

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
facultad de Ciencias y Humanidades

DETERMINACION DE GRASA VEGETAL EN PRODUCTOS  
LACTEOS POR MEDIO DE METODOS CROMATOGRAFICOS  
Y DENSITOMETRICOS

WALESKA SOLORZANO LEAL

Trabajo de Investigación presentado  
para optar al grado académico de  
Licenciado en Ingeniería y Ciencia de Alimentos

Guatemala  
1988

SIBLIOTECA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

A mis Padres

A mis hermanas

A mis amigos

## AGRADECIMIENTO

Muy especialmente a la Licenciada Azucena Lizama y al Dr. Jorge Zúñiga por su intensa colaboración y orientación en este trabajo.

A el personal de LUCAM que amablemente me brindó su ayuda, en especial a los miembros de la sección de alimentos.

## CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. OBJETIVOS	17
IV. MATERIALES Y METODOS	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
VI. CONCLUSIONES	91
VII. RECOMENDACIONES	93
IX. BIBLIOGRAFIA	95

### APENDICES

- A. Composición de ácidos grasos de leche de vaca
- B. Composición de ácidos grasos de distintas grasas vegetales
- C. Composición de la grasa de leche de vaca

## RESUMEN

Se usó cromatografía de gases para la determinación cualitativa y cuantitativa de ácidos grasos en muestras de leche adulteradas con aceite de algodón hidrogenado a distintos porcentajes, así como también en leche de vaca, cremas, varios tipos de quesos y mantequillas. Para determinar la presencia de grasa vegetal en los distintos productos lácteos, se tomó como índice la relación  $C16:0/C14:0 = 3.00$  y la  $C18:1/C14:0 = 2.87$ , encontrándose que la última es más sensible en la detección de adulteraciones con aceite de algodón hidrogenado. La cromatografía de gas para el análisis de los esteroides se utilizó como medio de corroboración en los casos que las relaciones de los ácidos mencionados anteriormente no coincidieran en los resultados. Se utilizó densitometría para determinar los parámetros que pueden servir para detectar adulteraciones en productos lácteos. Se realizó una clasificación de 30 perfiles densitométricos que fueron separados en 3 grupos en base a el valor de la relación  $C18:1/C14:0$ , para poder observar cambios en los perfiles y en las placas cromatográficas, debidos al nivel de adulteración. Se encontró que la relación de áreas de los picos del perfil densitométrico correspondientes a las bandas de los alcoholes e hidrocarburos, son un buen índice para detectar adulteración con aceite de algodón hidrogenado. El método densitométrico, tal como se desarrolla en este trabajo puede ser utilizado para determinar presencia de grasa de algodón hidrogenado y posiblemente otras

grasas vegetales. El ensayo es cualitativo y puede descubrir aproximadamente hasta 5% de sustitución. La coloración de las bandas de la placa cromatográfica observadas con luz UV es una característica importante en la determinación de adulteraciones con grasa vegetal. Las bandas rojo oscuro observadas en placas de muestras altamente adulteradas, no fueron encontradas en muestras puras. Se analizó distintos productos lácteos de diferentes marcas comerciales, para determinar la presencia de grasa vegetal. En estas muestras se aplicaron los valores de las relaciones  $C16:0/C14:0$  y  $C18:1/C14:0$  como índices de adulteración. De acuerdo a los resultados obtenidos, es evidente que la mayoría de productos lácteos comercializados en Guatemala son imitaciones.

## I. INTRODUCCION

El estudio de la composición de la grasa es el método más útil para detectar adulteraciones en los productos lácteos. La calidad, textura y sabor de estos alimentos, depende principalmente del contenido de grasa. Revilla (1982:23-25) menciona por ejemplo que el sabor característico de la crema y mantequilla, se debe al ácido butírico que se encuentra en la grasa de leche.

En muchos casos, las industrias procesadoras sustituyen la grasa láctea por grasa vegetal para disminuir los costos de producción. Los productos resultantes deben ser considerados como imitaciones, Winkelman (1978:27-30) de acuerdo a las normas del comité de expertos FAO/OMS define estos alimentos de la siguiente manera: "aquellos que imitan la composición y las propiedades de la leche o de los productos lácteos, principalmente por la sustitución de la materia grasa y/o de la materia proteica láctea con la materia grasa y/o materia proteica de origen no lácteo".

Los laboratorios de control de calidad deben detectar estas imitaciones que en ocasiones son puestos en evidencia con simples exámenes organolépticos, pero que en la mayoría de casos es necesario utilizar análisis químicos con instrumental sofisticado. Younes y Soliman (1986:200-203) afirman que los análisis para descubrir adulteraciones en productos lácteos requieren el examen de composición de ácidos grasos y esteroides (5). Los

exámenes de composición esterólica son más complicados que los análisis de composición de ácidos grasos. Los primeros pueden efectuarse rápidamente pero sólo pueden detectar hasta 10% de sustitución. Los análisis de esteroides en cambio son sensibles, se puede detectar hasta 1% de sustitución, pero tienen la desventaja de ser muy tediosos, es necesario cerca de dos días de trabajo para la obtención de resultados, según método utilizado por Benavides (1978:45).

Es pues conveniente averiguar si el análisis densitométrico es una opción ventajosa para el examen de estos productos.

## II. ANTECEDENTES

Desde el punto de vista nutricional, la leche es el alimento natural más completo. Johnson y Peterson (1974:483) señalan que la composición en peso de un litro de leche de vaca es aproximadamente la siguiente:

proteínas	34 g (caseína 78% y proteína del suero 17%)
carbohidratos	49 g (lactosa 97.5%)
grasas	35 g (triglicéridos 98%)
vitaminas	trazas
minerales	9 g
agua	905 g

A pesar de que los triglicéridos están presentes en la leche en una cantidad que varía entre 3.5 y 6.0%, el sabor y otras propiedades características de la leche y sus derivados, dependen grandemente de la calidad y contenido de estos componentes según Revilla (1982:23-25).

Se han reportado alrededor de 60 ácidos grasos componentes de la grasa de leche de vaca (Apéndice A). Sin embargo en los análisis de composición de ácidos grasos, con el objeto de detectar adulteraciones, sólo es necesario tomar en cuenta los ácidos mirístico /1/ (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) y linoléico (C18:2); debido a que estos ácidos

/1/ En esta nomenclatura el número inmediato siguiente a la letra C indica el número de carbonos, y el número colocado después de los dos puntos, indica el número de dobles enlaces en la cadena.

constituyen aproximadamente el 85% de grasa láctea según Younes y Soliman (1986:200-203).

En las imitaciones en las que la grasa láctea es reemplazada o adicionada con grasas de origen vegetal, el contenido de estos ácidos difiere de la composición original. Debido a ello, el análisis de composición de ácidos grasos de los productos lácteos, es el método más utilizado para determinar la pureza de la grasa láctea según Farag *et al* (1983:1665-1669).

Segun Winkelman (1978:27-30) otros componentes de la leche pueden ser sustituidos y el cambio puede pasar desapercibido, debido a que no existen métodos de análisis simples para detectar la adulteración o que el sustituto es idéntico al componente original. Sustituciones de material proteico son un ejemplo del primer caso y sales minerales y carbohidratos ilustran el segundo.

La composición de los ácidos grasos, característica de leche de vaca, es utilizada como patrón de comparación en la investigación de productos lácteos adulterados. Buron *et al* (1980:325-338), Parodi (1971:155-158), Younes y Soliman (1986:200-203), Metcalfe (1979:819A-822A), Fernández *et al* (1984:181-184), Chapman (1979:77-79), Magidman *et al* (1978:325-331) y Courcelles *et al* (1975:283-306) han realizado muchos estudios de composición de ácidos grasos, utilizando la instrumentación de cromatografía de gas, que constituye el método de análisis más adecuado para éste propósito.

La tabla 2.1 muestra los resultados de diferentes estudios del contenido de los principales ácidos grasos de la grasa láctea. Las investigaciones provienen de diferentes países y se efectuaron en condiciones variables referentes a la época del año y razas de los hatos lecheros. A pesar de estas diferencias el contenido de todos los componentes se mantienen dentro de límites poco más o menos estrechos. Es importante observar que en la literatura no se encuentran datos de composición de grasa láctea en países tropicales.

Tabla 2.1  
Composición (%) de ácidos grasos de leche de vaca de diferentes países encontrada por Gallacier et al (1974:117-138)

País	C12:0		C14:0		C16:0		C18:0		C18:1	
	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min
Francia	4.1	2.7	11.7	9.5	30.9	23.6	13.0	9.6	28.4	22.4
Inglater.	4.0	3.1	12.4	10.4	29.3	23.8	13.2	9.2	30.7	24.0
Bélgica	3.6	2.8	12.0	9.7	31.4	22.4	12.6	8.3	29.9	22.5
Italia	3.8	3.2	12.4	10.2	31.1	27.2	10.4	9.2	23.9	21.3
España	3.7	3.1	10.8	9.8	25.6	22.9	12.7	10.8	24.3	21.4
Suiza	3.6	2.2	11.6	8.6	30.6	21.3	11.5	7.7	30.5	21.1
Polonia	4.2	2.4	13.0	8.4	34.6	23.3	11.8	5.0	29.7	15.2
U.S.A./2/	3.4	2.2	11.3	8.9	29.4	23.2	13.6	10.6	28.0	22.2

/2/ Este es el único dato de la tabla obtenido de Sheppard (1978: 371-376).

En la literatura se encuentran numerosas referencias de investigaciones de adulteración de grasa láctea basadas en el análisis de composición de ácidos grasos.

Farag *et al* (1979:819A-822A), examinó la composición de ácidos grasos utilizando cromatografía de gas para detectar la adulteración de leche de búfalo hembra con leche de vaca. Farag encontró diferencias significativas en el contenido de los ácidos mirístico, palmítico, oleico y linoléico en ambas especies. Es posible utilizar estas diferencias como parámetros de referencia para determinar este tipo de adulteración.

Parodi (1971:155-158) realizó un estudio sobre el análisis de los ácidos grasos de leche pura y adulterada con diferentes cantidades de sebo de res: 10, 15, 20 y 25 por ciento. Como criterios para estimar la adulteración se utilizaron relaciones de contenido de diferentes parejas de ácidos grasos componentes de la grasa láctea. Los valores de estas relaciones se obtienen a partir de las áreas integradas de los picos del cromatograma. Ver tabla 2.2.

Tabla 2.2

Valores mínimos y máximos para relaciones de ácidos grasos de leche pura, calculados por Parodi (1971:155-158)

Relación	Mínimo	Máximo
6:0/8:0	1.66	2.06
12:0/10:0	1.05	1.20
14:0/12:0	2.77	4.08
16:0/14:0	2.06	2.65
16:0/18:0	1.39	2.95
18:0/14:0	0.85	1.71
18:1/16:0	0.76	1.29
18:1/18:0	1.62	2.44

Parodi (1971:155-158) encontró que la relación C16/C14 era la más conveniente para detectar la adulteración con sebo. La grasa de leche pura presenta un valor mínimo de 2.06 y un máximo de 2.65 para éste cociente. Esta relación aumenta conforme se incrementa el porcentaje de sustitución. También observó que adulteraciones con sebo menores del 25% no pueden ser detectadas en la totalidad de los casos utilizando este índice. Por ejemplo, de 6 muestras adulteradas al 25%, Parodi pudo detectar adulteración en 5, por medio de la relación C16/C14, pero de 45 muestras adulteradas al 10%, solamente pudo detectar 27 adulteraciones por medio de la misma relación.

Younes y Soliman (1986:200-203) realizaron un estudio sobre la adulteración de grasa láctea con grasa de algodón y sebo de buey. En esta investigación se utilizó cromatografía gaseosa para analizar muestras de mantequilla, aceite de algodón hidrogenado y sebo. La grasa de la mantequilla se caracteriza por la presencia

de ácidos grasos de cadena corta, en cambio el aceite de algodón hidrogenado contiene principalmente ácido oléico, (C18:1); palmítico, C16:0; linoléico, C18:2; y esteárico, C18:0. Para detectar la adulteración, se utilizaron seis relaciones de ácidos grasos, encontrándose que las relaciones C18:1/C14 y C18:1/C18 son las más efectivas.

Farag *et al* (1980:1383-1388) encontró que la relación C18/C18:2 y la de ácidos grasos totales saturados/ác. grasos insaturados, son parámetros efectivos para detectar la adulteración de grasa de leche de vaca y búfalo hembra, con sebo animal.

Gargano (1979:557-558) ha propuesto las relaciones C12/C10, C14/C12 y C18/C18:1 (19), como los parámetros más sensibles para la detección de adulteraciones con grasas vegetales.

Echizen y Deki (1975:111-114) reportan que la disminución del ácido butírico está relacionada con la adulteración de la grasa láctea.

El contenido de ácidos grasos de la grasa de leche es variable y depende de la raza de la vaca, de su alimentación, del período de lactancia, de la estación del año y otros factores.

Debido a estas variaciones, Roos (1964:182-191) ha recomendado utilizar el método estadístico de la elipse de tolerancia para el análisis de resultados.

El concepto de la elipse de tolerancia ha sido empleado por Roos (1964:182-191) para el análisis del porcentaje de mezcla de

dos grasas a partir de dos índices lipoquímicos X y Y.

Buron (1980:325-338) utilizó este método para estimar los intervalos de tolerancia para cada uno de los ácidos grasos de mantecillas españolas.

En general estos métodos estadísticos no son usualmente empleados. Las relaciones de composición entre parejas de ácidos grasos es el criterio más ampliamente utilizado en la detección de adulteraciones.

En la tabla 2.3 puede observarse los resultados obtenidos por Gallacier et al (1974:117-138) de su estudio sobre la composición de algunos ácidos grasos y sus variaciones en los distintos meses del año.

Tabla 2.3

Promedios mensuales de proporciones relativas de ácidos grasos de mantecquilla calculados por Gallacier et al (1974:117-138)

Acido	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
12:0	3.7	3.8	3.7	4.2	3.9	3.4	3.1	2.7	3.0	3.3	3.4	3.7
14:0	11.5	11.7	11.2	10.9	10.9	10.5	10.3	9.5	9.8	10.6	10.8	11.2
16:0	30.5	30.9	28.2	24.4	24.1	23.6	24.2	24.1	24.0	25.7	27.1	28.1
18:0	9.9	9.6	10.4	11.3	12.0	12.7	12.9	13.1	12.3	11.3	10.4	9.9
18:1	22.6	22.4	24.1	25.0	25.2	25.7	26.4	28.6	27.0	25.4	24.3	22.7
18:2	1.7	1.5	2.0	2.1	1.6	1.8	1.6	1.6	2.0	2.0	2.0	1.7

Gallacier et al (1974:117-138) realizó un estudio sobre la variación de la composición de los ácidos grasos de leche de vaca

en las distintas estaciones del año, observando que la proporción de ácido linoléico, C18:3, es más elevada en el período de pasto que en el invierno en Europa ( Enero y Febrero). En base a sus resultados, se comprobó que la proporción de ácidos grasos en la leche varía significativamente con la estación del año, debido al cambio en el régimen de alimentación del ganado. Por ejemplo, el ácido linoléico cambia con la estación del año, y el dieno conjugado, aumenta en el período de pasto según Kuzdzal-Savoie (1977:7-11).

Sheppard *et al* (1978:371-376) reporta que la raza del ganado vacuno no afecta mayormente la composición de ácidos grasos de la leche. La alimentación influye no solamente en el contenido de grasa, sino en el grado de insaturación de los ácidos grasos. También señala que se producen cambios en el contenido de ácidos grasos debido a la estación del año. El C16:0 por ejemplo, en el invierno aumenta de 25.4% a 34.4%, mientras que el C18:1 disminuye de 30.7% a 22.4%.

A pesar de que los métodos de análisis de la composición de ácidos grasos son muy utilizados en la determinación de adiciones de grasas vegetales a grasas lácteas, estos no pueden detectar generalmente adulteraciones menores al 10%. Según Farodi (1971:155-158) y Faraf *et al* (1983:52-53), a niveles más bajos de adulteración el análisis de la fracción esterólica del insaponificable permite obtener resultados confiables.

Masson (1981:249-254) indica que el colesterol está presente

en la leche y en general es un componente de los lípidos de origen animal, mientras que el estigmasterol, campesterol, brassicasterol y sitosterol son de origen vegetal. Un litro de leche vacuna contiene aproximadamente 0.13 g de colesterol. Gallacier *et al* (1974:117-138) y Courcelles (1975:283-306) afirman que en la leche los glicéridos constituyen el 98.5% de los lípidos totales, el colesterol libre, promedio de 0.3%, los fosfolípidos 1% y los ésteres de esterol, un promedio de 0.03%. Para el análisis de esteroides, es necesario aislarlos de la fracción insaponificable, empleando cromatografía de capa fina. Luego se analiza su composición por medio de cromatografía de gas.

Parks (1980:295-297) realizó un estudio de la materia insaponificable de leche entera y descremada, utilizando cromatografía de capa fina para la separación del colesterol y los ésteres de colesterol, y luego cromatografía de gas para la cuantificación. Se encontró que en la leche descremada, los ésteres del colesterol se caracterizan por tener un contenido mayor a 70% en peso del total de ácido esteárico mientras que en leche entera, el contenido del mismo ácido graso es de 10 y 24% en los esteroides del colesterol.

Cuando los productos lácteos son adulterados con sebo animal, un simple análisis de la fracción esteróica no es suficiente, ya que en el cromatograma de los esteroides no aparecerá ninguna señal de adulteración. Por esta razón algunos investigadores han recurrido al análisis de los hidrocarburos y otros componentes de

la fracción insaponificable. Maritano y Oxley (1985:88-92) realizaron un estudio de composición de alcoholes alifáticos e hidrocarburos contenidos en el insaponificable de grasa de leche, manteca y sebo vacuno. Para este estudio emplearon métodos analíticos de cromatografía de capa fina y cromatografía de gas. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los alcoholes alifáticos e hidrocarburos de la grasa de leche, la grasa de cerdo y el sebo vacuno.

Gómez y Vázquez (1985:250-253) y Sengupta et al (1981:703-704) afirman que la cromatografía de capa fina es el método más adecuado para el análisis de la fracción insaponificable y que la separación de las bandas depende de la fase móvil utilizada. Maritano y Oxley (1985:88-92) observaron que utilizando como solvente de desarrollo benceno:metanol (100:1.8), se obtiene la separación de cuatro bandas principales que son: hidrocarburos, alcoholes alifáticos, alcoholes terpénicos y esteroides. También pueden utilizarse otras mezclas de solventes como hexano:benceno 3:2, benceno, éter de petróleo:éter dietílico:ácido acético, 90:10:1, éter de petróleo:éter dietílico, 50:50. Stahl (1969:328-361) ha publicado una lista de mezclas de solventes que pueden utilizarse en la cromatografía de capa fina, para el examen de la fracción insaponificable.

En las placas de sílica gel, en cuya superficie se han separado las bandas correspondientes a los distintos compuestos

del insaponificable, se pueden hacer estudios de densitometría óptica para determinar la intensidad de cada una de las bandas reveladas en la placa. Kirchner (1978:415) indica que con este método es posible obtener perfiles densitométricos que son característicos de las fracciones insaponificables provenientes de diferentes especies animales o vegetales.

Bachman (1969:3-21) realizó estudios de cromatografía de capa fina en la materia insaponificable de grasa láctea y grasas vegetales, para determinar el porcentaje de sustituciones en la mantequilla. Utilizando el solvente revelador molibdato de ácido fosfórico al 3.5%, se pudo constatar cualitativamente hasta un 5% de adiciones de grasa vegetal a grasa láctea. Se observó en la placa cromatográfica de la grasa vegetal dos franjas separadas, situadas arriba de la correspondiente a los esteroides, mientras que en las placas de grasa láctea sólo se observó una.

La cromatografía de capa fina detecta inequívocamente adulteraciones superiores al 15%. Con experiencia es posible detectar porcentajes de adulteración aún menores. Este método se basa en la intensidad y tamaño de las dos bandas colocadas arriba de la franja de esteroides. El ensayo es incapaz de cuantificar el % de adulteración con precisión y debe ser utilizado para exámenes rápidos.

Bachman (1969:3-21) comprobó que las diferencias de intensidad en las bandas de las grasas vegetales y sebos animales, pueden usarse para detectar estas mezclas utilizando el densitó-

metro que convierte la intensidad de cada banda en un pico. El conjunto de picos correspondientes a las bandas reveladas en la placa de silica gel, constituyen el perfil densitométrico de la placa. Es necesario tomar en cuenta que las franjas que aparezcan en la placa dependerán del solvente y el revelador utilizado, los cuales son factores determinantes en cada análisis.

Al realizar análisis de ácidos grasos y materia insaponificable para descubrir adulteraciones de productos lácteos, debe tomarse en cuenta que hay compuestos que pueden interferir en los resultados. Por ejemplo en mezclas para helados, Revilla (1982:248) menciona que algunos de los emulsificadores que se utilizan son monoglicéridos, diglicéridos o compuestos de polioxietileno, los cuales no deben ser usados en cantidades mayores de 0.10%.

Fernández et al (1986:152-155) menciona que la composición de ácidos grasos de algunos quesos sufre modificaciones en el proceso de maduración debido a la presencia de hongos. Los cambios más pronunciados ocurren en el contenido de ácidos grasos de cadena corta, debido a los fenómenos de reesterificación y degradación oxidativa que sufren.

Sin embargo, Sheppard et al (1978:371-376) afirma que los procesos para la elaboración de quesos afecta el contenido de grasa, pero no la composición de ácidos grasos. Esta observación la obtuvo de un estudio basado en la composición de los ácidos

grasos de tres tipos de quesos; Cheddar, Blue y Cottage, no encontrando diferencia significativa en la composición de ácidos grasos de estos tres productos.

El Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, LUCAM, de la Dirección General de Servicios de Salud en Guatemala, utiliza métodos de cromatografía de gas, capa fina y densitometría óptica en la detección de adulterantes en la leche y productos lácteos.

Los criterios para los dictámenes de laboratorios son exámenes de composición de ácidos grasos. Cuando estos exámenes indican una relación C16:0/C14:0 de 3 o más, se considera que las muestras están adulteradas. En caso de duda se efectúan los exámenes más tediosos de composición de esteroides.



### III. OBJETIVOS

Información obtenida en el Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos, LUCAM, indica que la venta de imitaciones comercializadas como productos auténticos es una práctica corriente en relación a los productos lácteos.

Los análisis químicos necesarios para la detección de estas adulteraciones son el análisis químico de composición de ácidos grasos y el análisis de esteroides. El primero es un análisis simple pero poco sensible. El tiempo de análisis no es más de una hora, pero sólo se puede detectar con seguridad alrededor de 20% de sustitución.

Por el contrario el análisis de esteroides es un método tedioso que requiere dos días de análisis pero que permite detecciones de hasta 1% de sustitución.

El principal objetivo de este estudio consiste en averiguar si el análisis densitométrico es una opción ventajosa para el examen de productos lácteos adulterados con grasa vegetal, y establecer hasta que nivel de adulteración puede ser utilizado con confianza. Para realizar este propósito será indispensable efectuar los estudios siguientes:

A. Establecer la composición de ácidos grasos tanto de la leche comercializada en Guatemala, como la de las grasas vegetales de sustitución más utilizadas.

- B. Validar los criterios para la detección de las imitaciones. Para ello es necesario examinar muestras de grasa láctea adulteradas con diferentes cantidades de aceite de algodón hidrogenado, el cual constituye la materia más utilizada en la confección de imitaciones.
- C. Efectuar el análisis de ácidos grasos en muestras de crema, quesos y mantequillas comercializadas en Guatemala y confirmar las adulteraciones indicadas por los exámenes de composición de ácidos grasos, utilizando el análisis de esteroides que constituye un método sensible e independiente para la detección de grasas vegetales en productos lácteos.
- D. Estudio densitométrico de las placas cromatográficas del insaponificable con el objeto de comprobar si pueden utilizarse para la detección de adulteraciones y, la sensibilidad del ensayo (nivel de adulteración).

## IV. MATERIALES Y METODOS

A. Materiales y equipo

1. Cromatógrafo de gas - Tracor 222
2. Integrador - Hewlett Packard 3380A
3. Densitómetro - Kontes 800
4. Graficador - Linear 1200
5. Placas cromatográficas - Merck 20x20 cm de sili-  
cagel 60 F254 con 0.25  
mm de espesor
6. Centrifuga - Garver 55
7. Balanza - Mettler AC100
8. Estufas - Cornin

A. Reactivos

- Solución Babcock : disolver 70 g de hexametafosfato de sodio en 600 ml de agua. Agregar 30 ml de triton X100 y 5 ml de metanol. Aforar a 1000 ml con agua.
- Reactivos: NaOH, KOH, trifluoruro de Boro en metanol, ácido sulfúrico, sulfato de sodio anhidro, NaCl, piridina y anhidro acético.
- Solventes: éter de petróleo, éter etílico, metanol, etanol, cloroformo, agua destilada, heptano.

## B. Métodos

### 1. Universo de trabajo

- Muestras de grasa extraídas de diferentes tipos de quesos, cremas, leches y mantequillas.
- Muestras de leche de vaca obtenida directamente de la ubre para asegurar así resultados confiables.
- Muestra de grasa láctea extraída de leche recolectada de varias fincas a la cual se le agregó aceite de algodón hidrogenado para alcanzar niveles de 5, 10, 20, 40, 50, 60 y 75% de adulteración.

Para hacer las mezclas, con la grasa de leche pura, se le agregó suficiente cantidad de grasa de algodón hidrogenado para alcanzar el % de adulteración deseado. En todos los casos el peso final de la mezcla fué de 50 g. La composición de las mezclas se indica en la siguiente tabla:

<u>% adulteración</u>	<u>grasa láctea (g)</u>	<u>grasa algodón (g)</u>
5	47.5	2.5
10	45.0	5.0
20	40.0	10.0
40	30.0	20.0
50	25.0	25.0
60	20.0	30.0
75	12.5	37.5

- Muestra de grasa de aceite de palma hidrogenado.

## 2. Procedimiento

Se efectuaron análisis de composición de ácidos grasos por medio de cromatografía de gas con la grasa extraída de cada uno de los productos. La fracción insaponificable se analizó por cromatografía de capa fina y la composición de los esteroides fue analizada por cromatografía de gas, en las muestras que no coincidieron en la determinación de adulteración por medio de la relación C16:0/C14:0 y C18:1/C14:0. Por último se obtuvo el perfil densitométrico de la placa cromatográfica de cada muestra.

A continuación se describe detalladamente el procedimiento que se llevó a cabo en el análisis de la grasa de cada muestra.

### a. Extracción de la grasa de los distintos productos lácteos:

#### a.1. Preparación de la muestra:

- Mantequilla: derretir una cantidad aproximada de 5 g en un vaso de precipitados. La grasa fluida se toma para efectuar los análisis de ácidos grasos y esteroides.
- Cremas: medir aproximadamente 150 ml de la muestra y agregarle 50 ml de reactivo de Babcock y homogenizar en licuadora.
- Quesos: tomar aproximadamente 100 g de muestra (dependiendo del porcentaje de grasa de la muestra, para quesos procesados por ejemplo, menos de 100 g es suficiente. Para queso cottage y requesón se recomienda un poco más) y licuar con 100 ml de reactivo de Babcock.

a.2. Extracción:

Vertir la muestra homogenizada con el reactivo de Babcock, en dos o tres butirómetros de 9 g, hasta la marca de 3 cm. Colocar la mezcla en un baño maría hirviendo, hasta que la grasa se separe. Agregar a cada butirómetro una solución de metanol-agua (1:1), hasta la altura del cuello. Centrifugar durante 5 min. Agregar solución metanol agua (1:1) hasta la parte superior del butirómetro. Centrifugar 3 min y extraer la grasa con una pipeta Pasteur.

b.1. Análisis de ácidos grasos

b.1.1. Esterificación de los ácidos grasos:

En un balónvolumétrico de 25 ml colocar 20 gotas de la grasa, agregar 4 ml de NaOH 0.5 N en metanol, calentar hasta saponificar la grasa y luego añadir 3.5 ml de trifluoruro de boro en metanol y 4.5 ml de heptano, agregar una solución saturada de NaCl hasta la parte superior del cuello del balón volumétrico. La capa superior del líquido se extrae con una pipeta Pasteur y se coloca en un vial, que contiene una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro.

b.1.2. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gas:

La solución de ácidos grasos en heptano es inyectada en un cromatógrafo Tracor 222. Para medir el porcentaje de área se utiliza un integrador 3380A.

## Condiciones cromatográficas:

Cantidad de inyección Aprox. 1 ul  
 Longitud de la columna 6 pies D.I. 1/4 "  
 Empaque 12 % DES en Anakon ABS  
 Tamaño de partícula 90/10 mallas  
 Fase móvil nitrógeno  
 Temperatura de detector 230o C  
 Temperatura de Columna 100 C hasta 200 C

## b.2. Análisis de Esteroles

## b.2.1. Extracción de la materia insaponificable /\*\*/

En un balón de 50 ml pesar 2.5 g de grasa, se le adiciona 25 ml de alcohol etílico al 95%, 6 pastillas de KOH, 1 ml de agua destilada, y perlas de ebullición. Calentar en reflujo durante 30 minutos. Transferir la solución alcohólica de jabón a una ampolla de decantación de 250 ml, lavar el balón de saponificación con 2 porciones de agua caliente, agregar 20 ml de agua destilada a la ampolla. Hacer cuatro extracciones, con 50 ml de éter primero, y con 20 ml las tres últimas extracciones. Las porciones de éter se ponen en otra ampolla. Lavar cuatro veces la fase etérea con 20 ml de agua destilada,

-----  
 /\*\*/ Se empleó el método recomendado por A.O.A.C. (Ref. 34) con algunas modificaciones.

alternando con 20 ml de KOH 0.5 N. Si se forma una emulsión durante el lavado, se extrae la fase acuosa hasta donde sea posible, dejando la emulsión en la ampolla de decantación con la fase etérea y se prosigue con el siguiente lavado; en algunos casos algunas gotas de etanol al 95% ayudan a la separación de la emulsión. Lavar cuatro veces más con 50 ml de agua destilada. Al último lavado, se agrega unas gotas de fenolftaleína. Si el indicador no presenta coloración se continua el procedimiento. En caso contrario debe hacerse mas lavados hasta que no haya coloración rosada.

Pasar la fase etérea a través de un filtro que contenga una capa de sulfato de sodio anhidro, y recolectar en un vaso de precipitar. Evaporar el eter sobre un baño maría y con corriente de nitrógeno. Disolver el residuo con cloroformo y colocar la solución en un vial. Evaporar hasta obtener un volumen adecuado para sembrar las placas cromatográficas.

b.2.2. Separación de los esteroides por cromatografía de capa fina

Sembrar la muestra insaponificable en forma de banda continua. Para desarrollar la placa utilizar una mezcla 1:1 de éter de petróleo:éter etílico. Localizar la banda de esteroides en una cámara UV. Raspar la banda de esteroides y extraer con cloroformo; filtrar en un vial de 5 ml, evaporar el solvente por medio de calentamiento y corriente de nitrógeno.

### b.2.3. Metilación de la fracción esterólica

Agregar unas gotas de piridina y de anhídrido acético, luego cerrar el vial con un tapón de rosca. Dejar acetilar durante la noche. Al día siguiente, evaporar a sequedad por medio de calentamiento en baño maría y corriente de nitrógeno. Agregar con una jeringa apropiada una aproximadamente 500 ul de cloroformo.

### b.2.4. Análisis de esteroides por cromatografía de gas

Injectar la solución de esteroides en un cromatógrafo de gas y registrar el porcentaje de área con un integrador.

Condiciones cromatográficas:

Cantidad Aprox. 4 ul

Longitud de la columna 6' pies I.D. 1/4 "

Empaque 3% de O.V.1 en supelcoport

Tamaño de partícula 80/100 mallas

Fase móvil nitrógeno

Temperatura de detector 270 C isométrico

Temperatura de columna 270 C

Se empleó nitrógeno como gas portador, y fue regulado de tal manera que el pico correspondiente al colesterol se mantuviera a un tiempo de retención aproximado de 9.50.

### b.2.5. Análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las placas cromatográficas.

## b.2.5.a. Revelado de las placas de cromatografía de capa fina

Con un atomizador, rociar las placas con una solución de ácido sulfúrico al 5% en etanol. Secar durante 15 min. en horno a 100 C.

## b.2.5.b. Perfiles densitométricos

Por medio de un densitómetro y de un graficador, obtener el perfil densitométrico de cada una de las placas cromatográficas.

Condiciones del densitómetro:

Atenuaciones utilizadas 1024 y 512

Velocidad de la placa 1 cm/min

Longitud de inicio de lectura de placa 16 cm

Condiciones del graficador:

Velocidad de papel 1 cm/min

Atenuación 2 mv y 5 mv

La atenuación debe ajustarse dependiendo de la intensidad de coloración de las bandas reveladas con la solución de ácido sulfúrico. Si los picos son muy pequeños debe disminuirse la atenuación para lograr mayor sensibilidad en el instrumento.

## V. RESULTADOS

A. Composición de ácidos grasos en leches y grasas de sustitución

La tabla 5.1.a presenta la composición de 39 muestras de leche pura. En los primeros 15 casos la leche se obtuvo de la ubre de diferentes vacas, en los casos restantes fue leche cruda recolectada de los tanques de recolección de las empresas distribuidoras de leche por inspectores del departamento de Control de Alimentos.

Las primeras siete muestras de la tabla fueron analizadas específicamente para este trabajo, los otros datos fueron obtenidos de los archivos de LUCAM. De las últimas 24 muestras, 3 fueron analizadas en 1983, 10 en 1984 y 11 en 1985.

Tabla 5.1.a

Contenido (%) de ácidos grasos de leche de vaca analizada

Muestra	C14	C16	C18	C18:1	C16/C14	C18:1/C14
1	11.36	28.85	11.7	28.55	2.54	2.51
2	11.05	26.68	11.65	25.53	2.42	2.31
3	11.67	28.99	12.92	27.59	2.48	2.36
4	11.28	28.54	12.63	23.20	2.53	2.06
5	12.52	28.80	13.01	21.90	2.30	1.75
6	11.30	29.11	13.72	28.88	2.58	2.56
7	11.23	28.08	17.58	28.88	2.50	2.57
8	12.50	29.76	10.64	26.58	2.38	2.13
9	12.53	28.55	12.13	21.89	2.28	1.75
10	12.21	30.90	12.56	23.22	2.53	1.91
11	12.53	28.55	12.13	21.89	2.28	1.75
12	12.35	25.32	13.83	25.88	2.05	2.10
13	12.07	30.89	12.54	25.59	2.56	2.10
14	10.72	29.72	12.50	29.59	2.77	2.76
15	10.39	29.61	12.69	29.07	2.85	2.80
16	10.50	30.07	11.87	27.63	2.86	2.63
17	11.21	29.97	12.30	26.48	2.67	2.36
18	11.21	30.77	12.32	26.79	2.75	2.39
19	10.77	31.39	11.61	27.48	2.91	2.55
20	10.85	32.01	13.97	31.49	2.95	2.90
21	10.22	29.93	12.82	30.26	2.93	2.96
22	9.99	28.37	12.43	29.09	2.84	2.91

tabla 5.1.a (continuación)

No.	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C16/C14	C18:1/C14
23	10.05	27.56	11.44	26.59	2.74	2.65
24	10.28	27.16	12.45	25.24	2.64	2.46
25	10.42	28.01	11.87	26.95	2.69	2.59
26	10.02	27.92	10.79	25.80	2.79	2.58
27	9.91	28.61	10.30	25.19	2.89	2.54
28	9.58	24.73	11.72	23.59	2.58	2.46
29	10.15	27.93	11.78	27.38	2.46	2.70
30	10.36	26.99	13.49	28.13	2.61	2.72
31	10.03	25.69	12.53	29.39	2.56	2.93
32	10.45	30.50	12.50	27.43	2.92	2.63
33	10.15	30.30	12.87	29.52	2.99	2.90
34	10.83	30.87	12.18	26.55	2.85	2.45
35	12.66	28.93	16.82	27.16	2.29	2.15
36	12.43	28.27	16.83	27.22	2.27	2.19
37	11.04	27.77	12.13	29.65	2.52	2.69
38	9.48	30.26	14.12	26.51	3.19	2.80
39	10.46	30.04	12.06	29.75	2.87	2.84
Promedio	10.99	28.88	12.70	26.91	2.64	2.47
**	+0.30	+0.52	+0.48	+0.75	+0.08	+0.11

Debe observarse que las muestras de leche fueron obtenidas en años diferentes y estaciones diferentes, y sin embargo no muestran las variaciones de composición características de zonas templadas. Es posible que la composición de la leche en Guatemala no sufra estos cambios debido a que su clima no tiene variaciones muy grandes de temperatura. Es también probable que la homogeneidad de composición de las muestras se deba a que la leche cruda recogida en tanques colectores es en realidad una mezcla de lotes provenientes de diferentes hatos lecheros.

Puede observarse también en la tabla anterior, que el valor promedio de cada ácido graso se encuentra muy cercano a los valores presentados por varios autores (tabla 2.3).

En la figura 5.1.a se presenta el cromatograma de ácidos grasos de una muestra de leche pura. Puede notarse claramente los picos correspondientes a los ácidos grasos principales. El contenido de cada uno de ellos está indicado en la columna de la derecha.

La Figura 5.2.a muestra el análisis cromatográfico del colesterol de una muestra de leche pura. El único pico del perfil en el cromatograma, es el correspondiente al colesterol.

La figura 5.3 muestra el cromatograma de ácidos grasos de una muestra de aceite de algodón hidrogenado, utilizado en la mayoría

de industrias para la producción de imitaciones en lácteos. En éste cromatograma puede observarse la alta cantidad de C18:1, aproximadamente el 63% de la composición de ésta grasa. También el ácido C18:2 se encuentra en una cantidad significativamente mayor que en una grasa láctea.

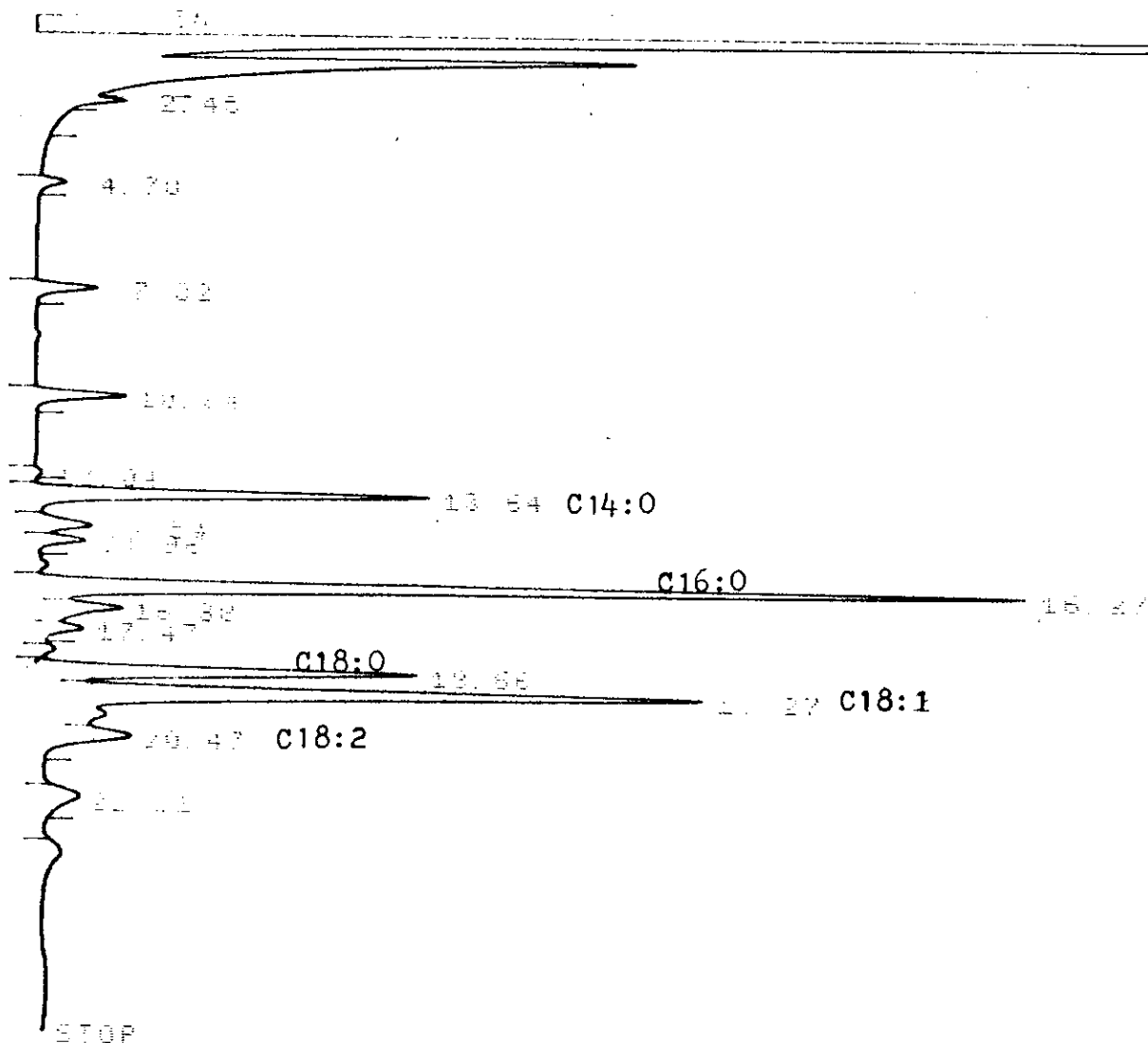
En la figura 5.4 se muestra el cromatograma de los ácidos grasos de una muestra de aceite de palma hidrogenado. Se observa que sus mayores componentes son los ácidos palmítico, C16:0, 46% y oléico, C18:1, 40%. El C18:2, también se encuentra en mayor cantidad que en una grasa láctea.

El aceite de palma es una de las principales grasas vegetales producidas en Centroamérica y es utilizado ocasionalmente en la confección de imitaciones.



FIGURA 5.1.a.

Cromatograma de acidos grasos de leche pura (1)

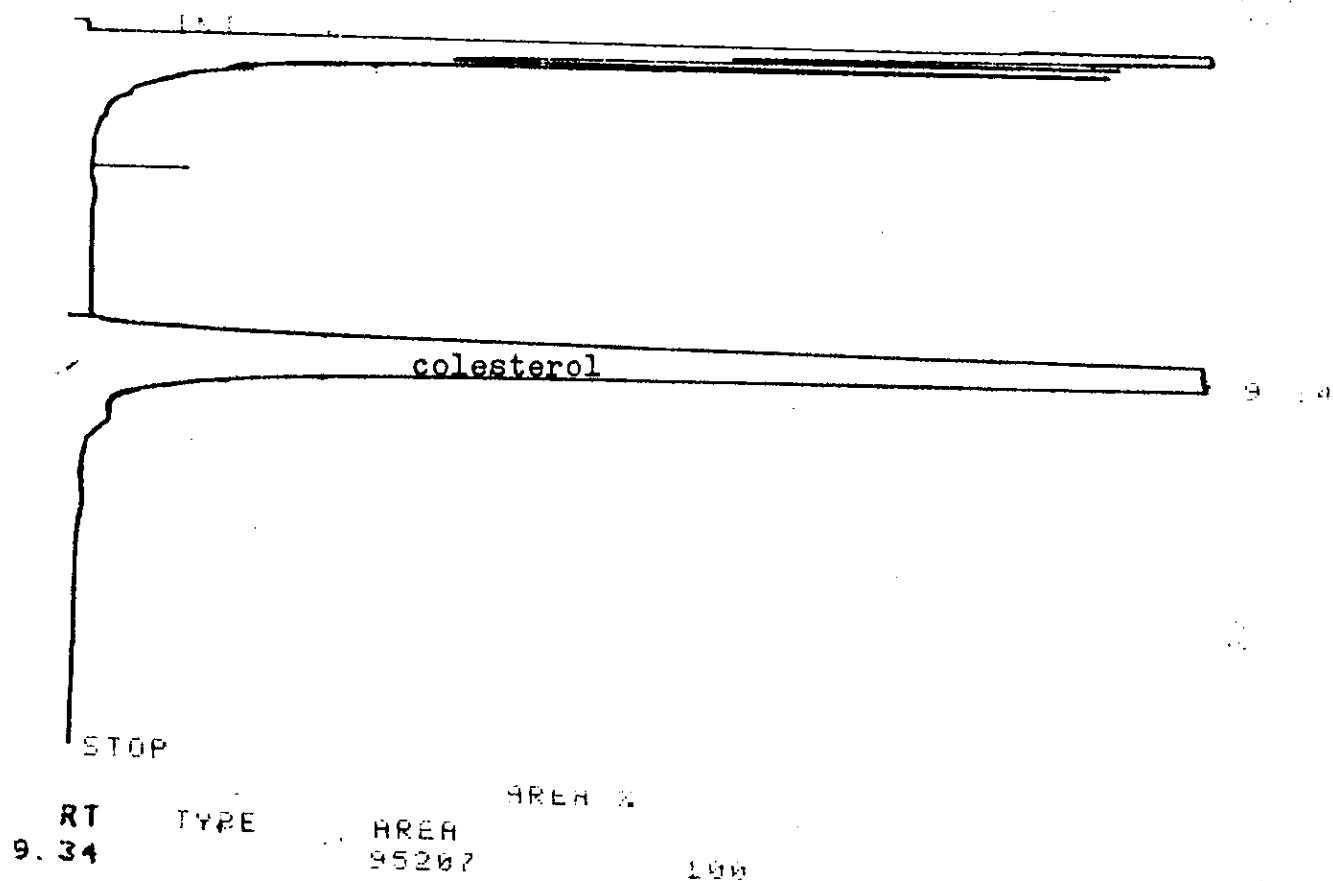


RT	AREA	AREA %
4.70	112	0.004
7.32	114	0.006
10.34	610	0.014
11.54	1181	0.019
11.74	5069	0.081
14.54	910	0.012
15.54	1181	0.012
16.27	1181	0.012
16.68	1181	0.012
17.47	1181	0.012
18.55	1181	0.012
19.55	1181	0.012
20.47	1181	0.012
21.27	1181	0.012
22.47	1181	0.012
23.47	1181	0.012
24.47	1181	0.012
25.47	1181	0.012
26.47	1181	0.012
27.47	1181	0.012
28.47	1181	0.012
29.47	1181	0.012
30.47	1181	0.012
31.47	1181	0.012
32.47	1181	0.012
33.47	1181	0.012
34.47	1181	0.012
35.47	1181	0.012
36.47	1181	0.012
37.47	1181	0.012
38.47	1181	0.012
39.47	1181	0.012
40.47	1181	0.012
41.47	1181	0.012
42.47	1181	0.012
43.47	1181	0.012
44.47	1181	0.012
45.47	1181	0.012
46.47	1181	0.012
47.47	1181	0.012
48.47	1181	0.012
49.47	1181	0.012
50.47	1181	0.012
51.47	1181	0.012
52.47	1181	0.012
53.47	1181	0.012
54.47	1181	0.012
55.47	1181	0.012
56.47	1181	0.012
57.47	1181	0.012
58.47	1181	0.012
59.47	1181	0.012
60.47	1181	0.012
61.47	1181	0.012
62.47	1181	0.012
63.47	1181	0.012
64.47	1181	0.012
65.47	1181	0.012
66.47	1181	0.012
67.47	1181	0.012
68.47	1181	0.012
69.47	1181	0.012
70.47	1181	0.012
71.47	1181	0.012
72.47	1181	0.012
73.47	1181	0.012
74.47	1181	0.012
75.47	1181	0.012
76.47	1181	0.012
77.47	1181	0.012
78.47	1181	0.012
79.47	1181	0.012
80.47	1181	0.012
81.47	1181	0.012
82.47	1181	0.012
83.47	1181	0.012
84.47	1181	0.012
85.47	1181	0.012
86.47	1181	0.012
87.47	1181	0.012
88.47	1181	0.012
89.47	1181	0.012
90.47	1181	0.012
91.47	1181	0.012
92.47	1181	0.012
93.47	1181	0.012
94.47	1181	0.012
95.47	1181	0.012
96.47	1181	0.012
97.47	1181	0.012
98.47	1181	0.012
99.47	1181	0.012
100.47	1181	0.012



FIGURA 5.2.a

Cromatograma de esteroides de leche pura.



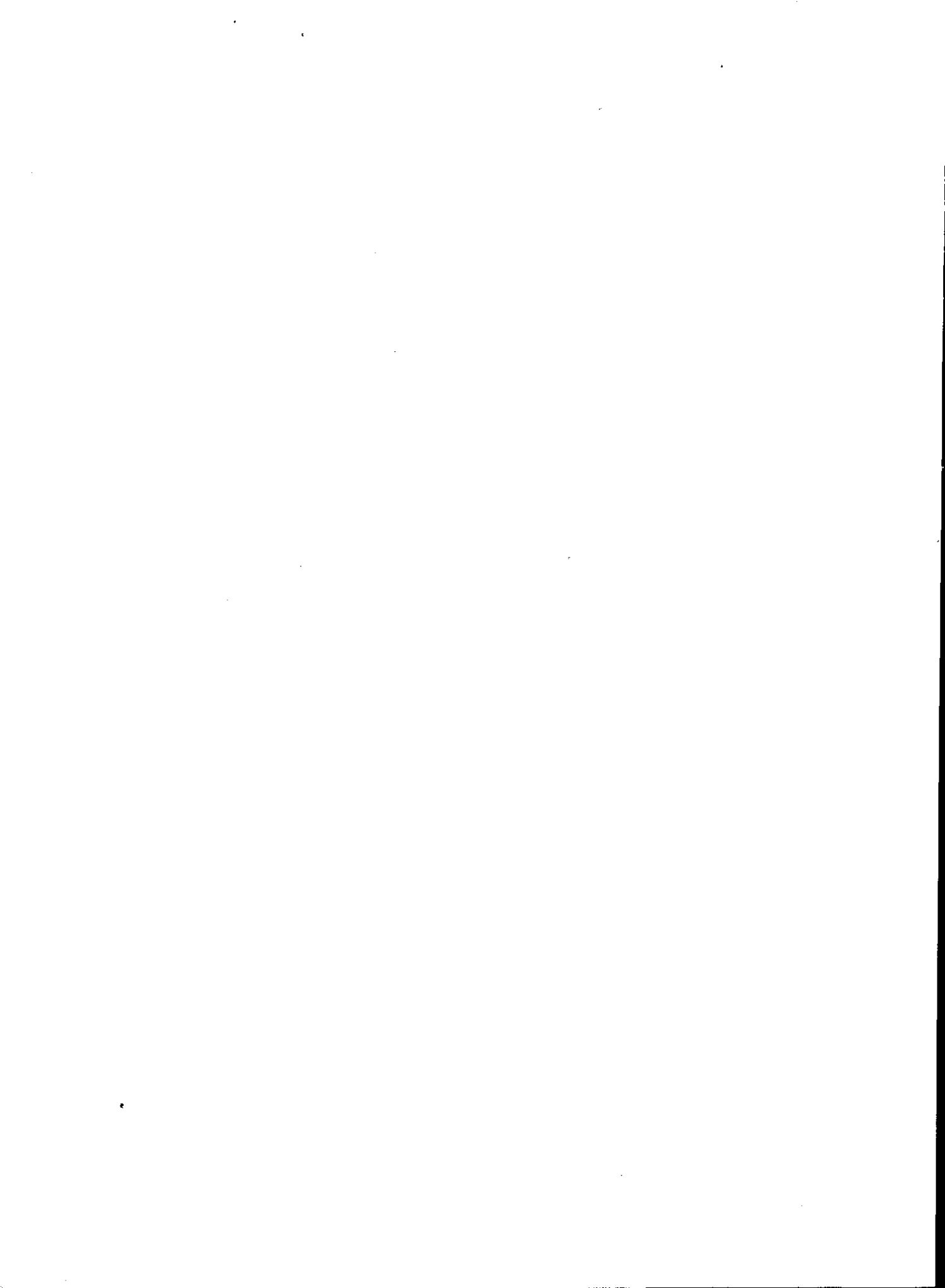
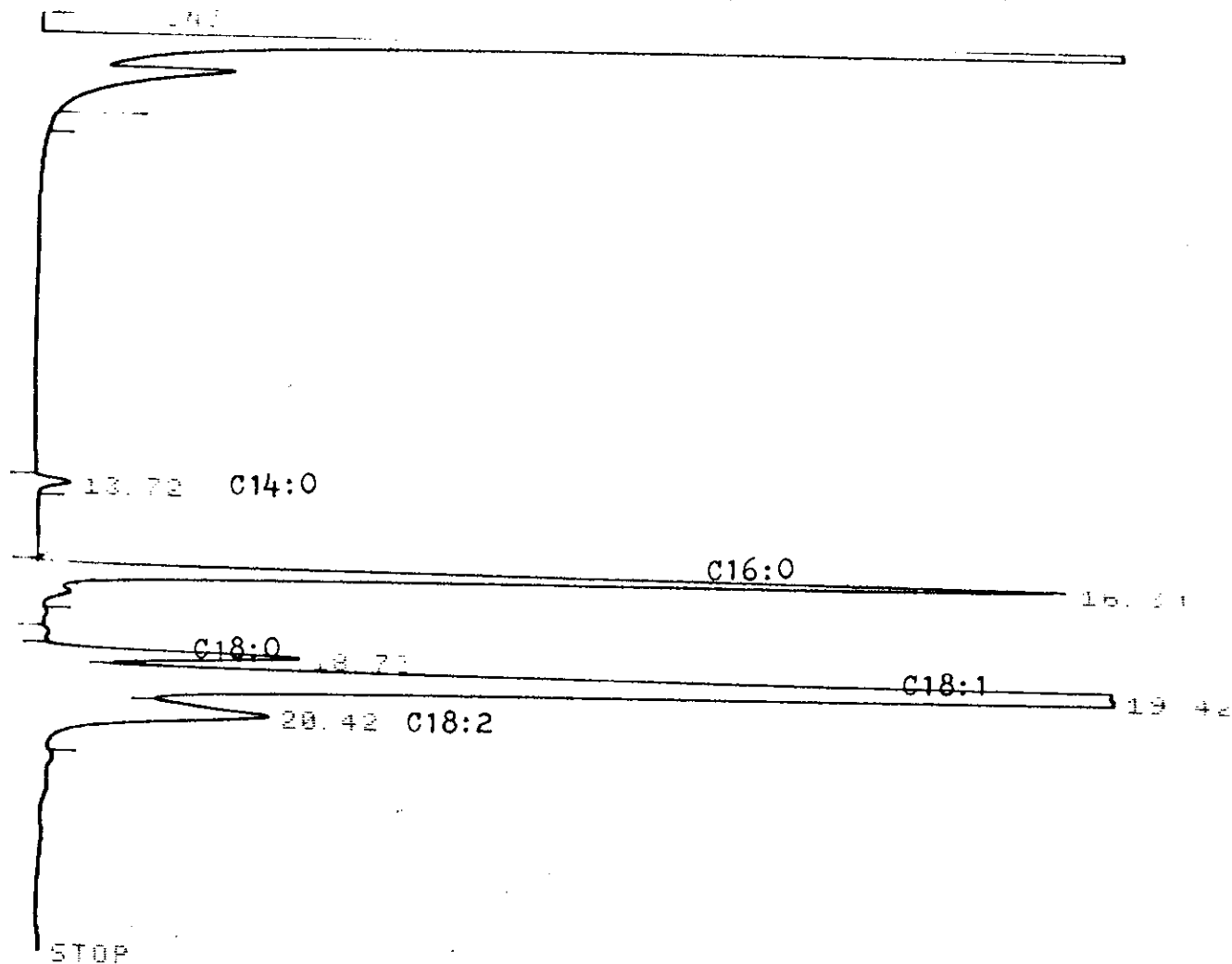


FIGURA 5.3.a

0000 1.30

HITN

Cromatograma de acidos grasos de aceite  
de algodón hidrogenado.



RT	TYPE	AREA	AREA %
13.72		416	0.5727
16.30		14984	20.63
18.72		13916	19.413
19.42	M	45921	63.22
20.42	M	7382	10.18

HP 1136A

OLY 2.

RVAM 02

STOP 30

HITN

1

REJECT

100

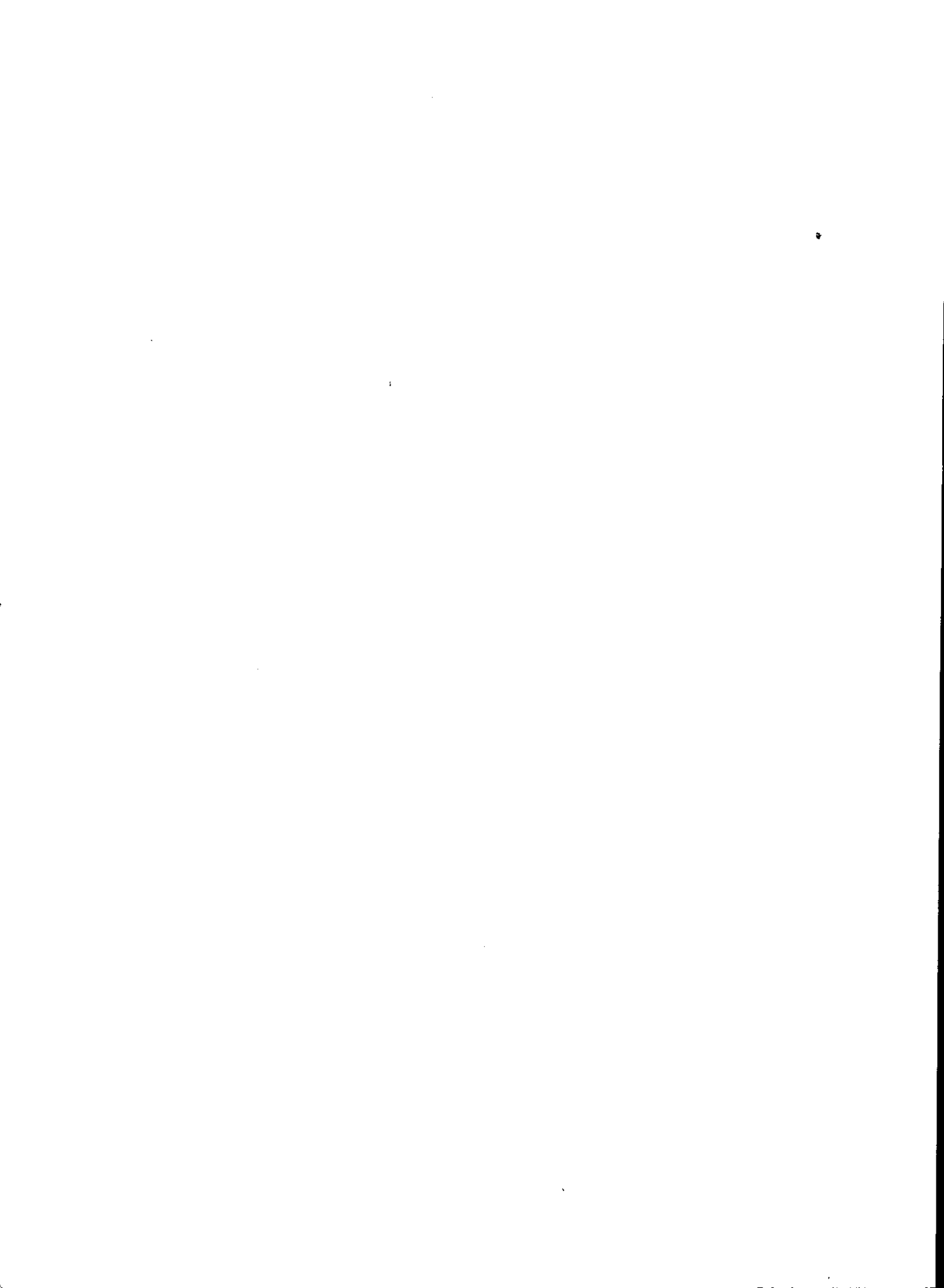
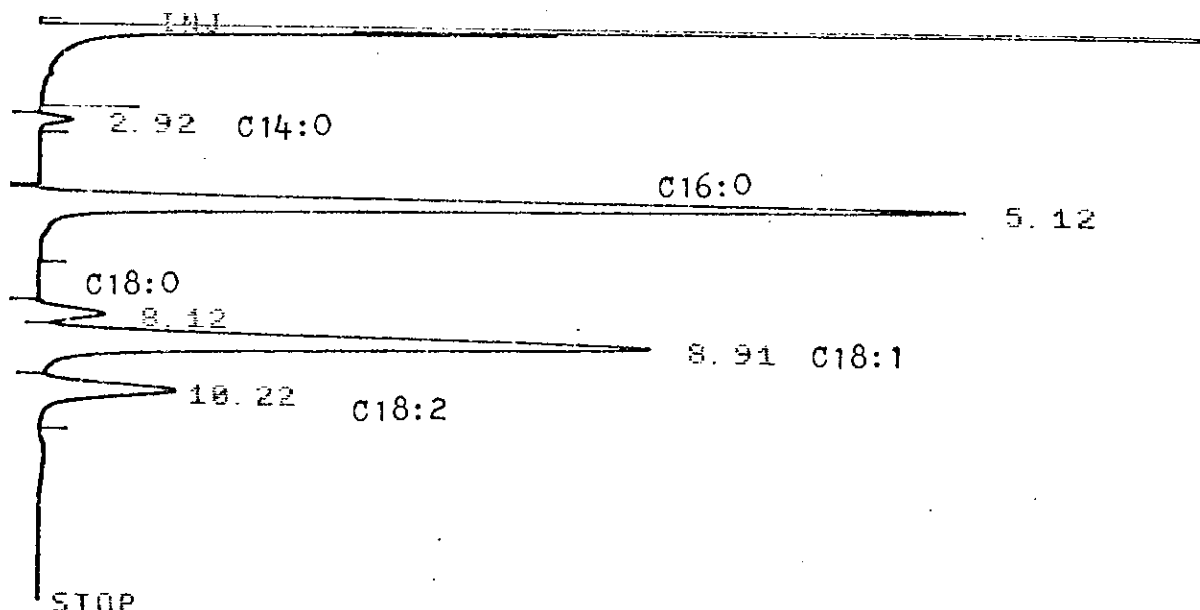


FIGURA 5.4.a

Cromatograma de ácidos grasos de aceite  
de palma hidrogenado



RT	TYPE	AREA	AREA %
2.92		300	.928
5.12		14874	46.05
8.12		1228	3.802
8.91	M	12938	40.06
10.22	M	2960	9.164

HP 3380A  
 DLY 2. STOP 30 REJECT 100  
 MV/M .01 ATTN 1



B. Estudio de muestras de leche adulteradas con aceite hidrogenado de algodón a distintos porcentajes

Se trabajó con una muestra de grasa de leche de vaca, obtenida de una mezcla de leches de diferentes fincas, que fue adulterada con 5, 10, 20, 40, 50, 60 y 75 % de aceite de algodón hidrogenado. Por medio del análisis de cromatografía de gas, se obtuvo el contenido de ácidos grasos para cada muestra, así como el cromatograma de la franja de los esteroides aislados de la placa de capa fina. También se obtuvieron perfiles densitométricos correspondientes a las placas de capa fina de la fracción insaponificable de todas las muestras.

En la tabla 5.2.b se presentan los datos de la composición de ácidos grasos y los cocientes C16/C14, C18:1/C14 para cada uno de los niveles de adulteración. En esta tabla puede observarse que al aumentar el porcentaje de adulteración, aumenta el contenido del C18:1, así como también el valor de las relaciones C16/C14 y C18:1/C14. A la vez el contenido de los ácidos C14:0, C16:0 y C18:0 disminuyen. Con estos datos se calcularon ecuaciones de correlación para poder obtener un valor aproximado del % de adulteración en base al contenido de C14:0 y C18:1; se eligieron estos dos ácidos grasos, debido a que son los mejores indicadores de la adulteración (7). Las ecuaciones obtenidas son :

$$(1) \text{ \% adulteracion} = 2.68 \text{ C18:1} - 76.42$$

$$\text{correlacion} = 1.0$$

$$(II) \% \text{ adulteración} = - 8.95 \text{ C14:0} + 101.62$$

$$\text{correlación} = -1.00$$

Con estas ecuaciones se puede estimar aproximadamente el porcentaje de adulteración que tiene una muestra en función del contenido de C14 y C18:1.

De la tabla 5.2.b es posible deducir que el cociente C18:1/C14 es un indicador más sensible de la sustitución de grasa láctea con aceite de algodón hidrogenado, debido a que el valor de esta relación se incrementa más rápidamente al aumentar el grado de sustitución.

Tabla 5.2.b

Composición de ácidos grasos de mezclas de grasa láctea con

Adult. (%)	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
0	11.36	28.85	11.70	28.55	4.78	2.54	2.51
5	10.83	28.25	11.14	30.20	5.03	2.61	2.79
10	10.25	27.74	10.84	31.86	5.21	2.71	3.11
20(1)	9.14	26.87	10.12	36.04	5.65	2.94	3.94
20(2)	8.91	26.45	10.19	36.77	5.74	2.97	4.13
40(1)	6.98	24.98	9.49	42.48	8.00	3.58	6.09
40(2)	6.75	23.60	8.80	39.57	8.80	3.50	5.86
50	6.38	23.76	8.66	45.21	8.44	3.72	8.44
60	4.64	23.46	7.80	50.61	8.85	5.06	10.91
75	3.06	22.14	6.95	55.23	9.35	7.34	18.31
100	0.57	20.63	5.42	63.22	10.16	-	-

En la figura 5.2.b se observa el cromatograma de ácidos grasos de una muestra de leche adulterada en un 75 % con grasa vegetal. Se puede observar que esta grasa adulterada presenta un contenido anormalmente pequeño de ácidos grasos de cadena corta, además el contenido de C18:1 es elevado.

El análisis por cromatografía de gas de los esteroides, muestra los picos correspondientes al sitosterol y stigmasterol (fig. 5.3.b) en las muestras adulteradas con la grasa vegetal. En el cromatograma de la muestra adulterada al 5% (fig. 5.4.b) puede notarse el pico, de tiempo de retención de 13.46, correspondiente al sitosterol característico de la grasa vegetal. Esta señal no debería estar presente en el caso de una leche pura (fig.5.1.a). El contenido de sitosterol es otro parámetro que puede ser tomado en cuenta para determinar el porcentaje de adulteración.

Es necesario enfatizar que a este nivel de adulteración, 5%, la composición de ácidos grasos y la relación C18:1/C14:0 no permiten detectar la presencia de grasa vegetal. Sin embargo el análisis de los esteroides utilizando cromatografía de gas y de capa fina, confirman la adulteración en forma categórica. Adulteraciones de hasta 1% pueden ser fácilmente detectadas con el análisis de esteroides.

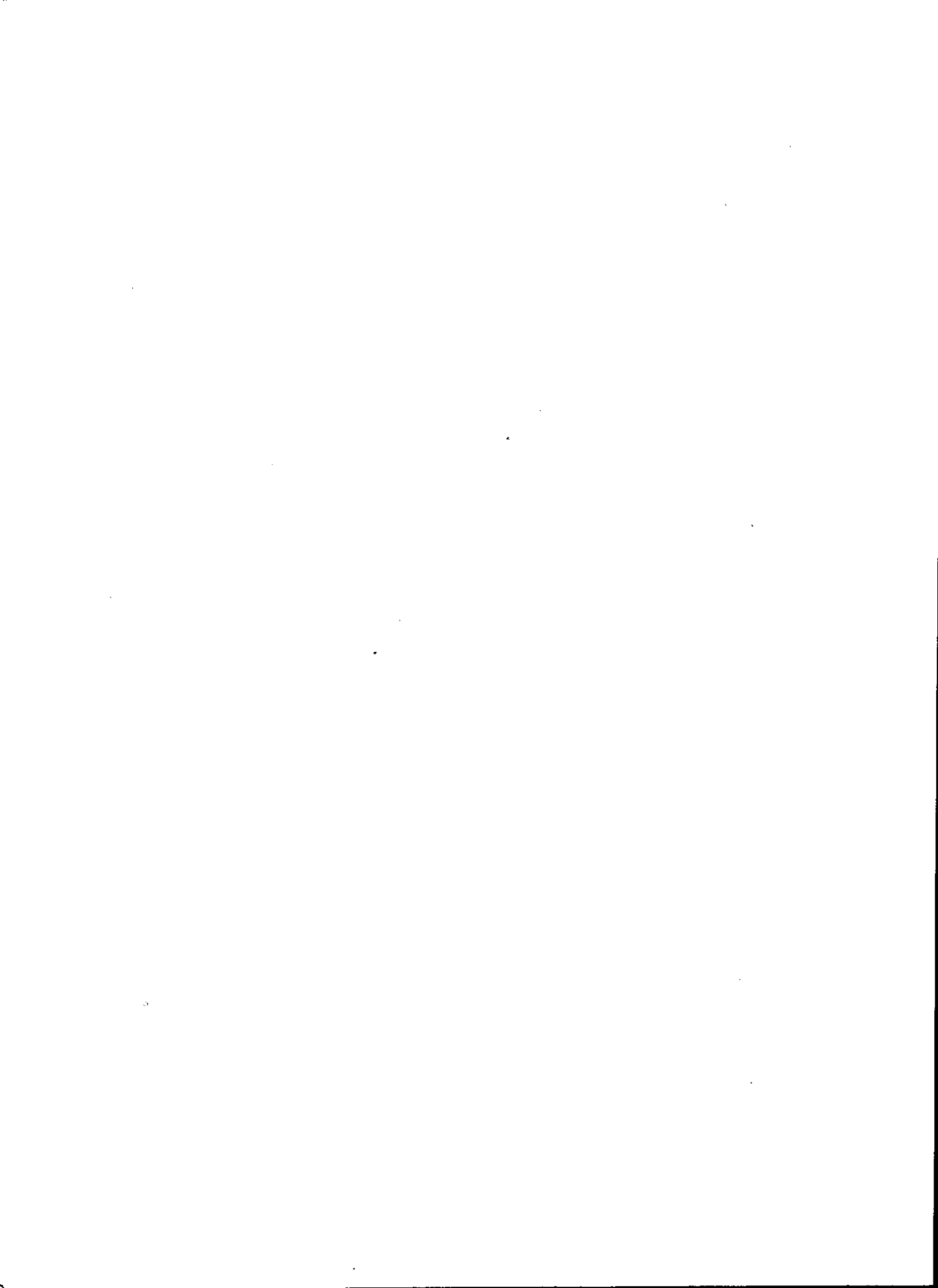
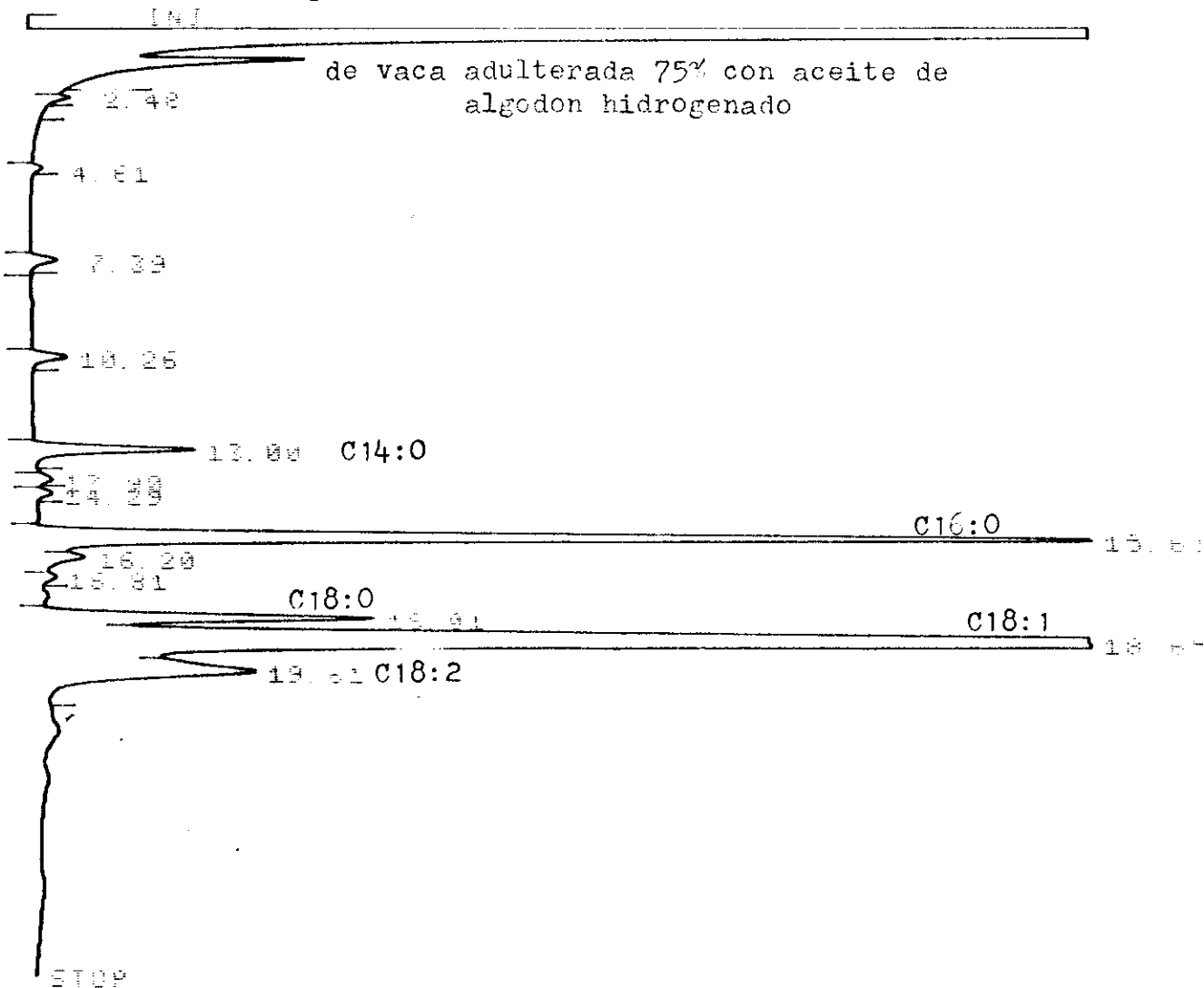


FIGURA 5.2.b

Cromatograma de acidos grasos de leche



RT	TYPE	AREA	AREA %
2.48	T	101	0.117
4.81		110	0.128
7.39		349	0.401
10.26		488	0.566
13.00		2228	2.613
13.90		141	0.165
14.29		154	0.179
15.81		16356	19.14
16.20	M	870	1.012
16.81	M	228	0.267
16.91		3108	3.632
18.01	M	40797	47.87
19.81	M	6980	8.17

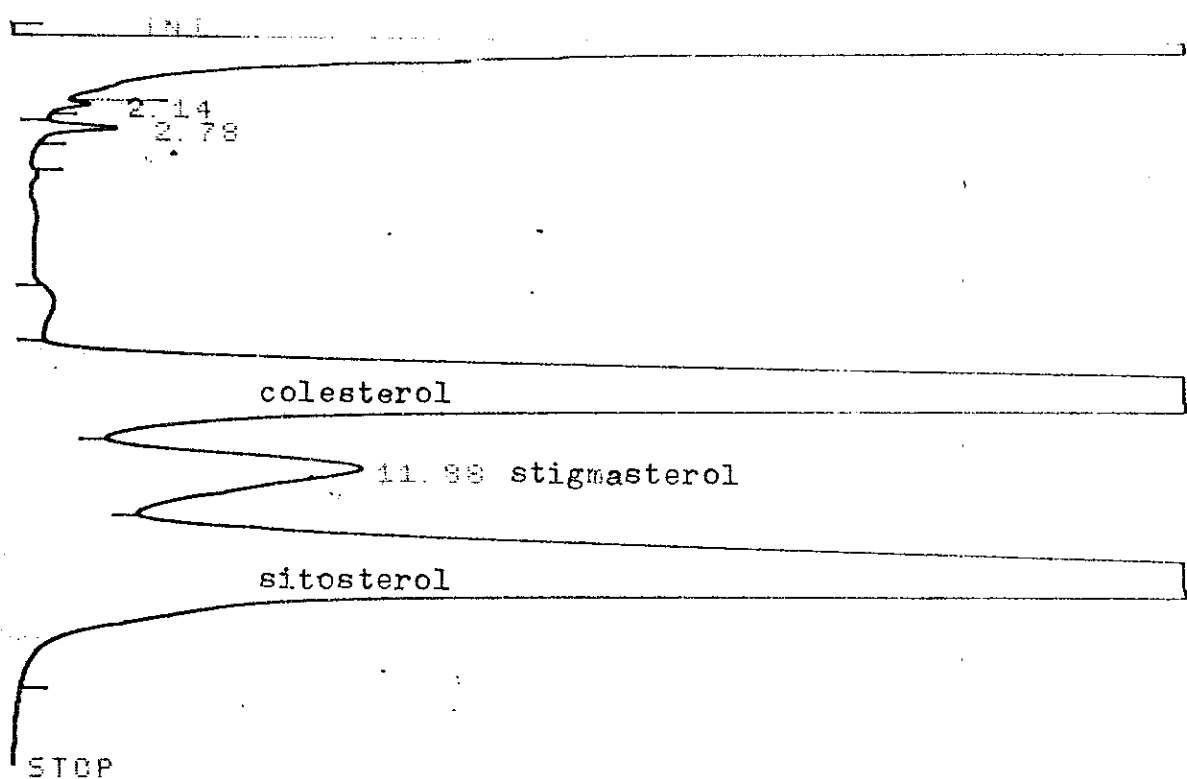


FIGURA 5.3.b

Cromatograma de esteroides de muestra de grasa  
 lactea adulterada 75 % con aceite de algod6n  
 hidrogenado

MV/M .03

HTIN 1



RT	TYPE	AREA	AREA %
2.14	T	201	0.52
2.78	T	346	0.88
2.96		140096	35.14
11.88	M	21010	5.28
14.97	M	125056	31.22

HP 3380A  
 DLY 2  
 MV/M .03

STOP 20  
 HTIN 1

PERCENT 100

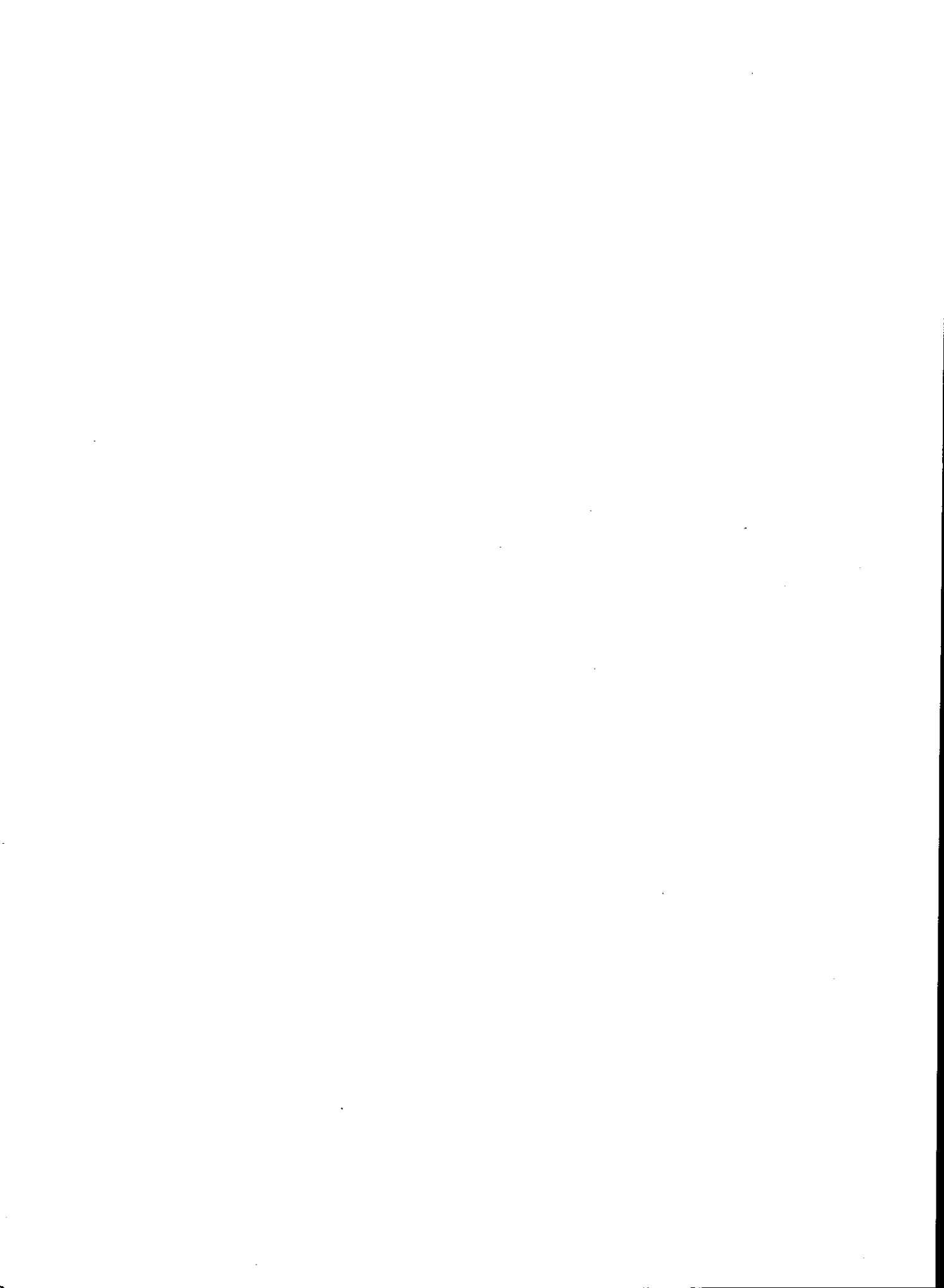


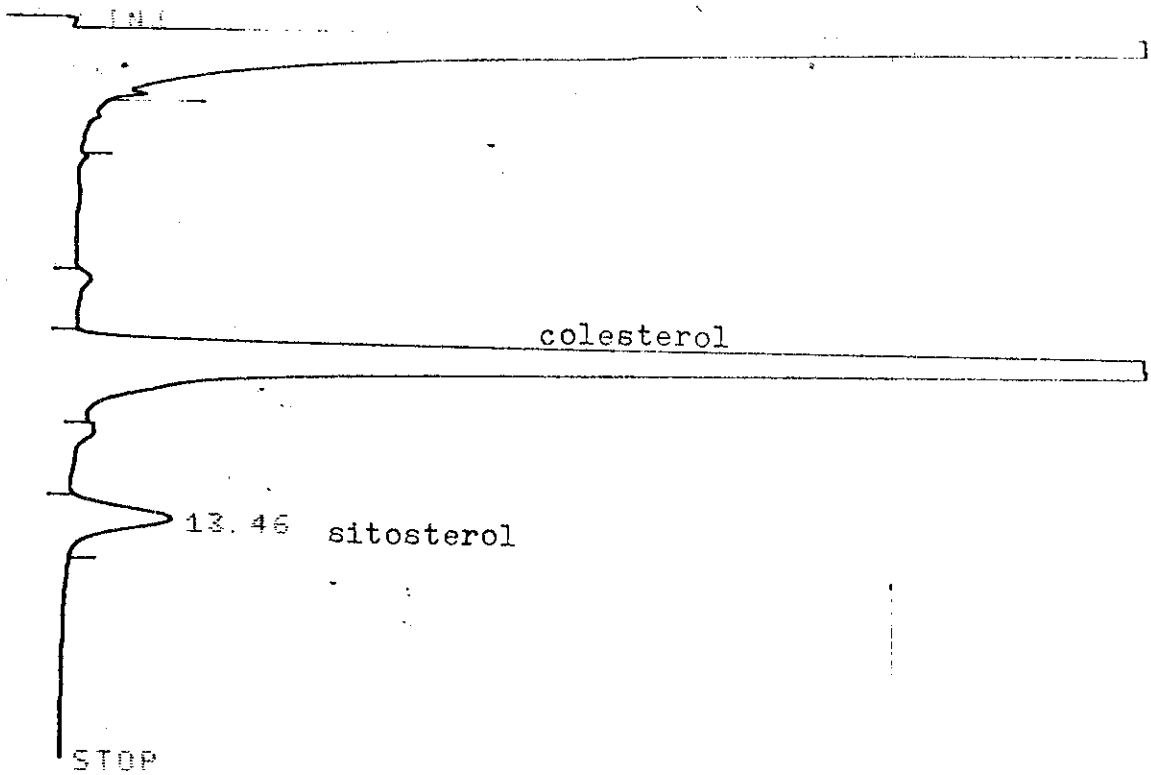
FIGURA 5.4.b

Cromatograma de esteroides de grasa láctea  
adulterada 5 % con aceite de algodón hidrogenado

DLY 2.  
MV/M .03

STOP 22  
RTIN 1

RETC 0



RT	TYPE	AREA	AREA
9.19		71435	
13.46		3461	

HP 3380A



C. Estudio de muestras de crema, quesos y mantequilla comercializadas en Guatemala.

I. Cremas

Se analizó la composición de ácidos grasos de 34 muestras de cremas de distintas marcas comerciales.

La tabla 5.3 muestra el contenido de ácidos grasos y el valor de la relación C16/C14 Y C18:1/C14 de las muestras. El valor tomado como límite para señalar una muestra como adulterada, fue considerado como 3 para la relación C16/C14 ( valor utilizado en los laboratorios de LUCAM ), y de 2.87 para la relación C18:1/C14:0 utilizada por Younes y Soliman (7).

Las muestras señaladas como adulteradas por los índices C16/C14 y C18:1/C14, han sido marcadas con un asterisco (\*) en la tabla 5.3 y subsiguientes.

La primer muestra es la que presenta el valor más alto para la relación C16/C14, de 50.13. Otras muestras con índices anormales (con asterisco) fueron ordenadas en la tabla en orden decreciente de valor para esta relación. Las muestras sin asterisco fueron ubicadas al final de la lista.

En la columna correspondiente a la relación C16:0/C14:0 aparecen 16 muestras marcadas con asterisco. En todas el valor de este índice es mayor de 3 y por lo tanto se considera que las muestras están adulteradas. En este grupo, 13 muestras tienen el índice C18:1/C14 anormalmente alto.

Las muestras 8, 13 y 15 presentan un valor normal para la relación  $C18:1/C14$ . Los contenidos anormalmente elevados de  $C16:0$  permiten conjeturar que estas muestras fueron adulteradas con aceite de palma.

Las siguientes 13 muestras, de la número 17 hasta la número 29, aparecen normales si se toma en cuenta el cociente  $C16/C14$ , pero adulteradas de acuerdo con el cociente  $C18:1/C14:0$ .

Para confirmar la adulteración indicada por la relación  $C18:1/C14$ , se efectuaron análisis de la fracción de esteroides, encontrándose en todos los casos la presencia de fitosteroides de origen vegetal. Puede notarse además que el contenido de  $C14:0$  de estas 13 muestras presentan valores abajo del promedio indicado en la tabla 5.1.a.

Se encontraron 16 muestras adulteradas según la relación  $C16/C14$  y 26 según la otra relación. Solamente 5 muestras de crema estuvieron libres de adulteración, confirmada por ambas relaciones de ácidos grasos.

Tabla 5.3

Contenido (%) de ácidos grasos en cremas y relación C16/C14  
C18:1/C14

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	0.31	15.54	8.04	61.02	13.80	50.13*	196.84*
2	0.65	22.47	5.06	59.51	9.92	34.57*	91.55*
3	9.07	31.69	12.44	35.19	3.29	3.49*	3.88*
4	9.28	31.88	12.45	31.52	1.20	3.43*	3.40*
5	7.95	26.96	13.70	32.60	5.04	3.40*	4.10*
6	8.93	30.38	11.74	32.98	1.86	3.40*	3.69*
7	10.36	34.45	13.24	35.34	--	3.32*	3.41*
8	10.65	34.27	13.68	30.60	--	3.31*	2.87
9	9.32	30.71	18.20	29.46	2.09	3.29*	3.16*
10	9.57	31.51	11.73	31.38	1.32	3.28*	3.28*
11	9.13	29.84	13.03	30.32	1.31	3.27*	3.32*
12	8.38	27.06	13.30	33.97	4.78	3.23*	4.06*
13	10.65	33.51	13.26	27.43	1.56	3.15*	2.58
14	8.82	27.33	14.88	31.25	2.78	3.10*	3.54*
15	10.57	32.30	13.62	28.59	0.80	3.06*	2.70
16	10.13	30.92	12.10	29.52	1.48	3.05*	2.91*
17	9.16	27.20	14.00	40.01	--	2.97	4.37*
18	9.95	29.47	14.18	30.88	3.32	2.96	3.10*
19	9.56	28.29	12.36	33.05	2.34	2.96	3.46*

Tabla 5.3 (Continuación)

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:1	C16/C14	C18:1/C14
20	9.56	28.27	13.50	31.51	3.56	2.95	3.30*
21	9.77	28.83	12.92	30.11	2.68	2.95	3.02*
22	9.99	29.37	15.65	29.23	3.32	2.94	2.92*
23	9.66	28.28	13.40	32.44	2.85	2.93	3.36*
24	9.00	26.37	13.13	31.86	3.23	2.93	3.54*
25	9.72	27.85	14.87	29.62	2.46	2.87	3.05*
26	9.52	27.21	14.28	29.86	2.57	2.86	3.14*
27	9.09	26.03	14.90	32.06	2.54	2.86	3.53*
28	9.61	26.87	12.94	31.24	2.97	2.80	3.25*
29	9.97	26.23	14.54	28.91	2.83	2.63	2.90*
30	11.07	32.97	14.45	30.57	--	2.98	2.76
31	10.48	30.23	16.45	30.04	--	2.88	2.87
32	10.71	30.46	11.14	28.23	1.17	2.84	2.64
33	10.25	27.99	14.20	29.01	2.98	2.73	2.83
34	11.35	28.72	13.46	28.87	2.56	2.53	2.54

\* Adulterado

## II. Mantequillas

En la tabla 5.4 aparecen las composiciones y relaciones de los ácidos grasos de 23 muestras de mantequilla.

El perfil cromatográfico de la primera muestra indicó que el producto es una margarina vegetal etiquetada como mantequilla.

La relación  $C16:0/C14:0$  señala las 14 muestras siguientes, del No. 2 hasta el 14, como adulteradas. Los valores límites utilizados para estas relaciones fueron los mismos que para las cremas. En este grupo, 8 muestras tienen el índice  $C18:1/C14:0$  elevado pero las muestras 4, 5, 11 y 12 lo presentan normal. Como en el caso de las cremas, puede conjeturarse que la sustitución fue hecha con aceite de palma hidrogenado en lugar de aceite hidrogenado de algodón.

La relación  $C18:1/C14$  indica que las muestras 15, 16 y 17 están adulteradas. En estas tres muestras, se observa un valor muy bajo para el  $C14$  y  $C16$ , así como valores fuera de rango para el  $C18$ . Para confirmar la predicción se efectuaron análisis de esterol en estas muestras. Los resultados indicaron que las 3 muestras estaban adulteradas. La relación  $C18:1/C14$  funciona perfectamente cuando se utilizan aceites de algodón hidrogenado para la adulteración de productos lácteos. Cuando los resultados del cociente  $C18:1/C14:0$  es anormal, la muestra se debe considerar adulterada. En estos casos el sustituto puede ser manteca o aceite de palma.

Tabla 5.4

Composición (%) de ácidos grasos en mantequillas

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	-	18.17	5.03	61.61	12.49	*	*
2	8.72	32.96	13.34	31.36	1.93	3.78*	3.60*
3	8.55	31.33	20.59	31.23	1.73	3.66*	3.65*
4	10.45	34.66	13.40	28.72	0.92	3.31*	2.75
5	10.68	34.02	13.67	29.44	--	3.19*	2.76
6	10.72	31.92	15.13	32.80	--	3.17*	3.06*
7	9.47	29.92	12.96	32.88	1.43	3.16*	3.47*
8	9.94	31.44	12.74	29.90	1.09	3.16*	3.01*
9	9.94	31.24	12.67	29.69	1.19	3.14*	2.99*
10	10.33	31.92	14.16	29.04	--	3.09*	2.81
11	11.19	34.29	13.01	30.80	2.05	3.06*	2.75
12	10.69	32.64	14.25	31.10	1.22	3.05*	2.91
13	9.43	28.69	13.31	30.53	3.19	3.04*	3.24*
14	9.61	29.06	12.46	32.10	2.70	3.03*	3.34*
15	10.72	31.92	15.13	32.80	--	2.98	3.06*
16	9.06	26.33	18.78	32.58	3.19	2.91	3.60*
17	9.45	27.12	14.00	28.61	2.68	2.87	3.03*
18	10.31	30.42	14.91	28.69	3.29	2.95	2.78

Tabla 5.4 ( continuación)

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
19	10.84	29.62	11.79	27.23	3.51	2.73	2.51
20	11.81	30.19	13.34	30.97	--	2.56	2.62
21	11.98	29.39	12.96	30.32	--	2.50	2.53
22	12.04	29.81	13.51	31.28	--	2.47	2.60
23	11.30	25.83	12.25	30.12	2.37	2.29	2.67

\*Adulterado

### III. Quesos

#### a. Quesos frescos

La tabla 5.5.1 presenta la composición de los ácidos grasos y la relación C16/C14 Y C18:1/C14 en quesos frescos de distintas casas comerciales. De 16 muestras analizadas se encontró 12 adulteradas según la relación C16/C14, y 10 según la otra relación. Las muestras 10, 11 y 12 presentan un cuadro diferente a las siete restantes, ya que se observa un elevado contenido de C16, mientras que los demás ácidos grasos se encuentran entre el promedio normal. Estos casos son similares a los encontrados en las mantecillas y cremas, es decir una posible adulteración con aceite de palma. También se efectuó en estos casos el análisis de esteroides, encontrándose presencia de fitosteroides.

Tabla 5.5.1

Composición (%) de ácidos grasos en quesos frescos de diferentes marcas

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	0.37	16.78	10.13	36.21	37.11	45.35*	97.86*
2	6.44	24.80	9.97	29.71	25.55	3.85*	4.61*
3	8.94	30.96	11.35	34.56	1.18	3.46*	3.87*
4	9.74	32.88	11.28	30.06	1.24	3.37*	3.09*
5	10.18	33.68	11.26	30.20	2.06	3.31*	2.97*
6	9.66	31.30	11.92	30.26	2.49	3.24*	3.13*
7	10.21	32.12	10.84	29.63	1.24	3.14*	2.90*
8	9.66	30.35	13.16	29.32	2.30	3.13*	3.04*
9	9.92	30.89	11.54	30.79	1.32	3.11*	3.10*
10	11.46	35.60	15.80	31.00	--	3.11*	2.71
11	10.93	33.80	12.25	28.70	1.52	3.09*	2.63
12	10.42	32.01	12.18	28.00	1.17	3.07*	2.69
13	8.10	23.81	16.97	35.31	3.12	2.94	4.36*
14	9.39	26.82	12.66	29.63	2.96	2.86	3.16*
15	10.91	32.48	14.17	29.17	2.61	2.97	2.67
16	10.91	29.38	14.16	30.29	1.37	2.69	2.78

\* Adulterada

b. Quesos Crema.

La tabla 5.5.2 presenta la composición de ácidos grasos en distintas muestras analizadas. Se analizaron 20 quesos, de los cuales se determinó adulteración en 10 según la relación C16/C14, y 14 en base a la relación C18:1/C14. Las cuatro muestras identificadas como adulteradas en base a la relación C18:1/C14 ( No.11, 12, 13 y 14 de la tabla 5.5.2 ), presentan un valor abajo del promedio para el C14, y un valor alto para el C18:1, lo que indica adulteración con aceite de algodón hidrogenado. En tales casos se efectuaron análisis de esteroides, encontrándose presencia de fitosteroides.

Tabla 5.5.2

Composición (%) de ácidos grasos en diferentes queso crema

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	1.57	19.59	7.60	63.53	7.43	12.48*	40.46*
2	7.07	33.79	13.78	36.88	2.42	4.78*	5.21*
3	7.82	32.35	12.01	44.61	--	4.14*	5.70*
4	6.32	23.78	11.95	37.36	8.36	3.76*	5.91*
5	7.27	25.60	9.78	27.49	21.74	3.52*	3.78*
6	9.70	31.21	11.41	30.97	1.23	3.22*	3.19*
7	8.55	28.89	9.80	27.22	--	3.19*	3.19*
8	9.57	29.84	13.44	33.09	2.95	3.12*	3.46*
9	9.83	29.88	11.12	33.80	--	3.04*	3.44*
10	9.79	30.58	11.54	28.82	1.13	3.10*	2.94*
11	9.79	29.11	13.72	28.88	2.74	2.97	2.95*
12	9.93	29.12	12.71	31.90	2.85	2.93	3.21*
13	10.31	28.32	13.43	30.16	2.44	2.75	2.93*
14	9.72	26.07	14.47	30.60	2.54	2.68	3.15*
15	10.87	32.48	13.56	29.79	1.14	2.99	2.77
16	11.11	32.32	13.34	28.16	1.03	2.91	2.53
17	10.88	30.81	14.20	30.05	--	2.83	2.76
18	12.42	34.78	16.06	31.56	--	2.80	2.54
19	11.44	31.26	14.22	28.86	--	2.73	2.52
20	12.44	30.26	10.97	27.68	3.37	2.43	2.22

\* Adulterada

c. Quesos de Capas

La tabla 5.5.3 presenta la composición de ácidos grasos en varios quesos de capas. Se analizaron 17 muestras de las cuales, se determinaron 11 como adulteradas en base a la relación C16/C14 y 11 según la relación C18:1/C14.

Las muestras No. 6 y 7 de la tabla presentan un elevado contenido de C16 y C18, así como un valor un poco abajo del promedio para el C18:1. Este caso es comparable a las cremas y mantequillas que presentaron adulteración con aceite de palma. Se realizó análisis de esteroides para comprobar la presencia de grasa vegetal, en las muestras cuyas relaciones no coincidieron en el mismo resultado. En todos los casos se encontró presencia de fitosteroides, coincidiendo la relación C18:1/C14 con el cromatograma de esteroides.

La muestra No. 8 aparece como adulterada según la relación C16:0/C14:0, pero al efectuar el análisis de esteroides no se encontró presencia de fitosteroides. Se puede observar que el contenido de los ácidos grasos se encuentra dentro de los valores presentados en la tabla 5.1.a. En este caso también la relación C18:1/C14:0 resultó ser más acertada.

Tabla 5.5.3

Composición (%) de ácidos grasos de varios quesos de capas

No.	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	7.09	31.93	10.54	32.82	5.70	4.50*	4.63*
2	8.26	31.29	14.09	33.87	4.57	3.79*	4.10*
3	8.93	31.13	11.58	32.82	3.78	3.48*	3.68*
4	9.93	33.06	13.13	31.37	--	3.33*	3.16*
5	9.72	31.96	11.78	30.80	1.21	3.29*	3.17*
6	10.64	34.44	13.78	27.35	1.71	3.24*	2.57
7	11.27	35.78	14.18	25.80	1.99	3.18*	2.29
8	10.36	32.58	11.20	29.27	1.00	3.15*	2.83
9	9.24	24.84	12.44	29.62	2.96	3.12*	3.21*
10	9.90	30.54	14.14	32.29	--	3.08*	3.26*
11	10.04	30.76	12.37	29.14	1.19	3.06*	2.90
12	9.85	28.33	13.91	29.58	2.18	2.80	3.01*
13	9.68	28.48	13.75	29.94	2.99	2.94	3.09*
14	9.38	27.53	12.98	29.7	2.54	2.93	3.17*
15	10.31	30.42	11.63	28.16	1.29	2.95	2.73
16	9.86	29.12	13.12	28.04	2.54	2.91	2.84
17	10.71	31.51	10.93	28.97	1.79	2.91	2.70

\* Adulterado

#### d. Quesos Procesados.

Se analizaron 21 muestras de diferentes tipos de quesos (Camembert, Cheddar, Suizo, Emmental, Craft, Cheez-wiss, parmesano y mozzarella) algunos de los cuales requieren de períodos de maduración para obtener la calidad deseada. En la tabla 5.5.4 se presentan la composición de ácidos grasos y las dos relaciones consideradas en este estudio. Por medio de la relación C16/C14 se detectaron 4 adulteraciones, y por medio de la relación C18:1/C14 fueron 10.

Las muestras del No. 1 al 4, presentan un caso claro de adulteración, confirmado por ambas relaciones, además de un contenido de ácidos grasos fuera de los valores presentados en las tablas 2.1 y 5.1.a. Sin embargo las 6 muestras siguientes aparecen como adulteradas según la relación C18:1/C14:0, pero el contenido de ácidos grasos se encuentra dentro de los valores normales, excepto por el C14:0 que en estos casos fue menor.

Al realizar el análisis de esteroides a estas 6 muestras, se encontró presencia de fitosteroides. La composición de los ácidos grasos de estas muestras presentan valores de C14:0 anormalmente pequeños.

Tabla 5.5.4

Composición (%) de ácidos grasos de quesos procesados

No.	C14	C16	C18:0	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
1	5.10	26.82	16.13	39.61	5.09	5.29*	4.54*
2	6.95	26.72	15.47	37.26	3.26	3.84*	5.36*
3	7.79	27.12	15.33	34.48	3.41	3.48*	3.43*
4	9.30	27.95	12.79	33.80	3.12	3.01*	3.63*
5	9.80	28.97	13.18	28.26	5.31	2.96	2.88*
6	9.75	28.70	12.63	30.07	3.89	2.94	3.09*
7	9.48	27.72	11.24	28.67	2.78	2.92	3.02*
8	10.40	30.34	11.56	30.16	3.10	2.92	2.90*
9	9.94	28.97	11.54	28.73	2.04	2.91	2.89*
10	12.81	35.54	10.35	27.71	1.61	2.77	2.16
11	10.90	29.82	12.72	27.87	2.48	2.74	2.56
12	10.21	29.74	11.92	28.28	2.35	2.91	2.77
13	11.13	32.46	14.37	29.13	1.40	2.91	2.62
14	10.06	28.73	11.58	27.88	3.42	2.86	2.77
15	9.68	27.57	11.81	28.39	2.03	2.85	2.93*
16	10.17	28.83	12.46	27.62	--	2.84	2.72
17	10.29	29.03	12.45	27.67	--	2.82	2.69
18	10.44	29.12	12.15	27.42	1.01	2.79	2.63

Tabla 5.5.4. (Continuación)

19	10.19	28.44	12.47	27.86	1.38	2.79	2.73
20	11.08	30.84	12.77	28.09	2.01	2.78	2.54
21	10.64	29.21	13.27	29.97	1.04	2.74	2.42
22	11.60	30.11	13.15	27.35	0.61	2.60	2.80
23	11.30	26.34	15.87	31.02	--	2.30	2.75

---

\* Adulterado

Tabla 5.6

Resumen de los resultados de muestras analizadas

muestra	muestras analizadas	adulteradas con índice C16/C14	adulteradas con índice C18:1/C14	total adult.
crema	34	16	26	29
mantequilla	23	14	12	17
Q. fresco	16	12	10	14
Q. crema	20	10	14	14
Q. capas	17	11	11	13
Q. procesados	21	4	10	11

El número total de muestras adulteradas para cada producto, se obtuvo al sumar el número de muestras adulteradas indicado por las dos relaciones de ácidos grasos, más las muestras que fueron clasificadas como adulteradas, según una de las relaciones y luego confirmada con el análisis de los esteroides.

Tabla 5.7

Resumen de la composición de ácidos grasos de muestras puras de  
cremas, quesos y mantequillas.

muestra	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C16/C14	C18:1/C14
crema n = 5	10.77 +0.44	30.07 +1.92	13.94 +1.92	29.34 +0.94	1.34 +1.40	2.79 +0.17	2.73 +0.14
mantequilla n = 6	11.38 +0.70	29.21 +1.70	13.13 +1.09	29.77 +1.53	1.53 +1.72	2.58 +0.23	2.62 +0.10
Q. fresco n = 2	10.91 +0.00	30.93 +2.19	14.17 +0.01	29.73 +0.79	1.99 +0.88	2.83 +0.20	2.73 +0.08
Q. crema n = 6	11.53 +0.73	31.99 +1.62	13.73 +1.65	29.35 +1.42	0.92 +1.31	2.78 +0.19	2.56 +0.20
Q. capas n = 4	10.31 +0.35	30.91 +1.48	11.72 +0.98	28.61 +0.60	1.66 +0.67	2.98 +0.11	2.78 +0.07
Q. procesa- dos n = 17	10.87 +0.75	29.75 +2.56	12.96 +1.53	28.49 +1.28	1.38 +1.03	2.73 +0.20	2.64 +0.17

Las tablas 5.8 y 5.9 presentan un resumen de las marcas comerciales de las muestras que se analizaron. Por razones éticas los nombres originales de las empresas no aparecen, en su lugar fueron empleadas letras del abecedario. Esta tabla da una idea clara de la cantidad de productos lácteos comercializados en Guatemala que son adulterados con grasas vegetales. No fue posible analizar en su totalidad todas las marcas comerciales que circulan en el país, pero se trató de tomar la mayor cantidad posible.

En los laboratorios de LUCAM, se analizan muestras de "control" que inspectores de salud recogen de supermercados para obtener directamente las muestras que finalmente llegan al consumidor. También se analizan muestras "de registro" enviadas por los fabricantes para poder obtener el permiso de poner a la venta su producto.

En las dos tablas siguientes se presentan los datos de muestras de registro y control para diferentes fábricas de productos lácteos. Puede observarse que hay mayor cantidad de muestras puras en las de registro, sobre todo en cremas y quesos procesados. Debido a que las muestras de registro son enviadas con un lapso muy grande de tiempo, únicamente se pudieron obtener algunas de las marcas.

Tabla 5.8

Muestras de Control  
Clasificación de muestras puras en base a marcas comerciales y  
productos lácteos.

marca	crema	mantequilla	Q.fresco	Q.crema	Q.capas	Q.procesado
A	adul.	--	adul.	--	adul.	--
B	adul.	adul.	adul.	adul.	adul.	adul.
C	adul.	adul.	adul.	adul.	adul.	--
D	adul.	adul.	adul.	adul.	adul.	--
E	adul.	adul.	--	--	--	--
F	adul.	adul.	pura	adul.	--	--
G	adul.	pura	adul.	pura	pura	adul.
H	adul.	pura	--	adul.	--	--
I	adul.	--	--	adul.	--	--
K	adul.	--	--	pura	--	--
L	pura	--	--	--	--	--
M	adul.	--	--	adul.	--	pura
N	--	--	--	pura	--	--
O	adul.	--	adul.	--	--	--
P	--	pura	--	--	--	--
Q	--	--	--	--	--	adul.
R	--	pura	--	--	--	--
S	--	adul.	--	--	--	--
T	--	--	--	--	adul.	--
X	--	--	--	--	--	adul.

adul. = muestra adulterada con grasa vegetal  
pura = muestra de grasa láctea

Tabla 5.9

Muestras de Registro  
 Clasificación de muestras puras y adulteradas en base a marcas  
 comerciales y productos lácteos.

marca	crema	mantequilla	Q.fresco	Q.crema	Q.capas	Q.procesado
B	adul.	--	--	puro	--	pura
C	pura	adul.	pura	--	adul.	--
D	pura	--	adul.	puro	pura	--
F	adul.	adul.	--	adul.	--	--
G	pura	--	--	pura	adul.	pura
J	adul.	adul.	--	--	--	--
M	--	--	--	--	--	adul.
N	adul.	--	--	adul.	--	--
O	--	--	--	--	--	pura
Q	--	--	--	--	--	adul.
S	--	--	--	pura	--	--
X	--	--	--	--	--	pura
Y	--	--	--	--	--	pura

adul. = muestra adulterada  
 pura = muestra de grasa láctea

D. Estudio densitométrico de las placas cromatográficas del insaponificable.

La figura 5.1.d. muestra el perfil densitométrico de una placa cromatográfica revelada con ácido sulfúrico al 5% en etanol, usada en el análisis del insaponificable de una muestra de leche pura. Se puede observar que el pico 5 corresponde a la banda del colesterol, mientras que los picos 6 y 7 corresponden probablemente a los alcoholes e hidrocarburos (15). Después de revelar las placas con el ácido sulfúrico al 5% en etanol y secarlas en un horno, se observó en la cámara UV una coloración amarillo-naranja oscuro en la banda del colesterol, y en la banda correspondiente al pico 7 una leve coloración amarillo pálido. El color de la banda correspondiente al pico 6, fue muy tenue y de coloración lila. Estas bandas aparecen como señales pequeñas en relación a la banda de colesterol en el perfil densitométrico. El último pico que aparece en algunos perfiles corresponde, a una banda amarilla característica de la grasa láctea. Esta señal estuvo presente en todas las placas analizadas, pero no aparece en todos los perfiles densitométricos debido a que en algunas muestras el solvente se dejó correr hasta el borde superior de la placa, lo cual impidió que la banda fuera leída por el densitómetro.

La fig. 5.2.d es otro perfil densitométrico de una leche pura. La diferencia en el tamaño de los picos estriba en la intensidad de tinción obtenida con el revelador; sin embargo la

relación de áreas entre el pico 6 y 7 se mantiene proporcional en ambos casos. Es notorio que el pico 6 es mucho menor que el 7, y que ambos son menores que el pico 5 (esteroles). Debe de aclararse el hecho de que todos los otros números se refieren a bandas visualizadas con luz ultravioleta. Las dos placas presentaron la misma cantidad de bandas en la cámara UV. La mayoría de estas bandas son débilmente reveladas con el ácido sulfúrico, de allí que no aparezcan en el perfil densitométrico.

La figura 5.3.d muestra el perfil densitométrico de una muestra de aceite de algodón hidrogenado. Puede observarse que los picos 6 y 7 son casi del mismo tamaño, además en relación con el pico 5, la relación de alturas no es tan grande como en el caso de los perfiles de leche pura. Asimismo se observa una mayor cantidad de picos correspondientes a distintas bandas reveladas en las placas. Los picos 9 y 11 corresponden a dos bandas delgadas que en luz UV pueden verse con una coloración rojo muy oscuro. En los perfiles densitométricos de grasa vegetal obtenidos, pudo observarse mayor número de picos que en las muestras de grasa láctea. De igual manera, en las muestras adulteradas con grasa vegetal, se observaron mayor cantidad de picos. En los perfiles densitométricos, obtenidos de las muestras adulteradas a distintos porcentajes (Fig 5.4.d), se observó que el pico 6 correspondiente a la banda situada inmediatamente por encima de los esteroides en la placa cromatográfica, se eleva al aumentar el porcentaje de adulteración. En caso de la adulteración de 75 % y

en el de grasa vegetal pura, los picos 6 y 7 tienen casi la misma altura.

Se observó en la misma figura, que los picos 8, 9 y 10 van aumentando su intensidad al elevarse el % de adulteración, aunque no en forma homogénea. Cada uno de los picos señalados en el perfil densitométrico corresponde a bandas que fluorescen con diferente intensidad y con distinto color. Al rociar con mayor cantidad de revelador unas placas de muestras puras, no se observó en los perfiles ni en la cámara UV, ningún aumento en la coloración. La grasa láctea se caracterizó por presentar perfiles con pocas señales de baja intensidad. En la cámara de UV se observó, que al aumentar el % de adulteración, aumenta la intensidad de la banda correspondiente al pico 6, y a la vez, aparecen más bandas oscuras en la parte superior de la placa cromatográfica, correspondientes a los picos 11, 12 y 13. El color para el pico 10 y 11 en las muestras adulteradas desde el 5 %, presentaban una coloración rojo oscuro, mientras que en la muestra de leche pura, no aparecen bandas con este color. Si se observa detenidamente la Fig. 5.2.d y la Fig. 5.3.d, puede notarse que la leche pura presenta bandas de poca absorción, es decir, picos poco agudos (8, 9, 10) en la parte superior del perfil densitométrico, mientras que al ser adulterada la muestra, estos picos se hacen más evidentes y aumenta el número de ellos.

La figura 5.5.d presenta el perfil densitométrico de una muestra de mantequilla cuyas relaciones de ácidos grasos son las

siguientes:  $C16/C14 = 3.80$  (adulterada) y  $C18:1/C14 = 5.05$  (adulterada). Puede observarse en el perfil que la altura de los picos 6 y 7 son casi iguales, además que enseguida aparecen otros picos pronunciados que no se encuentran en un perfil densitométrico de muestras puras.

La figura 5.6.d. muestra el perfil densitométrico de una muestra de crema cuyas relaciones de ácidos grasos son:  $C16/C14 = 2.96$  Y  $C18:1/C14 = 3.46$  (adulterada). Puede observarse que el pico 9 de la figura 5.1.c no se encuentra en muestras puras. Al realizar el análisis de esteroides de esta muestra, se encontró presencia de fitosteroides.

Es evidente que los perfiles densitométricos de la grasa láctea y vegetal tienen diferencias significativas que pueden ser consideradas en la detección de adulteraciones.

En base a la relación  $C18:1/C14:0$  se eligieron 10 muestras con valores  $> 3.5$  (grupo A), 10 con valores  $>2.9$  y  $<3.5$  (grupo B) y 10 muestras con valores  $>2.6$  y  $< 2.9$  ( grupo C). Esto se resume en el siguiente cuadro:

Cuadro 5.1

	grupo A n = 10	grupo B n = 10	grupo C n = 10
C18:1/C14:0	$> 3.5$	$>2.9$ y $< 3.5$	$>2.6$ y $<2.9$

Las muestras del grupo C son muestras de grasa láctea auténtica, las del grupo B presentan adulteración con grasa vegetal en

un grado medio, y las del grupo C son muestras altamente adulteradas con grasa vegetal.

La información recabada del examen de las placas cromatográficas y los perfiles densitométricos se presenta en el siguiente cuadro:

Cuadro 5.2

Características de perfiles densitométricos con distintos niveles de grasa vegetal.

	n = 10 >3.5		n = 10 >2.9 y <3.5		n = 10 >2.6 y <2.9	
Rel. C18:1/C14						
número de picos ***	max. 9	mín 6	max. 5	min. 4	max. 5	min. 3
relación de área de picos 7/6 n = 10	2.36	0.88	9.14	2.81	21.72	9.20
coloración de bandas						
pico 6	amarillo		amarillo pálido		amarillo muy pálido	
pico 7	amarillo-naranja fuerte		amarillo-naranja		amarillo	
pico 8	amarillo-naranja		lila suave		lila suave y ténue	
pico 9	banda lila y banda rojo oscuro		lila		lila suave	
pico 10	amarillo suave		rojo oscuro		amarillo	
pico 11	rojo oscuro		---		---	

/\*\*/ Estos picos corresponden a los perfiles densitométricos y fueron contados a partir del pico No.5 e siguiente.

Para comprobar la predicción del método densitométrico, los 30 perfiles fueron mezclados al azar y entregados a un analista del laboratorio con la solicitud de agruparlos en tres grupos de acuerdo a los datos del cuadro 5.2. El resultado del ensayo se muestra en el cuadro 5.3.

Tabla 5.6

Clasificación de muestras en base a los perfiles densitométricos

grupo	A	B	C
Rel. C18:1/C14:0	>3.5	>2.9 y <3.5	>2.6 y <2.9
muestras detectadas	9	13	8

El analista pudo detectar las 20 muestras adulteradas, pero colocó 2 muestras buenas entre el grupo de las adulteradas. Sin embargo en base a la relación de áreas de picos 6/7 el acierto es total.

La diferencia de relación de áreas entre el valor mínimo del grupo C y el máximo del grupo B es solamente de 0.6.

Debe de tomarse en cuenta que la medida de las áreas se hizo en forma manual. Es posible que utilizando un integrador, el cálculo de las áreas sería más preciso y no se hubiera producido la casi superposición de valores entre el grupo B y C.

La tabla 5.7 presenta las áreas de los picos 6 y 7 y su

relación obtenidas de los perfiles densitométricos de la muestra de leche pura que fue adulterada a distintos niveles con aceite de algodón hidrogenado. Puede observarse claramente que el área del pico 6 aumenta relativo al pico 7 con el porcentaje de adulteración /\*\*/. Puede observarse claramente que la relación de áreas disminuye con la adulteración y por ello, éste es un buen parámetro para la determinación de pureza. Tal como se muestra en la tabla 5.7, esta relación de áreas puede servir como una ayuda para estimar aproximadamente el nivel de adulteración con aceite de algodón hidrogenado. Es necesario añadir que es posible que estos datos no funcionen en adulteraciones hechas con otro tipo de grasa.

---

/\*\*/ Es necesario enfatizar que diferencias absolutas en el tamaño del mismo pico en dos perfiles, puede deberse a mayor o menor cantidad de materia insaponificable colocada en la placa cromatográfica. Lo importante son los tamaños relativos de los picos en un mismo perfil.

Tabla 5.7

Areas de picos 6 y 7 obtenidas de perfiles densitométricos a distintos niveles de adulteración.

% adulteracion	área pico 6	área pico 7	relación áreas 7/6
0	3.75	34.5	9.20
5	10.50	96.0	9.14
10	40.50	195.0	4.81
20	56.60	159.0	2.81
40	33.00	78.0	2.36
50	42.25	89.0	2.16
60	63.00	109.1	1.73
75	64.40	90.0	1.40
100	64.60	73.8	1.14



FIGURA 5.1.d

Perfil densitométrico de leche pura (1)

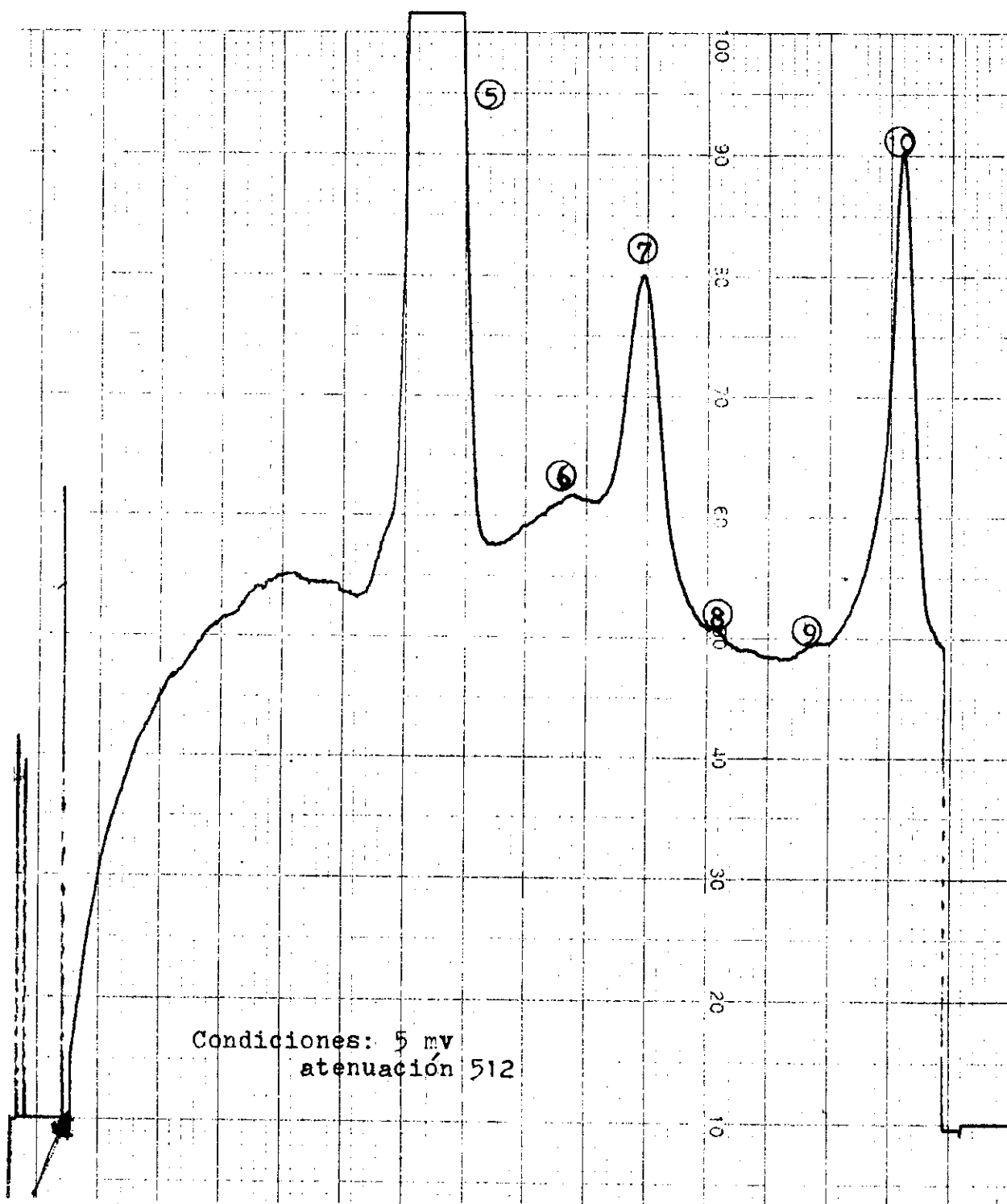
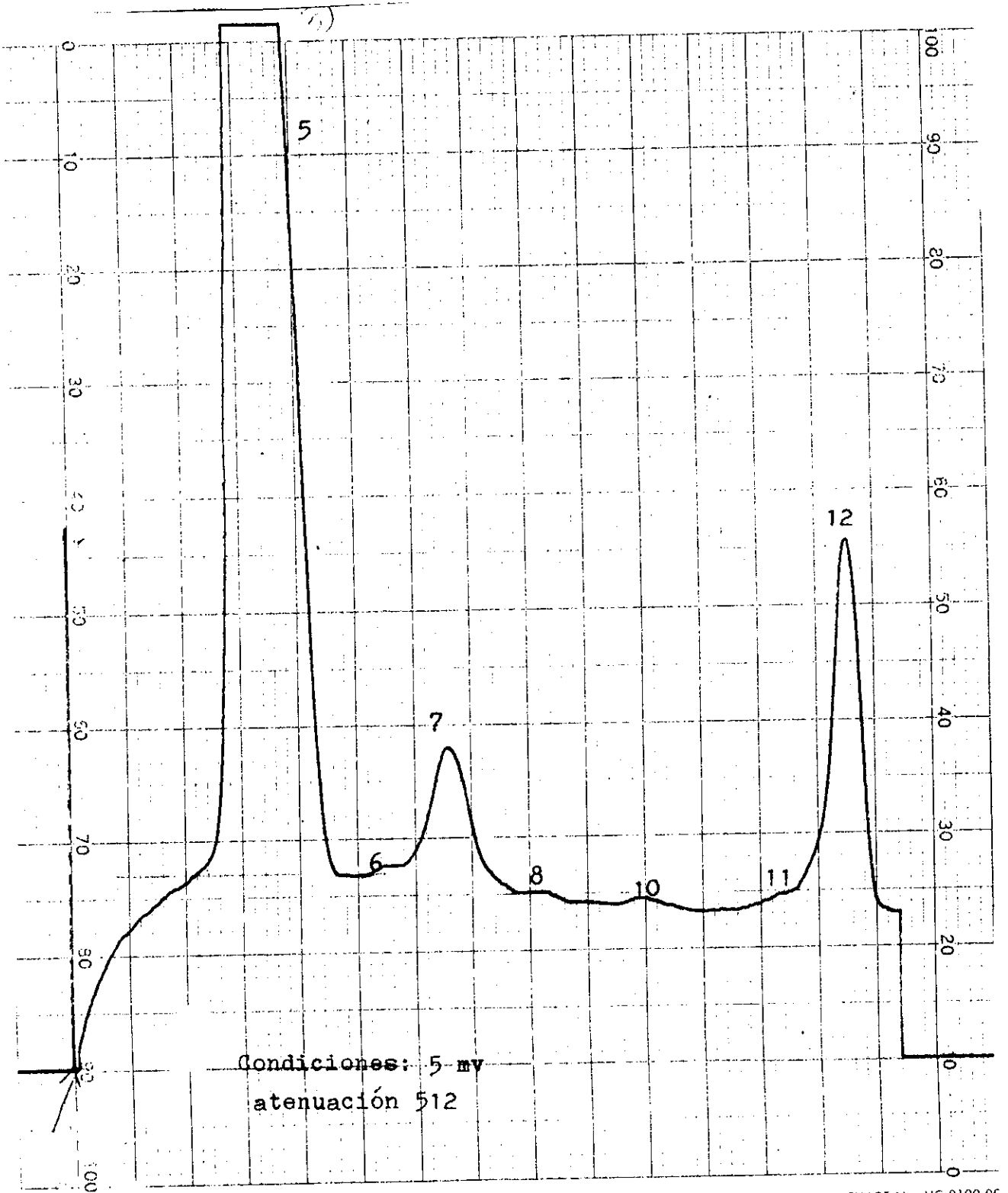




FIGURA 5.2.d

Perfil densitométrico de leche pura (2)



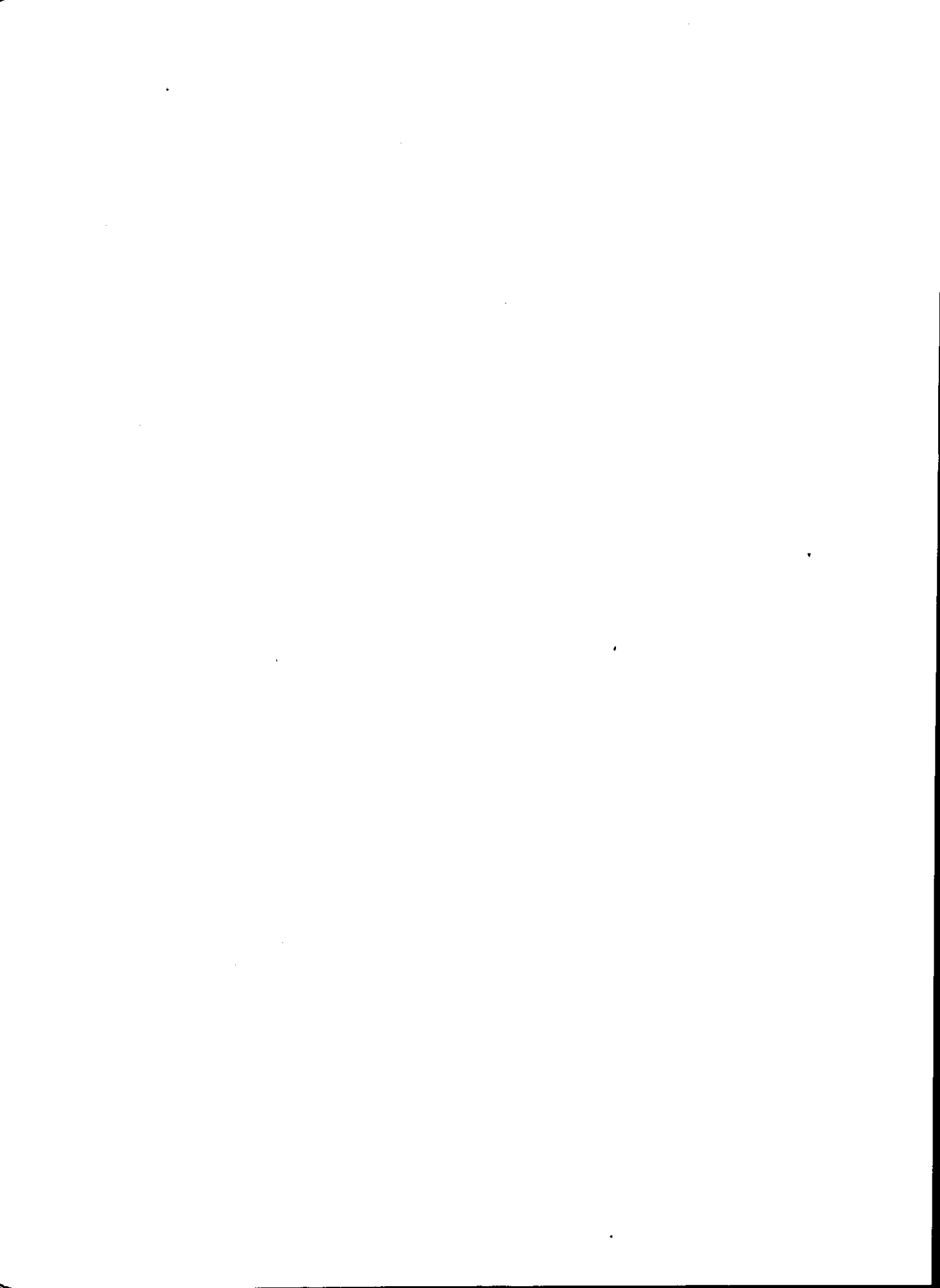


FIGURA 5.3.d

Perfil densitométrico de aceite de algodón hidrogenado

condiciones: 5 mv  
atenuación 512

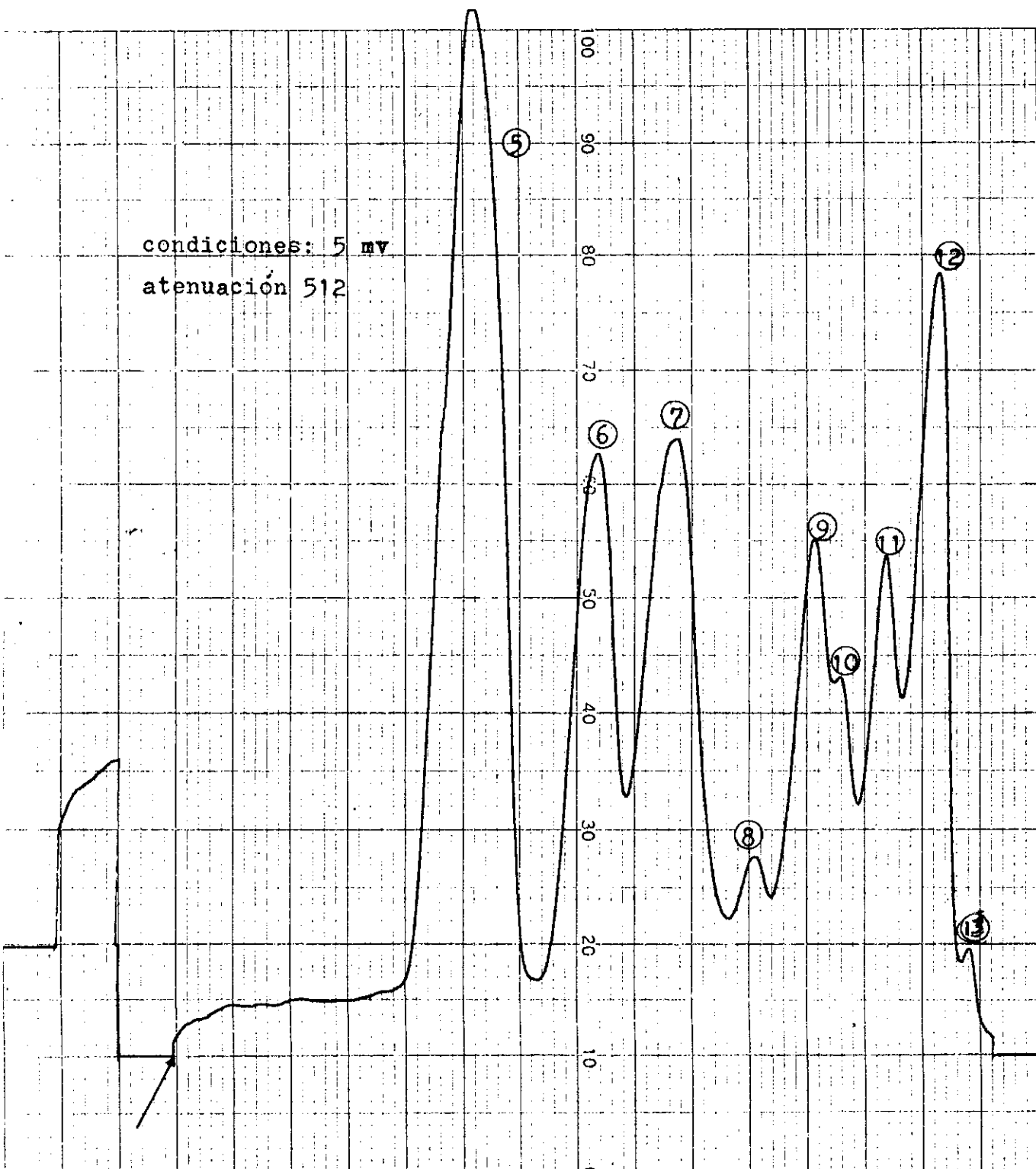
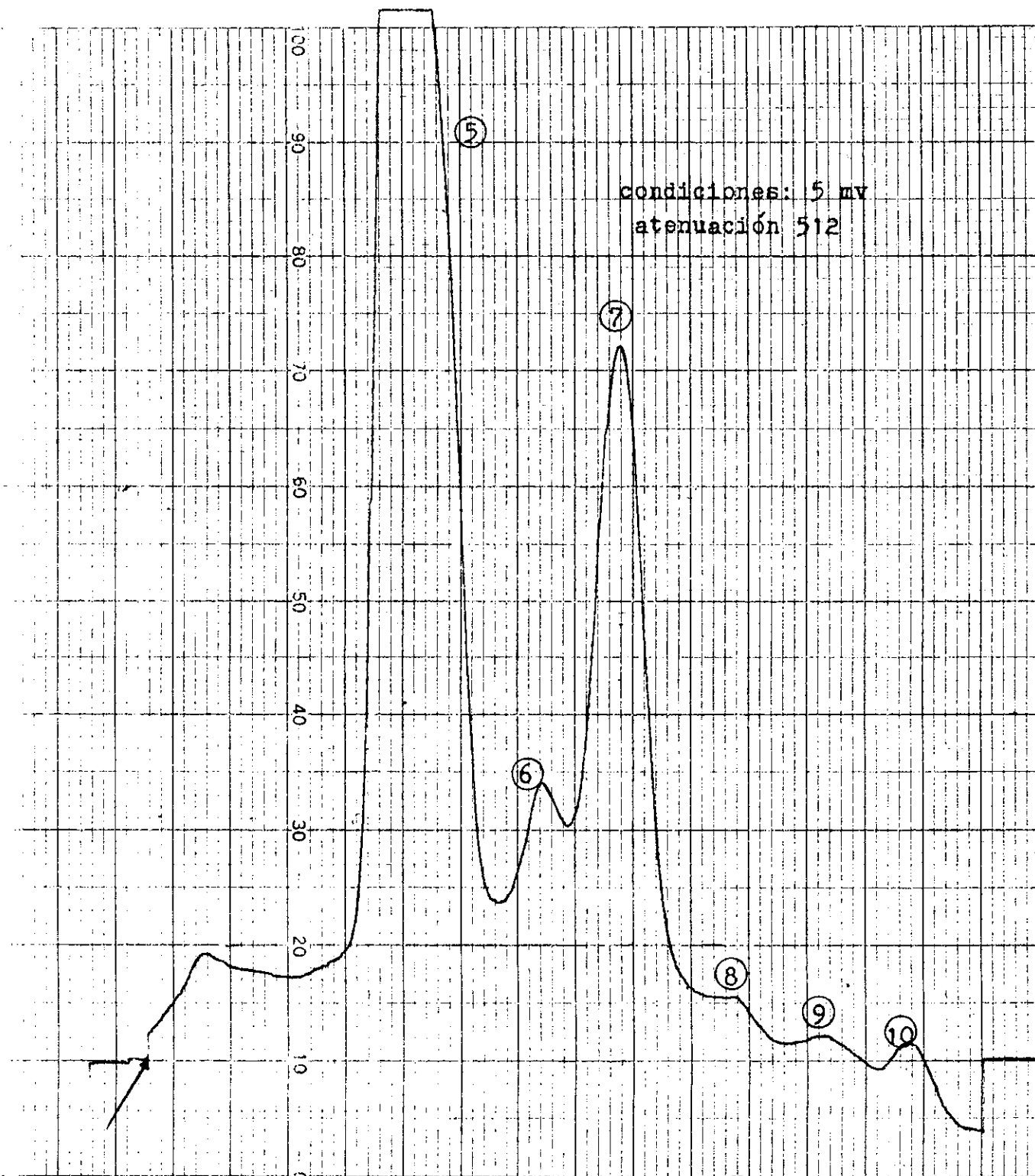




FIGURA 5.4.d

Perfil densitométrico de muestra láctea adulterada  
5% con aceite de algodón hidrogenado



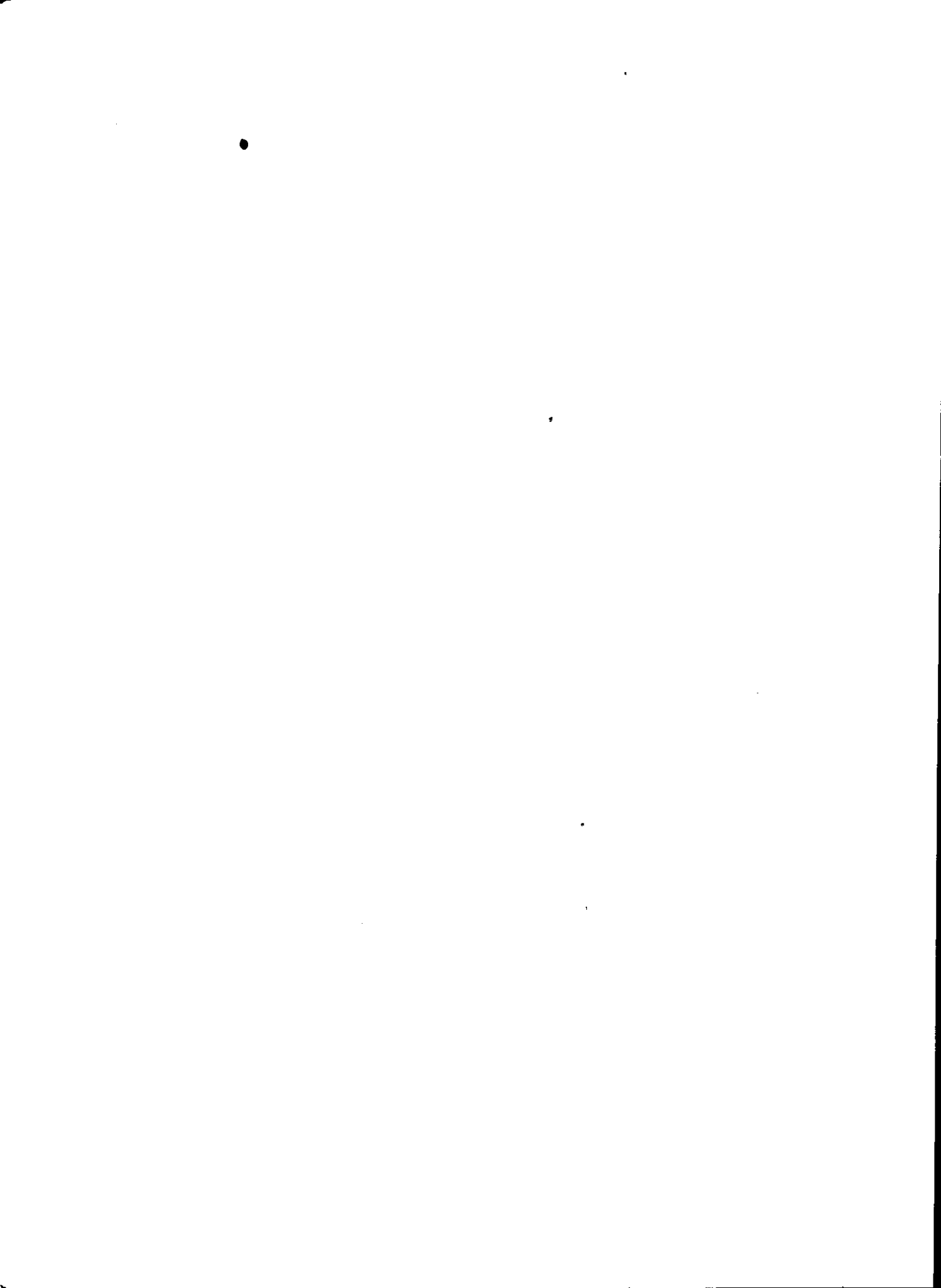
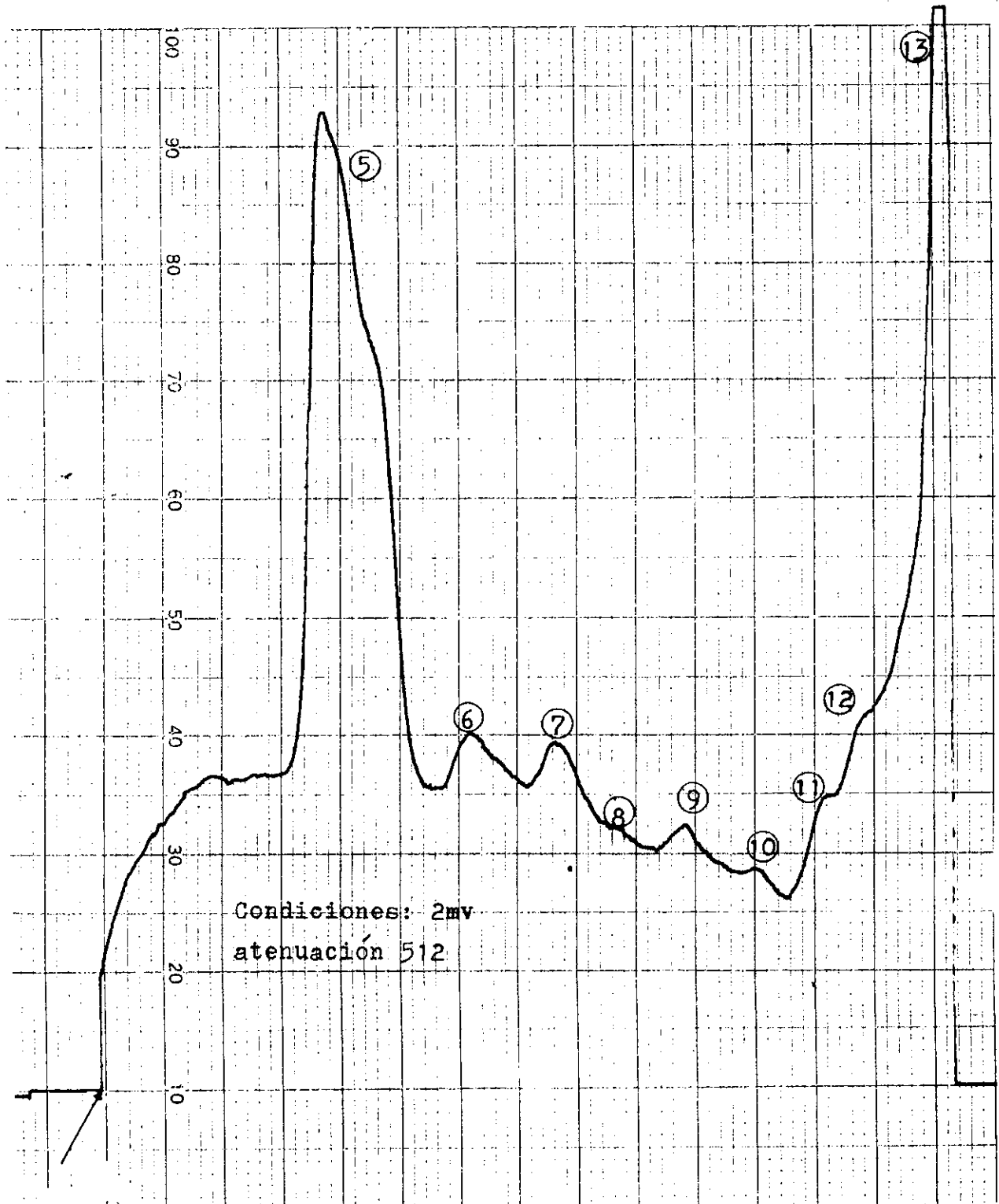


FIGURA 5.5.d

Perfil densitométrico de muestra de mantequilla  
adulterada



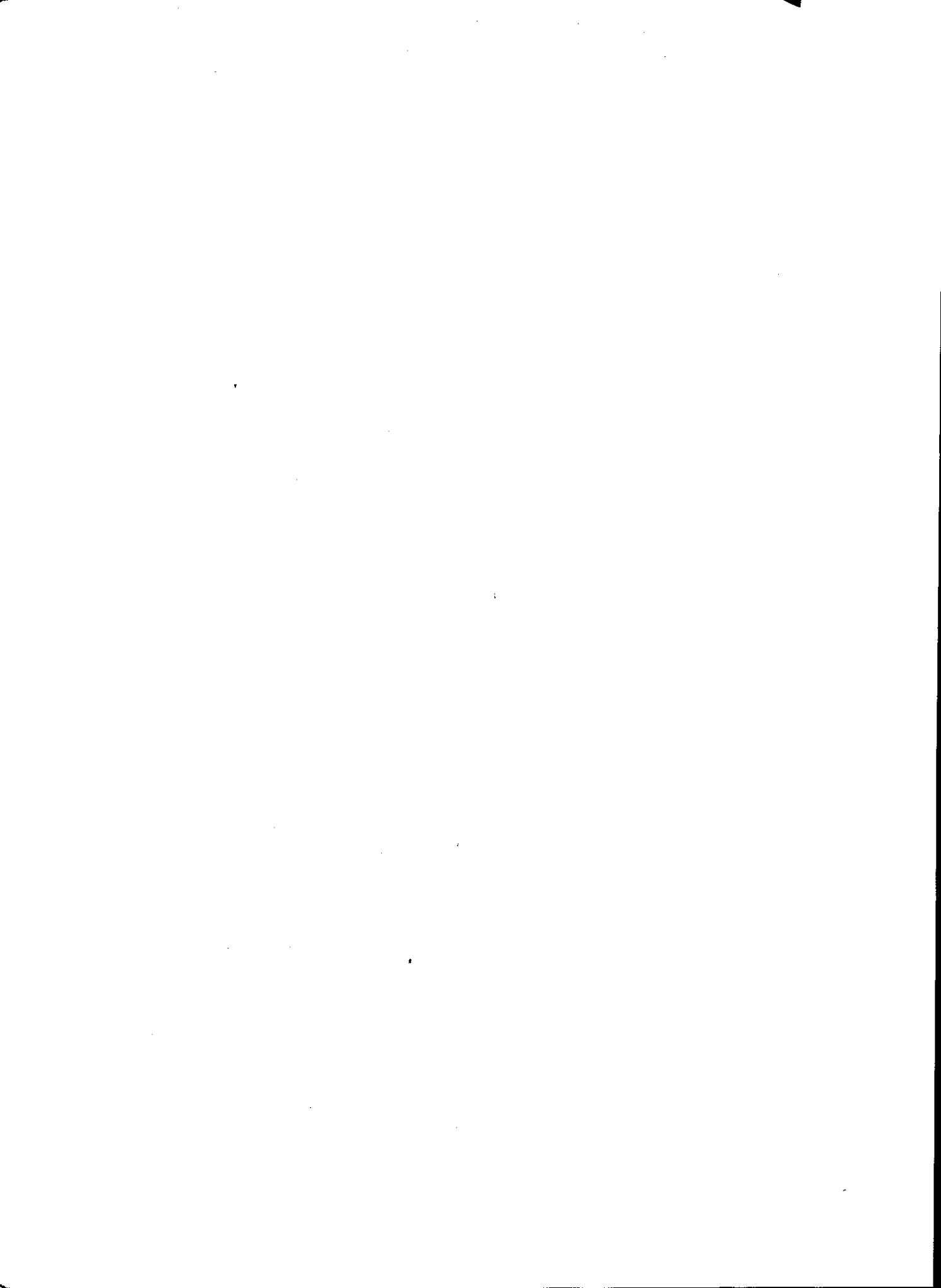
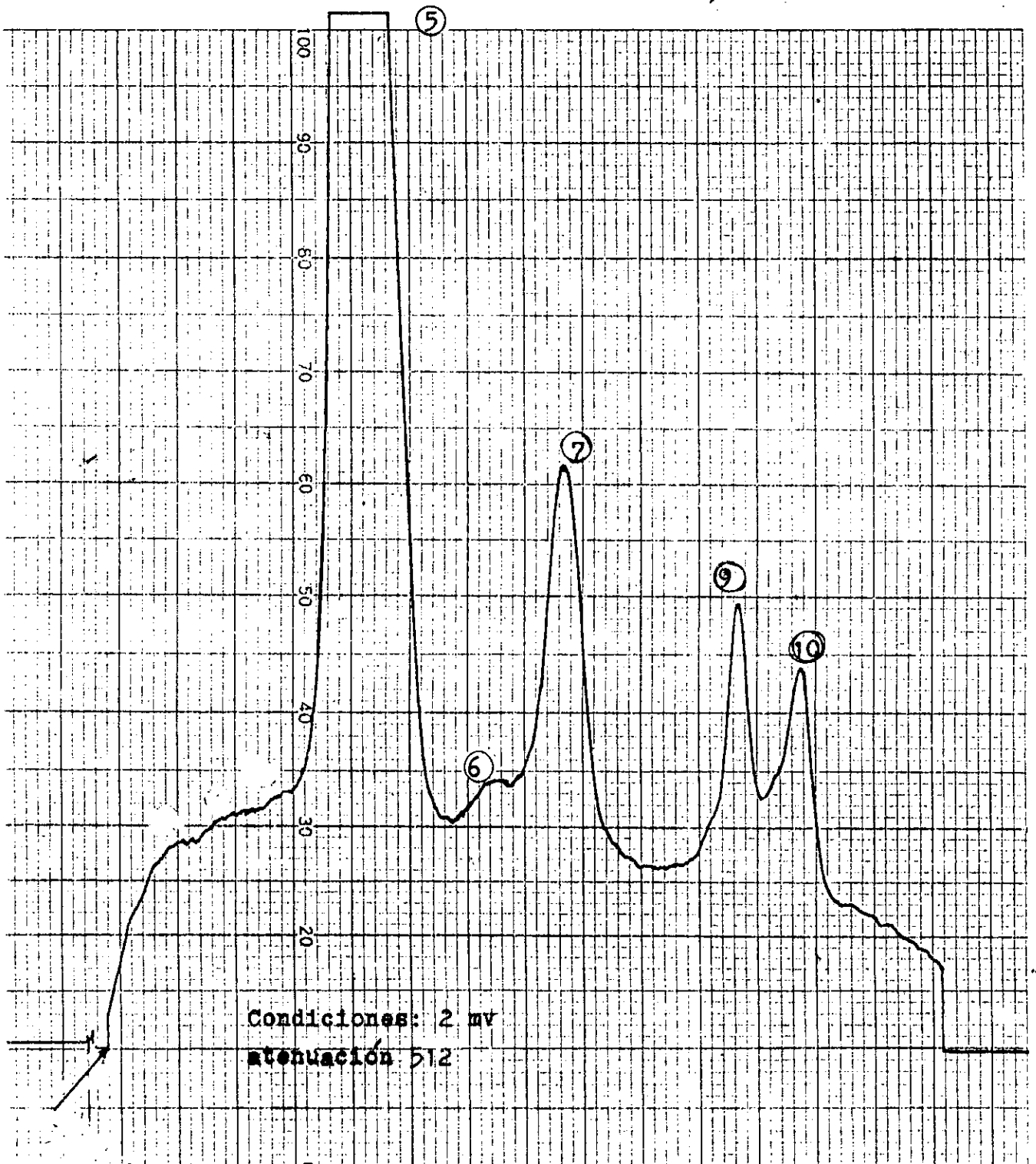


FIGURA 5.6.d

Perfil densitométrico de muestra de crema  
adulterada





## VI. CONCLUSIONES

- A. La relación C16:1/C14:0 puede detectar hasta 20% de sustitución y la relación C18:1/C14:0 hasta un 10%, siendo esta última más efectiva cuando la adulteración es llevada a cabo con aceite de algodón hidrogenado. Sin embargo la primera relación es más sensible que la última cuando la adulteración es con aceite de palma.
- B. El método densitométrico, tal como se desarrolló en éste trabajo, puede ser utilizado para determinar presencia de grasa hidrogenada de algodón y posiblemente de otras grasas vegetales. El ensayo es cualitativo y puede descubrir hasta 5% de sustitución.
- C. La relación de áreas de los picos 6 y 7 mostrados en los perfiles densitométricos, es el mejor parámetro en la determinación aproximada del nivel de grasa vegetal que se encuentre en la muestra analizada. La presencia de grasa de algodón hidrogenada incrementa dramáticamente el tamaño del pico 6. Cuando el nivel de adulteración es del 75%, el tamaño del pico 6 es prácticamente igual al pico 7.
- D. En los perfiles densitométricos, los picos que aparecen después del 7, pueden servir como señales para detectar adulteraciones. Estos picos crecen en forma irregular cuando la muestra ha sido adicionada con grasa vegetal. Bajo la luz UV

pueden observarse también mayor cantidad de bandas en muestras con alto grado de adulteración, muchas de las cuales no aparecen en los perfiles densitométricos pero su presencia puede ser utilizada como otro parámetro adicional para detectar la grasa vegetal.

- E. La coloración de las bandas de la placa cromatográfica observadas con luz UV es una característica importante en la determinación de adulteraciones con grasa vegetal. Las bandas delgadas rojo oscuro observadas en placas de muestras altamente adulteradas, no fueron encontradas en muestras puras, por lo que puede tomarse como un índice de adulteración.
- F. Por medio del análisis de cromatografía de gas de la muestra de los esteroides, se detectó fácilmente 5% de adulteración, aunque es posible detectar hasta 1%.
- G. De acuerdo a los resultados del trabajo, es evidente que la mayoría de productos lácteos comercializados en Guatemala son imitaciones. Es necesario añadir que en sólo una minoría de productos se advierte en la etiqueta la presencia de grasas vegetales.

## VII. Recomendaciones

- A. Utilizar el valor de 2.87 para la relación de ácidos grasos C18:1/C14:0 como índice de adulteración en los distintos productos lácteos.
- B. Utilizar los perfiles densitométricos como un método analítico para corroborar la adulteración en muestras cuyas relaciones de ácidos grasos C16:0/C14:0 y C18:1/C14:0 se encuentren en valores límites.
- C. Efectuar estudios más detallados de los perfiles densitométricos ya que constituyen una valiosa ayuda en la determinación de adulteración de productos lácteos con grasas vegetales y sebos animales.
- D. Efectuar estudios de composición de las bandas 6 y 7 utilizando cromatografía de gas.
- E. Las imitaciones elaboradas por las fábricas de productos lácteos no son dañinas a la salud, es más, permiten a la mayoría de la población una ingesta adecuada de materia grasa a un costo adsequible. Sin embargo se recomienda que estos productos sean etiquetados correctamente para dar opción al consumidor de elegir la calidad de producto que desea consumir.
- F. Debido a que la relación de áreas de los picos obtenidos en los perfiles densitométricos constituyen un buen índice para detectar adulteración en productos lácteos, se recomienda uti-

lizar un integrador, el cual puede proveer áreas exactas de los picos y una mayor sensibilidad, y probablemente ayudando a detectar niveles más bajos de adulteración.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed. Washington 1975.
- Bachman, M. Zum Nachweis pflanzlicher fette im butterfett. 1969 Schweizerischen Mlchzeitung Schaffhausen Nr.16. 3-21 pp.
- Benavides, J. Determinación de esteroides en materias grasas. 1978 Universidad de San Carlos, Guatemala. 16-18 pp.
- Burón, I., T. García y F. Valenzuela. "Aplicación de los límites de tolerancia a la caracterización de la mantequilla por su composición en ácidos grasos". Grasas y aceites 31: 325-338. 1980
- Chapman, G. "Gas chromatographic determination of free fatty acids in vegetable oils by a modified esterification procedure". J. Am. Oil Chem. Soc.; 56: 77-79. 1979
- Courcelles, C., F. Blanchard, O. Veretout, M. Choukroun, y A. Aicardi. "Aspects analytiques concernant la matiere grasse butyrique: mise en evidence d'un traitement d'hydrogenation". Ann. Fals. Exp. Chim. 68(730): 283-306. 1975
- Echizen, A. y M. Deki. "Determination of butterfat in mixed fats. III. Relation between butyric acid and butterfat content in mixed fats". Reports of the Central Customs Laboratory. 15: 111-114. 1975
- Farag, R.S., S.H. Abo-Raya, F.M. Hewendi y H.H. Khalifa. "Fractional crystallization and gas chromatographic analysis of fatty acids as a means of detecting butterfat adulteration". JAOC 60: 1665-1669. 1983

- Farag, R., M. Hewedi, S. Abo-Raya y H. Khalifa.  
1984 "Detection of cow's milk admixture tu buffalo's milk". Grasas y aceites 35: 181-184.
- Farag, R., A. Abdel-Samad y H. El-Raffy. "Detection  
1980 of lard and shortenig adulteration in pure buffalo and cow ghee". Research Bulletin, Fac. of Agric., Ain-Shams Univ. 1283: 346.
- Farag, R.S., F.A. Ahmed, A.A. Shihata, S.H. Abo-Raya, y  
1982 A.F. Abdalla. "Use of unsaponifiable matter for detection of ghee adulteration with otres fats". J. Am. Oil Chem. Soc. 59: 557-560.
- Fernández, J., S. Florido, M. Alcalá y A. Marcos.  
1986 "Composición en ácidos grasos de algunos quesos madurados por hongos". Grasas y Aceites 37: 152-155.
- Gallacier J., J. Barbier y A. Skudzal-Savoie. "Influ-  
1974 ence de l'estation de l'ann en les acides gras du lait". Le Lait, Tomo LIV 534: 117-138.
- Gargano, A. "Testing of butter imported from the EEC". Ind.  
1979 Aliment. 18: 557-558.
- Gómez, R. y A. Vázquez. "Detección de aceites minerales en  
1985 aceites vegetales por cromatografía en capa fina". Grasas y aceites; 36: 250-253.
- Johnson A. y M. Peterson. Encyclopedia of Food Te-  
1974 chnology and Food Science Series. Vol. 2. The AVI Publishing Company, Inc., Connecticut. 348 pp.
- Kirchner, J. Thin layer chromatography. 2o. Edit. Vol.  
1978 XIV. New York, John Wiley & Sons. 335-387 pp.
- Kuzdzal-Savoie, A. Le probleme des acides gras polyinsa-  
1977 tures". La Tech. Laitiere .905: 7-11.

- Magidman, P., S. Herb, R. Barford y R. Riemenschneider.  
1962 "A. Fatty acids of cow's milk. Techniques employed en supplementing gas-liquid chromatography for identification of fatty acids". The J. of Am. oil Soc. 39: 137-142.
- Maritano De Correche, M. y R. Oxley. "Composición de  
1985 ácidos grasos totales, alcoholes alifáticos e hidrocarburos en materia grasa comestible". Grasas y aceites. 36: 88-92.
- Masson, L. "Relative nutritional value of various dietary  
1981 fats and oils". J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 249-254.
- Metcalf, L. "Recent Advances in the analytical chemistry of fatty acids and derivates". J. Am. Oil Chemists Soc. 56: 819A-822A.  
1979
- Parks, O. "Cholesterol esters of skim milk". J. Dairy Sci. 63: 295-297.  
1980
- Parodi, P. "Detection of Synthetic and adulterated  
1971 butterfat. 3. Triglyceride fatty acid analysis". Aust. J. Dairy Technol. 26: 155-158.
- Revilla, A. Tecnología de la leche. Costa Rica,  
1982 I.I.C.A. Press. 19-20, 23-25, 248 PP.
- Roos, J. "Fette". Seifen. Anstrichmittel, (Alemania);  
1964 66: 182-191.
- Sengupta, P., S. Sil, y J. Chattarjea. "Detection of palm  
1981 oil in vanaspati by thin layer chromatography". J. Am. Oil Chem. Soc. 58: 703-704.

- Sheppard, A., J. Iverson y J. Weihrauch. Handbook  
1978 of Lipid Research, Vol. 1, Washington D.C.  
Amis Kuksis Publishing, Co. 371-376 pp.
- Stahl, E. Thin layer Chromatography. 2a. ed. Berlin  
1969 Sprienger Verlag. 328-361 pp.
- Winkelman F. - FAO -. Les produits de substitution et les  
1978 produits d'imitation". La Tech. Laitiere  
925: 27-30.
- Younes, N. y M. Soliman. "Adulteration of butterfat  
1986 with other sources of fat". Grasas y Aceites.  
37: 200-203.

APENDICE A

Composición de ácidos grasos de leche de vaca expresado como porcentaje promedio en peso en base al contenido total de ácidos grasos (2).

Tabla A.1

Acido graso	contenido %
C4:0	3.8
C6:0	2.3
C8:0	1.1
C10:0	2.0
C11:0	0.1
C12:0	3.1
C13:0	0.1
C14:0	11.7
C14:1	0.8
C15:0	1.6
C16:0	26.2
C16:1	1.9
C17:0	0.7
C17:1	0.2
C18:0	12.3
C18:1	28.2
C18:2	2.9
C18:3	0.5
C20:1	0.2
C20:4	0.1

## APENDICE B

### Composición típica de ácidos grasos de algunas grasas vegetales (2).

Debe aclararse que la composición de estas grasas vegetales puede variar si se les aplica o no y en qué grado, el proceso de hidrogenación.

Tabla B.1

#### Composición de aceite de algodón

.ujo

Acido graso	contenido (%)
C14:0	0.9
C16:0	24.7
C16:1	0.7
C17:1	0.1
C18:0	2.5
C18:1	17.6
C18:2	53.3
C18:3	0.3
C20:0	0.1

Tabla B.2

Composición de aceite de palma

Acido graso	contenido(%)
C12:0	0.3
C14:0	1.1
C16:0	45.1
C16:1	0.1
C18:0	4.7
C18:1	38.8
C18:2	9.4
C18:3	0.3
C20:0	0.2

.uj1

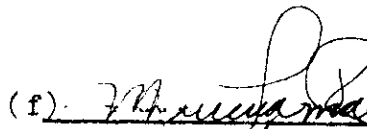
APENDICE C

Composición de la grasa de leche (2).

Tabla C.1

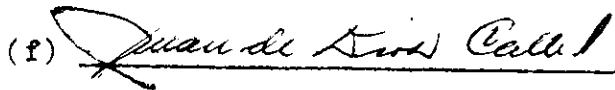
Compuesto	contenido en 100 g de grasa
triglicéridos	97 - 98 g
diglicéridos	250 - 480 mg
monoglicéridos	16 - 38 mg
otros glicéridos	872 - 1318 mg
ácidos grasos libres	100 - 444 mg
fosfolípidos	200 - 1000 mg
Cerebrócidos	13 - 66 mg
esteroles	220 - 410 mg
carotenoides	700 - 900 mg
Vitamina A	600 - 900 mg
Vitamina D	1 - 2 micro g
Vitamina E	2 400 micro g
Vitamina K	100 micro g

Vo. Bo. :

(f)   
Licenciada Azucena Lizama de Zuniga  
Asesor

Tribunal:

(f) 

(f) 

(f) 