : promedio
- μ : valor aceptado



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 LINEALIDAD RESULTADOS

La linealidad fue determinada para los ácidos grasos trans ácidos grasos Trans-linoleaidico y Trans-octadecanoico (elaidico), los cuales fueron analizados por detector GC/FID y extraídos de la gráfica de calibración preparada a partir de las diluciones del mix de FAMES #35077.

Para la elaboración de la gráfica de calibración, se realizó la previa determinación del rango lineal. El mismo que se definió en base a bibliografía reciente de autores que trabajaron con la matriz de ácidos grasos (Omar Talal⁴³ y Pierluigui del Monte⁴⁴). El primero de ellos Talal O. obtuvo resultados adecuados para la respuesta lineal, con valores entre 0-30ppm, mientras que en la investigación de Del Monte P. se halló que el tiempo de retención en el cromatograma aumenta de forma proporcional a la concentración.

Tomando como base estos estudios, se adoptó los puntos 1, 5, 10, 15 y 20ppm para la realización de las gráficas de calibración.

Cada gráfica de calibración se realizó por duplicado, y se preparó una gráfica para cada ácido graso trans presente en el estándar (ácidos grasos Trans-linoleaidico y Trans-octadecanoico (elaidico))

La gráfica de calibración para el ácido graso trans-linoleaidico obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0,9977, el cual se obtuvo de la siguiente tabla, la cual contiene los resultados obtenidos por cada gráfica de calibración.

Tabla 3.1 Valores expresados en área de ácido-linoleaidico

Áreas obtenidas para el ácido trans-linoleaidico		
Ppm	A	B
1	201,1	268,6
5	503,2	570,7
10	878,0	954,7
15	1319,4	1322,0
20	1638,7	1595,8

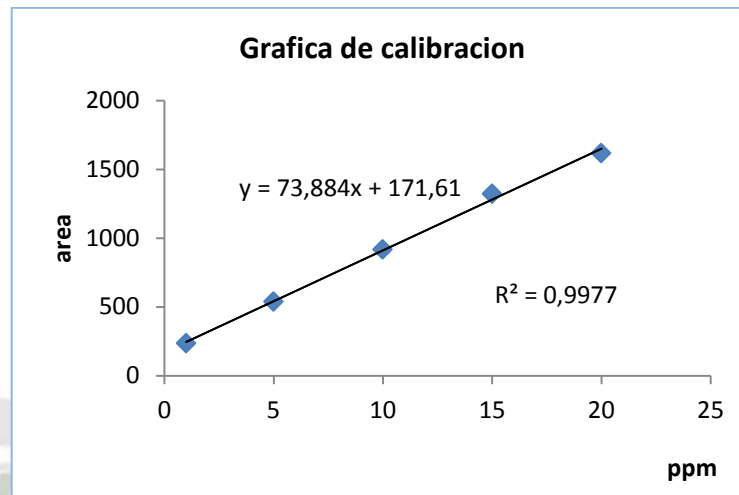


Figura 3.1 Curva de calibración para el ácido trans-linoleaidico como metil ester

Tabla 3.2 ANOVA ácido graso trans linoleaidico

ANÁLISIS DE VARIANZA						
OV	SC	GL	PC	F	P	VF
Entre grupos	3900,625	1,000	3900,625	0,015	0,905	5,318
Dentro de los grupos	2075627,144	8,000	259453,393			
Total	2079527,769	9,000				

Como se muestra en la tabla 3.2 la tabla ANOVA descompone la varianza del ácido trans linoleico en dos componentes: Un componente entre grupos y componente dentro de grupos. La razón F que en este caso es igual a 0,015 es el cociente estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P de la prueba F es mayor que 0,05 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos graficas de calibración del ácido trans linoleaidico. Esto con un nivel de confianza del 95%.

La curva de calibración para el ácido graso trans-octadecanoico (elaidico) obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0,9980, siendo este valor aceptado por

sobrepasar el mínimo admisible de 0,995 por la ICH y la Norma de validaciones Chilena⁴⁶.

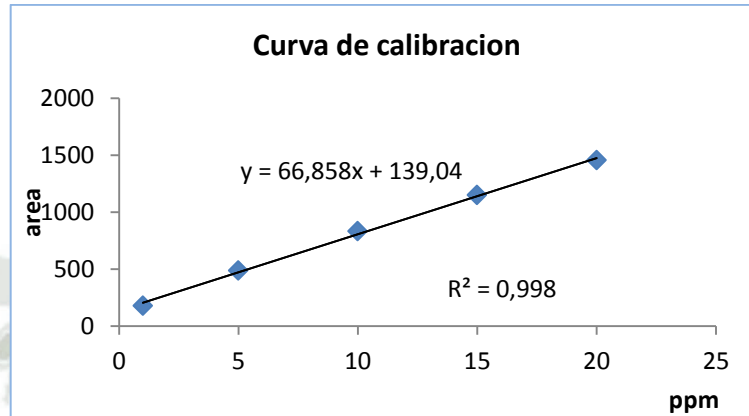


Figura 3.2 Curva de calibración para el ácido trans-octadecanoico (elaidico) como metil éster

Para confirmar que no existe diferencia significativa entre los datos se realizó el análisis estadístico ANOVA, mediante el cual se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 3.3 Análisis de varianza ácido trans-octadecanoico (elaidico)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
OV	S C	GL	P C	F	P	VF
Entre grupos	2937,796	1,000	2937,796	0,009	0,926	5,318
Dentro de los grupos	2530989,400	8,000	316373,675			
Total	2533927,196	9,000				

Se muestra en la tabla 3.3 de ANOVA la razón F en este caso es igual a 0,009, es el cociente estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor P es mayor a 0,05 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de ambas gráficas de calibración para el ácido trans-octadecanoico (elaidico). Esto con un nivel de 95,0% de confianza.

3.2 SENSIBILIDAD RESULTADOS

La sensibilidad se determinó por la técnica de las gráficas de calibración, las cuales fueron tomadas de las gráficas de calibración utilizadas para la determinación de la linealidad.

De estas gráficas, se realizó el análisis matemático correspondiente al cálculo del límite de detección y de cuantificación. Para lo cual se elaboró graficas de dispersión de datos usando los coeficientes de variación, a partir de este paso se determinó la ecuación de la recta y se procedió al reemplazo de los datos para el límite de detección y cuantificación.

- Límite de detección:

$$LD = \frac{3\sigma \times b}{s}$$

Reemplazando:

$$LD = 1,656 \text{ ppm}$$

- Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10\sigma \times b}{s}$$

Reemplazando:

$$LC = 3,842 \text{ ppm}$$

Con los resultados obtenidos, se observa que el límite de cuantificación es mayor que limite de detección para el caso del ácido trans-linoleaidico. Por tanto se puede asumir que va influir en los valores de sensibilidad del equipo la programación de integración que se le dé al software.

Para el caso del ácido trans-octadecanoico (elaidico) se realizó el mismo procedimiento que en el caso anterior y se obtuvieron los siguientes valores:

- Límite de detección

$$LD = \frac{3\sigma \times b}{s}$$

Reemplazando:

$$LD = 1,063ppm$$

- Límite de cuantificación

$$LC = \frac{10\sigma \times b}{s}$$

Reemplazando:

$$LC = 1,343ppm$$

Para el límite de detección del ácido graso trans octadecanoico (elaidico) se obtuvo el valor de 1,063mg/ml y para el límite de cuantificación el valor de 1,343mg/ml. De manera semejante que en el caso anterior se puede afirmar que el límite de cuantificación para este ácido graso es levemente mayor que su límite de detección.

Sin embargo se debe comentar que los valores de límite de cuantificación y detección de los ácidos grasos expresados como metil éster son distintos a pesar que ambos proceden del mismo estándar mix.

Además en ambos casos el límite de cuantificación es mayor que el de detección, por tanto, para el trabajo de esta técnica se debe tener especial consideración en la obtención de las concentraciones, eliminación de interferentes y uso correcto de software.

3.3. PRECISION RESULTADOS

La precisión indica la reproducibilidad de los resultados y se puede definir como la concordancia de dos o más medidas obtenidas de la misma manera y para la misma muestra. Esta se puede expresar en términos de la desviación estándar.

Como ya se mencionó anteriormente la presión fue determinada por dos técnicas el de repetibilidad y la precisión intermedia.

Para la determinación de la repetibilidad se procedió al tratamiento de diez muestras de cobertura solida de chocolate para helado, según lo estipulado en el procedimiento y estas se inyectaron en el cromatógrafo de gases GC/FID en el mismo día, por el mismo técnica, mismos parámetros y mismo analista.

En la siguiente tabla se expresan el promedio de los resultados obtenidos tras realizar la evaluación; El total de resultados se aprecian en el anexo 3:

Tabla 3.4 Promedio de los resultados - repetibilidad

COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO				
Ac. Graso	%	ppm	S	CV
Ac. Trans-linoleaidico	42,94	42943	0,007	0,017
Ac. Trans-octadecanoico (elaidico)	10,14	10140	0,001	0,013

Los ácidos grasos Trans-linoleaidico y trans-octadecanoico (elaidico) presentaron una desviación estándar menor al 1%, siendo este valor aceptado por la ICH, ya que el valor máximo permitido es de 2%. Por otro lado el coeficiente de variación presenta un valor menor 1%, encontrándose también este valor dentro de lo esperado ya que el valor máximo permitido por la AOAC es <8%.

En el caso de la determinación de la precisión intermedia esta se realizó a través del tratamiento de diez muestras de cobertura de chocolate sólida para helado, y una vez

listas las muestras para inyección estas se procesaron en el cromatógrafo de gases GC/FID, mediante el mismo técnica, mismos parámetros, mismo analista pero en diferentes días (se procesó una muestra por día).

El total de resultados se muestra en el anexo 4, y a continuación se muestra el promedio de ellos:

Tabla 3.5 Promedio de resultados- precisión intermedia

COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO				
Ac. Graso	%	ppm	S	CV
Ac. Trans-linoleaidico	42,90	42897	0,147	0,343
Ac. trans-octadecanoico (elaidico)	10,13	10129	0,008	0,078

Los ácidos grasos Trans-linoleaidico y trans-octadecanoico (elaidico) presentaron una desviación estándar menor al 1%, siendo este valor aceptado por la ICH ya que el valor máximo permitido es de 2%. Por otro lado el coeficiente de variación presenta un valor menor 1%, encontrándose también este valor dentro de lo esperado ya que el valor máximo permitido por la AOAC correspondiente al rango de concentración del analito es <8%.

La AOAC (Association of Official Analytical Chemists) indica que para los analitos que se encuentran entre un 0,1 - 1,0%, 1,0 - 10,0% y sobre 10%, el CV máximo permitido es de un 8%, 4% y 2%, respectivamente.

Para determinar la aceptabilidad de los resultados se aplicó la ecuación de HoRat, y se obtuvo como resultado en promedio para la repetibilidad 0,07 y para la precisión intermedia un promedio de 0,95. Siendo ambos valores por debajo de 2%. Se puede afirmar que la técnica tiene una precisión satisfactoria.

Los valores obtenidos de CV para la repetibilidad fueron superiores a los de la precisión intermedia, lo que se puede explicar por el cambio de día, ya que las otras

condiciones (analista e instrumento) no fueron variadas durante el estudio. De esta forma se puede concluir que el cambio de día de análisis de una muestra de cobertura sólida para helado afecta los parámetros que se está midiendo, sin afectar a que los resultados que se obtengan sean certeros.

3.4. EXACTITUD

La exactitud indica la proximidad de la medida de una serie de datos, al valor que se acepta como verdadero.

Para la determinación de este parámetro se empleó diez muestras de estándar diluidas a 1ppm y se inyectaron en el cromatógrafo de gases GC/FID, bajo los mismos parámetros, misma técnica y por el mismo analista.

Los resultados obtenidos se compararon versus la concentración indicada por el fabricante. En el anexo 5 se detallan los resultados obtenidos. Mientras que en la siguiente tabla se muestra el promedio de los resultados obtenidos expresados en porcentaje para los dos ácidos grasos expresados como metil éster:

Tabla 3.6 Promedio de resultados – exactitud

PROMEDIO-EXACTITUD						
	%	ppm	S	CV	%	ppm
					fabricante	fabricante
Ac. Trans-octadecanoico	1,99	19900	0,014	0,722	2	20000
Ac. Trans-linoleaidico	1,98	19840	0,031	1,543	2	20000

De la tabla de datos obtenida, se sustrajeron los valores necesarios para la determinación de la exactitud del ácido trans-octadecanoico (elaidico) por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{porcentaje de Edet} = \frac{X-\mu}{\mu} \cdot 100$$

Reemplazando:

$$\text{porcentaje de Edet} = 0.5\%$$

El valor de la exactitud obtenido para el ácido graso trans octadecanoico fue de 0,5% esto indica, que este es el valor del error existente entre el valor real y el valor obtenido.

En el caso de ácido graso trans linoleaidico se realizó el mismo proceso:

$$\text{porcentaje de Edet} = \frac{X - \mu}{\mu} \cdot 100$$

Reemplazando

$$\text{porcentaje de Edet} = 0,8\%$$

Para el caso del ácido graso trans linoleaidico se obtuvo 0,8% de error determinado, lo que nos indicaría que esta es la diferencia entre el valor obtenido y el valor esperado.

3.5. PRESENTACION DE LAS MATRICES ANALIZADAS

La determinación de ácidos grasos trans octadecanoico (elaidico) y ácido trans-linoleaidico fue aplicada en las matrices de snacks salados de dos marcas comerciales, cobertura de chocolate para helado y en sus posibles componentes (margarina para untar, manteca hidrogenada, pasta de cacao, crema de leche y cobertura de chocolate).

El detalle de los resultados de cada una de las matrices analizadas será presentado en los párrafos siguientes.

3.5.2 RESULTADOS SNACK SALADOS

Se realizaron los análisis a la matriz de bocaditos snack salados de dos marcas comerciales. Tomando de sus líneas de venta dos productos coincidentes en ambas marcas (chisitos y papas en hojuelas naturales).

El estudio de esta matriz se efectuó se debido a la abundante información bibliográfica que señala a estos alimentos (snack) como fuentes de ácidos grasos trans, y en segundo lugar para comprobar los datos registrados en la tabla de valores nutricionales.

Se analizó el perfil de ácidos grasos de 10 muestras por cada variedad de producto, haciendo distinción entre las marcas en el día de tratamiento, para evitar una posible contaminación cruzada.

En la siguiente tabla se muestran el promedio de los resultados obtenidos para cada una de las muestras analizadas:

Tabla 3.7 Promedio- Snack analizados

SNACKS COMERCIALES ANALIZADOS				
Ac. graso/ Marca %	MARCA A		MARCA B	
	Chisitos	Papas H	Chisitos	Papas H
Ac. palmítico (C16:0)	41,80	47,05	45,70	49,09
Ac. estearico (C18:0)	5,89	4,65	6,70	3,94
Ac. oleico (C18:1)	41,85	47,02	32,80	48,34

Tal como se observa en la tabla 3.7 las muestras analizadas pertenecientes a los bocaditos snack de las marcas comerciales analizadas, no presentaron dentro de su composición ácidos grasos trans.

Tras la evaluación de los resultados de la matriz, se pudo concluir que no se puede afirmar la presencia grasas trans en estos productos. Se cree que una de las razones

por las que no se detectan grasas trans, es por el énfasis que ha dado la FDA en la disminución de grasas trans en los alimentos, además de obligar al registro del valor de grasas trans en la tabla nutricional de cualquier alimento.

Por otra parte, actualmente en nuestro país la norma NTP209.655 (Norma para los ácidos grasos trans), también exige el registro del valor grasas trans en el etiquetado.

3.5.3 RESULTADOS EN COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO

Como segunda matriz de estudio se examinó cobertura de chocolate para helado. Para determinar la importancia del estudio de esta matriz se realizó una encuesta de frecuencia de consumo a los puntos expendedores de helado (*Ver anexo 8*).

Los resultados obtenidos en esta matriz fueron de carácter positivo, siendo estos contrarios a los encontrados en las muestras de snacks salados. Sin embargo no se encontró bibliografía específica sobre la matriz para poder contrastar los hallazgos.

En las siguientes tablas se muestra el promedio del perfil de ácidos grasos de las muestras analizadas de cobertura de chocolate sólido para helado de las dos marcas analizadas:

Tabla 3.8 Perfil de ácidos grasos muestra C

COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO MARCA C			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac. Cis-Palmitoleico	33,79	0,072	0,212
Ac. Trans-linoleaidico	42,94	0,201	0,468
Ac. Trans-octadecanoico (elaidico)	10,14	0,101	0,996
Ac. Araquidónico	9,55	0,004	0,037

En el perfil de ácidos grasos de la muestra C se encontró 42,94% en promedio de ácido graso trans linoleaídico y 10,14% de ácido graso trans octadecanoico (elaídico).

Tabla 3.9 Perfil de ácidos grasos muestra D

COBERTURA DE CHOCOLATE PARA HELADO MARCA D			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac. Pentadecanoico	6, 51	0,006	0,087
Ac.Cis-Palmitoleico	46, 80	0,450	0,961
Ac. Trans-linoleaídico	30 ,66	0,050	0,163
Ac. trans-octadecanoico (elaídico)	8 ,33	0,053	0,636
Ac. Araquidónico	6 ,91	0,003	0,041

En el perfil de ácidos grasos de la muestra D se encontró 30,66% de ácido graso trans linoleaídico y 8,33% de ácido trans octadecanoico (elaídico), siendo que el valor máximo permitido por la FAO¹ es de 1% y el de la FDA¹⁶ de 05%.

Tal como se observa en las tablas 3.8 y 3.9 ambas muestras comerciales presentan en su composición altas concentraciones de los dos ácidos grasos trans de estudio. Con este resultado se puede afirmar la presencia de grasas trans en la matriz y también hace necesaria la investigación de los probables componentes que sean la fuente de estos ácidos grasos.

Para ello se analizaron los posibles componentes de esta cobertura, usando como base la receta de cobertura de chocolate sólida tradicional-cacera e implementando algunos posibles ingredientes industriales.

Las matrices analizadas fueron:

- Chocolate para cobertura.
- Pasta de cacao.

- Manteca hidrogenada comercial.
- Crema de leche comercial al 50% de materia grasa
- Margarina para untar

3.5.4 RESULTADOS COBERTURA DE CHOCOLATE

Se analizaron dos muestras de cobertura de chocolate comerciales, cada una de las muestras fue analizada por quintuplicado y en las siguientes tablas se muestra el promedio del perfil de los ácidos grasos obtenidos.

Tabla 3.10 Perfil ácidos grasos marca E

CHOCOLATE PARA COBERTURA MARCA E			
Ac. Graso	%	S	CV
Cis-Palmitoleico	17,43	0,324	1,860
Ac. Cis-Octadecanoico	35, 68	0,739	2,070
Ac. trans-linoleaidico	7,72	0,054	0,699
Ac. Behenoico FAME	7, 72	0,019	0,243
Ac. cis-Eicosatrienoico	10,01	0,086	0,854
Ac. cis-Erucico	4,93	0,052	1,060
Ac. Tricosanoico	4,85	0,051	1,055

Tabla 3.11 Perfil de ácidos grasos muestra F

CHOCOLATE PARA COBERTURA MARCA F			
Ac. Graso	%	S	CV
Cis-Palmitoleico	31,08	0,224	0,722
Ac. Cis-Octadecanoico	29,25	0,192	0,657
Ac. trans-linoleaidico	5,66	0,072	1,269
Ac. cis-Nervonico	8,87	0,029	0,328

Como se observa en las Tablas 3.10 y 3.11 el perfil de ácidos grasos solo se evidencia la presencia del ácido graso trans linoleaidico C18:2 trans-9,12. Hallando en promedio 7,72% y 5,66% correspondientemente.

Los valores encontrados fueron contrastados con investigaciones ya existentes, como la de Cakmak Y.S et al³. Quien realizó un estudio en 35muestras de chocolate y 27 muestras de galletas wafer nacionales de Turquía, donde determinó que los valores de ácidos grasos trans en estas muestras oscilaban entre los 0,00-6,23%, mientras que Aftab⁴ A.K et al realizo un análisis semejante en chocolates de distintas marcas comerciales y obtuvo valores hasta de 8% de ácidos grasos trans en estas muestras. Por lo cual se puede aceptar el valor obtenido para las muestras de chocolate para cobertura como parámetro experimental, sin embargo excede el límite dado por la FAO

3.5.5 PASTA DE CACAO

Se analizó una muestra de pasta de cacao por quintuplicado, y el promedio de los resultados se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3.12 Perfil de ácidos grasos- pasta de cacao

PASTA DE CACAO			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac. Heptadecanoico	30,64	0,770	2,512
Ac. trans-linoleaidico	20,94	0,276	1,318
Ac. cis- linoleaidico	39,94	0,430	1,076
Ac. Butirico	2,59	0,014	0,541

Tal como se evidencia en la tabla 3.12 la composición de ácidos grasos trans presenta:

La ausencia del ácido graso trans octadecanoico (elaídico) C18:1 trans-9, en comparación con la presencia de este ácido graso en la cobertura de chocolate para helado. Sin embargo se aprecia que la concentración promedio de ácido graso trans linoleaídico C18:2 trans-9,12 es correspondiente a 20.94%.

La presencia de ácidos grasos trans en las muestras de pasta de cacao y de chocolate para cobertura, se debe a la existencia de aditivos usados en la industria y a las condiciones que se somete al chocolate durante la etapa del conchado.

3.5.6 CREMA DE LECHE

Se analizó por quintuplicado una muestra de crema de leche al 50% de materia grasa de una marca comercial. El promedio de los resultados encontrados se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3.13 Perfil de ácidos grasos muestra crema de leche

CREMA DE LECHE			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac.butirico	8,38	0,025	0,304
Ac caproico	70,93	0,078	0,086
Ac.palmitoleico	3,15	0,001	1,704
Ac.trans-linoleaídico	0,02	0,000	2,667
Ac.cis-linoleaídico	1,41	0,001	1,003
Ac.hecicosanoico	1,73	0,003	1,635
Ac.euricico	5,70	0,001	2,481
Ac.docosadienoico	3,85	0,007	1,837
Ac.lignoserico	4,05	0,001	0,503

Como se muestra en la Tabla 3.13 se evidencia la ausencia del ácido graso trans octadecanoico (elaidico) C18:1 trans-9, en comparación con la presencia de este ácido graso en la cobertura de chocolate sólida para helado.

Además se muestra que el porcentaje promedio presente de ácido graso trans linoleaidico en la muestra es de 0,02%, indicando que este porcentaje es mucho menor frente al hallado en la muestra de cobertura sólida para chocolate, lo cual descarta que esta matriz sea la fuente principal de ácidos grasos trans.

La pequeña cantidad de grasas trans presentes en la crema de leche se debe a la hidrogenación biológica propia de los rumiantes, que hace que formen pequeñas cantidades de grasas trans en parte de las grasas animales. Esto se menciona en la investigación sobre las implicaciones de los ácidos grasos trans en la dieta por María Castro-Martínez et al¹².

3.5.7 MANTECA HIDROGENADA RESULTADOS

Se analizó por quintuplicado una muestra comercial de manteca hidrogenada y se obtuvo el siguiente perfil de ácidos grasos:

Tabla 3.14 Perfil de ácidos grasos manteca hidrogenada

MANTECA HIDROGENADA			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac. Cis-Palmitoleico	17,6	0,002	1,0
Ac. Trans-linoleaidico	0,25	0,002	0,8
Ac. Cis- linoleaidico	11,51	0,002	0,0
Ac. Araquidónico	23,0	0,001	2,6
Ac. Cis-Eicosanoico	0,09	0,000	0,3

En la tabla se aprecia que la concentración promedio de ácido graso trans linoleaidico C18:2 trans-9,12 es correspondiente a 0,25% del total de la muestra analizada.

No se puede descartar la presencia de este producto en la elaboración de cobertura de chocolate para helado, sin embargo no aporta grandes concentraciones de grasas trans.

3.5.8 MARGARINA RESULTADOS

La matriz de margarina utilizada fue de origen comercial por tanto se empleó de la variedad para untar. Fue analizada por quintuplicado y el promedio del perfil de ácidos grasos se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3.15 Perfil de ácidos grasos muestra margarina

MARGARINA			
Ac. Graso	%	S	CV
Ac. Cis-Palmitoleico	88,55	0,02	0,02
Ac. Trans octadecanoico	2,09	0,005	1,91
Ac. cis- linoleaidico	5,99	0,08	1,34
Ac. heptadecanoico	5,256	0,19	1,90

El perfil de ácidos grasos de la matriz, muestra presencia de ácido graso trans octadecanoico (elaidico) C18:1 en una concentración promedio de 2,09%.

Tanto para la margarina como para la manteca hidrogenada, la cantidad de ácidos grasos trans en su composición, se debe al proceso de hidrogenación propio de su elaboración.

Además debido a la normatividad impuesta por la FDA e INDECOPI las industrias productoras de estos artículos son cada vez más exigentes con la calidad del producto final.



3.5.9 COMPARACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LAS MUESTRAS

La siguiente evaluación estadística realizó una comparación entre matrices que presentan el mismo ácido graso trans dentro de su composición. Para poder determinar si existe diferencia significativa entre cada una de ellas.

Las primeras matrices en ser evaluadas fueron aquellas que contienen ácido trans linoleaidico, y los resultados se muestran a continuación:

Tabla 3.16 Matrices que presentan ácido trans linoleaidico

Concentraciones de Ácido Trans. linoleaidico en %							
Repeti ciones	Cobertura Helado C	Cobertura Helado D	Chocolate E	Chocolate F	Pasta De cacao	Crema De leche	Manteca H
1	43,1984	30,60839	7,72408	5,662	21,13756	0,01428	0,24503
2	42,9610	30,71300	7,71130	5,6631	21,14399	0,01502	0,24619
3	42,6331	30,70301	7,79133	5,6601	20,62014	0,01516	0,24952
4	42,9603	30,61305	7,82454	5,6601	21,13440	0,01516	0,24469
5	42,9621	30,68303	7,72314	5,6612	20,65014	0,01451	0,24639

En la siguiente tabla se muestran las matrices que presentan ácido trans-linoleaidico en su composición.

Tabla 3.17 ANOVA para Trans linoleaidico por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor- P
Entre grupos	8,209	6	1368,	78664,11	0,0000
Intra grupos	0,487	28	0,01739		
Total (Corr.)	8,210	34			

La tabla ANOVA descompone la varianza del ácido Trans linoleaidico en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 7,866, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es

menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ácido Trans linoleaidico entre un nivel de muestra y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

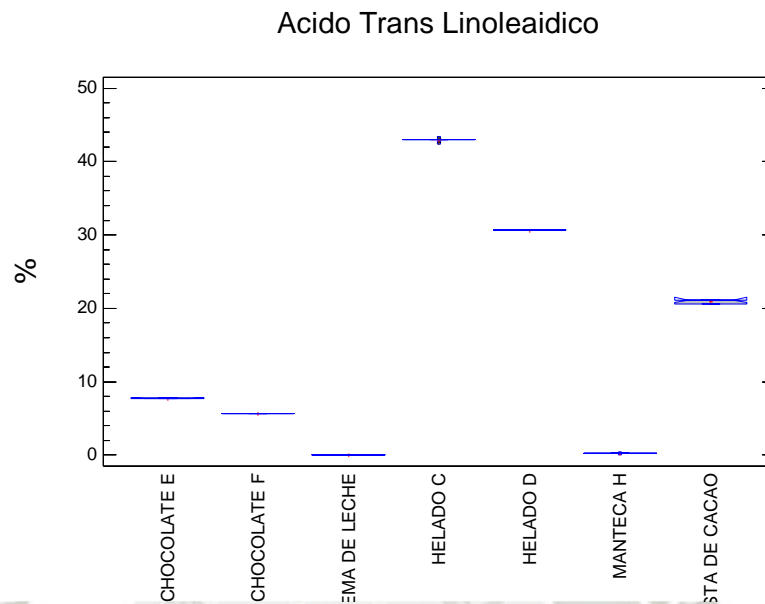


Figura 3.3 Gráfico de caja y bigotes

Esta gráfica despliega 7 diagramas de caja y bigote, una para cada nivel de muestra. La parte rectangular de la gráfica se extiende desde el cuartil inferior hasta el cuartil superior, cubriendo la mitad central de cada muestra. Los bigotes se extienden desde la caja hasta los valores mínimo y máximo de cada muestra, excepto para cualquier punto alejado ó muy alejado, los cuales se grafican en forma individual.

En la siguiente página se exponen los resultados hallados para el ácido trans octadecanoico (elaidico):

Tabla 3.18 Matrices que presentan ácido trans octadecanoico (elaidico)

Concentraciones de Ácido Trans-octadecanoico en %			
Repeticiones	Cobertura helado C	Cobertura helado D	Margarina
1	10,15208	8,29968	2,0901
2	9,96275	8,39206	2,0888
3	10,19514	8,29202	2,0989
4	10,19514	8,30216	2,0957
5	10,19514	8,39701	2,0903

En la tabla se muestran las matrices que presentan ácido trans-octadecanoico (elaidico) en su composición.

Tabla 3.19 ANOVA para Trans octadecanoico (elaidico) por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	178,3	2	89,16	20567,73	0,0000
Intra grupos	0,05202	12	0,004335		
Total (Corr.)	178,4	14			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Trans octadecanoico en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 2,057, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Trans octadecanoico entre un nivel y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

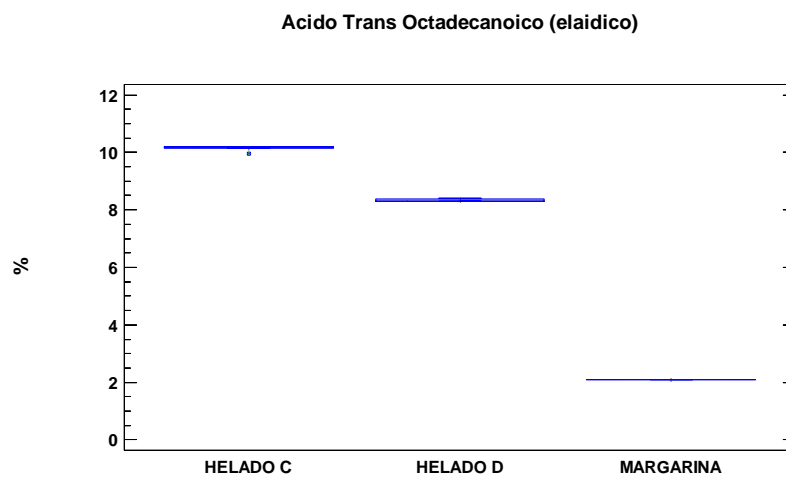


Figura 3.4 Gráfico de caja y bigotes

Esta grafica despliega tres diagramas de caja y bigotes, en los cuales se ratifica la diferencia estadística entre las muestras.

CONCLUSIONES

1. Se desarrolló satisfactoriamente la técnica analítica para la determinación de ácidos grasos trans. Tomando como base la técnica de la AOAC 996.06.
2. Se comprobó el cumplimiento de la linealidad de la técnica para la determinación de ácidos grasos trans linoleaidico y trans octadecanoico (elaidico), en el intervalo de concentraciones que se estudiaron por su elevado valor de los coeficientes de correlación ambos cercanos a 1. Se determinó también que la técnica es sensible, precisa y exacta.
3. Se determinó el perfil de ácidos grasos para cada una de las matrices, y se encontró principalmente la presencia de ácido trans-linoleaidico en proporciones que van de 0,01-50% según cada una de ellas.
4. Las matrices analizadas de cobertura de chocolate para helado, chocolate para cobertura y pasta de cacao expusieron niveles de grasas trans(50% , 15% y 20%) por encima de lo sugerido por la FAO <1% y lo permitido por la FDA <0.5%.
5. Se realizó una comparación estadística entre las matrices que presentaban el mismo ácido graso trans en su composición y se determinó que existe diferencia significativa entre la cantidad grasa trans presente en cada matriz.

RECOMENDACIONES

Al público consumidor se le recomienda:

- Se recomienda al público consumidor el revisar el etiquetado nutricional de los alimentos que adquiera para su consumo.
- Evitar la cobertura de chocolate como alternativa de aditivo para el helado.

En el sector industrial se recomienda:

- Buscar alternativas de grasas industriales diferentes a las hidrogenadas ya que estas son en gran parte la fuente de ácidos grasos trans (grasas técnicas)
- Seguir las recomendaciones en cuanto límite permisible de ácidos grasos trans dada por la FAO

Para el análisis de muestras por esta técnica se sugiere:

- Asegurarse de realizar la técnica bajo un ambiente de temperatura contralada y considerando solo la cantidad de iluminación necesaria
- El tratamiento de las muestras deberá ser durante el día de proceso para evitar la degradación de la grasa.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. FAO. Alimentación y nutrición, Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Ginebra.2008
2. KNIGHT, I. Chocolate and cocoa: health and nutrition. EEUU: I. (ed) Oxford.2000
3. KAMAK, Selim, Yavuz. Trans fatty acid contents in chocolates and chocolates wafers in Turkey. Selcuk University. Turkey.2010
4. AFTAB, A.K et all. Consequence of fatty acids profile including trans-fat in chocolate and pastry samples. Pakistan 2013
5. FAO. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. EEUU.2003
6. FEDNA. Aceites y grasas. España.2001
7. PUEYRREDON, Paula et al. Aceites y grasas trans; actualizacion y situación en Argentina. Argentina.1999
8. TAVELLA Marcelo, Et al; Ácidos grasos trans conceptos e implicancias clínicas, Argentina.2001
9. SEMMA, Masori. Trans fatty acids; propiedades benefictas an risks. Japan.2001
10. Principios de la química. Universidad de Alcala.1994
11. GUNSTOME & NORRIS. Stability in trans fatty acids. EEUU.1982
12. CASTRO M María Et al; Ácidos grasos trans de la dieta y sus implicancias metabólicas, Artículo de revisión; México; 2010
13. FDA. Hablemos de grasas trans. EEUU.2006
14. SERRA, Luis y Aranceta, Javier. Nutrición y salud pública: técnicas, bases científicas y aplicaciones. 2ª ed. Barcelona, Masson, 2006
15. HUNTER et all. Trans fats and nutrition.EEUU.1988
16. FDA, Trans Fatty Acids in Nutrition. Guidance for Industry.2003
17. NTS N093-MINSA-DIGESA-V.01, Norma técnica de salud que establece las directrices generales para la consideración de ácidos grasos trans (AGT) en el etiquetado de los alimentos elaborados industrialmente, Perú; 2012

18. R.M N°202-2012/MINSA Derogación de la norma NTS N093-MINSA-DIGESA-V.01
19. NTP209.655 Norma técnica para el etiquetado de ácidos grasos trans.Peru.2012
20. RONALD A. Hites; Gas Chromatography Mass Spectrometry; Indiana University; EEUU
21. J. T. Watson and K. Biemann, Gas chromatography. EEUU.2005.
22. RODRIGUEZ, Magadan Héctor. Cromatografía de gases.Mexico.2004
23. DABRIO, M.V.Cromatografía de gases. Vol. I. Ed. Alhambra, S.A. España.1971
24. JENNINGS, W. Analytical Gas Chromatography. Academic Press, Inc. Canada.1987
25. NTP209.226 Norma técnica para bocaditos. Peru.2011
26. CODEX STAN 87-1981, Rev. 1 – 2003. Standard for chocolate and chocolate products
27. CODEX STAN 87,1-1981. Tipos de chocolate y sus componentes.
28. CODEX STAN 288-1976. Natas (cremas) y las natas (cremas) preparadas
29. CODEX ALIMENTARIOS-FAO. Compendio de normas de productos lácteos. EEUU.2006
30. CODEX STAN 32-1981 Norma del codex para la margarina
31. CODEX STAN 211-1999 Norma del codex
32. CODEX STAN 32-1981 (Rev. 1-1989) Norma del codex para la margarina
33. Departamento de química analítica de Valencia. Formación de grasas trans. España.1999
34. WOLKE,L, Robert. Lo que Einstein le conto a su cocinero. España.2009
35. BRATA, Francis. Derivatization reaction and reagents for GC. Kenya.2012
36. GRACIDA, Ulises. Derivatización de analitos. Universidad de Yucatan.Mexico.2012
37. ATKINS et All. Shiver & Atkins Química Inorgánica. Cuarta Edición. México.2006

38. Validación de técnicas y determinación de la incertidumbre de la medición:
“Aspectos generales sobre la validación de técnicas”. Chile.2010
39. ISO-15189. Requerimiento técnicos para la acreditación
40. BRAVO, Yerko. Validación de técnicas analíticas. España. 2012
41. ISO-3534 Vocabulario y símbolos para la validación
42. AOCS Official method 996.06; Preparation of methyl esters of long- chain fatty acids
43. TALAL. Omar et all. Validation and application of a gas chromatographic method for determining fatty acids and trans fats in some bakery products.Malaysia.2013
44. DEL MONTE, Pierluigui. Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of Trans fat. EEUU.2007
45. VILLAFUERTE, Santiago. Técnicas numéricas de la estadística. 2010
46. Validación de técnicas y determinación de la incertidumbre de la medición:
“Aspectos generales sobre la validación de técnicas”. Chile.2010
47. AOCS Official method of analysis; 17th edition, Revision 1, 2002

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación de la linealidad y sensibilidad

La determinación de la linealidad y la sensibilidad se realizó a través de una curva de calibración de los ácidos grasos trans presentes en el estándar mix de FAMES #35077.

Para contrastar las corridas hechas para los diferentes puntos de la validación se hizo una corrida madre de estándar puro.

1.1.Preparación de la solución madre

Se preparó una solución madre del estándar mix de Fames a 200ppm, la cual se llevó a volumen de 25ml en fiola. Posteriormente esta se conservó en frío en tubo con tapa cerrado.

Para realizar esta solución madre se tomó 170 μ l del estándar con micropipeta de 100-1000 μ l graduable.

1.2.Construcción de las curvas de calibración

Se prepararon 5 diluciones des de la solución madre y se inyectaron en el cromatografía de gases. Con los datos obtenidos de cada área se procedió a la construcción de la curva de calibración. En la Tabla 1y2 se muestras las concentraciones y sus áreas respectivas.

Tabla 28 Concentración y área obtenida para la curva de calibración del ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico)

C18:1 trans-9				
ppm	1 medida	2 medida	promedio	s
1	193,8	165,2	179,5	20,22
5	499,5	474,8	487,15	17,47
10	862,2	804,5	833,35	40,80
15	1126,5	1172,1	1149,3	32,24
20	1521,7	1389,6	1455,65	93,41

En la tabla 1 se muestran las áreas obtenidas, el promedio y la desviación estándar para cada punto de la linealidad del ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico).

Tabla 29 Concentración y área obtenida para la curva de calibración del ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12

C18:2 trans-9,12				
	1 medida	2 medida	promedio	s
1	201,1	268,6	234,85	47,73
5	503,2	570,7	536,95	47,73
10	878	954,7	916,35	54,24
15	1319,4	1322	1320,7	1,84
20	1638,7	1595,8	1617,25	30,33

En la tabla 2 se muestran las áreas obtenidas, el promedio y la desviación estándar para cada punto de la linealidad del ácido trans-linoleico C18:2 trans-9,12.

Tabla 30 Prueba T de Student para ácido trans-linoleico C18:2 trans-9,12.

	Variable 1	Variable 2
Media	908,08	942,36
Varianza	341910,767	290836,583
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,99892645	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	-1,46390375	
P(T<=t) una cola	0,10853274	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184679	
P(T<=t) dos colas	0,21706549	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Tabla 31 Prueba T de Student para el ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico)

	Variable 1	Variable 2
Media	840,74	801,24
Varianza	270200,483	248706,303
Observaciones	5	5
Coefficiente de correlación de Pearson	0,99290958	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,37580312	
P(T<=t) una cola	0,12044655	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184679	
P(T<=t) dos colas	0,24089311	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Las tablas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos por la prueba estadística T de Student, aplicada para los ácidos grasos trans trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 y trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico).

ANEXO 2

Determinación del límite de detección y de cuantificación.

La determinación de los límites de detección y de cuantificación se realizó por la técnica de las curvas de calibración y para ello se utilizó los puntos realizados para la determinación de la sensibilidad.

1.3.Preparación de la solución madre.

Se preparó 5 soluciones las cuales se llevaron a 5ml en medio hexànico. En la siguiente tabla se muestra la cantidad tomada de la solución madre de 200ppm.

Tabla 32 Cantidad en μ l usada para cada punto

Puntos para la curva de calibración	
ppm	μ l
1	25
5	125
10	250
15	500
20	600

ANEXO 3

Repetibilidad

En la tabla 6 se muestran los datos de porcentajes obtenidos en cada análisis de las 10 muestras de cobertura de chocolate sólida para helado, analizadas en el mismo día, por el mismo analista y en el mismo equipo, en la misma tabla se muestra el porcentaje (éster metílico), promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada ácido graso, parámetros con los cuales se evaluó la repetibilidad para ellos.

Tabla 33 Muestras de cobertura de chocolate para determinar la repetibilidad

%	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Prom	DE	CV
Ac. Trans-linoleaidico	42,9431	42,9424	42,9567	42,9475	42,95262	42,94008	42,9339	42,9355	42,9389	42,9399	42,943	0,007	0,017
Ac. Trans-octadecanoico (elaidico)	10,1401	10,1399	10,1402	10,1389	10,1411	10,1405	10,1387	10,1397	10,1412	10,1432	10,140	0,001	0,013

ANEXO 4

Precisión Intermedia

En la tabla 7 se muestran los datos de porcentajes obtenidos en cada análisis de las 10 muestras de cobertura de chocolate sólida para helado, analizadas en diferentes días, por el mismo analista y en el mismo equipo, en la misma tabla se muestra el porcentaje, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada ácido graso, parámetros con los cuales se evaluó la precisión intermedia para ellos.

Tabla 34 Muestras de cobertura de chocolate para determinar la precisión intermedia

%	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Prom	DE	CV
Ac. Trans-linoleaidico	42,8996	43,0212	42,8587	42,8865	42,7989	43,2106	42,9565	42,8794	42,6598	42,7982	42,897	0,147	0,343
Ac. trans-octadecanoico (elaidico)	10,1401	10,1099	10,1299	10,1317	10,1275	10,1278	10,1315	10,1258	10,1347	10,1318	10,129	0 008	0,078

ANEXO 5

Exactitud

En la tabla 8 se muestran los valores obtenidos para el trabajo de la exactitud:

Tabla 35 Muestras los valores obtenidos para el trabajo de la exactitud

%	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	Prom	CV	DE
Ac. Trans	1,984	2,002	1,987	1,998	1,985	1,988	1,997	1,956	2,007	1,999	1,990	0,014	0,722
Ac. Trans linoleaidico	1,998	1,985	1,979	1,899	1,997	1,999	2,001	1,992	1,988	1,999	1,984	0,031	1543

ANEXO 6

Muestras

Se analizaron 10 muestras de snack salados comerciales, 5 muestras de cobertura de chocolate sólida para helado, 5 muestras de chocolate para cobertura, 5 muestras de pasta pura de cacao, 5 muestras de manteca hidrogenada y 5 muestras de margarina para untar.

En las siguientes tablas se mostrara el resumen estadístico de las muestras con respecto a su contenido de ácidos grasos trans, el grafico de distribución normal y cromatograma ejemplo.

1.4.Snacks Salados

Para el caso de los snacks salados como ya se mencionó no se ha encontrado presencia de ácidos grasos trans por tanto solo se observara en la página siguiente el cromatograma de la muestra.

1.5.Cobertura de chocolate sólida para helado

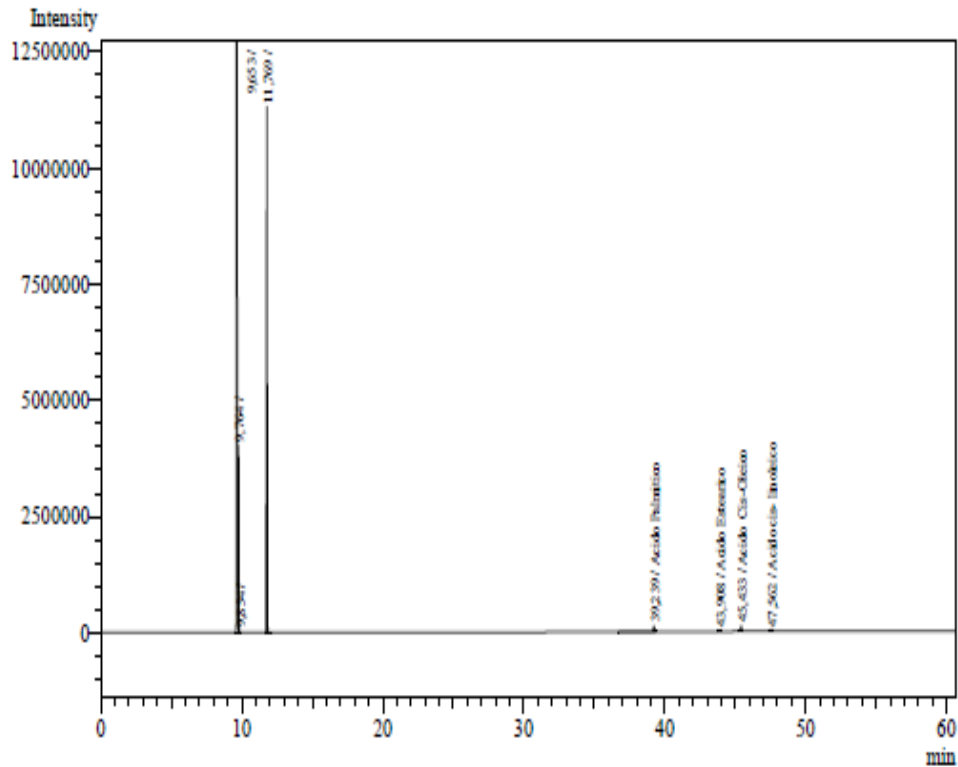
En la siguiente página se muestra un cromatograma de la muestra. A continuación se muestra a estadística aplicada.

Tabla 36 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico) en cobertura de chocolate

Recuento	5
Promedio	10,14
Desviación Estándar	0,1009
Coefficiente de Variación	0,9946%
Mínimo	9963
Máximo	10,2
Rango	0,2324
Sesgo Estandarizado	-1,88
Curtosis Estandarizada	1951

Analysis Date & Time : 15/01/2014 09:12:43 a.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 1
 Sample Name : 15-01-14 ml
 Sample ID : 15-01-14 ml
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 1,00
 ISTD Amount :

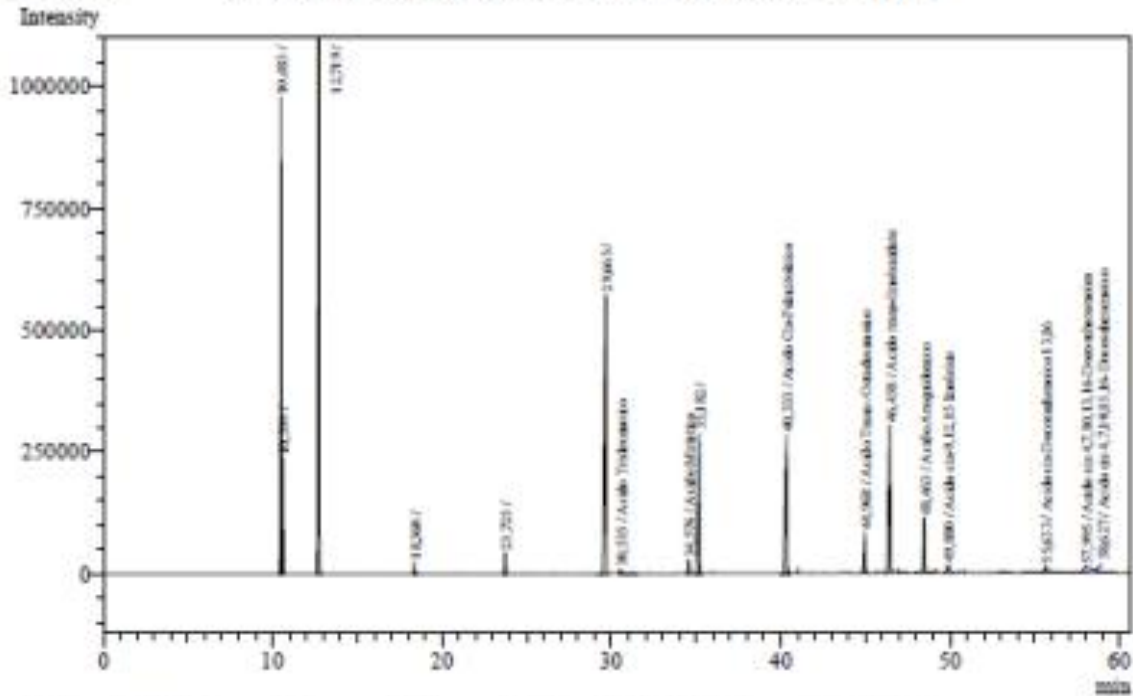
Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\15-01-14 ml.gcd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cptos tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	9,653	50895454	20477069	0,000				
2	9,764	9737605	3969379	0,000		V		
3	9,854	68490	29386	0,000		V		
4	11,769	33762080	11263563	0,000		S		
5	39,239	508093	110852	41,537	%	V	12	Acido Palmítico
6	43,908	80572	20870	6,388	%		16	Acido Estearico
7	45,433	511760	109459	41,188	%	V	18	Acido Cis-Oleico
8	47,562	133498	35038	10,887	%		20	Acido cis- linoleico
Total		95697552	36015616					

Analysis Date & Time : 03/06/2014 05:00:38 p.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : donofrio B
 Sample ID : donofrio B
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 8,00
 ISTD Amount :

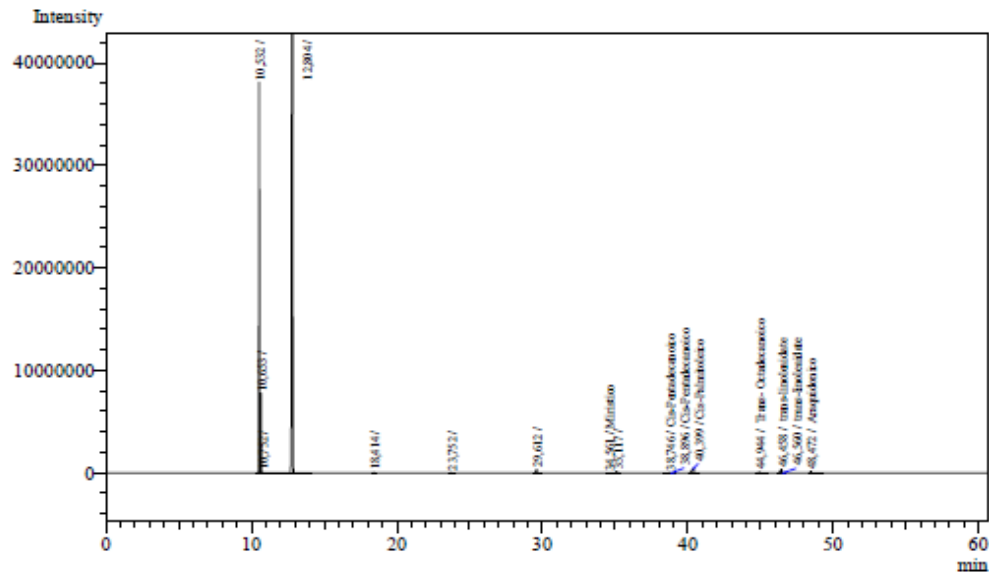
Data Name : C:\GCsolutions\Data\Project1\tesis trans\donofrio b.gcd
 Method Name : C:\GCsolutions\Data\Project1\papas trans\Fame37cptox tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	10,483	2542917	973876	0,000				
2	10,599	624150	235342	0,000		V		
3	12,719	20864073	6602337	0,000				
4	18,360	87787	23954	0,000		V		
5	23,725	165290	43069	0,000		V		
6	29,665	3888333	572197	0,000				
7	30,535	53128	8126	1,005 %		SV	7	Acido Tridecanoico
8	34,576	126941	27738	2,352 %		S	8	Acido Mirístico
9	35,182	1634150	286176	0,000		V		
10	40,333	1870173	282286	33,970 %		V	13	Acido Cis-Palmitoleico
11	44,968	455068	83554	7,998 %		V	17	Acido Trans- Octadecanoico
12	46,438	1997273	302584	35,780 %		V	19	Acido trans-linoleico
13	48,463	476927	111670	8,200 %		SV	21	Acido Araquidónico
14	49,880	111902	15605	2,005 %		V	24	Acido cis-9,12,15 linoleico
15	55,633	116419	11721	2,042 %		V	33	Acido cis-Docosadienoico
16	57,995	329986	9771	5,554 %		V	37	Acido cis 4,7,10,13,16-tetradecatrienoico
17	58,627	64929	4241	1,093 %		V	37	Acido cis 4,7,10,13,16-tetradecatrienoico
Total		35409446	9394247					

Analysis Date & Time : 29/05/2014 02:01:18 p.m.
User Name : Admin
Vial# : 1
Sample Name : helado
Sample ID : helado
Sample Type : Unknown
Injection Volume : 8,00
ISTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\tesis trans\helado.gcd
Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cptos tesis 17-12-2013 .gcm



Peak#	Ret.Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	10.532	102533096	37947107	0,000				
2	10.653	20835024	7754441	0,000		SV		
3	10.752	77261	38623	0,000		T		
4	12.804	249931452	58632710	0,000		SV		
5	18.414	224227	61196	0,000				
6	23.752	195638	50941	0,000				
7	29.612	1811267	334577	0,000				
8	34.561	61945	14002	0,701 %	%	S	8	Mirístico
9	35.117	676035	146268	0,000				
10	38.746	315468	39070	3,531 %	%		11	Cis-Pentadecanoico
11	38.896	265534	35072	2,973 %	%	V	11	Cis-Pentadecanoico
12	40.399	4189471	447333	46,478 %	%		13	Cis-Palmitoleico
13	44.944	773176	113975	8,300 %	%	SV	17	Trans- Octadecanoico
14	46.458	2797465	363601	30,608 %	%		19	trans-linoleaidate
15	46.560	45838	12035	0,502 %	%	V	19	trans-linoleaidate
16	48.472	657803	144976	6,908 %	%	S	21	Araquidónico
Total		385390700	106135927					

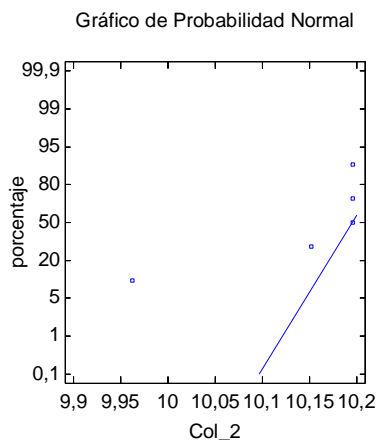


Figura 21 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-octadecanoico C18:1 trans-9 (elaidico) en cobertura de chocolate

Tabla 37 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en cobertura de chocolate

Recuento	5
Promedio	42,94
Desviación Estándar	0,2014
Coefficiente de Variación	0,469%
Mínimo	42,63
Máximo	43,2
Rango	0,5653
Sesgo Estandarizado	-0,6087
Curtosis Estandarizada	1022

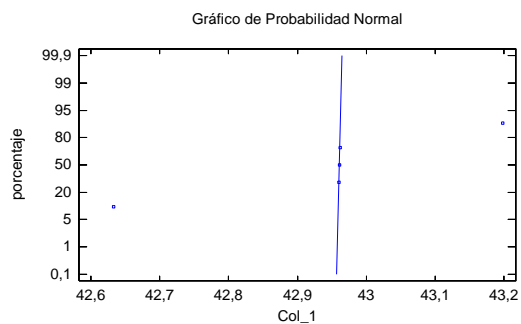


Figura 22 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en cobertura de chocolate.

1.6.Chocolate para cobertura

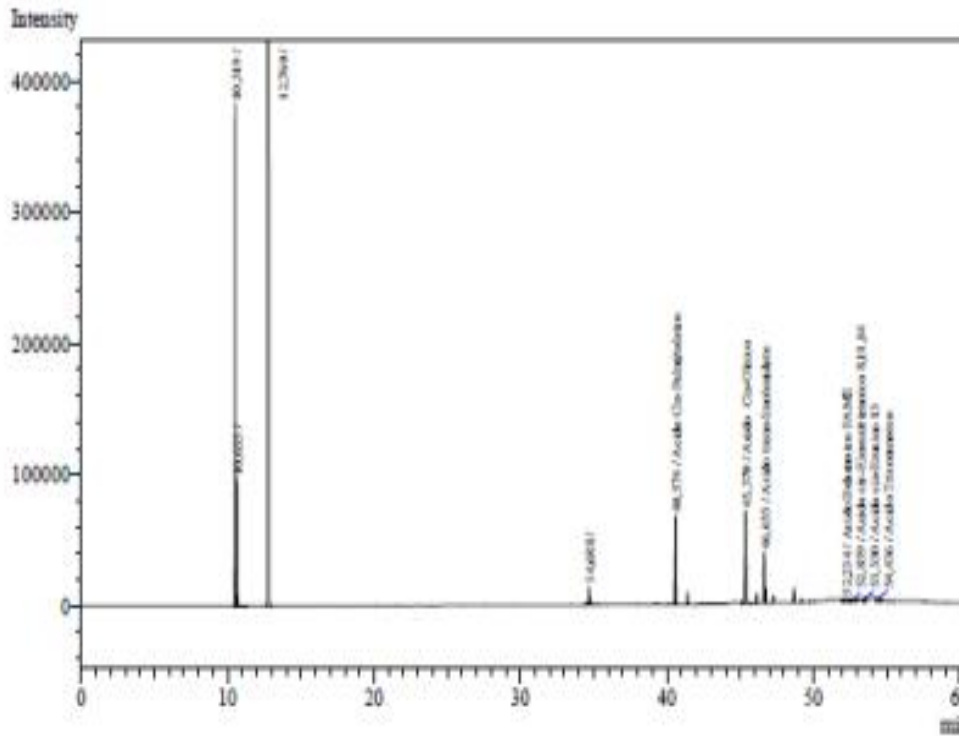
En la siguiente página se muestra el cromatograma de la muestra, y a continuación el tratamiento estadístico

Tabla 38 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 Chocolate para cobertura

Recuento	5
Promedio	7755
Desviación Estándar	0,05009
Coefficiente de Variación	0,6459%
Mínimo	7711
Máximo	7825
Rango	0,1132
Sesgo Estandarizado	0,7341
Curtosis Estandarizada	-0,8569

Analysis Date & Time : 10/06/2014 07:51:02 p.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 1
 Sample Name : 2
 Sample ID : 2
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 8,00
 ISTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\tesis trans\linr2.grd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cpops tesis 17-12-2013.grm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	10,519	1018356	378890	0,000				
2	10,635	262174	96376	0,000		SV		
3	12,760	14790753	4669458	0,000				
4	34,688	66941	14538	0,000		S		
5	40,574	279000	67626	30,917	%	V	13	Acido Cis-Palmitoleico
6	45,370	323160	70475	34,657	%	V	18	Acido Cis-Oleico
7	46,655	70557	27046	7,711	%		19	Acido trans-linolenidate
8	52,234	90940	2957	9,350	%	V	27	Acido Behenico FAMI
9	52,859	63419	2789	6,955	%	V	28	Acido cis-Eicosatrienoic
10	53,530	46303	2899	4,889	%	V	29	Acido cis-Erucico 13
11	54,436	48570	3027	5,520	%	V	32	Acido Tricosanoico
Total		17060173	5336081					

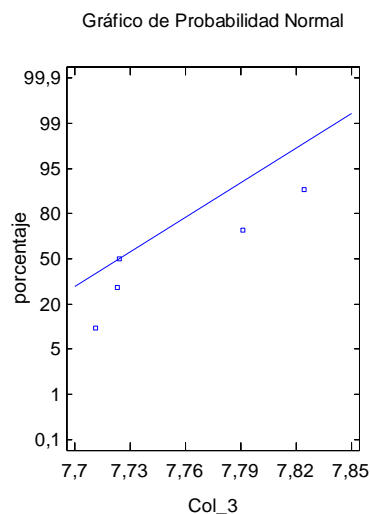


Figura 23 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en Chocolate para cobertura

1.7.Pasta de cacao

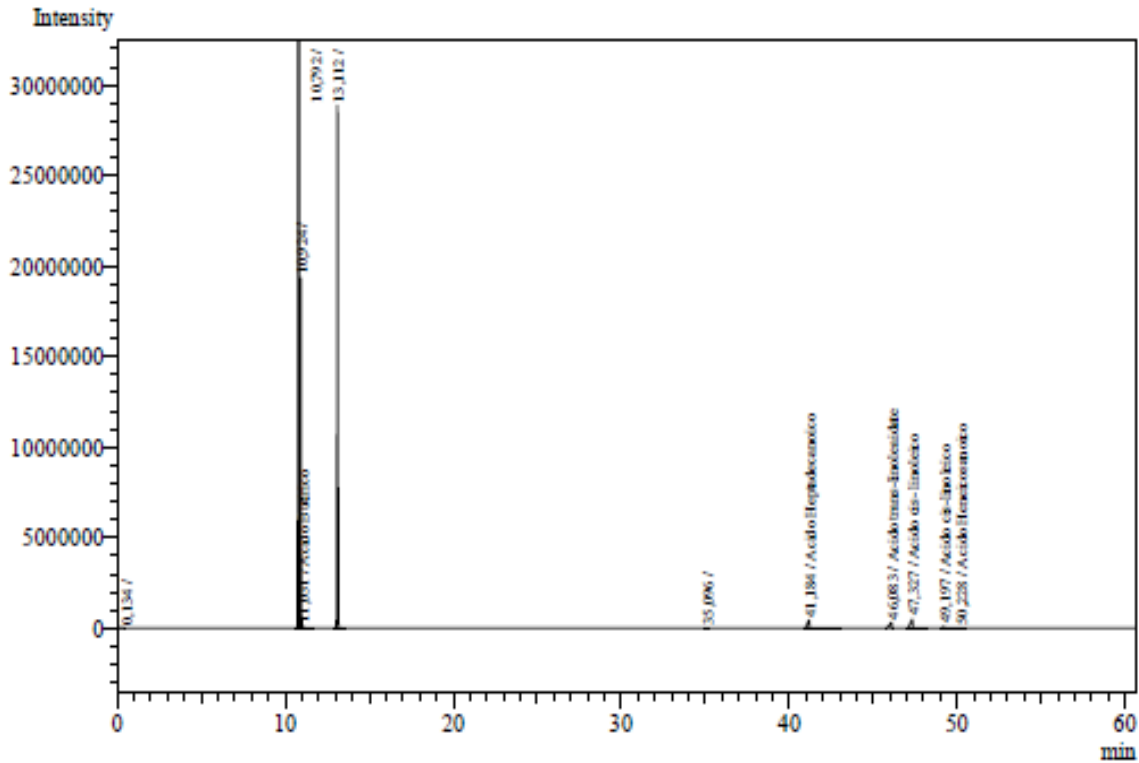
En la siguiente página se muestran en primer lugar el tratamiento estadístico de la muestra y seguido de ello el cromatograma correspondiente.

Tabla 39 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en pasta pura de cacao

Recuento	5
Promedio	20,94
Desviación Estándar	0,276
Coficiente de Variación	13.18
Mínimo	20,62
Máximo	21,14
Rango	0,5238
Sesgo Estandarizado	-0,561
Curtosis Estandarizada	-1503

Analysis Date & Time : 14/08/2014 10:02:52 a.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 1
 Sample Name : pasta 1
 Sample ID : pasta 1
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 8,00
 ISTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\tesis trans\pasta de cacao\pasta 1.gcd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cptos tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	0,134	121699	7567	0,000				
2	10,792	321716878	110144632	0,000				
3	10,924	56088967	19221860	0,000		SV		
4	11,031	174330	84404	2,597 %		T	1	Acido Butírico
5	13,112	107204712	28797895	0,000		S		
6	35,096	60996	13645	0,000				
7	41,184	3733568	429056	32,182 %		S	14	Acido Heptadecanoico
8	46,083	2407789	285845	21,138 %			19	Acido trans-linoleaidate
9	47,327	4541007	479502	39,637 %		S	20	Acido cis- linoleico
10	49,197	408940	78078	3,638 %		S	22	Acido cis-linoleico
11	50,228	96669	20961	0,809 %		V	25	Acido Heneicosanoico
Total		496555555	159563445					

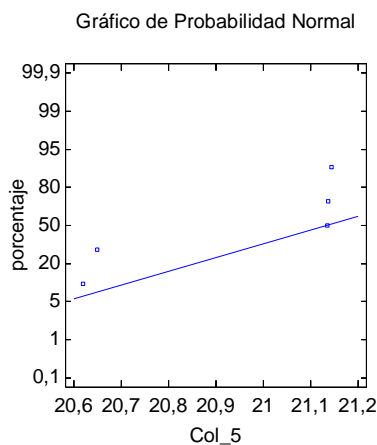


Figura 24 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en pasta pura cacao

1.8.Manteca hidrogenada

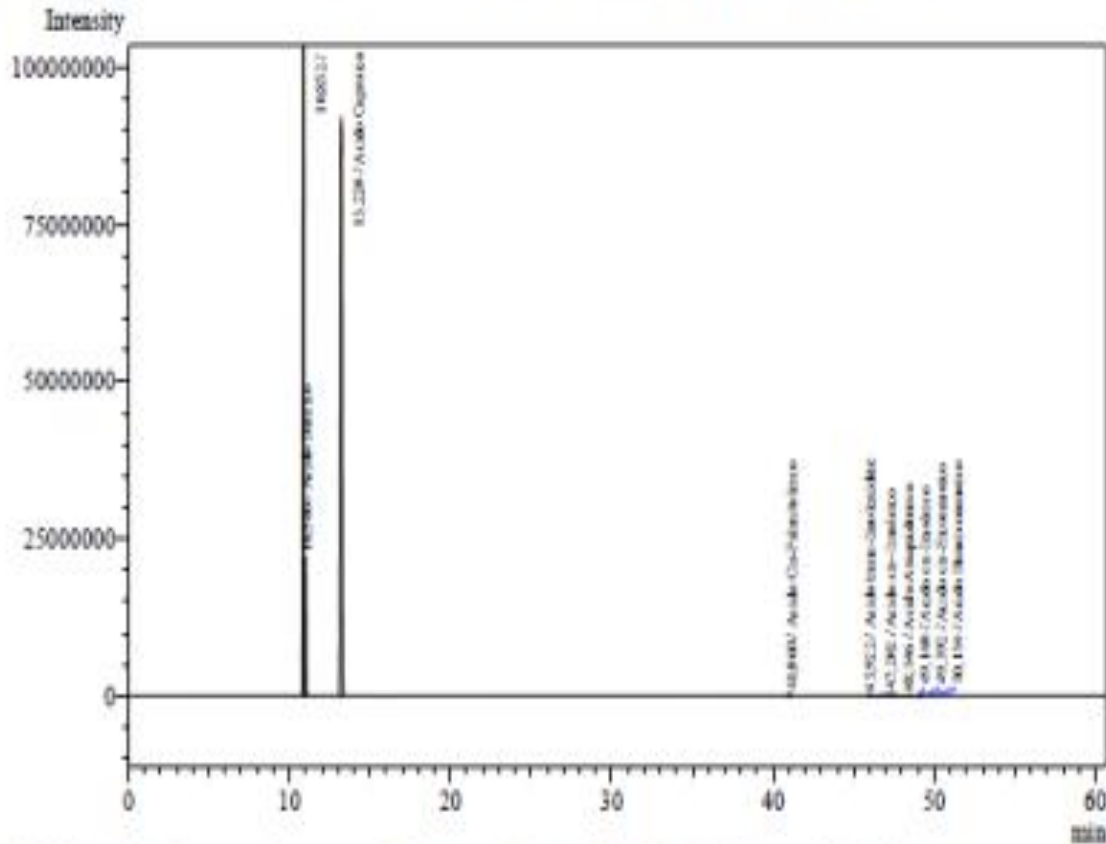
Se muestra el tratamiento estadístico de la muestra y el cromatograma correspondiente, en la siguiente pagina

Tabla 40 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en manteca hidrogenada

Recuento	5
Promedio	0,2464
Desviación Estándar	0,001909
Coefficiente de Variación	0,7748%
Mínimo	0,2447
Máximo	0,2495
Rango	0,00483
Sesgo Estandarizado	1333
Curtosis Estandarizada	1087

Analysis Date & Time : 08/08/2014 01:44:24 p.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 1
 Sample Name : B
 Sample ID : B
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 8,00
 ESTD Amount :

Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\tesis trans manteca b.gcd
 Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cpes tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	10.852	402313987	129684428	0,000				
2	10.986	67735402	21877502	13,889 %	V		1	Acido Butirico
3	13.220	506249295	91843261	85,288 %			2	Acido Caproico
4	41.060	958917	184946	0,118 %	V		13	Acido Cis-Palmitoleico
5	45.922	2027385	137222	0,245 %	V		19	Acido trans-linoleaidne
6	47.202	2922897	240931	0,351 %	V		20	Acido cis- linoleico
7	48.346	164008	15379	0,019 %	V		21	Acido Araquidonico
8	49.140	624422	91874	0,076 %	V		22	Acido cis-linoleico
9	49.392	56828	8030	0,007 %	V		23	Acido cis-Eicosanoico
10	50.154	56389	6932	0,006 %	V		25	Acido Heneicosanoico
Total		983109530	244090505					

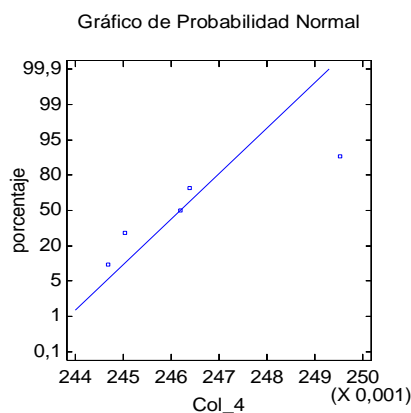


Figura 25 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en manteca hidrogenada

1.9.Crema de leche

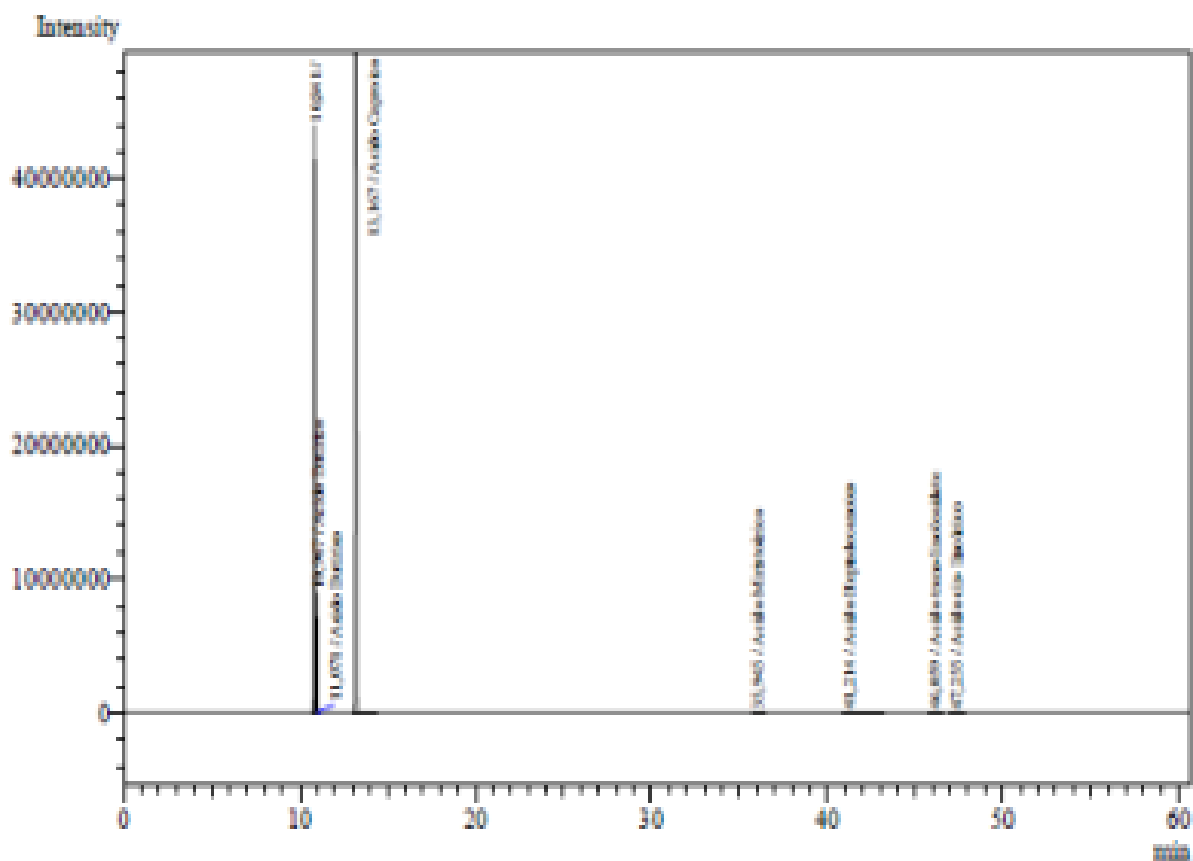
Se muestra el tratamiento estadístico de la muestra y el cromatograma correspondiente está en la siguiente página.

Tabla 41 Resumen estadístico de los porcentajes de ácido trans-linoleaidico C18:2 trans-9,12 en crema de leche

Recuento	5
Promedio	0,01483
Desviación Estándar	0,0004058
Coefficiente de Variación	27.37
Mínimo	0,01428
Máximo	0,01516
Rango	0,00088
Sesgo Estandarizado	-0,6403
Curtosis Estandarizada	-1019

Analysis Date & Time : 26/08/2014 03:13:57 p.m.
 User Name : Admin
 Vial# : 2
 Sample Name : crema de leche 4
 Sample ID : crema de leche 4
 Sample Type : Unknown
 Injection Volume : 8,00
 ESTD Amount :

Data Name : C:\GC\evolution\Data\Project\tesis trans\crema de leche\crema 04.gcd
 Method Name : C:\GC\evolution\Data\Project\papas trans\Fams37cptos tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Compd Name
1	10,841	124721304	43608266	0,000				
2	10,967	24962033	8836095	10,606	%	V	1	Acido Butirico
3	11,071	192513	71465	0,082	%	V	1	Acido Butirico
4	13,167	255560654	56732626	89,212	%	SV	2	Acido Caproico
5	35,945	49294	4557	0,013	%	V	9	Acido Miristoleico
6	41,214	167562	12149	0,041	%	S	14	Acido Heptadecanoico
7	46,659	60551	3480	0,015	%		19	Acido trans-linoleidate
8	47,255	124134	8259	0,031	%	SV	20	Acido cis-linoleico
Total		405838045	109276907					

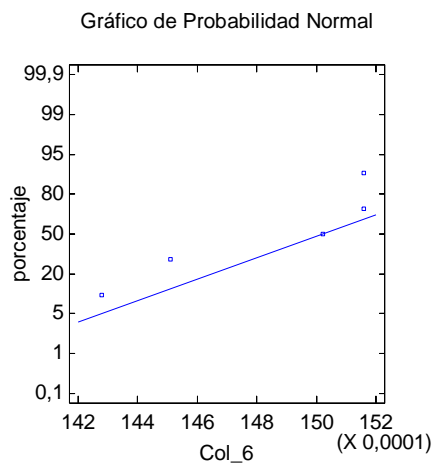


Figura 26 Gráfico de probabilidad normal para ácido trans-linoleaidico C18:1 trans-9,12 en crema de leche.



ANEXO 7

Estándar mix de Fames #35077

1.10. Lista de componentes y ficha técnica del estándar mix de Fames

Chain	%	by	Weight			
				C20:1	(<i>cis</i> -11)	2.0
C4:0			4.0	C20:2	(all- <i>cis</i> -11,14,)	2.0
C6:0			4.0	C20:3	(all- <i>cis</i> -8,11,14)	2.0
C8:0			4.0	C20:3	(all- <i>cis</i> -11,14,17)	2.0
C10:0			4.0	C20:4	(all- <i>cis</i> -5,8,11,14)	2.0
C11:0			2.0	C20:5	(all- <i>cis</i> -5,8,11,14,17)	2.0
C12:0			4.0	C21:0		2.0
C13:0			2.0	C22:0		4.0
C14:0			4.0	C22:1	(<i>cis</i> -13)	2.0
C14:1		(<i>cis</i> -9)	2.0	C22:2	(all- <i>cis</i> -13,16)	2.0
C15:0			2.0	22:6	(all- <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19)	2.0
C15:1		(<i>cis</i> -10)	2.0	C23:0		2.0
C16:0			6.0	C24:0		4.0
C16:1		(<i>cis</i> -9)	2.0	C24:1	(<i>cis</i> -15)	2.0
C17:0			2.0			
C17:1		(<i>cis</i> -10)	2.0			
C18:0			4.0			
C18:1		(<i>trans</i> -9)	2.0			
C18:1		(<i>cis</i> -9)	4.0			
C18:2		(all- <i>trans</i> -9,12)	2.0			
Chain	%	by	Weight			
C18:2		(all- <i>cis</i> -9,12)	2.0			
C18:3		(all- <i>cis</i> -6,9,12)	2.0			
C18:3		(all- <i>cis</i> -9,12,15)	2.0			
C20:0			4.0			

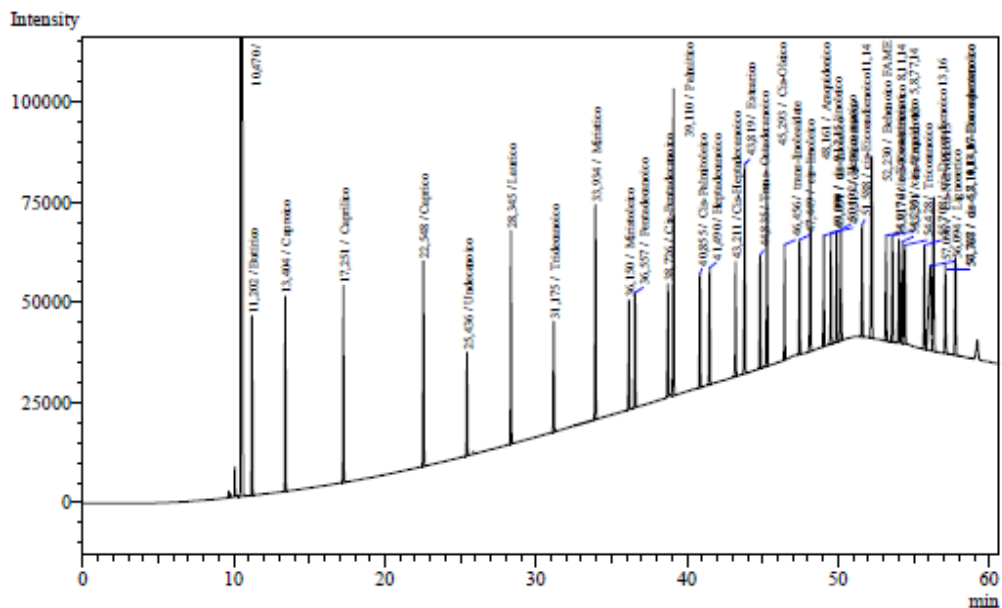
1.11. Cromatograma en FID Y Masas del estándar mix de Fames

En la siguiente página se muestran en primer lugar el cromatograma de la corrida del estándar por el detector FID y en segundo lugar el estándar por el detector de masas.



Analysis Date & Time : 29/11/2012 03:50:38 p.m.
User Name : Admin
Vial# : 1
Sample Name : STDFames37
Sample ID : STDFames37
Sample Type : Standard
Injection Volume : 1,00
ISTD Amount :

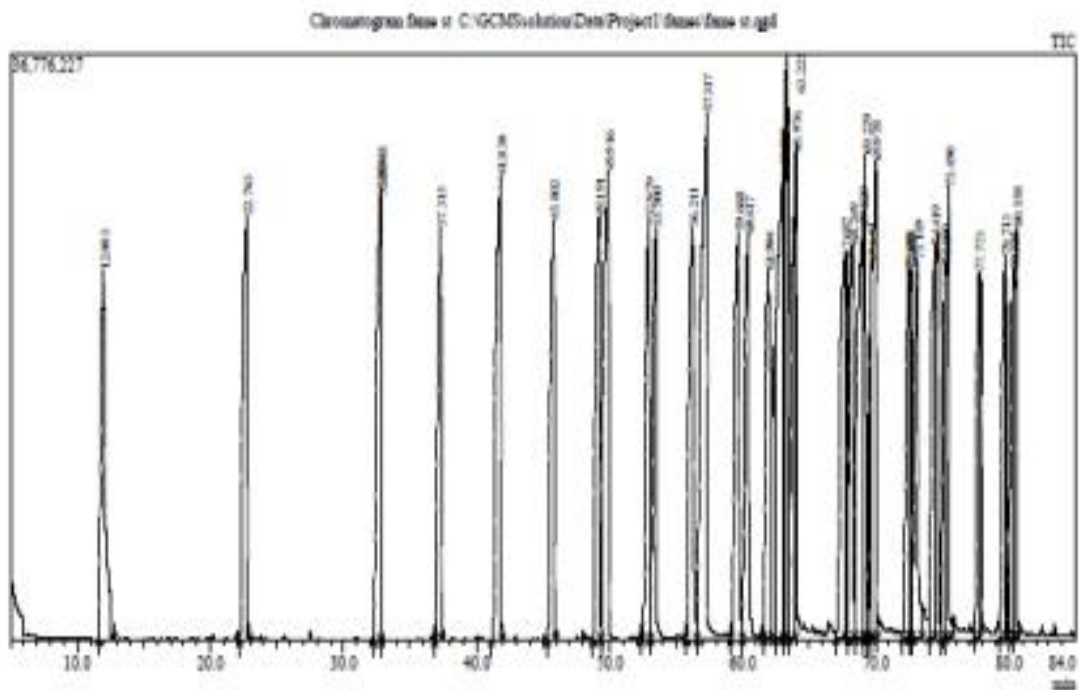
Data Name : C:\GCsolution\Data\Project1\STDFames37_01A- correcto.gcd
Method Name : C:\GCsolution\Data\Project1\papas trans\Fame37cptos tesis 17-12-2013.gcm



Peak#	Ret Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	10,470	34564810	8235351	0,000	%	V		1 Butirico
2	11,202	126880	44596	4,000	%			2 Caproico
3	13,404	154431	48367	4,000	%	V		3 Caprilico
4	17,251	174318	49140	4,000	%	V		4 Caprico
5	22,548	189019	51101	4,000	%			5 Undecanoico
6	25,436	95439	25772	2,000	%			6 Laurico
7	28,345	199663	53120	4,000	%			7 Tridecanoico
8	31,175	101885	27530	2,000	%			8 Miristico
9	33,934	208146	53553	4,000	%	V		9 Miristoleico
10	36,150	102371	27289	2,000	%			10 Pentadecanoico
11	36,557	105871	28612	2,000	%			11 Cis-Pentadecanoico
12	38,726	105202	27976	2,000	%			12 Palmítico
13	39,110	323970	76396	6,000	%			13 Cis-Palmitoleico
14	40,855	106156	28463	2,000	%			14 Heptadecanoico
15	41,490	109623	29072	2,000	%			15 Cis-Heptadecanoico
16	43,211	106752	28520	2,000	%			16 Estearico
17	43,819	222712	52258	4,000	%			17 Trans- Octadecanoico
18	44,835	109710	28232	2,000	%			18 Cis-Oleico
19	45,293	219380	55461	4,000	%			19 trans-linoleaidate
20	46,456	107635	28740	2,000	%			20 cis- linoleico
21	47,449	108254	28625	2,000	%			21 Araquidónico
22	48,161	224291	49921	4,000	%			22 cis-linoleico
23	49,051	106205	27602	2,000	%			23 cis-Eicosanoico
24	49,519	106298	27674	2,000	%			24 cis-9,12,15 linoleico
25	49,900	107617	27644	2,000	%			25 Heneicosanoico
26	50,192	112885	27705	2,000	%	V		

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
27	51,588	110105	27957	2,000	%		26	cis-Eicosadienoico11,1
28	52,230	228820	45193	4,000	%		27	Behenoico FAME
29	53,170	107264	26266	2,000	%		28	cis-Eicosatrienoico 8,11
30	53,591	111410	26587	2,000	%		29	cis-Erucico 13
31	54,017	106356	25707	2,000	%		30	cis-Eucosatrienoico
32	54,235	114491	25223	2,000	%	V	31	cis-Araquidonoico 5,8,7
33	54,428	103511	24555	2,000	%		32	Tricosanoico
34	55,708	109923	25906	2,000	%		33	cis-Docosadienoico 13,
35	56,094	222278	21118	4,000	%		34	Lignoserico
36	56,327	229086	38342	2,000	%	V	35	cis-5,8,11,14,17-Eicos
37	57,096	99263	22317	2,000	%		36	cis-Nervonico 15
38	57,768	114560	24128	2,000	%		37	cis 4,7,10,13,16-Docos
Total		39856590	9522019					





Peak Report TIC

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	12.003	11.590	12.800	540421987	3.06	23114265	2.45	23.38	SV	Hexanoic acid, methyl ester
2	21.763	22.225	22.940	587912703	3.32	26789584	2.81	22.15	V	Octanoic acid, methyl ester
3	32.800	32.245	32.810	560787088	3.17	27729195	2.94	20.22	V	Decanoic acid, methyl ester
4	32.846	32.820	36.865	106827762	0.61	28315992	3.00	3.84	SV	Methyl 8-oxododecanoate
5	37.315	36.865	37.400	440306289	2.48	25878988	2.74	17.01	V	Undecanoic acid, methyl ester
6	41.830	41.130	41.920	724809360	4.10	29044939	3.08	24.95	V	Methyl 10-methylundecanoate
7	45.802	45.320	45.955	487461699	2.75	26273797	2.78	18.48	V	Tridecanoic acid, methyl ester
8	48.191	48.720	49.345	507396567	2.87	26371504	2.79	19.25	V	Methyl myristate
9	49.916	49.345	52.405	743907892	4.21	29293596	3.10	25.39	SV	Methyl tetradecanoate
10	52.979	52.405	53.090	522435057	2.95	28239573	2.79	19.82	V	9-Octadecanoic acid (Z)-, methyl ester
11	53.500	53.090	55.695	504851170	2.85	25778829	2.73	19.38	SV	Methyl 13-methyltetradecanoate
12	56.211	55.695	56.570	580661598	3.28	25778697	2.73	22.52	V	Methyl hexadecanoate
13	57.317	56.570	59.080	1054648243	5.96	32920729	3.49	32.04	SV	Heptadecanoic acid, methyl ester
14	59.688	59.080	59.965	565393304	5.20	25437942	2.70	22.22	V	cis-10-Heptadecanoic acid, methyl ester
15	60.417	59.965	61.545	560237211	3.17	25251378	2.67	22.19	SV	Methyl 15-methylhexadecanoate
16	61.804	61.545	62.205	611902010	3.46	23049380	2.44	26.55	V	Methyl 6,9,12-trimethyltridecanoate
17	63.005	62.415	63.020	881376910	4.88	29500348	3.12	29.88	V	Methyl 6,11-octadecanoate
18	63.225	63.020	63.235	436474412	2.36	35055900	3.71	11.88	V	8,11,14-Tricosanoic acid, methyl ester
19	63.976	63.490	63.985	632634421	3.58	30428849	3.22	20.79	V	Methyl 16-methylheptadecanoate
20	67.687	67.020	67.695	581349524	3.29	25888437	2.55	24.34	V	3,8,11,14-Tetracosanoic acid, methyl ester
21	68.249	67.935	68.405	470434534	2.66	24678825	2.61	19.06	V	Methyl 8,11,14-tricosanoate
22	69.029	68.405	69.070	746017878	4.22	25786408	2.73	28.93	V	10,13-Hicosanoic acid, methyl ester
23	69.229	69.070	69.595	378375782	2.14	30294154	3.21	12.49	V	8,11,14-Docosanoic acid, methyl ester
24	69.651	69.395	69.670	241211825	1.36	25480512	2.49	10.27	V	Methyl 18-methylicosanoate
25	69.978	69.695	70.105	491813733	2.78	29779023	3.15	16.52	V	Methyl 18-methylnonadecanoate
26	72.488	72.020	72.550	398780087	2.34	22985522	2.43	17.26	V	Hexacosanoic acid, methyl ester
27	72.552	72.530	72.565	47688279	0.27	22781750	2.41	2.09	V	Ethyl 6-methyl-3-oxopentanoate
28	72.625	72.565	72.710	130936752	0.85	22992283	2.44	6.16	V	Hexacosanoic acid, methyl ester
29	73.149	72.710	73.485	518694029	2.93	23657556	2.51	21.93	V	4,7,10,13,16,19-Docosahexanoic acid, methyl ester
30	74.419	73.965	74.475	482393221	2.73	24589248	2.60	19.62	V	cis-13,16-Docosanoic acid, methyl ester
31	75.190	74.870	75.240	323860848	1.83	23418551	2.48	13.83	V	Methyl 20-methyl-hacosanoate
32	75.490	75.240	75.725	433940870	2.47	28222809	2.99	15.45	V	Methyl 20-methyl-lacosanoate
33	77.773	77.400	77.805	338596376	1.91	22889478	2.42	14.79	V	Methyl 20-methyl-docosanoate
34	79.713	79.315	79.740	378080171	2.14	23929077	2.55	13.80	V	15-Tetracosanoic acid, methyl ester
35	80.325	79.935	80.360	336932497	1.91	22947200	2.43	14.68	V	Eicosanoic acid, methyl ester
36	80.558	80.360	80.700	333420516	1.89	25672686	2.72	12.99	V	Eicosanoic acid, methyl ester
				17683151107	100.00	944187206	100.00			

ANEXO 8

Encuesta

Para determinar la frecuencia de consumo de los helados con cobertura de chocolate y de esta manera observar el impacto de la investigación, se realizó una encuesta a los puntos expendedores de helados en los principales centros comerciales (Real plaza, Mall aventura plaza y Parque Lambramani).

La encuesta se realizó de forma anónima, frente a la negativa del personal que laboraba en estos puntos de venta de dar sus nombres. Esta se aplicó a los 11 puntos de ventas de helados (no tiendas) de los centros comerciales ya mencionados.

El muestreo se realizó entre los días 05 y 07 de mayo ya que al ser días laborables, el personal de estos centros tendría más disposición para responder las preguntas.

1.12. Encuesta realizada:

Marque con sinceridad las siguientes respuestas

1. Numere de mayor a menor según la frecuencia de venta (Siendo 1 el mayor y 4 el menor).
 - Solo de crema
 - Con cobertura de chocolate
 - Jalea de sabor
 - Confites (lentejas, chispitas, otros)
2. Marque la cantidad aproximada de venta de helados cubiertos de chocolate en un día normal (durante su horario).

Unidades	5-10	15-20	25-30	Más de 30
Cobertura de chocolate				

1.13. Resultados obtenidos de la encuesta

1. Numere de mayor a menor según la frecuencia de venta (Siendo 1 el mayor y 4 el menor).

%	Mall Aventura Plaza	Parque Lambramani	Real Plaza
Solo crema	61	50	70
Cobertura de chocolate	33	45	20
Jalea con sabor	4	2	5
Confites	2	2.5	5

Tabla 6 Resultados de la frecuencia de venta de helados clasificados según sus aditivos

Como se aprecia en el cuadro el segundo tipo de aditivo para el helado, escogido por los consumidores es la cobertura de chocolate, seguidos por las jaleas y los confites.

2. Marque la cantidad aproximada de venta del helados durante un día normal (no feriado)

Unidades	42134	15-20	25-30	Más de 30
Mall Aventura Plaza	10%	90%		
Parque Lambramani	70%	30%		
Real Plaza	30%	50%	20%	

Tabla 42 Resultados de la cantidad aproximada de venta de helados con cobertura de chocolate solida

En la tabla 16 se aprecia que la frecuencia aproximada de venta de los helados con cobertura de chocolate solido es de hasta 20 unidades aproximadamente durante un turno normal de 8horas de trabajo y en un día no feriado.

Los resultados de la encuesta son aproximados ya que se está tomando como base la honestidad del trabajador.

Pero resulta ser una herramienta útil como referente en cuanto a la frecuencia de venta de este tipo de helado.

