

**Validación de un método de cuantificación de
colesterol total en leche semidescremada en
Zamorano usando cromatografía de gases**

Elia Aurora Castro Osorto

Honduras
Diciembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Validación de un método de cuantificación de colesterol total en leche semidescremada en Zamorano usando cromatografía de gases

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Elia Aurora Castro Osorto

Honduras
Diciembre, 2005

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Elia Aurora Castro Osorto

Honduras
Diciembre, 2005

Validación de un método de cuantificación de colesterol total en leche semidescremada en Zamorano usando cromatografía de gases

Presentado por:

Elia Aurora Castro Osorto

Aprobado:

Francisco J. Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

Raul Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios por iluminarme con su sabiduría para poder culminar este gran proyecto tan importante en mi vida.

A mi padre y a mi madre, en especial a mi madre por estar a mi lado en cada momento y brindarme su apoyo siempre que la necesite.

A mi abuelita Aurora de Osorto por sus consejos y sus oraciones.

A mis hermanos por su apoyo incondicional.

A Mauricio Salazar por estar a mi lado y ayudarme en este período tan difícil.

A Dora Baquedano y Armando Baquedano por sus consejos y su apoyo a lo largo de toda mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso por permitirme llegar a la recta final de este estudio, por darme el conocimiento necesario para tomar decisiones en el transcurso de estos cuatro años.

A mis padres Adalberto y Edma por su comprensión, su cariño y por haberme enseñado que todo en la vida requiere esfuerzo y dedicación.

A mi abuelita Aurora de Osorto por cuidarme, darme sus consejos, apoyarme y por ese inmenso cariño que día a día me demuestra.

A mis hermanos Tania y Alvaro David por ayudarme con su apoyo a culminar esta carrera.

A Dora Isabel y José Armando por su gran cariño.

A Mauricio Ricardo por su comprensión, ayuda incondicional y por todas las noches de desvelo que invirtió por mi bienestar.

A mis tíos, en especial a mi tío German Osorto por el apoyo brindado a mí y a mi familia.

A toda mi familia por confiar siempre en mí.

A mi asesor principal Dr. Francisco Javier Bueso por todo su tiempo brindado y por sus conocimientos impartidos en el transcurso de la ejecución de este proyecto.

A mi asesor secundario Dr Luis Fernando Osorio por su apoyo.

A mis amigos Ana Ochoa, Xochil Flores, Maryan Moncada, Marisol Perez, Verónica Molina, Elizabeth Bucheli, Keila Diaz, Victor Prado, Alvaro Asencio, Luis Acosta, Victor Taleón, por enseñarme el valor de la amistad y apoyarme cuando les necesite.

A todos mis amigos y compañeros por estos maravillosos cuatro años.

RESUMEN

Castro, Elia. 2005. Validación de un método de cuantificación de colesterol total en leche semidescremada en Zamorano usando cromatografía de gases. Proyecto de graduación de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “Zamorano”, Honduras. 34p.

Las concentraciones elevadas de colesterol en la sangre son perjudiciales para la salud porque causan enfermedades cardiovasculares. El objetivo principal del estudio fue validar un método de cuantificación de colesterol total en leche semidescremada en la Escuela Agrícola Panamericana usando cromatografía de gases (CG). Con este fin se estudiaron dos métodos de extracción, el método desarrollado por Fletouris (1998) para queso regato y el método de la AOAC 976.26 para cualquier alimento con índices de colesterol arriba de 1mg/100 g de muestra. Se realizó un análisis de regresión lineal donde se comparó el contenido de estándar de colesterol (mg de colesterol/ 100g de hexano) con el área de colesterol registrada por los cromatogramas, obteniendo un $R^2 = 0.97$. Para la aplicación del método Fletouris, se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), arreglado en parcelas sub-sub-sub-divididas, donde la parcela principal fue los tres tipos de leche (entera, semidescremada, descremada), la sub-parcela un ajuste en la concentración de KOH (0.5 y 1 M), la sub-sub-parcela las temperaturas de extracción (60°C y 80°C) y la sub-sub-sub-parcela el tiempo de calentamiento de la muestra (5, 15, 30, y 60 min) se usó un Diseño Completo al Azar (DCA) para el método de AOAC 976.26. Para comparar los métodos se usó una prueba t-student, usando el huevo como base. El resultado fue $Pr > |t| = 0.0089$ menor a 0.05, indicando que el método rápido de Fletouris extrajo significativamente más colesterol. La extracción con mayor concentración de KOH (1 M), mayor temperatura (80°C) y mayor tiempo de exposición (90 min) aplicado a leche entera superó al resto de tratamientos al poder recuperar colesterol de leche entera (2.08 mg/100 g), aunque no de leche semidescremada.

Palabras clave: Extracción de esteroides, saponificación, colesterol LDL, colesterol HDL.

Francisco Javier Bueso, Ph.D.
Asesor Principal

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimiento.....	v
	Resumen.....	vi
	Contenido.....	vii
	Índice de cuadros	ix
	Índice de figuras.....	x
	Índice de Anexos.....	xi
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	General.....	2
1.1.2	Específicos	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1	MOLÉCULA DE COLESTEROL	3
2.2	TIPOS DE COLESTEROL.....	3
2.3	COMPOSICIÓN DE LA LECHE	4
2.4	MÉTODOS DE MEDICIÓN DE COLESTEROL	4
2.5	CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	7
3.2	MATERIALES	7
3.3	EQUIPO.....	7
3.4	METODOLOGÍA	8
3.4.1	Diseño experimental	8
3.4.1.1	Fletouris	8
3.4.1.2	AOAC 976.26	9
3.4.1.3	Comparación de ambos métodos	10
3.4.2	Muestreos.....	10
3.4.2.1	Fletouris	10
3.4.2.2	AOAC 976.26	11
3.4.3	Desarrollo de curva estándar de colesterol	11
3.5	EXTRACCIÓN Y MÉTODOS CROMATOGRAFÍCOS	11

3.5.1	Preparación de la muestra	12
3.5.1.1	Fletouris	12
3.5.1.2	AOAC 976.26	12
3.5.1.3	Desarrollo de curva estándar de colesterol	13
3.6	ANÁLISIS CROMATOGRAFÍCO.....	13
3.7	HIPÓTESIS.....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1	DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE COLESTEROL....	15
4.2	FLETOURIS	17
4.3	AOAC 976.26	18
4.4	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS FLETOURIS Y AOAC 976.26	19
5.	CONCLUSIONES	20
6.	RECOMENDACIONES	21
7.	BIBLIOGRAFÍA	22
8.	ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Tratamientos con concentración de KOH 0.5 M	9
2.	Tratamientos con concentración de KOH 1.0 M	9
3.	Tratamientos evaluados con el método de la AOAC para extracción y cuantificación de colesterol en leche.	10
4.	Distribución de muestras en el tiempo.....	10
5.	Soluciones estándar de colesterol	11
6.	Estadígrafos de tiempo de retención del colesterol.....	16
7.	Niveles de extracción de colesterol con el método Fletouris (mg/100g de leche)	17
8.	Extracción de colesterol en leches con el método de la AOAC 976.26 ..	18
9.	Alimentos con colesterol.....	18
10.	Resultados de prueba t-student	19
11.	Extracción de colesterol en huevo por los métodos de Fletouris y AOAC 976.26	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1.	Molécula de colesterol.....	3
2.	Curva estándar de colesterol.....	15
3.	Tiempo de retención del colesterol.....	16

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		
1	Alimentos con mayor contenido de colesterol.....	25
2	Miligramos de colesterol por 100 gramos de alimento.....	26
3	Cromatograma de extracción de colesterol por el método de Fletouris en leche entera (TRT-32).....	27
4	Cromatograma de extracción de colesterol por el método de Fletouris en leche entera (TRT-33).....	28
5	Cromatograma de hexano	29
6	Cromatograma de estándar de colesterol al 8%	30
7	Cromatograma de estándar de colesterol al 17%	31
8	Cromatograma de estándar de colestetol al 25%	32
9	Cromatograma de estándar de colesterol al 50%	33
10	Cromatograma de huevo por extracción con el método de la AOAC	34

1. INTRODUCCIÓN

Según Tudela (1996) la inquietud del público en general sobre el colesterol es múltiple y variada. El colesterol es un compuesto químico, un alcohol que pertenece al grupo de los esteroides, clasificados como lípidos no saponificables que sólo se disuelven en disolventes orgánicos como el alcohol, el éter, la acetona y el cloroformo. Esto significa que no se pueden disolver en agua ni, por lo tanto, en soluciones acuosas como la sangre.

Las concentraciones elevadas de colesterol en la sangre representan un factor de riesgo para la salud ya que junto con otros lípidos puede depositarse en las paredes internas de las arterias, bloqueándolas, y llegar a ocasionar accidentes cardiovasculares como el infarto de miocardio. Es por esto que representa una gran preocupación para el ser humano. El colesterol también permite disfrutar de hormonas sexuales, tener huesos bien calcificados, poder digerir las grasas, resistir las infecciones y la fatiga nerviosa, reparar nuestras células dañadas y regular el nivel de azúcar en la sangre, entre otros beneficios. El colesterol es una sustancia indispensable para el buen funcionamiento de nuestro organismo, por lo que no se debe de dejar de consumir en su totalidad.

De acuerdo con Solís (2004) dos de cada seis personas mueren por enfermedades del corazón. Las enfermedades cardiovasculares, principalmente el infarto miocardio y el ataque cerebro vascular (infartos cerebrales) constituyen un sin número de muertes en el mundo. Sin embargo, existe un gran recurso para prevenirlas este recurso es controlar el colesterol.

Según Zonadiet (2003) si se desea controlar los índices de colesterol en el organismo es necesario disminuir el consumo de alimentos altos en grasas de origen animal por lo tanto es recomendable consumir alimentos con bajo contenido de colesterol como leche semidescremada o descremada. La leche es un producto integral del ordeño total e ininterrumpido, realizados en condiciones de higiene a vacas lecheras en buen estado de salud y alimentación, sin aditivos de ninguna especie. Se recomienda que los adultos consuman leche descremada, dado que sirve como medida preventiva a la aparición de enfermedades cardiovasculares.

El riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas por concentraciones altas de colesterol es la situación que realza importancia a la determinación del colesterol en alimentos de origen animal, como la leche y sus derivados. La determinación del contenido de colesterol en alimentos ha sido tema de investigación extensa. Se han realizado varios estudios y en muchos de los casos los pasos son muy laboriosos, costosos, las muestras suelen ser muy grandes y los procedimientos aburridos. Por esta razón se ha popularizado la detección y cuantificación de colesterol por cromatografía de gases, método rápido y confiable para la determinación de colesterol en leche.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Validar un método de cuantificación de colesterol total en leche semidescremada en la Escuela Agrícola Panamericana usando cromatografía de gases (CG).

1.1.2 Objetivos específicos.

- a. Optimizar el método de extracción de colesterol de la leche.
- b. Establecer una curva estándar que nos permita cuantificar el contenido de colesterol en diferentes alimentos.
- c. Determinar el contenido de colesterol en leche semidescremada producida por la planta láctea en zamorano.

2. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 MOLÉCULA DE COLESTEROL

De acuerdo con Tudela (1996) la molécula de colesterol está compuesta por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno dispuestos en cuatro anillos unidos entre sí y una cadena lateral, se presenta en la naturaleza en dos formas: como colesterol libre o como éster, producto de la combinación de la molécula de colesterol con diferentes ácidos grasos. El colesterol, fue aislado por primera vez en el siglo XVIII. El nombre de colesterol procede del griego chole- (bilis) y stereos (sólido), por haberse identificado por primera vez en los cálculos de la vesícula biliar.

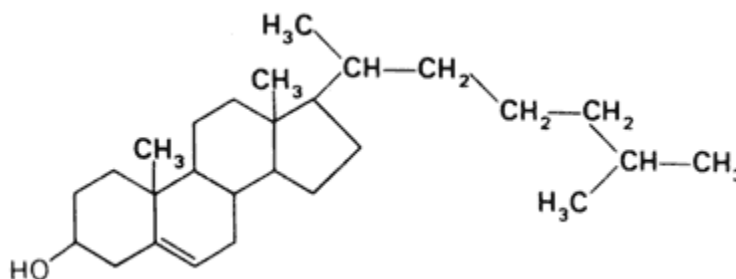


Figura 1. Molécula de colesterol

2.2 TIPOS DE COLESTEROL

Según Martínez (2005) es muy importante tener en cuenta que hay dos tipos de colesterol: el llamado colesterol "malo" conocido como LDL o lipoproteína de baja densidad (Low-density lipoprotein) y el colesterol "bueno" conocido como HDL o lipoproteína de alta densidad (High-density lipoprotein). Las lipoproteínas son las encargadas del transporte del colesterol a través de la corriente sanguínea. Es bueno que la cantidad de HDL sea alta porque nos está indicando que el colesterol que arrastran va a ser eliminado del cuerpo (facilita el flujo sanguíneo ya que lubrica las paredes de los vasos), pero un número alto de lipoproteínas de baja densidad es síntoma que el colesterol va a circular por la sangre y finalmente se va a depositar en las arterias, bloqueándolas y endureciéndolas. Se considera que unos niveles de colesterol inferiores a 200 miligramos por decilitro de sangre son los que debería tener el cuerpo para evitar el

riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por encima de 200 la persona se encuentra en riesgo. El riesgo, además de los niveles altos de colesterol, depende también de los niveles concretos de HDL y LDL (niveles por encima de 60 mg de HDL protegen contra las enfermedades vasculares aunque los niveles de LDL sean altos. Niveles debajo de 40 pueden considerarse peligrosos). Se dice que el 75% al 80% de colesterol se transporta en el LDL, el otro 15% o 20% restante se transporta en el HDL. Conviene tener un LDL lo más bajo posible y un HDL alto.

2.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

Según Sagarpa (2003) la composición de la leche varía según el origen, pero en general es una mezcla líquida cuya composición aproximadamente es la siguiente: proteínas 4%, lípidos 5%, azúcares 5%, agua 86%, minerales y vitaminas. En la leche existen tres tipos de lípidos: grasas o aceites (triglicéridos o triacilglicéridos), fosfolípidos y ésteres de colesterol (ácidos grasos).

De acuerdo con SEH – LELHA (2001) en el mercado existen un sin número de leches, las que se comercializan con mayor frecuencia son:

- a) Leche entera: es aquella que presenta el mayor contenido de grasa láctea, con un mínimo de 3,2 gramos por 100 gramos de producto. La leche entera contiene unos 15 mg de colesterol por cada 100 gramos. Tanto su valor calórico como su porcentaje de colesterol son más elevados con respecto a la leche semidescremada o descremada.
- b) Leche semidescremada: es la leche a la que se le ha eliminado parcialmente el contenido graso, y éste oscila entre 1.5 y 1.8 gramos por 100 gramos de producto. Por lo tanto, el contenido de colesterol es de 8 mg por cada 100 gramos. Su sabor es menos intenso y su valor nutritivo disminuye por la pérdida de vitaminas liposolubles A y D, aunque generalmente se suelen enriquecer con esas vitaminas para suplir dicha pérdida.
- c) Leche descremada: mantiene todos los nutrientes de la leche entera excepto la grasa, el colesterol es relativamente bajo conteniendo 2 mg por cada 100g. Muchas marcas comerciales les añaden vitaminas para compensar las pérdidas.

Según Barreda (2005) es más saludable consumir leche semidescremada que leche entera, por la diferencia en el contenido de grasa entre ambos productos.

2.4 MÉTODOS DE MEDICIÓN DE COLESTEROL

De acuerdo con Fletouris et., al. (1998) la determinación del contenido de colesterol en alimentos ha sido muy intensa y tediosa. Sin embargo, en la actualidad hay varios métodos cromatográficos para medir colesterol, como por ejemplo:

- El método de Tsui requiere de mucha limpieza en cartuchos no polares (Tsui, 1989).
- El método de al-Hasani-Hasani et al. requiere un tamaño de muestra grande, procedimientos largos y aburridos (Al-Hassani, 1993).

- El método de Thompson y de Merota requiere un paso inicial de extracción de lípidos antes de la saponificación y derivación directa del análisis (Thompson, 1993).

Según Fletouris et., al. (1998) un método simple para la determinación del colesterol en leche y productos lácteos se ha desarrollado por D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas and A.I. Mantis. El método fue desarrollado y probado en queso de Regato. El método necesita un tamaño de muestra pequeño (1 μ l) y ofrece ahorros considerables sobre el costo de solventes, materiales, manipulación de la muestra y el análisis final. El procedimiento de la preparación de la muestra es rápido y simple, y el muestreo automático puede ser explotado en ampliar la capacidad para el análisis con la operación cromatográfica y fácilmente aplicado en laboratorios. El método sólo ha sido aplicado en queso de regato por lo que los resultados obtenidos son referentes a este producto. Sin embargo, en dicho análisis se encontró que usando una temperatura de 60°C con una concentración de KOH 1 M y con un tiempo de exposición de baño maría de 15 minutos fue la combinación de variables con las que se obtuvo los picos más altos y el área mayor de extracción de colesterol. Este método nombrado se pretende adaptar al análisis de colesterol en leches descremada, semidescremada y entera.

De acuerdo con Fukuda (2003) otro método para el análisis de colesterol en alimentos, es el descrito por la AOAC 976.26, que se aplica a alimentos con una concentración mayor o igual a 1 mg de colesterol por 100 gramos de alimentos. Los lípidos en la muestra son saponificados a alta temperatura con una solución de KOH en etanol. La fracción no saponificable es la que contiene el colesterol y otros esteroides que son extraídos con tolueno. Los esteroides son derivatizados a trimetilsilil éteres y luego son cuantificados por medio de cromatografía de gases.

2.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Según Wikimedia (2005) el término “cromatografía” se empleó por primera vez en 1906, por un botánico ruso Mikhail Tswett. Esta palabra viene del griego chroma y graphos que significan respectivamente "color" y "escribir". A comienzos del año 1903, Mikhail Tswett usó columnas de adsorción de líquidos para separar pigmentos vegetales (por ejemplo, clorofilas). Las disoluciones se hacían pasar a través de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio. Los primeros equipos de cromatografía de gases aparecieron en el mercado a mediados del siglo XX.

De acuerdo con Barragán (2004) el proceso cromatográfico, aparentemente simple en práctica, es en realidad una compleja unión de fenómenos tales como hidrodinámica, cinética, termodinámica, química de superficie y difusión. Keulemans ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales constituye la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria.

“La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial. La fase móvil es un fluido (puede ser gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla. Se dice que el corazón de un cromatógrafo es la columna el lugar donde ocurre la separación, los materiales con los cuales generalmente pueden estar elaborada son: cobre, aluminio, acero inoxidable, vidrio ó teflón.” (Barragan, 2004)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Centro de Evaluación de Alimentos (CEA) y la Planta Procesadora de Lácteos (de donde se obtuvieron las muestras), ambos centros están localizados en la Escuela Agrícola Panamericana (ZAMORANO), ubicada en el Valle del Yeguaré, departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A.

3.2 MATERIALES

- Estándar de colesterol (colesterol Sigma grado HPLC).
- Hexano (Solvente, grado HPLC).
- Metanol (Solvente grado Reactivo).
- KOH-hidróxido de potasio (Reactivo).
- Dimetilformamida - DMF (Solvente – Grado HPLC).
- Tolueno.
- Na₂SO₄ - Sulfato de sodio (Reactivo).
- Etanol al 95% (Grado HPLC).
- Fibra de vidrio.
- Acetona.
- Leche entera.
- Leche semidescremada.
- Leche descremada.
- Agua destilada.

3.3 EQUIPO

- Cromatógrafo de gases (6890 plus – Agilent.).
- Columna capilar (SUPELCO – SAC-5.). Especificaciones: 30 m de longitud X 0.25 mm diámetro interior (grosor de la columna) y 0.25 µm (distancia de fase estacionaria).
- Baño María (Dubnoff metabolic shaking incubator – Precision – GCA Corporation). Descripción: 120 voltios, 7 amperios, 50/60 Hz.
- Centrífuga (IEC – K – Internacional equipment company). Descripción: 115 voltios, 7 amperios, 60 Hz.

- Vortex (Fisher vortex – Genie 2 – Fisher Scientific).
- Agitador Magnético (Thermolyne – cimarec 2). Descripción: 120 voltios, 9.5 amperios, 60Hz.
- Tubos de ensayo (PYREX – 9820.)
- Jeringas (HP de 10ul)
- Sample vials – SUPELCO – 4 ml.
- Balones 250ml (KIMAX 24/40)
- Erlenmeyer (KIMAX-125ml y 250ml.)
- Embudo de separación (PYREX-500ml No. 6404)
- Probeta (PYREX-10ml.)
- Embudo de vidrio (KIMAX-58.)
- Balón volumétrico (KIMAX-1000ml.)
- Condensador (PYREX - 24/40)
- Balanza analítica (METTER AE 200)
- Pipetas
- Papel aluminio.
- Algodón.

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1 Diseño experimental

Se evaluaron dos métodos de extracción de colesterol:

- a) Fletouris. Determinación rápida de colesterol en leche y productos lácteos por medio de saponificación y cromatografía de gases.
- b) AOAC 976.26 Análisis de colesterol en alimentos.

3.4.1.1 Fletouris

Se usó un diseño de parcelas sub-sub-sub-divididas en donde la parcela principal fueron los tres tipos de leche (entera, semidescremada, descremada), la sub-parcela un ajuste en la concentración de KOH (0.5 y 1 M), la sub-sub-parcela las diferentes temperatura (60°C y 80°C) y la sub-sub-sub-parcela el tiempo de calentamiento de la muestra (5, 15, 30, y 60 min), haciendo un total de 48 tratamientos con dos repeticiones que conforman 96 unidades experimentales (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Tratamientos con concentración de KOH 0.5 M

Tipo de leche	Temperatura °C	Tiempo* (minutos)			
		5	15	30	60
Leche entera	60	TRT-1	TRT-2	TRT-3	TRT-4
Leche entera	80	TRT-5	TRT-6	TRT-7	TRT-8
Leche semidescremada	60	TRT-9	TRT-10	TRT-11	TRT-12
Leche semidescremada	80	TRT-13	TRT-14	TRT-15	TRT-16
Leche descremada	60	TRT-17	TRT-18	TRT-19	TRT-20
Leche descremada	80	TRT-21	TRT-22	TRT-23	TRT-24

* Tiempo de la muestra en baño María.

Cuadro 2. Tratamientos con concentración de KOH 1.0 M

Tipo de leche	Temperatura °C	Tiempo* (minutos)			
		5	15	30	60
Leche entera	60	TRT-25	TRT-26	TRT-27	TRT-28
Leche entera	80	TRT-29	TRT-30	TRT-31	TRT-32
Leche semidescremada	60	TRT-33	TRT-34	TRT-35	TRT-36
Leche semidescremada	80	TRT-37	TRT-38	TRT-39	TRT-40
Leche descremada	60	TRT-41	TRT-42	TRT-43	TRT-44
Leche descremada	80	TRT-45	TRT-46	TRT-47	TRT-48

* Tiempo de la muestra en baño María.

Para determinar la concentración de colesterol en la leche se usaron tres tratamientos (niveles de grasa en la leche entera, semidescremada y descremada) con dos duplicados por tratamiento.

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Para evaluar el efecto del contenido de grasa de la leche en la concentración de colesterol total. Los bloques fueron los días o lotes de producción.

3.4.1.2 AOAC 976.26

Se usó un Diseño Completo al Azar (DCA). Se estudiaron tres tipos de leche (entera, semidescremada y descremada) con tres repeticiones haciendo un total de nueve unidades experimentales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos evaluados con el método de la AOAC para extracción y cuantificación de colesterol en leche.

Extracción	Tratamientos
1	TRT – 1 Leche entera
	TRT – 2 Leche semidescremada
	TRT – 3 Leche descremada
2	TRT – 1 Leche entera
	TRT – 2 Leche semidescremada
	TRT – 3 Leche descremada
3	TRT – 1 Leche entera
	TRT – 2 Leche semidescremada
	TRT – 3 Leche descremada

Para determinar la concentración de colesterol en la leche se corrieron las nueve unidades experimentales en el CG con dos duplicados.

3.4.1.3 Comparación de ambos métodos

Para comparar estos dos métodos se corrió una prueba t-student, usando huevo.

3.4.2 Muestreos

3.4.2.1 Fletouris

Se realizaron tres muestreos distribuidos en dos semanas correspondientes al mes de mayo (Cuadro 4). La toma de muestra se realizó tomando 100 g de leche entera, 100 g de leche semidescremada y 100g de leche descremada.

Cuadro 4. Distribución de muestras en el tiempo.

Fechas	Mayo		
	Lunes	Miercoles	Lunes
23/5/2005	x		
25/5/2005		x	
30/5/2005			x

3.4.2.2 AOAC 976.26

Se realizó un muestreo completo al azar tomando tres muestras de 100 g de leche entera, 100 g de leche semidescremada y 100 g de leche descremada.

3.4.3. Desarrollo de curva estándar de colesterol

Para la formación de la curva estándar de colesterol se hicieron soluciones de hexano con estándar de colesterol. La cantidad de hexano permaneció constante, por lo tanto la variable fue la concentración de colesterol.

Cuadro 5. Soluciones estándar de colesterol.

Concentración (mg colesterol/100g)	Cantidad de hexano (g)	Cantidad de estándar de colesterol (mg)
100	6	6.0
75	6	4.5
50	6	3.0
33	6	2.0
25	6	1.5
17	6	1.0
8	6	0.5
0	6	0

3.5 EXTRACCIÓN Y MÉTODOS CROMATOGRAFÍCOS

Para la preparación de las muestras de leche, se extrajo el colesterol por método Fletouris y el método de la AOAC 976.6. Las muestras fueron inyectadas en el CG bajo las siguientes condiciones:

- Fase estacionaria: Columna capilar SUPELCO – SAC-5. (30m de longitud x 0.25 mm ID x 0.25 μ m) Agilent®
- Fase móvil (gas de acarreo) N₂
- Split 75:1
- Flujo: 1.6ml/min.
- Inyector: 300°C
- Horno: rampas de temperatura comenzando en 40°C, 1 min, 40°C/min hasta 190°C, 20°C/min hasta 230°C, 40°C/min hasta 295, por 25 min.
- Detector con llama de ionización a 210°C
- Temperatura de la columna: 300°C

3.5.1 Preparación de la muestra.

3.5.1.1 Fletouris

- Preparación de la solución saponificada: 14 g ó 7 g de KOH fueron disueltos en metanol usando un agitador magnético, hasta lograr un volumen de 500 ml con el solvente para una concentración de 1 M y 0.5 M respectivamente.
- Preparación de la muestra:
 - Se pesaron 0.2 gramos de leche en un tubo de ensayo.
 - Se agregó a cada tubo 5 ml de solución de KOH (1 ó 0.5 M según el tratamiento).
 - El tubo se capsuló firmemente para ser agitado en el vortex por 15 segundos o según el tiempo establecido.
 - La mitad del tubo después de agitado fue sumergido en baño María de 80°C ó 60°C según el tratamiento. Estos tubos se retiraron cada 5 minutos y fueron agitados por 10 segundos.
 - Se dejaron enfriar los tubos y se les agregó a cada uno 1ml de agua y 5 ml de hexano.
 - Se agitaron fuertemente en el vortex por 1 minuto y se centrifugaron por 1 minuto a $2000 \times g$.
- Se generó la curva cuando se inyectó 1 μ l de cada solución.

3.5.1.2 AOAC 976.26

- Se pesaron 3 g de leche en un erlenmeyer de 250 ml y se colocó un magneto dentro del erlenmeyer.
- Se adicionó 40 ml de etanol al 95% y 50 ml de solución KOH al 1N.
- Preparación de la solución KOH al 1 N se pesaron 56 g de KOH en aproximadamente 800 ml de agua fría y se diluyeron hasta aforarla a 1000ml en el balón volumétrico.
- Se colocó el erlenmeyer en la hornilla-agitador y se le acopló el condensador, se encendió la hornilla y el agitador, poniéndolo en reflujo 70 ± 10 minutos, así se aseguró la saponificación completa de la muestra.
- Se apagó la hornilla y se agregó 60 ml de etanol al 95% a través de la parte superior del condensador mientras se agitaba la solución.
- Después de 15 minutos aproximadamente, se removió el frasco, se desconectó el condensador y se tapó el erlenmeyer, dejando enfriar la solución hasta temperatura ambiente (la muestra permaneció estable sólo durante 24 horas.)
- Para la extracción se adicionó a la muestra saponificada 100 ml de tolueno mientras estuvo en agitación. Cuando se agregó el tolueno, se tapó el recipiente y se agitó la muestra más de 30 segundos.
- Se decantó la solución en un embudo de separación de 500 ml y se agregó 110 ml de solución KOH 1 N. El embudo se agitó durante 10 s.
- Se dejó reposar el tiempo necesario para permitir que las fases se separaran y se descartó la porción acuosa (fase inferior).
- La fase grasa se lavó con 40 ml de agua, se dejó reposar hasta que se separaron las fases y se descartó de nuevo la fase acuosa. Este lavado se hizo por lo menos tres

- veces y se agitó cada vez con mayor vigor. Después del último enjuague el tolueno resultó con una apariencia clara-cristalina.
- El tolueno fue trasvasado a un erlenmeyer de 125 ml, que contenía 2 gramos de Na_2SO_4 . Para esto se usó un embudo de vidrio con fibra de vidrio y 20 gramos de Na_2SO_4 . El recipiente se tapó y se agitó por algunos segundos.
 - Luego se dejó reposar durante 15 minutos. La muestra se conservó estable durante 24 horas.
 - Con una pipeta se tomó 25 ml del extracto y se descargó en un balón de fondo plano.
 - El contenido fue evaporado hasta secarse por completo. En el momento que se evaporó la solución se agregó 3 ml de acetona y de nuevo se evaporó hasta secar.
 - El residuo fue disuelto en 3 ml de dimetilformamida.
 - Se inyectó 1 μl de la solución al CG.

3.5.1.3 Desarrollo de curva estándar de colesterol.

- Preparación del estándar de colesterol:
 - Utilizando la balanza analítica se pesaron 0.5-6 mg del estándar de colesterol en un frasco volumétrico y se diluyeron en 6 gramos de hexano.
- Se inyectó 1 μl de la muestra en el cromatógrafo y se dejó correr el tiempo de 42.62 minutos (tiempo establecido para el análisis).

3.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Se analizó el contenido de colesterol total de la leche, con tres lecturas para cada unidad experimental. Se utilizó el cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890, junto con el software ChemStation. Se creó el método del análisis en el software con las siguientes condiciones: la temperatura del inyector fue 300°C en modo split a una relación de 75:1; utilizando una columna capilar SUPELCO – SAC-5. (30m de longitud x 0.25 mm ID x 0.25 μm) con un flujo de 4.24 ml/cm de nitrógeno; se utilizó un detector FID a 250°C , la temperatura del horno a 190°C , que durante 2 minutos tuvo un incremento hasta 230°C a una tasa de 20°C por minuto. Después la temperatura incrementó hasta 295°C a una tasa de 40°C por minuto y se mantuvo durante 25 minutos. La duración total del análisis cromatográfico fue 42.63 minutos, el gas de acarreo que se utilizó fue nitrógeno. Los estándares utilizados en la formación de la curva de regresión fueron de grado HPLC para obtener un pico de colesterol único en el análisis.

Con las soluciones estándar de colesterol de 0-100mg/100g de muestra y el área registrada en el pico de colesterol (pA) se construyó una curva estándar de regresión lineal que permitió determinar la cantidad mínima que detecta de colesterol el cromatógrafo de gases.

3.7 HIPÓTESIS

- Hipótesis nula (H_0), no hubo diferencia significativa en la concentración de colesterol en leches con diferente contenido de grasa.
- Hipótesis alterna (H_a), por lo menos una de las concentraciones de colesterol en las muestras fue diferente de las demás.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 DETERMINACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE COLESTEROL

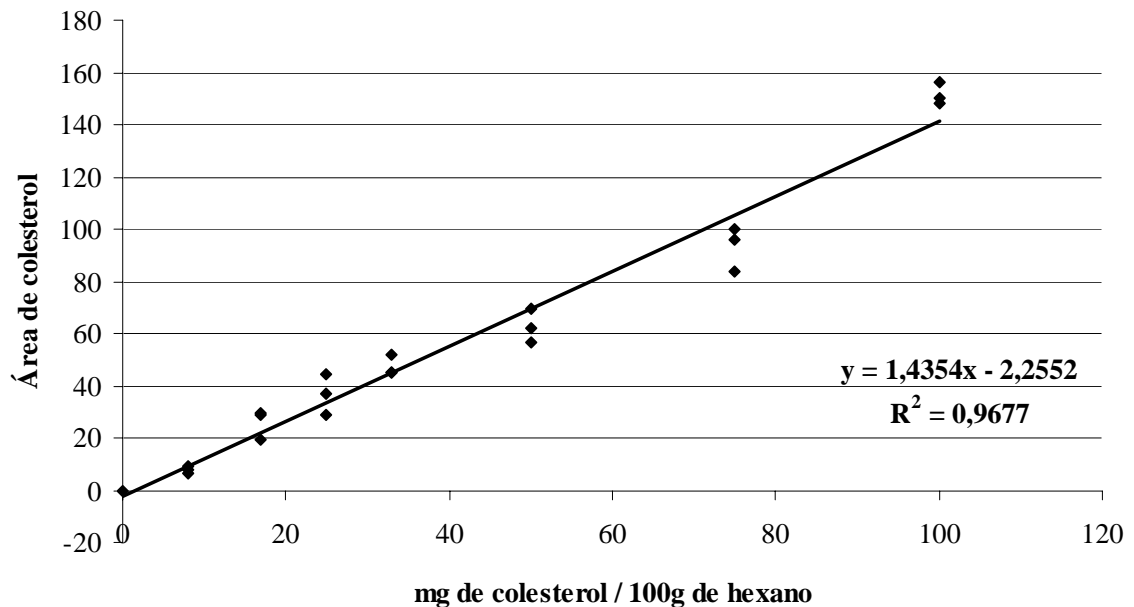


Figura 2. Curva estándar de colesterol

La Figura 2 muestra la curva estándar para la determinación de colesterol que se obtuvo por regresión lineal. El eje "el eje "Y" muestra el área de colesterol reportada en cada cromatograma corrido. "Y" representa los miligramos de colesterol diluidos en 6 gramos de hexano expresados como mg de colesterol/100 g de hexano. Se obtuvo un R^2 de 0.967, indicando que el modelo lineal explica bien la relación entre el área de pico de colesterol registrado por el CG y su concentración en mg/100 g de muestra.

Esta curva estándar permitirá determinar la cantidad de colesterol en alimentos que se encuentren en los rangos de 0 a 100 mg/100 g de muestra. Por ejemplo la leche descremada tiene niveles de colesterol bajos (2mg/100g), cerca de cero, el camarón tiene niveles de 150 mg/100g de muestra, el huevo es uno de los alimentos con mayor cantidad de colesterol (252 mg/100g). Por lo tanto, al analizar cualquier alimento será necesario tener una idea de la cantidad de colesterol que éste posee, para poder definir si está dentro de la curva estándar.

Al determinar la curva estándar de colesterol también se identificó que su tiempo de retención varió de una muestra a otra en segundos, por lo que se obtuvo un tiempo promedio de 33.95 ± 0.3 minutos (Figura 3). Por lo tanto, es a este tiempo donde el colesterol fue cuantificado por el CG.

La determinación del tiempo de retención del colesterol se hizo basada en los cromatogramas de esta curva estándar.

Cuadro 6. Estadígrafos de tiempo de retención del colesterol.

Media (min)	Desviación estándar (min)	% Coeficiente de variación
33.95	0.3	0.88

El Cuadro 6 muestra la media del tiempo de retención de 21 cromatogramas de la curva estándar. La desviación estándar nos indica que el tiempo de retención varió en ± 18 segundos y el coeficiente de variación nos muestra que nuestros datos no varían mucho uno de otro.

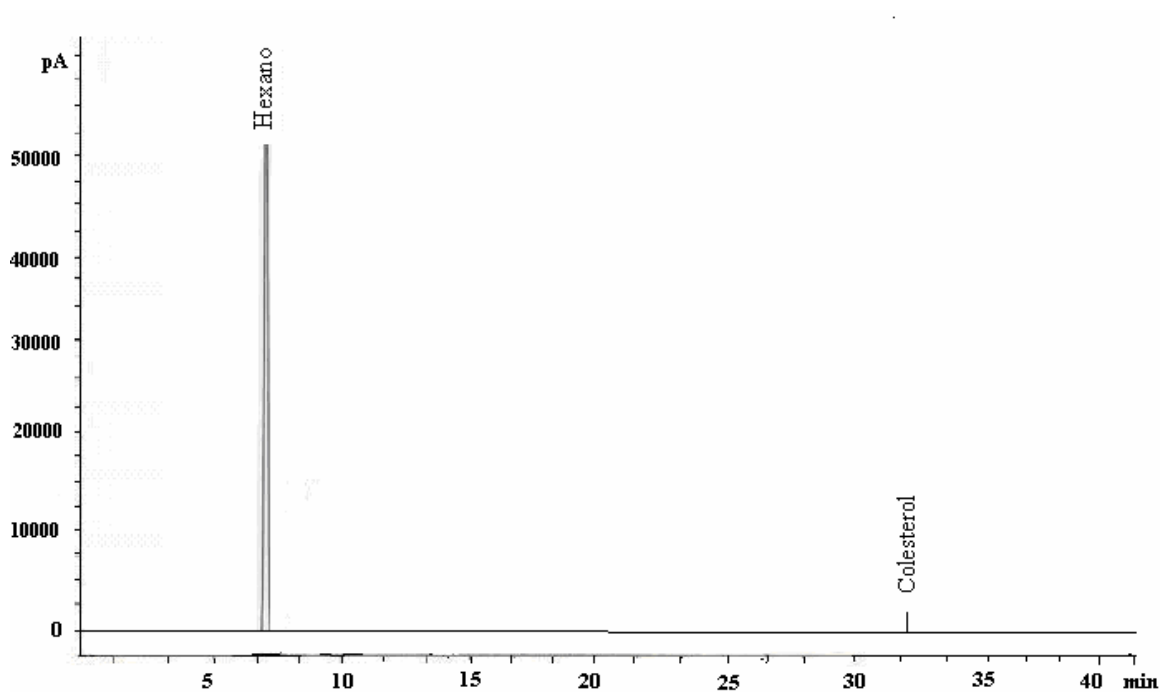


Figura 3. Tiempo de retención del colesterol

4.2 FLETOURIS

Cuadro 7. Niveles de extracción de colesterol con el método Fletouris (mg/100g de leche).

Tratamientos	Área de colesterol (mg/100g de leche)	Tratamientos	Área de colesterol (mg/100g de leche)
TRT-1	0	TRT-25	0
TRT-2	0	TRT-26	0
TRT-3	0	TRT-27	0
TRT-4	0	TRT-28	0
TRT-5	0	TRT-29	0
TRT-6	0	TRT-30	0
TRT-7	0	TRT-31	2.08
TRT-8	0	TRT-32	2.08
TRT-9	0	TRT-33	0
TRT-10	0	TRT-34	0
TRT-11	0	TRT-35	0
TRT-12	0	TRT-36	0
TRT-13	0	TRT-37	0
TRT-14	0	TRT-38	0
TRT-15	0	TRT-39	0
TRT-16	0	TRT-40	0
TRT-17	0	TRT-41	0
TRT-18	0	TRT-42	0
TRT-19	0	TRT-43	0
TRT-20	0	TRT-44	0
TRT-21	0	TRT-45	0
TRT-22	0	TRT-46	0
TRT-23	0	TRT-47	0
TRT-24	0	TRT-48	0

El Cuadro 7 indica que los únicos tratamientos de cuantificación de colesterol efectivos fueron los que combinaron la extracción con KOH 1 M, sumergido a una temperatura de baño María de 80°C, por un tiempo de 30 a 60 minutos, usando leche entera. Por lo anterior se deduce que a mayor temperatura, mayor tiempo, mayor concentración de KOH y mayor contenido de grasa, se logró extraer mayor cantidad de colesterol de la leche.

Sin embargo, las concentraciones de colesterol cuantificadas en leche entera fueron mínimas y no son las correspondientes a la cantidad verdadera de colesterol que posee.

Según la literatura la leche entera debe contener de 12-15 mg de colesterol por cada 100 g de leche, mientras en el experimento el método de Fletouris extrajo sólo 2.08 mg de colesterol/100g de muestra.

4.3 AOAC 976.26

Los tres tratamientos con sus respectivas repeticiones fueron corridos en el CG, mostrando los siguientes resultados.

Cuadro 8. Extracción de colesterol en leches con el método de la AOAC 976.26

Tratamientos	Área de colesterol (mg de colesterol/100g de leche)
Leche entera (rep.1)	0
Leche entera (rep. 2)	0
Leche entera (rep.3)	0
Leche semidescremada (rep. 1)	0
Leche semidescremada (rep. 2)	0
Leche semidescremada (rep. 3)	0
Leche descremada (rep. 1)	0
Leche descremada (rep. 2)	0
Leche descremada (rep. 3)	0

El Cuadro 8 muestra que no se logró cuantificar el colesterol en leche con el método de la AOAC, por lo que se deduce que el método para extraer colesterol no se puede usar para analizar productos con baja concentración de colesterol como leche entera, semidescrema o descremada.

Cuadro 9. Alimentos con colesterol

Alimento	Área de colesterol (pA*s)	Área mg de colesterol/100 g de muestra
Huevo	74.2	100.49
Huevo	76.6	103.64
Camarón	12.1	18.87
Camarón	14.1	21.50
Rosquilla	41.5	57.51
Rosquilla	28.5	40.39

El método fue probado con otros alimentos como: huevo, rosquilla, camarones, en donde se obtuvo resultados satisfactorios como se muestra en el cuadro anterior. El porcentaje recuperado de colesterol en el huevo representa el 41% del valor real de colesterol

(250mg/100g), mientras el porcentaje recuperado de colesterol en el camarón fue de 13% comparado con el 100% de colesterol real que contiene este alimento (150mg/100g).

4.4 COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS FLETOURIS Y AOAC 976.26

Para comparar los dos métodos se corrió una prueba “T” utilizando un sólo alimento (huevo).

Cuadro 10. Resultados de prueba t-student

	Media	Desviación estándar	Pr > t
Diferencia	66.45	6.32	0.0089

La prueba t-student demostró que el método de Fletouris extrajo más colesterol del huevo que el método de la AOAC 976.26 (Cuadro 10).

Cuadro 11. Extracción de colesterol en huevo por los métodos de Fletouris y AOAC 976.26.

Método	Área de colesterol (pA*s)	mg de colesterol/100 g de muestra
AOAC	74,2	100,49
AOAC	76,6	103,64
Fletouris	135,6	126,68
Fletouris	148	138,18

El método de la AOAC extrajo el 41% de colesterol total del huevo, y el método Fletouris extrajo el 53% de colesterol total. Por lo tanto el método Fletouris extrae 12% más de colesterol que el método de la AOAC en el huevo.

5. CONCLUSIONES

- El método de extracción de colesterol de Fletouris resultó más eficiente que el método de la AOAC 976.26 en leche entera y en alimentos con concentraciones de colesterol arriba de los 10mg/100g.
- Se logró establecer la curva estándar de colesterol que servirá como base para futuros análisis en alimentos con concentración de colesterol entre 0 a 100mg/100g de muestra.
- Los métodos de extracción de Fletouris y de la AOAC no fueron efectivos en alimentos con bajas concentraciones de colesterol como la leche semidescremada.
- El método Fletouris, logró extraer colesterol de alimentos con concentraciones más bajas que el método de la AOAC 976.26.
- A mayor temperatura, mayor tiempo, mayor concentración de KOH y mayor contenido de grasa, se extrajo mayor cantidad de colesterol de la leche por el método de extracción de Fletouris.

6. RECOMENDACIONES

- Establecer una nueva curva estándar de colesterol si se cambia el gas de acarreo de nitrógeno a hidrógeno, ya que el tiempo de retención en la columna del CG se acortará.
- Ampliar el rango de la curva estándar desde 0 hasta 555mg/100g de alimento para permitir el análisis de alimentos con bajo y alto contenido de colesterol.
- Evaluar modificaciones al método de Fletouris con mayor concentración de KOH, mayor tiempo de exposición a baño maría, mayor temperatura hasta obtener 100% de extracción.
- Comparar del método Fletouris y el método de la AOAC 976.26 con otros alimentos que contengan valores de colesterol altos y verificar si el comportamiento es el mismo que en huevo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Al-Hasani, S. M., Hlavac, J., y Carpenter, M. W.. 1993. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. J.AOAC. Int. 76:902-906.

Barragán, G.C. 2004. Cromatografía de gases (en línea). México. Consultado 20 de febrero del 2005. Disponible en: <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/gas.html> - 17k.

Barreda P. 2005. Leche descremada en mayor de dos años (en línea). Consultado el 9 de febrero del 2005. Disponible en: http://www.pediatraldia.cl/leche_descremada.htm - 8k - 17 Feb 2005

Fletouris et al. 1998. Determinación rápida del colesterol en leche y productos lácteos por cromatografía directa de la saponificación y de gas del tubo capilar. Vol.81, No. 11.

Fukuda G. 2003. Método de Análisis Químico (C.E.A.). Análisis de colesterol en alimentos. Zamorano, Honduras.

Martínez V. 2005. Colesterol (en línea). Copyright. Consultado 26 febrero del 2005. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/medicinalscolesterol.htm> - 32k -

Sagarpa. 2003. De que esta hecha la leche (en línea). Consultado 21 enero del 2005. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderito/compleche.htm> - 8k -

SEH – LELHA. 2001. Leche y derivados (en línea). Consultado 27 febrero del 2005. Disponible en: <http://www.seh-lelha.org/lacteos.htm> - 8k -

Solís B. 2004. Arteriosclerosis y Dislipidemia (en línea). Consultado 15 de noviembre del 2005. Disponible en: <http://www.medicosecuador.com/espanol/articulos/43.htm> - 50k -

Thompson, R.H., y Merola, G.V. 1993. A simplified alternative to the AOAC official method for cholesterol in multicomponent foods. J. AOAC Int. 76:1057-1068.

Tsui, I. C. 1989. Rapid determination of total cholesterol in homogenized milk. J. AOAC 72:421-424.

Tudela V. 1996. El Colesterol lo bueno y lo malo (en línea). Consultado el 21 de enero del 2005. Disponible en: http://www.omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/140/htm/sec_4.htm - 6k -

Wikimedia Project. 2005. Cromatografía-wikipedia (en línea). Consultado 12 de octubre del 2005. Disponible en: <http://www.es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía> - 17k -

Zonadiet. 2003. La leche (en línea). Consultado el 21 de enero del 2005. Disponible en: <http://www.zonadiet.com/bebidas/leche.htm> - 15k -

8. ANEXOS

Anexo 1. Alimentos con mayor contenido de colesterol

Alimentos con mayor contenido de colesterol en miligramos por 100 gramos de alimento.	
Vísceras en general	500
Caviar	300
Margarina tradicional	250
Mantequilla	220
Langosta	180
Camarón, Calamares	150
Langostinos	145
Crema leche	137
Almejas	140
Jaibas	125

Anexo 2. Miligramos de colesterol por 100 gramos de alimento

Miligramos de colesterol por 100 gramos de alimentos	
Alimento	Colesterol
Hígado vacuno cocido	389
Hígado pollo cocido	349
Riñones cocidos	326
Yema de huevo	300
Mantequilla, margarina, erizos y camarón	225
Jamón cocido	194
Carne de cerdo y de cordero	93
Pollo, pavo y vacuno desgrasado	70
Atún al agua	20

Se recomienda consumir máximo 200 mg de colesterol diariamente

Anexo 3. Cromatograma de extracción de colesterol por el método de Fletouris en leche entera (TRT-32).

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0075.D
 Colesterol en leche entera, 80°C * 60 min

Sample Name: TRT-32

Injection Date: 14/06/05 11:24:54 a.m.

Sample Name: TRT-32

Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1

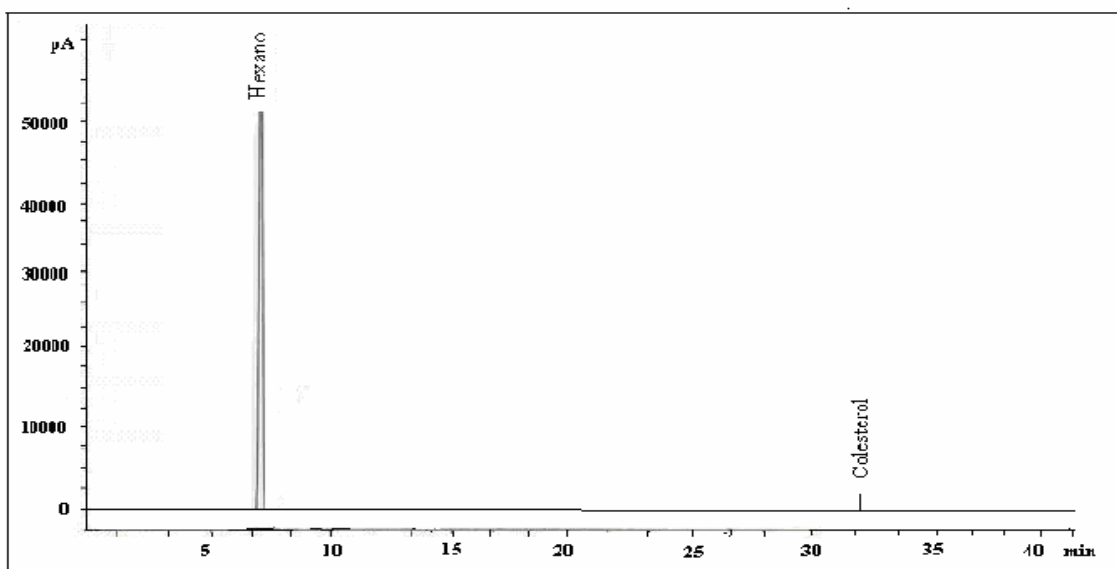
Inj: 1

Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M

Last changed: 14/06/05 08:22:25 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche entera



Area Percent Report

Sorted by: Signal

Multiplier: 1.0000

Dilution 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Widht	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.16	VB S	0.0549	1.79050e5	4.9836e4	97.06693
2	33.815	BV	0.0339	3.1	1.47496	0.00157

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1

15/06/05 12:07:41 a.m. Ecastro

Anexo 4. Cromatograma de extracción de colesterol por el método de Fletouris en leche entera (TRT-33).

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0074.D
 Colesterol en leche entera, 80°C * 90 min

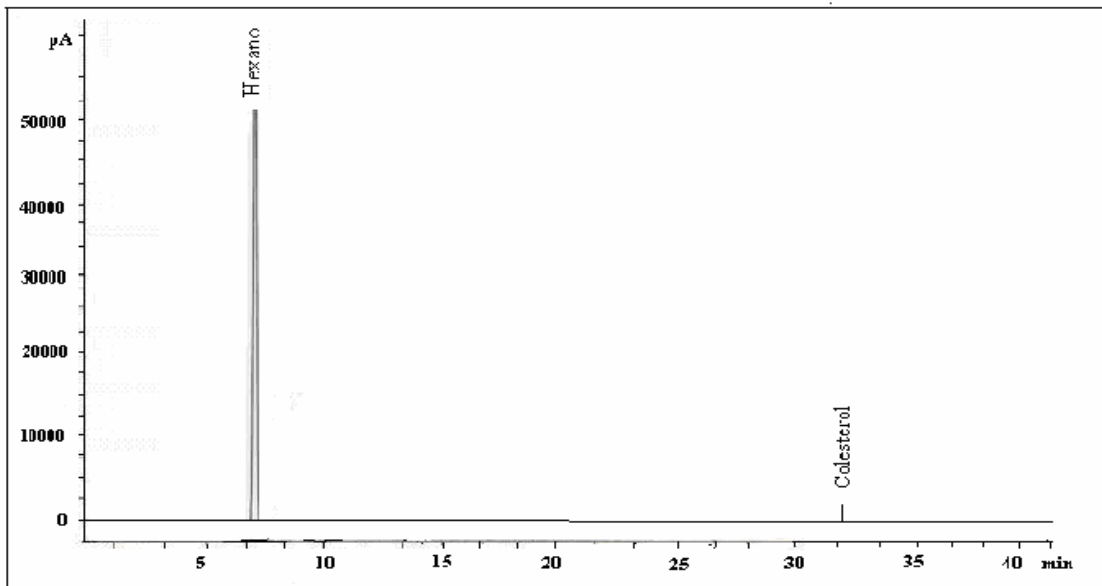
Sample Name: TRT-33

Injection Date: 14/06/05 10:25:49 p.m.
 Sample Name: TRT-33
 Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1
 Inj: 1
 Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M
 Last changed: 14/06/05 08:22:25 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche entera



Area Percent Report

Sorted by: Signal
 Multiplier: 1.0000
 Dilution 1.0000

Signal 1: F1D1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Widht	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.15	VB S	0.0572	2.02708e5	5.59788e4	97.09495
2	33.802	BV	0.0339	3.4	4.00031	0.00124

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 14/06/05 11:08:36 p.m. Ecastro

Anexo 5. Cromatograma de hexano.

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0079.D
0% colesterol

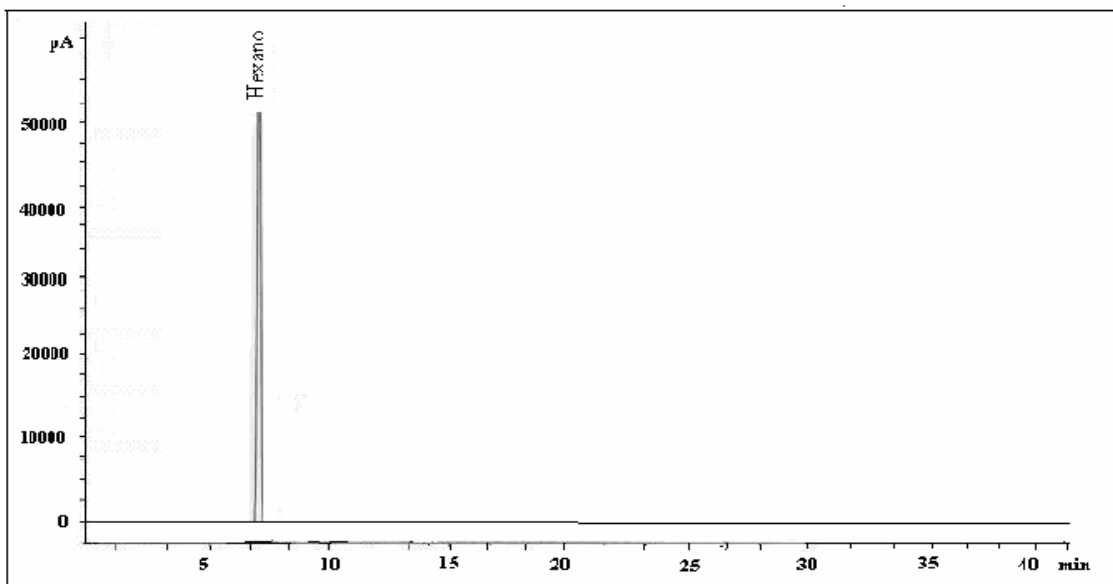
Sample Name: Hexano

Injection Date: 30/05/05 09:38:53 a.m.
Sample Name: Hexano
Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1
Inj: 1
Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M
Last changed: 31/05/05 08:03:29 a.m by Ecastro

Método de determinación de colesterol



Area Percent Report

Sorted by: Signal
Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000

Signal 1: F1D1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Width	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.200	VB S+	0.0671	2.43621e5	5.35390e4	98.57356

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 31/05/05 08:04:34 a.m. Ecastro

Anexo 6. Cromatograma de estándar de colesterol al 8%

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0080.D
 Estándar de colesterol 0.5mg/6g de hexano

Sample Name: 8%

Injection Date: 15/06/05 10:34:47 a.m.

Sample Name: 8%

Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1

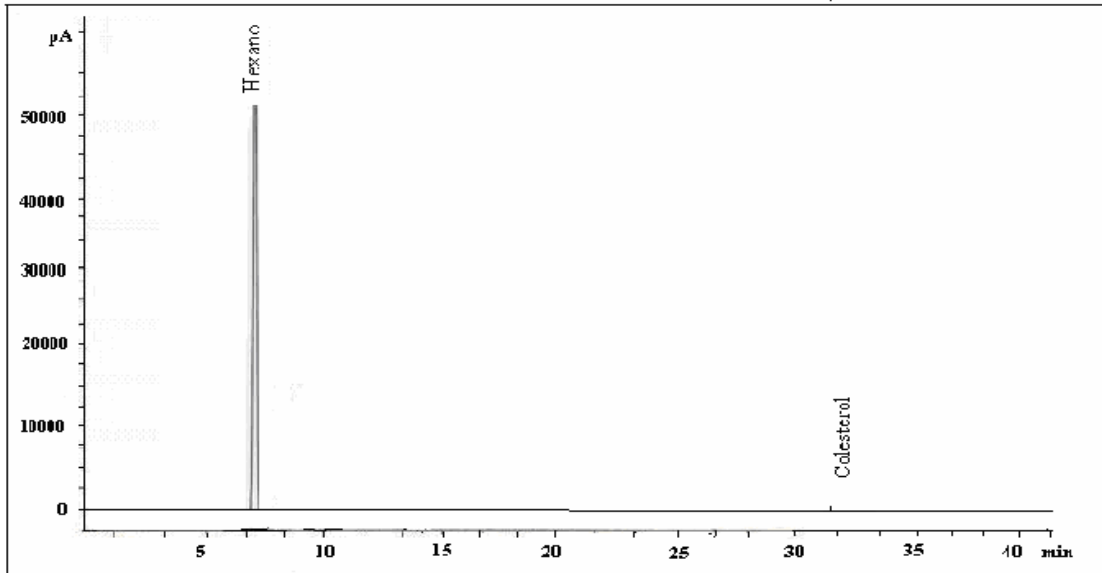
Inj: 1

Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M

Last changed: 14/06/05 08:22:25 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche



Area Percent Report

Sorted by: Signal

Multiplier: 1.0000

Dilution 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Width	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.151	VB S	0.0549	1.94723e5	5.51337e4	97.12543
2	33.832	BV	0.0339	7.7	3.54318	0.00408

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 15/06/05 11:17:37 a.m. Ecastro

Anexo 7. Cromatograma de estándar de colesterol 17%

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0102.D
 Estándar de colesterol 1.0mg/6g de hexano

Sample Name: 17%

Injection Date: 14/06/05 09:32:51 p.m.

Sample Name: 17%

Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1

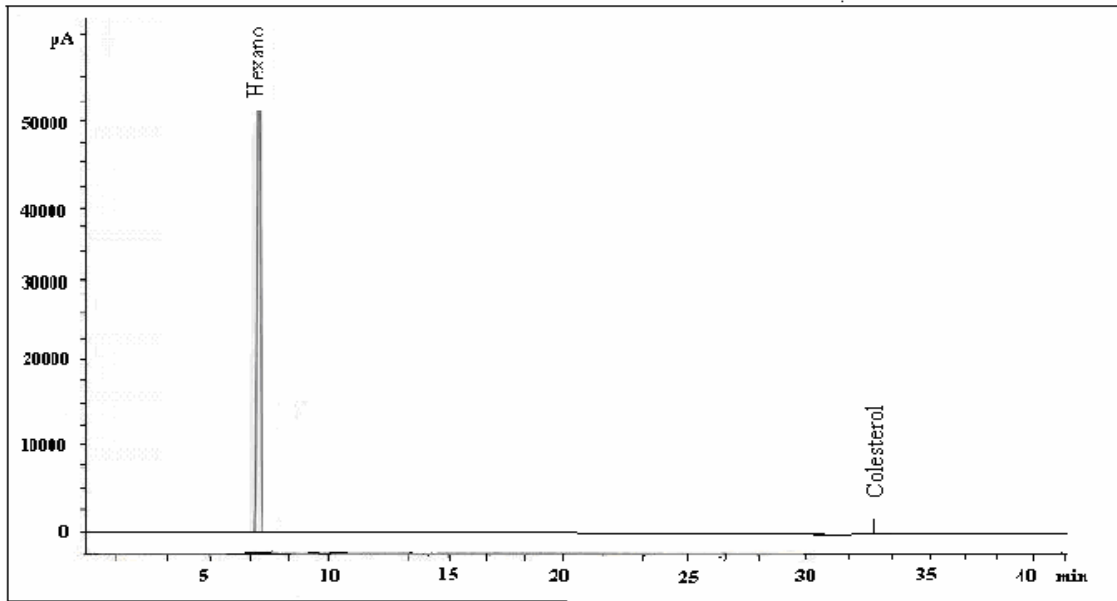
Inj: 1

Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M

Last changed: 14/06/05 08:22:25 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche



Area Percent Report

Sorted by: Signal

Multiplier: 1.0000

Dilution 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Width	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.144	VB S	0.0563	1.97264e5	5.44416e4	97.14104
2	33.81	BB	0.0393	28.5	8.82937	0.01036

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 14/06/05 10:15:41 p.m. Ecastro

Anexo 8. Cromatograma de estándar de colesterol 25%

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0102.D
 Estándar de colesterol 1.5 mg/6g de hexano

Sample Name: 25%

Injection Date: 21/06/05 02:11:21 p.m.

Sample Name: 25%

Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1

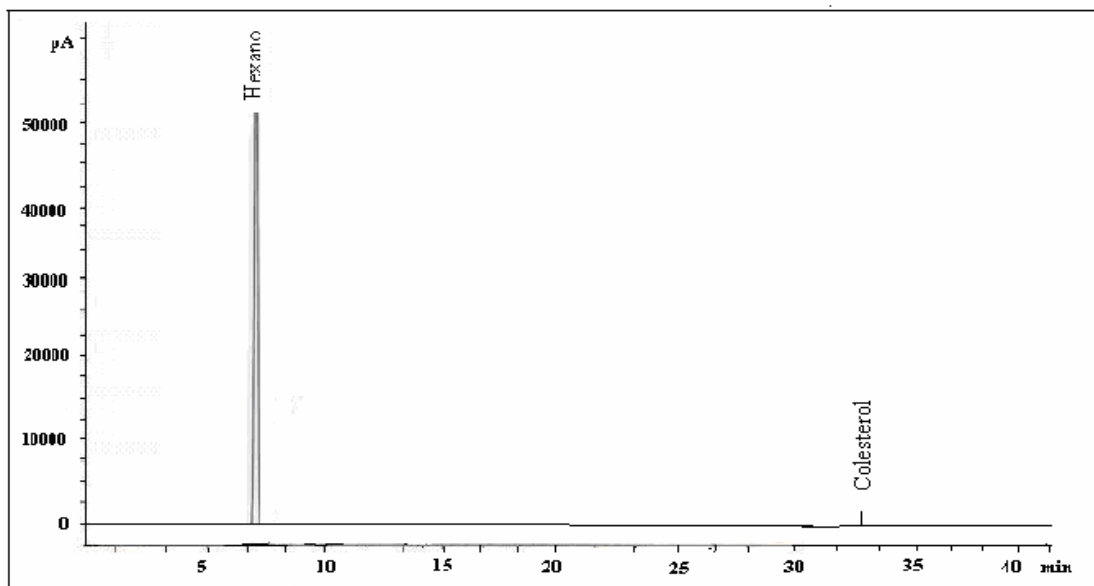
Inj: 1

Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M

Last changed: 21/06/05 08:49:20 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche



Area Percent Report

Sorted by: Signal

Multiplier: 1.0000

Dilution 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Width	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.144	VB S	0.0563	1.97264e5	5.44416e4	97.14104
2	34.532	BB	0.0393	37.2	5.02010	0.01486

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 21/06/05 02:54:05 p.m.

Ecastro

Anexo 9. Cromatograma de estándar de colesterol 50%

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B083.D
 Estándar de colesterol 3 mg /6g de hexano

Sample Name: 50%

Injection Date: 17/06/1 02:24 p.m.

Sample Name: 50%

Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1

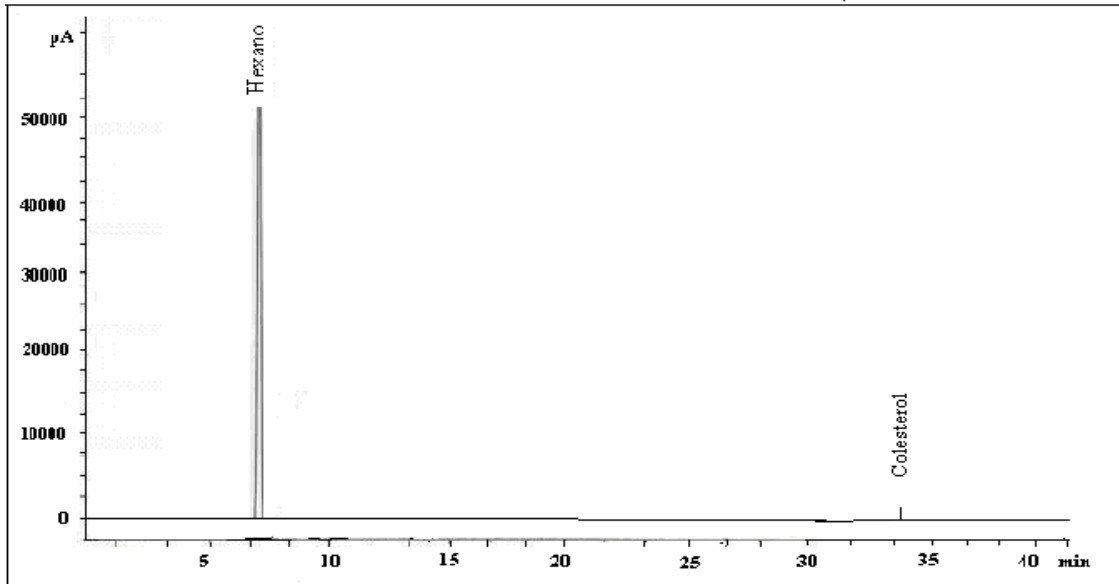
Inj: 1

Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M

Last changed: 14/06/05 08:22:25 a.m. by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche



Area Percent Report

Sorted by: Signal

Multiplier: 1.0000

Dilution 1.0000

Signal 1: F1D1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Widht	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	6.161	VB S	0.0501	1.90834e5	5.5568e4	97.06286
2	33.851	BB	0.1144	52	6.48155	0.02220

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1

17/06/05 04:45:14 p.m.

Ecastro

Anexo 10. Cromatograma de huevo por extracción con el método de la AOAC

Data File C:/HPCHEM/1/DATA/ESTERES/289B0191.D
 Colesterol en huevo método de la AOAC 976.26

Sample Name: huevo

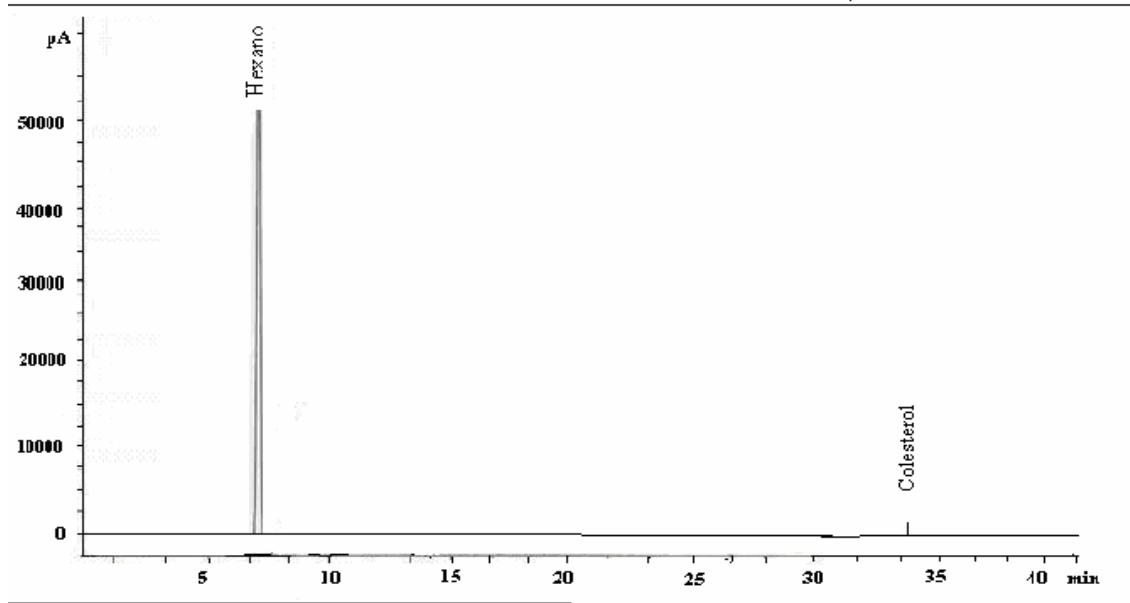
Injection Date: 10/05/05 4:54:25 PM

Sample Name: Huevo
 Acp Operator: Ecastro

Location: Vial 1
 Inj: 1
 Inj Volume: Manually

Method: C:/HPCHEM/1/METHODS/COLEST.M
 Last changed: 10/5/05 4:46:48 PM by Ecastro

Método de determinación de colesterol en leche



Area Percent Report

Sorted by: Signal
 Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000

Signal 1: F1D1 A,

Peak N°	Ret Time (min)	Type	Widht	Area (pA*s)	Height (pA)	Area (%)
1	7.611	BV	0.0354	4268.16699	1886.55798	62.7171
2	33.580	BB	0.0970	76.6	10.34059	0.46891

Results obtained with enhanced integrator!

Instrument 1 10/5/05 5:37:07 PM

Ecastro