



Guadalajara, Jalisco a, 31 de Enero de 2008

CFC-DG-553-2008

**LIC. JULIA VÁZQUEZ GUTIÉRREZ
DIRECTORA DE NORMALIZACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS
P R E S E N T E.**

En seguimiento a la reunión sostenida con Usted el pasado 23 de enero del presente, a los acuerdos del Subcomité Técnico de Normalización (STN) de Métodos de Prueba del Organismo Nacional de Normalización de COFOCALEC, y en relación con el método de prueba descrito en el punto 8.7 de la Norma Oficial Mexicana NOM-155-SCFI-2003, junto con el presente sírvase encontrar, para su consideración, copias de las minutas de reunión folios 110, 115 y 117, así como copia de la presentación hecha a dicho subcomité por la Dra. Amelia Farres González Saravia sobre el estudio realizado en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Con relación a lo anterior, es importante señalar a Usted que en estos momentos el ONN de COFOCALEC, a través del STN de Métodos de Prueba, se encuentra elaborando la Norma Mexicana para el método de prueba en comento. En este sentido, la Dirección de Normalización de COFOCALEC estará informándole de los avances mediante el envío de las minutas de reunión.

Agradeciendo la atención que tenga a bien prestar al presente, quedo de Usted para cualquier aclaración, aprovechando la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DR. SERGIO SOLTERO GARDEA
DIRECTOR GENERAL**



C.c.p. Q.F.B. BLANCA ROSA REYES ARREGUÍN; Directora de Normalización de COFOCALEC; Para su conocimiento.
C.c.p. Archivo.



Facultad de Química

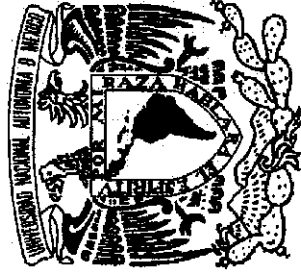
Universidad Nacional Autónoma de México

Comprometidos con la formación de los mejores profesionales de la Química

Especialistas en servicio

Método de separación de las proteínas de la leche y determinación de la adulteración mediante electroforesis capilar

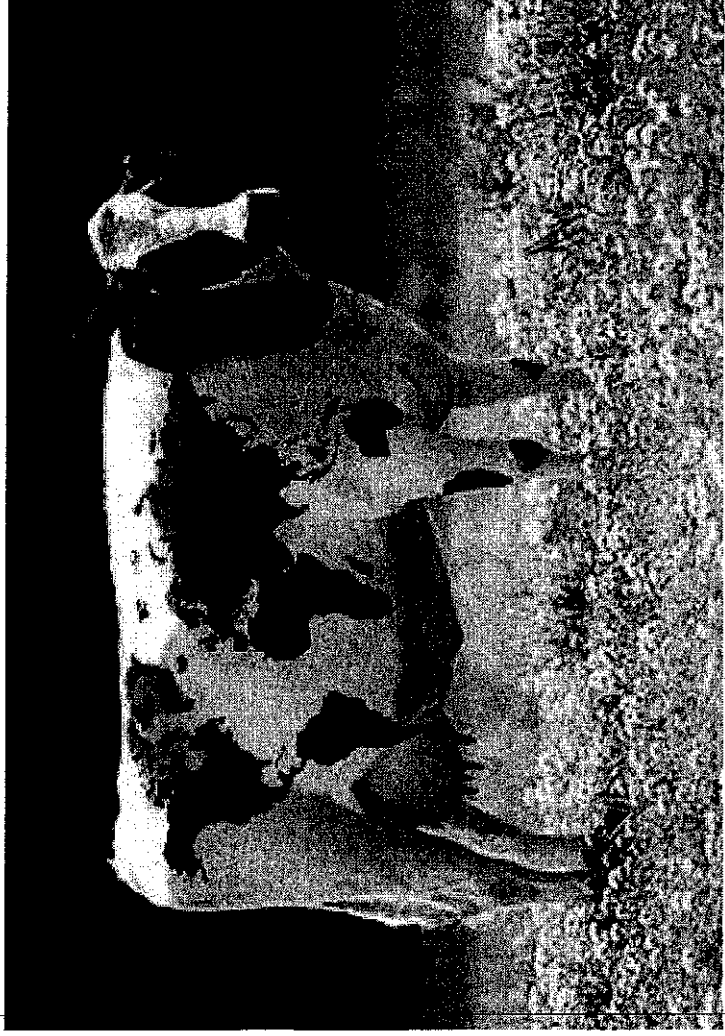
Trabajo realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología



Dra Amelia Farrés
M en C Sandra Pérez Munguía

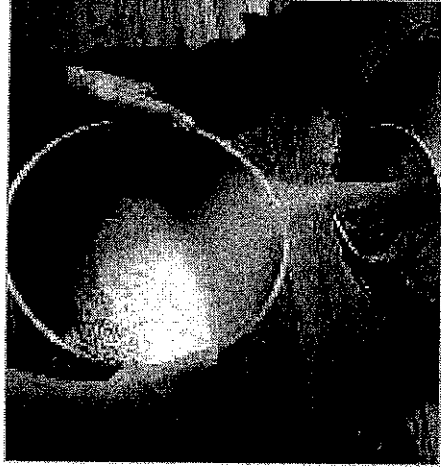
Objetivo

Desarrollar una metodología analítica que permita la detección de la utilización fraudulenta de leche en polvo, subproductos de la industria láctea y proteínas de origen vegetal en leche fluida de vaca mediante electroforesis capilar de zona.



LACTOSUERO

Líquido resultante de la coagulación de la leche en la fabricación de quesos cuando se separa la mayor parte de la caseína y la grasa



Leche



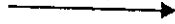
Cuajo



Queso

suero dulce
pH 5.9-6.6

Leche



Agente acidificante



Caseína

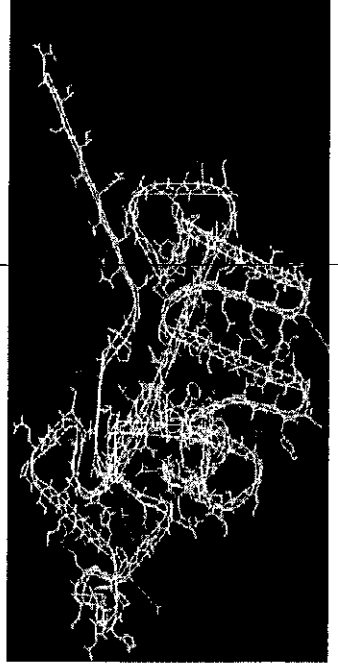
suero ácido
pH 4.3-4.6

CASEÍNAS

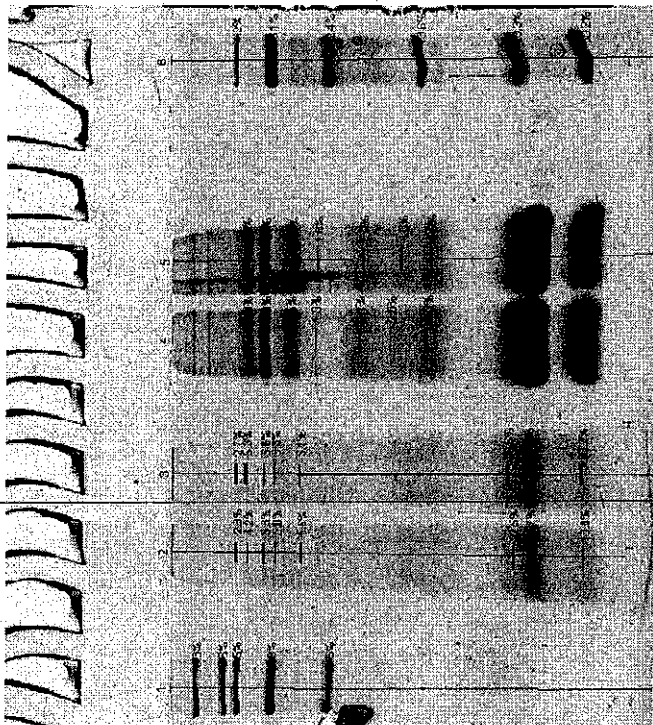
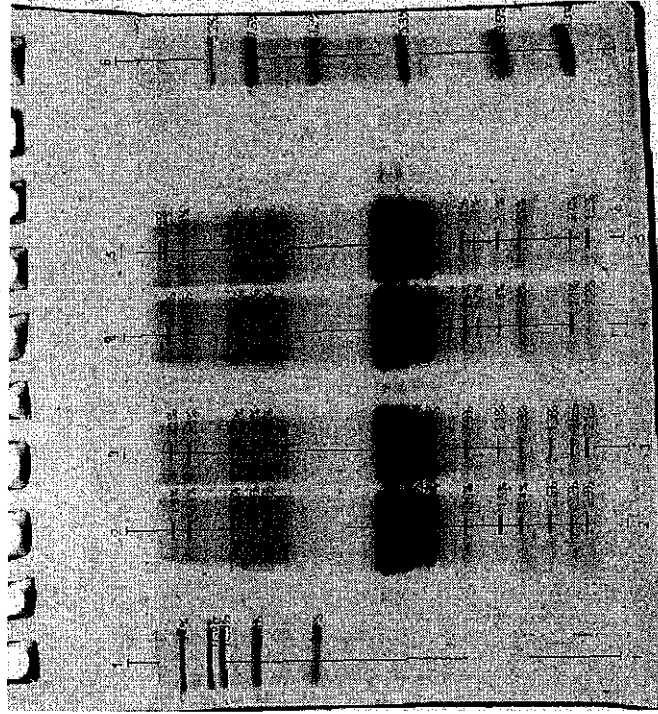
Principales proteínas de la leche (80%)



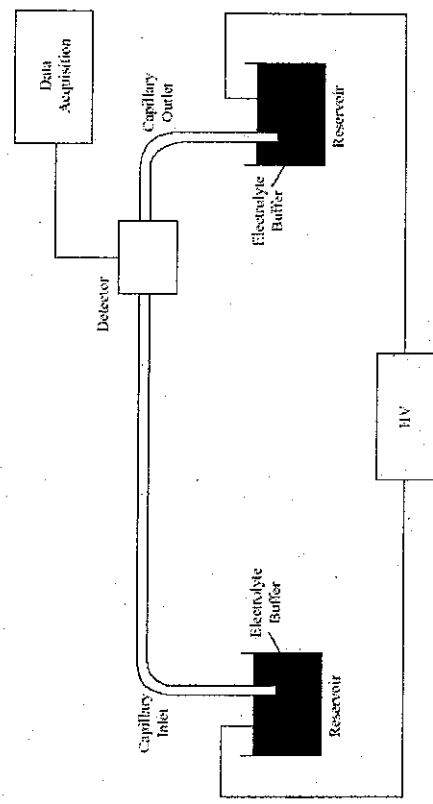
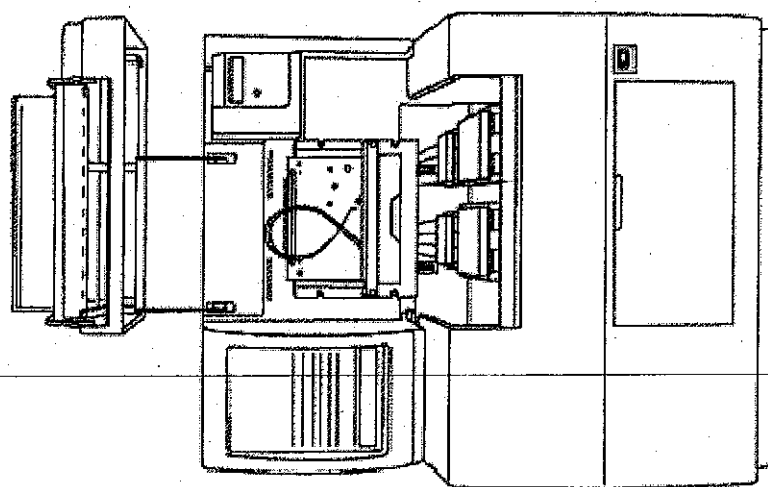
- caseína obtenida por la acción enzimática del cuajo
- caseína ácida precipitada por la adición de ácidos
- coprecipitados cálcicos proteínicos
- caseinatos obtenidos a partir de caseína ácida



CASEINS (82% total protein)	VARIANT TYPES	APPROXIMATE % OF SKIM MILK
α_s - CASEIN	A, B, C, D	45 - 55
β - CASEIN	A, B, C, D	25 - 35
γ - CASEIN	SEVERAL	3 - 7
λ - CASEIN	---	VARIABLE
κ - CASEIN	A, B	8 - 15
WHEY PROTEINS (18% total protein)		
β - LACTOGLOBULIN	A, B, C	7 - 12
α - LACTALBUMIN	A, B	2 - 5
BLOOD ALBUMIN	---	0.7 - 1
BLOOD GLOBULINS	SEVERAL	1 - 2
PROTEOSE - PEPTONE	SEVERAL	2 - 6



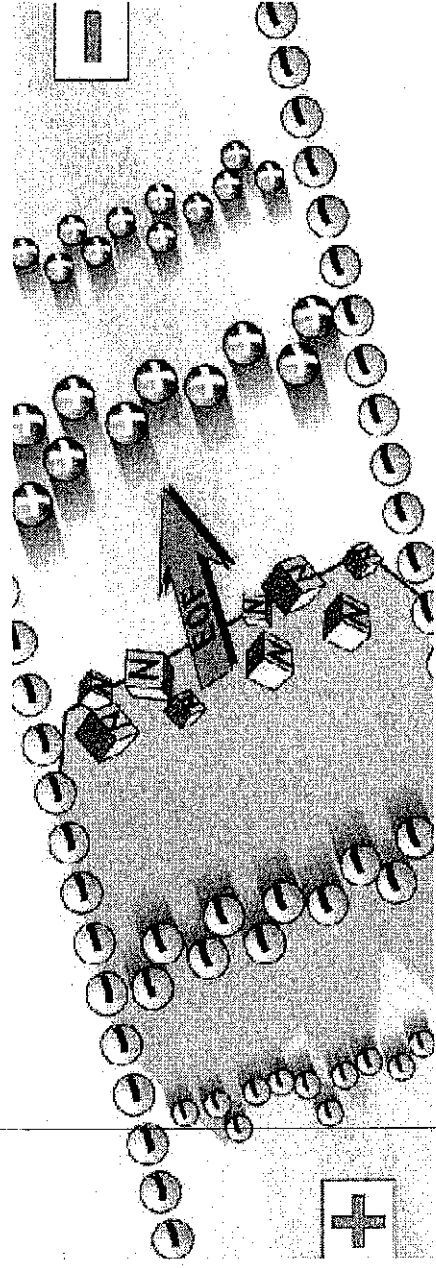
ELECTROFORESIS: técnica de separación basada en la migración de especies cargadas contenidas en un fluido semiconductor (buffer).



eCAP Neutral Capillary
P/ACE™ MDQ Glycoprotein System
32 Karat Software
Beckman Coulter

Electroforesis Capilar

- Tradicionalmente, esta técnica se ha empleado para separar sustancias iónicas o que pueden estar ionizadas en las condiciones de análisis.
- El medio de separación es un buffer que actúa simultáneamente como conductor de la corriente eléctrica y para controlar la carga eléctrica de las sustancias a analizar.
- El campo eléctrico representa el voltaje aplicado por unidad de longitud del medio de separación.



Electroforesis Capilar

Velocidad de electromigración de las proteínas:

- ✓ Intensidad del campo eléctrico
- ✓ Carga eléctrica global de la proteína
- ✓ Peso molecular de la proteína
- ✓ Forma de la molécula

Electroforesis en Gel vs. Electroforesis Capilar

SDS-PAGE

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Conocida	Consumo mucho tiempo
Fácil	Laboriosa
Bárata	Semicuantitativa
Sencilla	

EC

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Sistema instrumentado	Técnica poco conocida
Corto tiempo de análisis	Elevado costo de inversión
Elevada eficacia	
Versátil	
Cuantitativa	

HPLC vs. Electroforesis Capilar

HPLC

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Conocida	Consumibles caros
	Requiere entrenamiento

EC

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Más eficiente	Poco conocida
Menor consumo de disolventes y de muestra	Menor sensibilidad
Sencilla	Menor repetibilidad y reproducibilidad
Miniaturización (<i>microchips</i>)	

Electroforesis Capilar Indicadores

- Desde el punto de vista analítico, la determinación de la relación caseína/caseinatos adicionados a la leche fresca es un problema complejo debido a que los caseinatos son químicamente equivalentes a las caseínas presentes en la leche.
- La relación de proteínas del suero/proteína total (PS/PT) se emplearía como un indicador de la adición intencional de sólidos de origen lácteo a la leche fresca.
- La detección de κ -CN intacta y la presencia de *para- κ -CN* serían indicadores para determinar el porcentaje de caseína ácida o caseinatos adicionados intencionalmente al producto lácteo fresco.
- La detección de caseinomacropéptido (o *pseudo caseino-macropéptido*) sería un indicador de la adición de suero de quesería a la leche fluida. No obstante un manejo inadecuado del producto fresco puede generar falsos positivos.

Metodología

NOM 155-SCFI-2003

- Solución madre de fosfato [0.1M] con urea [6M]
- Solución madre de HPMC [0.1%]
- Solución de separación: para obtener la solución de separación, 24 horas aproximadamente antes de su uso, se mezclan 10 ml de la solución de fosfatos con 10 ml de la solución de HPMC, el pH final debe ser 2.5.

PROPUESTA DE MODIFICACIÓN

- Buffer de separación: Solución amortiguadora de citrato de sodio, urea, HPMC. El pH se ajusta con una solución concentrada de ácido cítrico.
- pH de estudio: 2.2-3.2

Referencias:

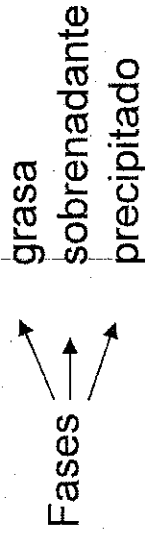
- Miralles, B., Rothbauer, V., Manso, M.A., Amigo, L., Krause, I., y Ramos, M. 2001. J Chromatography A. 915:225-230.
- Recio, I., y Olléman, C. 1996. Electrophoresis. 17:1228-1233.
- Kanning, M., Casella, M., y Olléman. 1993. LC-GC Int. 6:701-706.

Metodología

NOM 155-SCFI-2003

PROPUESTA DE MODIFICACIÓN

- Solución urea 6 M y fosfato de potasio 0.005, pH 8.
- Solución de DTT 0.2 M.
- Centrifugar 3.0 ml de leche a 18 000 g durante 15 min.



- Buffer de muestra: Solución amortiguadora de Tris, MOPS, EDTA, Urea y HPMC; pH 8.4 ± 0.1.
- Medir con exactitud 5 ml del buffer de muestra, adicionar y disolver DTT.
- Con una pipeta automática, tomar una alícuota de leche fluida de 0.5 ml.
- Verter en un tubo tipo *Eppendorf* de 2.0 ml.
- Adicionar 1.0 ml del buffer de muestra con DTT.
- Mezclar en el *Thermomixer* por 30 min a 40°C.
- Descremar la muestra mediante centrifugación
- Recuperar cuantitativamente la fracción proteínica.
- Con la ayuda de una jeringa desechable pasar 1.0 ml de la muestra a través de una unidad de filtración y recuperarla en un vial para electroforesis capilar de 0.5 ml.

- Recuperar 1 ml de sobrenadante y mezclarlo con 4 ml de una solución de 6M de urea y 0.005 M de fosfato de potasio. Agregar 10 µl de la solución de DTT 0.2 M a la muestra y agitar 30 min a temperatura ambiente.
- Filtrar la muestra (0.2 µm).

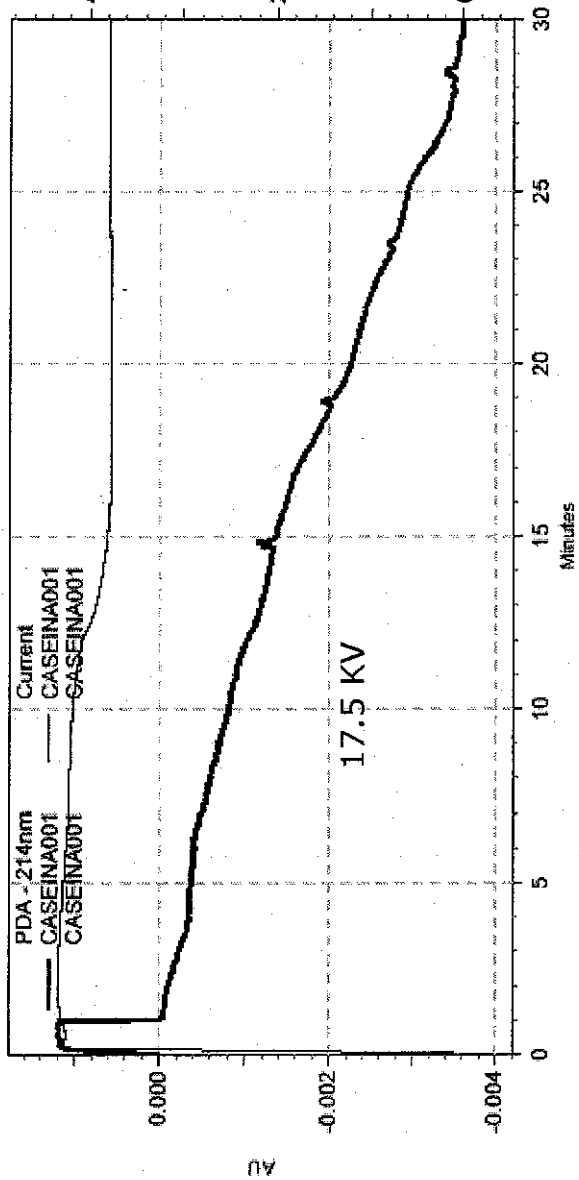
Metodología

NOM 155-SCFI-2003

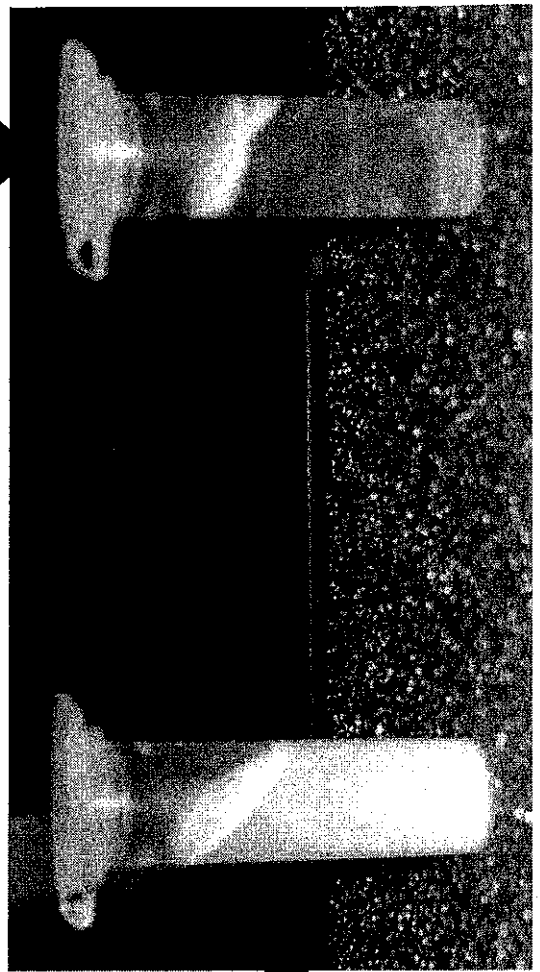
PROPUESTA
A DEFINIR:

- La separación se realiza en un capilar neutro de 50 cm de longitud efectiva (longitud a la ventana del detector) y 50 μm de diámetro interno.
- La inyección se realiza desde un vial tapado. Inyección por presión a 0.04 Mpa (0.5 psi) durante 20 s.
- Separación a tensión constante de 350 V/cm durante 30 min a temperatura constante de 35°C, pH 2.5.
- Detección a 214 nm. Polaridad normal (cátodo a la salida del capilar).
- Potencial aplicado
- Evaluar la eficiencia del capilar neutro
- Determinar la temperatura óptima del proceso de separación
- Determinar la temperatura de conservación de las muestras durante el análisis
- Detector de longitud de onda variable vs., DAD
- Longitud de la inyección
- Acondicionamiento del capilar
- Lavado del capilar entre muestras

Resultados



Modificación

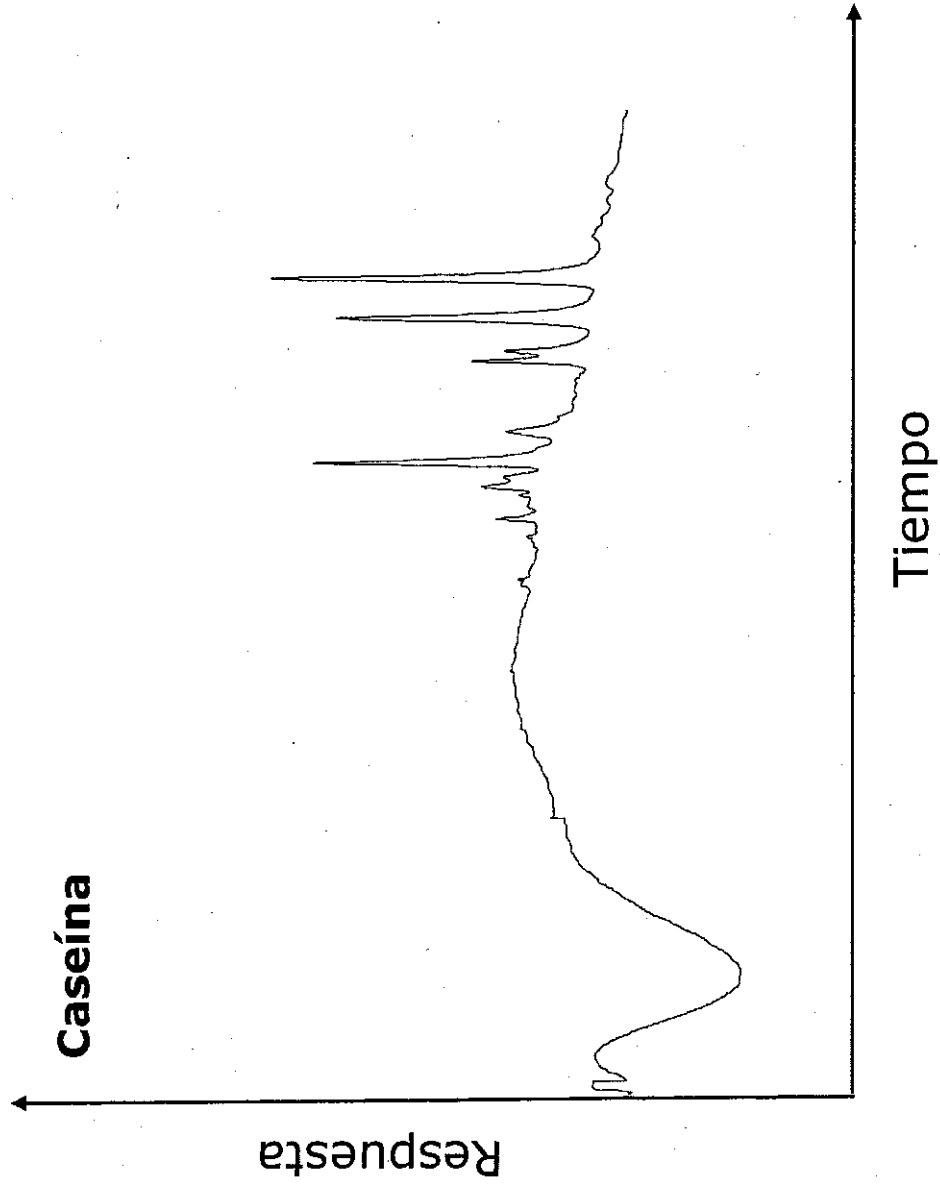


**Norma
Oficial
Mexicana**

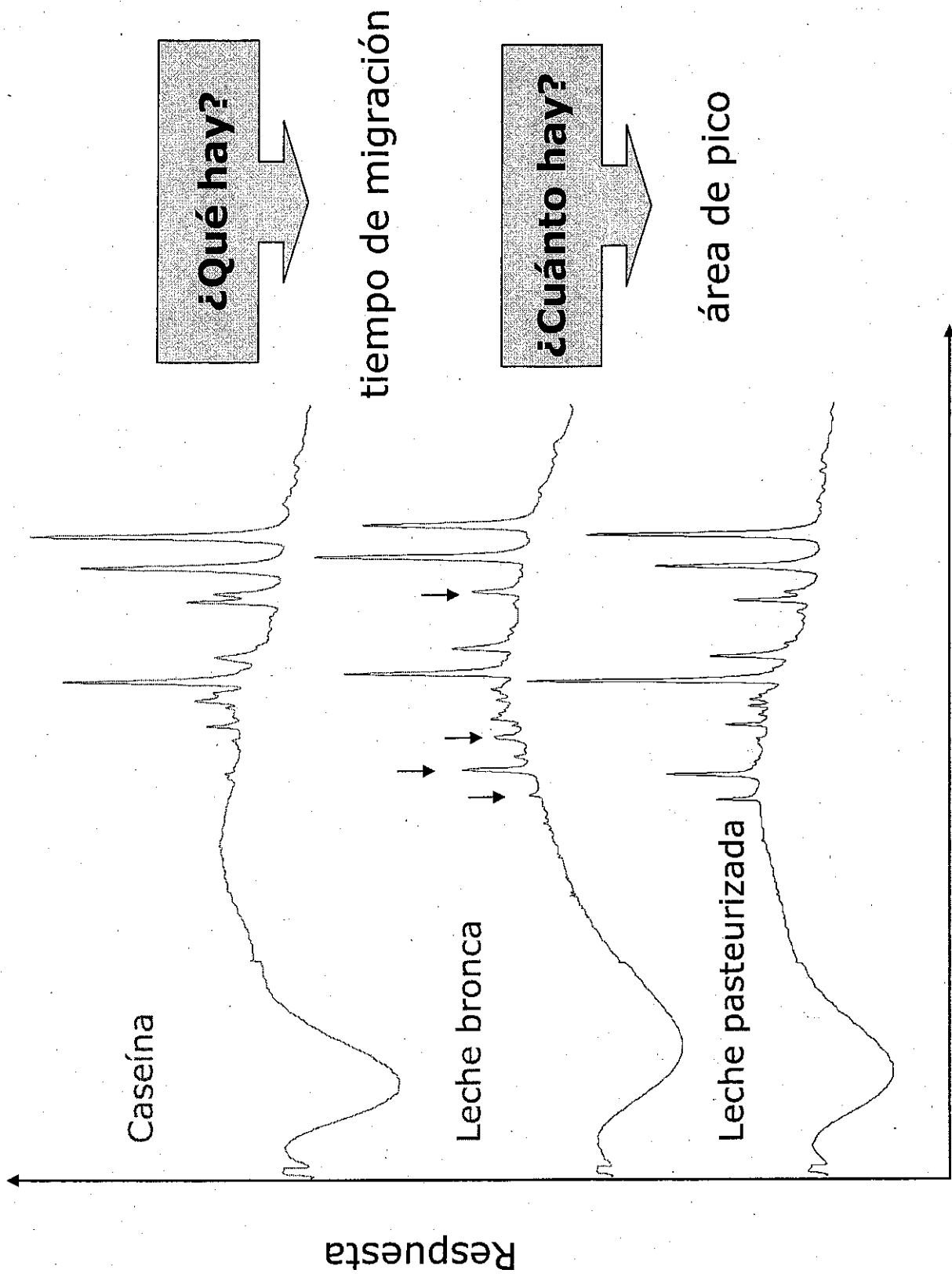
Figura 1. Señal a 214 nm de una muestra de caseína según NOM (sobrenadante)

Aspectos cuali-cuantitativos

Electroforegrama



Aspectos cuali-cuantitativos



Caseína

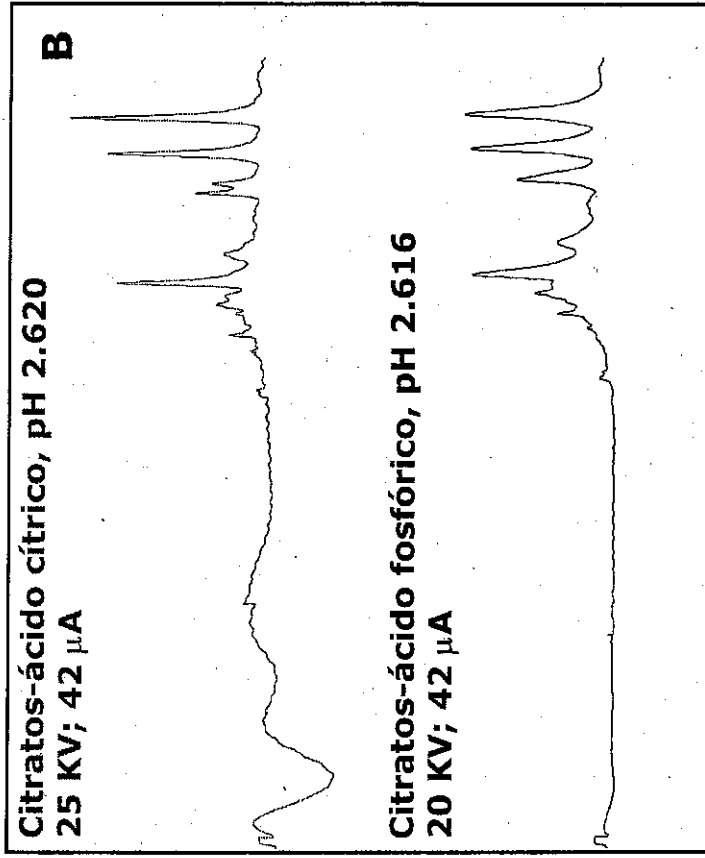
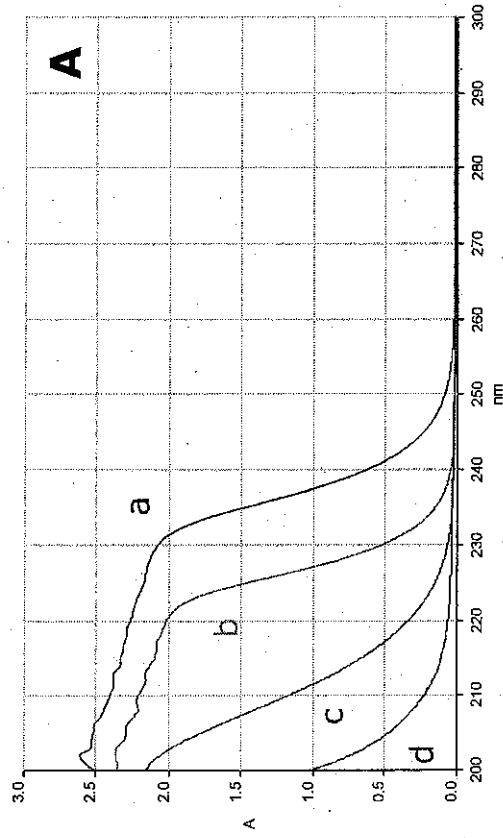
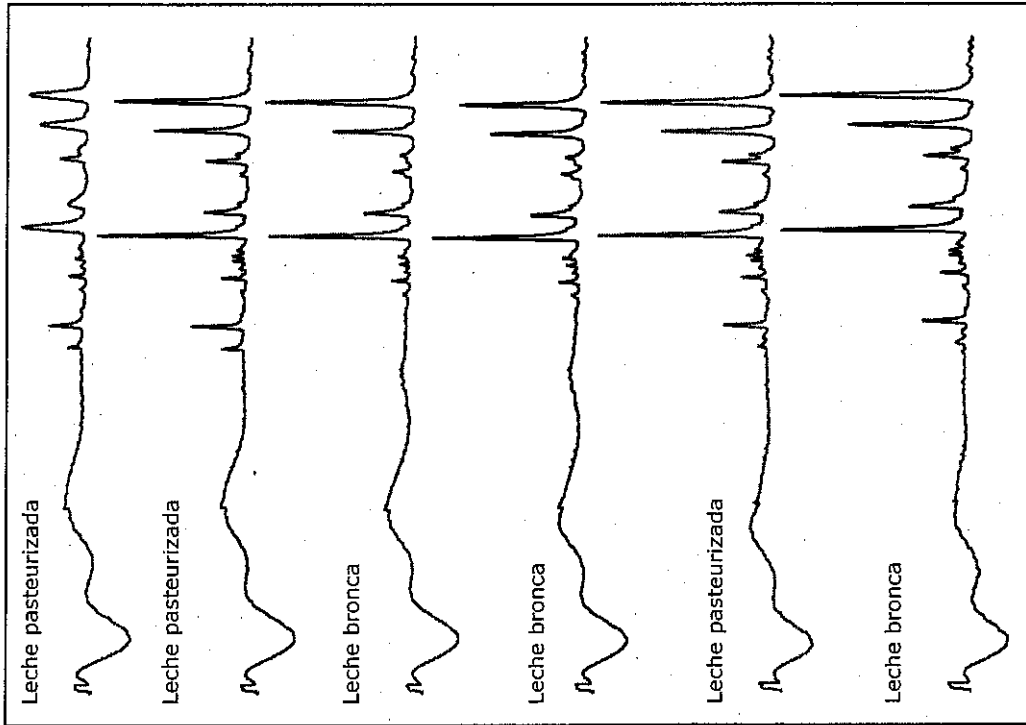


Figura 2. A) Perfil espectral: a) buffer de muestra; b) buffer de separación de citratos; c) buffer de separación de citratos-ácido fosfórico y d) buffer de separación de fosfatos. B) Efecto de la composición del buffer de separación (ácido cítrico vs. ácido fosfórico) en la estabilidad de la línea base. Muestra de caseína. DAD a 214 nm.

Aspectos cuali-cuantitativos



- La eficiencia de los picos (simetría y ancho de los picos)
- Ausencia de los picos correspondientes a las proteínas del suero
- La relación de áreas o alturas entre las caseínas
- No se detecta κ -CN
- La relación de áreas entre las proteínas de suero y las caseínas

Figura 3. Electroforegramas de las proteínas de diferentes muestras de leche fluida (misma escala). Buffer de separación de citratos, pH 2.53. DAD 214 nm. Inyección hidrodinámica.

Aspectos cuali-cuantitativos

¿Cómo producir datos confiables?

- La reproducibilidad en el t_m
 - a. Composición y estabilidad del medio de separación
 - b. Temperatura
 - c. Estado de la pared interna del capilar

$$\% \text{ R.S.D.}_{t_m} = 0.3-1.0$$

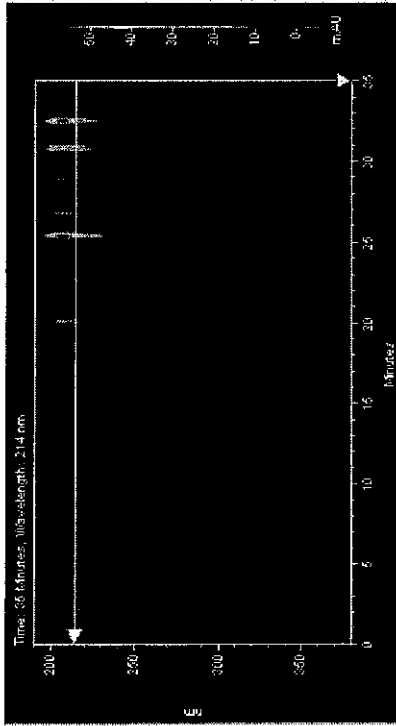
- Perfil del pico (simetría del pico)
 - a. Electrodispersión (concentración)
- La reproducibilidad en el área de los picos
 - a. Movilidad de los analitosValores de áreas corregidas: $A_p \text{ } t_m^{-1}$

$$\% \text{ R.S.D.}_{\text{área de pico}} = 1-5$$

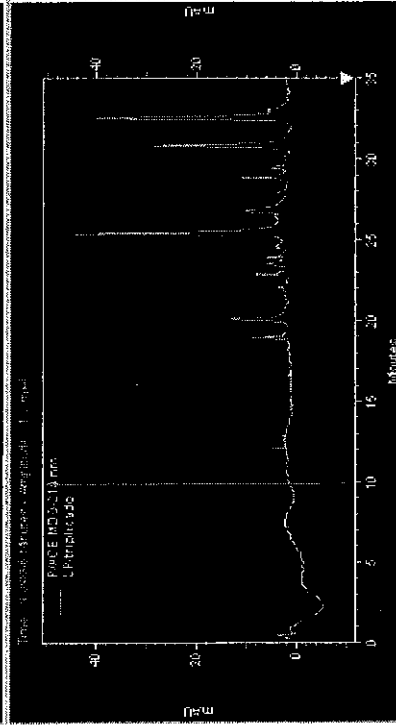
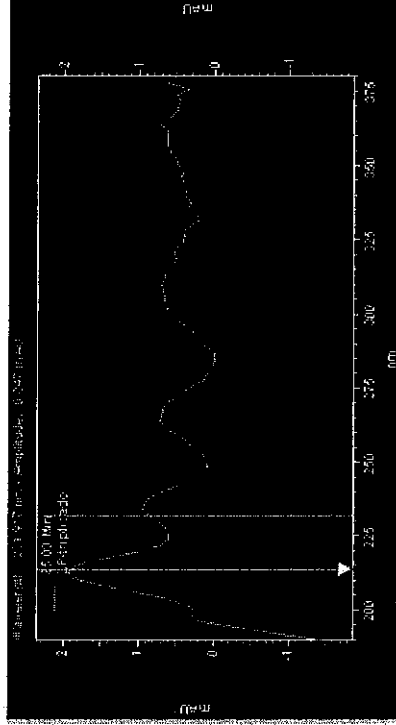
- La inyección (introducción de muestra)

Detector de absorción UV-vis de serie de diodos

Gráficos de isoabsorbancia



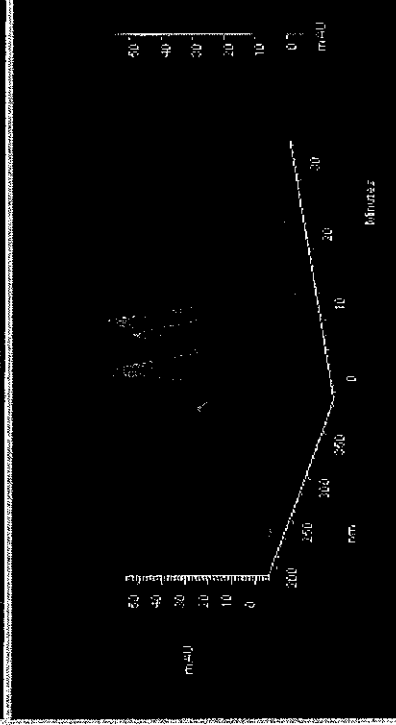
Espectro de absorción



Electrochromograma

Electrochromogramas tridimensionales

- Optimizar la sensibilidad y selectividad
- Identificar un pico
- Conocer la pureza de un pico



Optimización

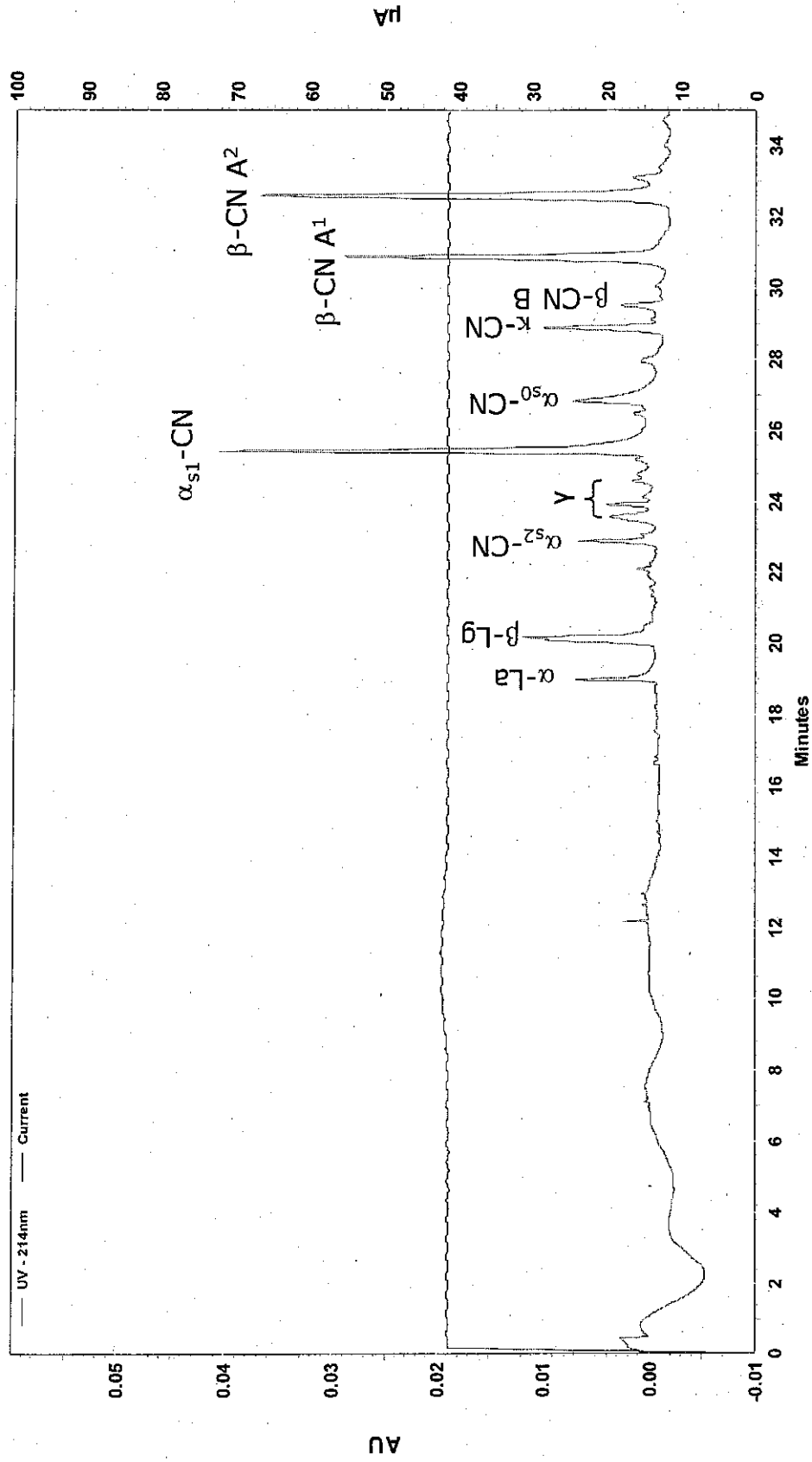


Figura 4. Electroforegrama de una muestra de leche pasteurizada en el buffer de muestra. Buffer de separación de citratos, pH 3.00. Detector UV 214 nm. Inyección hidrodinámica.

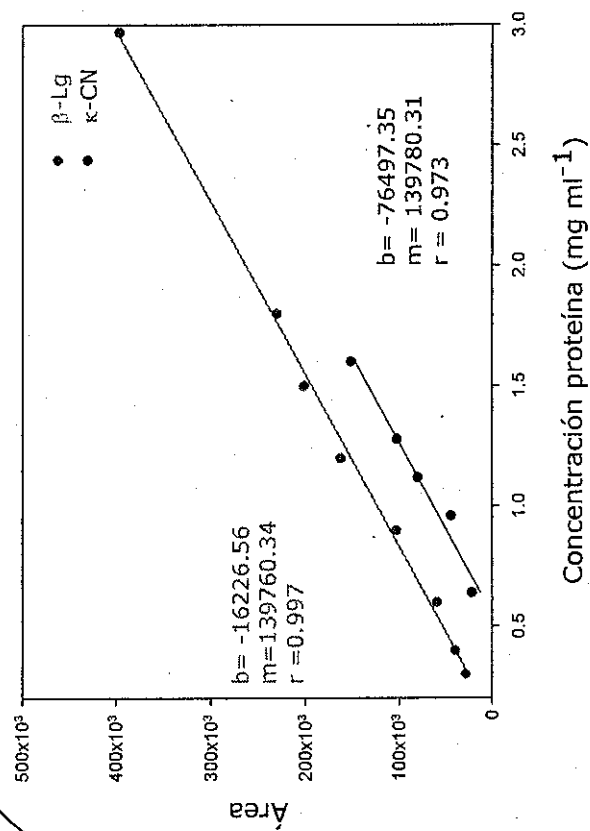
Análisis cuantitativo

Tabla 1. Repetibilidad de la inyección –misma muestra- mismo día de análisis. Inyección hidrodinámica.

repetibilidad (riesgo 0.05)	tiempo de migración (min)							Área Total ^a (A. 214 nm)
	α -La	β -Lg	α_1 -CN	κ -CN	β -CN A ¹	β -CN A ²		
1	19.000	20.200	25.433	28.904	30.908	32.621	1 603 928	
2	18.992	20.196	25.446	28.913	30.904	32.625	1 611 286	
3	19.008	20.229	25.462	28.942	30.958	32.683	1 738 313	
4	19.008	20.225	25.438	28.913	30.921	32.638	1 704 095	
5	19.000	20.217	25.471	28.958	30.962	32.683	1 576 679	
6	18.983	20.200	25.446	28.921	30.921	32.646	1 679 262	
media \pm incertidumbre	19.00 \pm 0.01	20.21 \pm 0.02	25.45 \pm 0.02	28.93 \pm 0.02	30.93 \pm 0.03	32.65 \pm 0.03	1 650 000 \pm 70 000	
desv. stdr. (σ)	0.009	0.014	0.014	0.020	0.024	0.027	6 4106.8366	
RSD _{tm}	0.050	0.070	0.056	0.071	0.080	0.084	3.88	

^a Integración manual "valle a valle"

Análisis cuantitativo



$$m_{\beta\text{-Lg}} = m_{\kappa\text{-CN}}$$

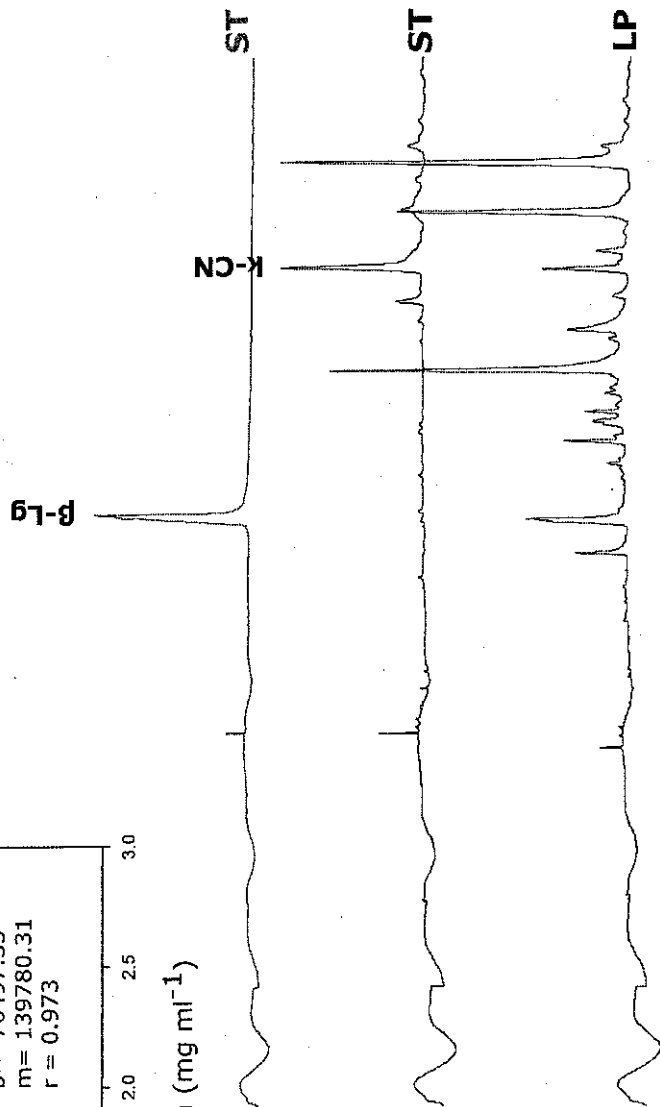
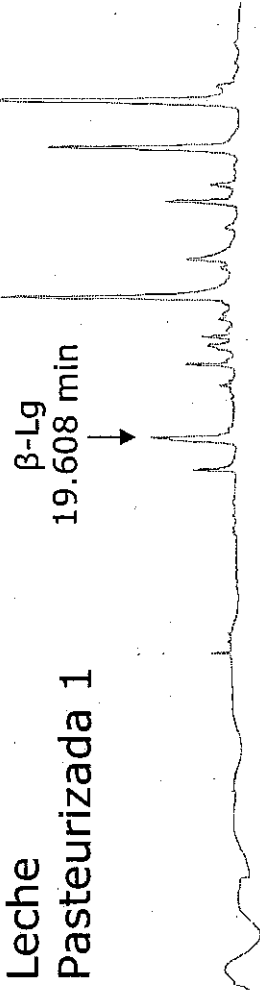


Figura 5. Curva patrón de estándares de proteínas de leche de vaca: β -Lg y κ -CN (Sigma-Aldrich). Condiciones de trabajo descritas en la figura 4.

Análisis cuantitativo

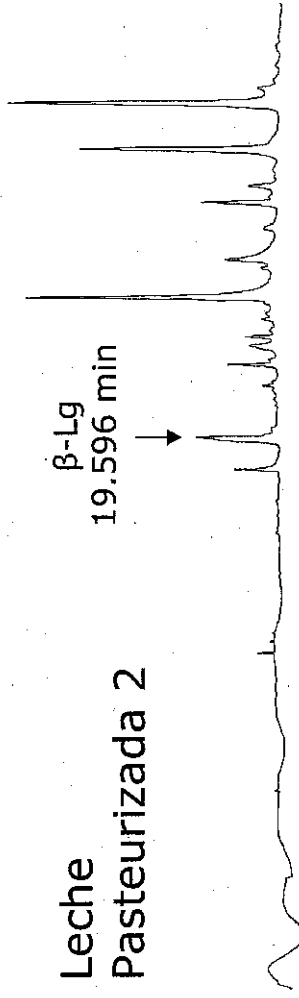
Leche
Pasteurizada 1



β -Lg = 1.18 mg ml⁻¹ x FD
 β -Lg = 3.54 mg ml⁻¹ leche

Área β -Lg = 148830, Área total = 1457511; 10.21%

Leche
Pasteurizada 2



β -Lg = 1.20 mg ml⁻¹ x FD
 β -Lg = 3.60 mg ml⁻¹ leche

Área β -Lg = 151841, Área total = 1468613; 10.34 %

Figura 6. Identificación y cuantificación de β -lactoglobulina en dos muestras de leche pasteurizada.

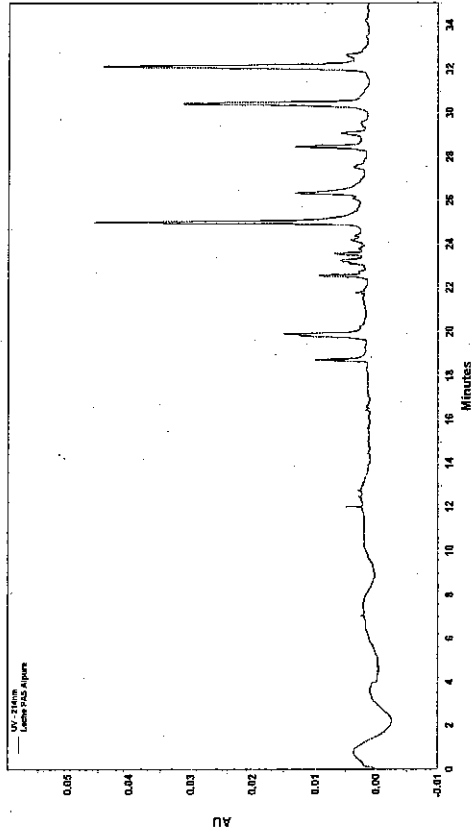
Análisis cuantitativo

Tabla 2. Concentración¹ y porcentaje de las proteínas de una muestra de leche pasteurizada 1

Proteínas de la leche	Tiempo migración (min)	Área	Área (%)	Concentración mg ml ⁻¹ leche	Concentración (%)	Porcentaje w/w TEO
1:3	α-La	38 396	2.63	1.17	3.3	3.7
	β-Lg	148 830	10.21	3.54	10.1	9.8
1	α _{s2} -CN	45 803	3.14	1.33	3.8	8.0
	γ-CN	38 261	2.63	1.17	3.3	2.4
23.175		18 505	1.27	0.74	2.1	
4	α _{s1} -CN	32 9001	22.57	7.41	21.1	30.6
	α _{s0} -CN	91 815	6.30	2.32	6.6	
1	κ-CN	76 945	5.28	2.00	5.7	10.1
		29 506	2.02	1.00	2.8	
4	β-CN B	265 522	18.22	6.05	17.2	28.4
	β-CN A ¹	374 927	25.72	8.40	24	
TOTAL		1457511	100	35.13	100	

¹utilizando la curva patrón de β-Lg x= y-(-16226.561)/139760.34

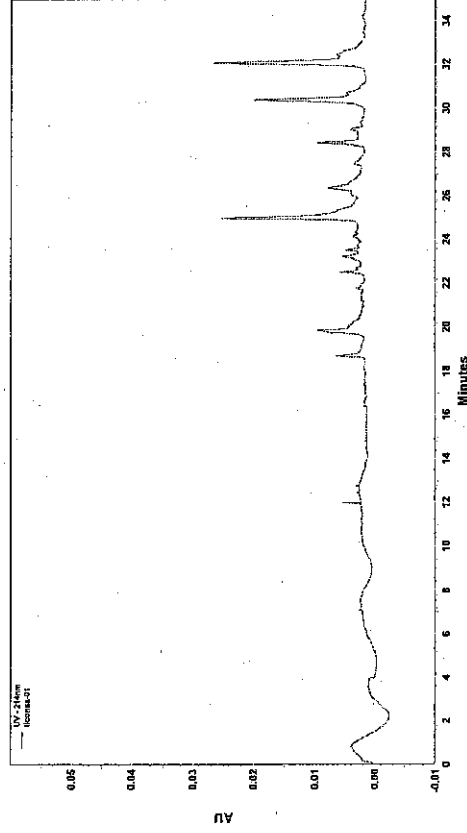
Leche entera pasteurizada marca X



Leche entera pasteurizada
31 g L⁻¹ proteínas propias de la leche
10.3 mg prot ml⁻¹

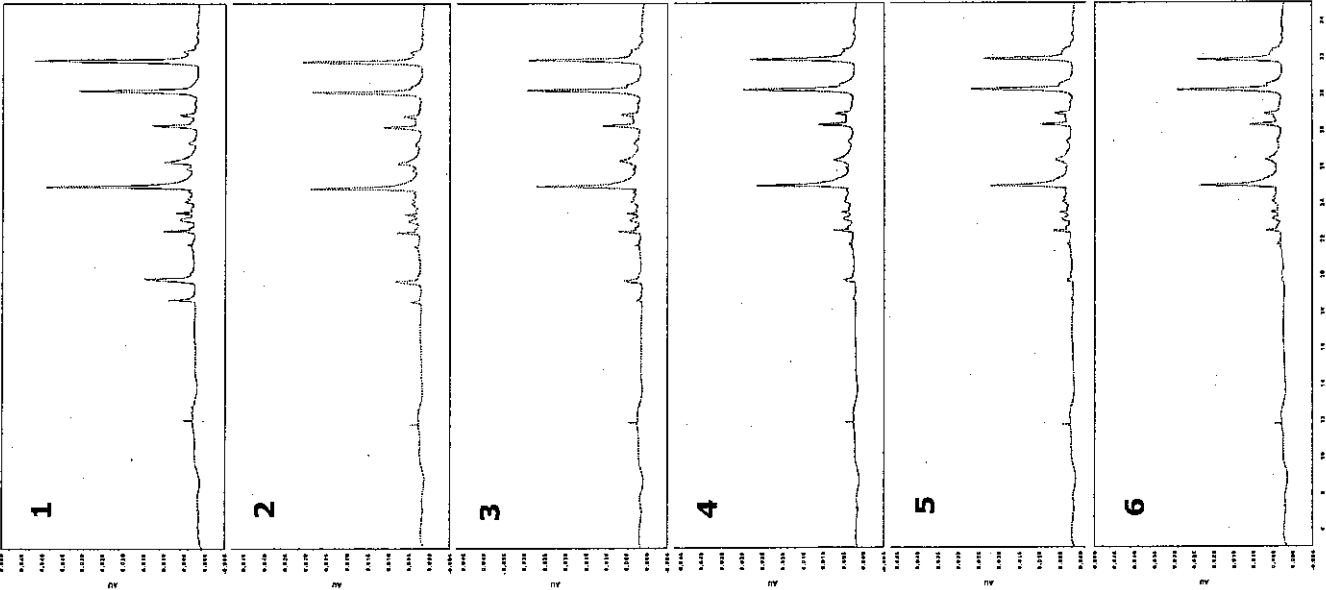
Área total = 1 682 649 (100%)

Leche entera pasteurizada marca Y



Leche descremada en polvo
rehidratada, con grasa vegetal
pasteurizada
30 g L⁻¹ proteínas propias de la leche
10 mg prot ml⁻¹

Área total = 1 169 044 (70%)



**Mezclas de leche pasteurizada
(PAS) y caseinatos (CAS)**

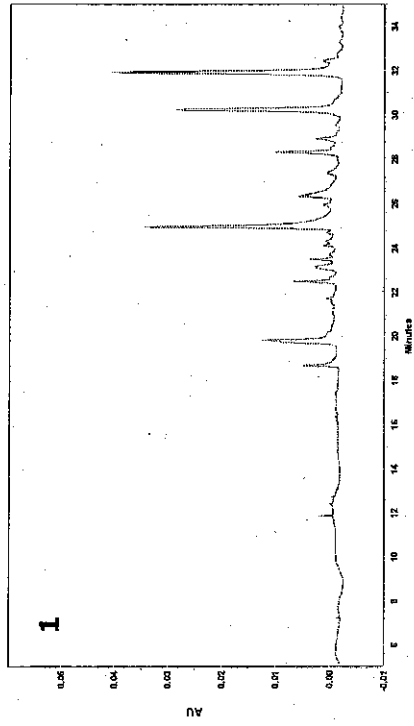
COMPOSICIÓN

1. Leche pasteurizada
10.3 mg prot ml⁻¹
2. PAS 50 % + CAS 50 %
3. PAS 30 % + CAS 70 %
4. PAS 20 % + CAS 80%
5. PAS 10 % + CAS 90 %
6. Caseinato de calcio Lactonat
EC (mín. 88.5% Proteína)
10.0 mg prot ml⁻¹

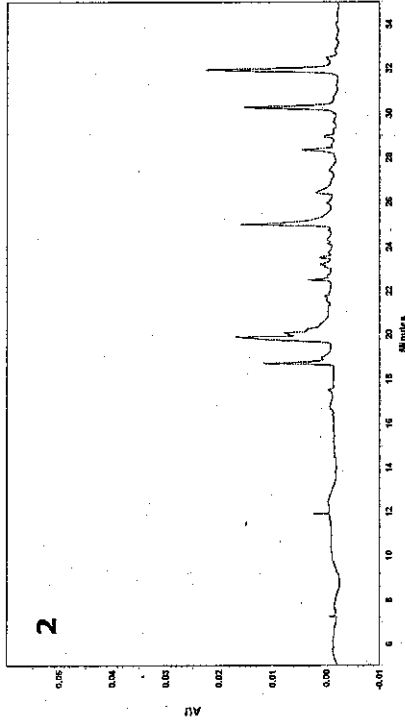
**Mezclas de leche pasteurizada (PAS) y
proteínas de suero (Nisecas)**

COMPOSICIÓN

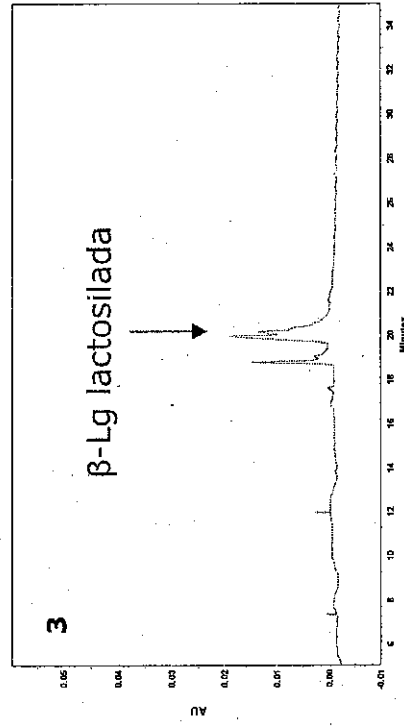
1. PAS 10.3 mg prot ml⁻¹

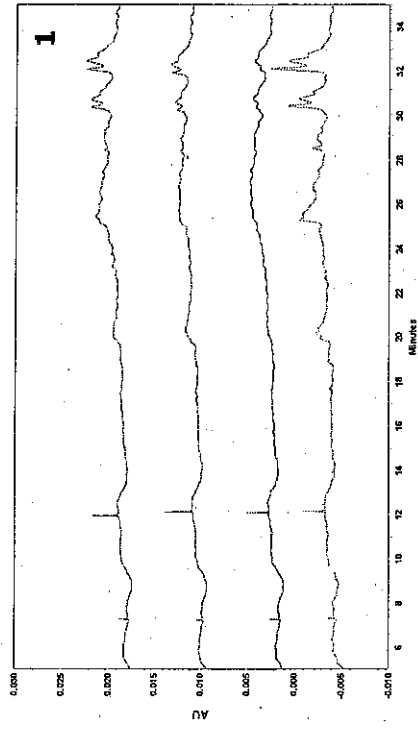


2. PAS (50%) + Nisecas (50%)

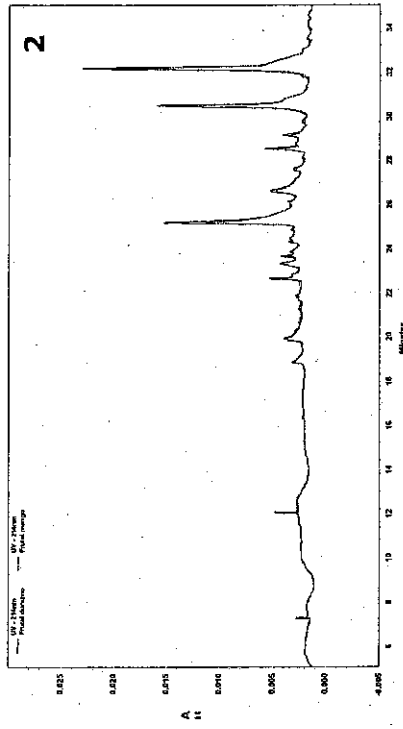


**3. Nisecas (NIZO Food Research;
Ede, Holanda)
(30 g muestra 100 ml⁻¹)**



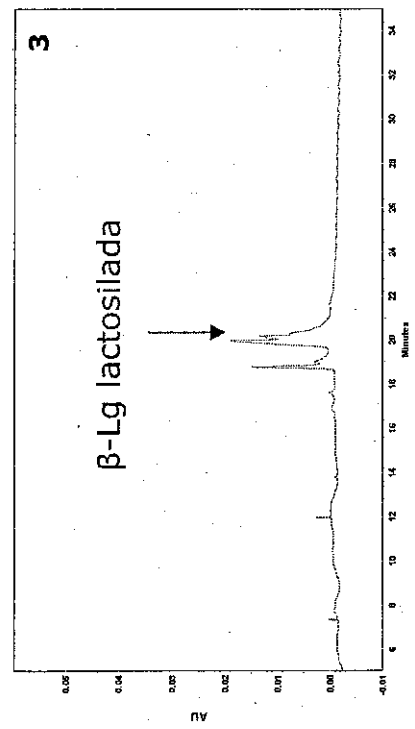


1. Leches UHT con sabor a chocolate



**2. Producto lácteo combinado
7.44 mg prot ml⁻¹**

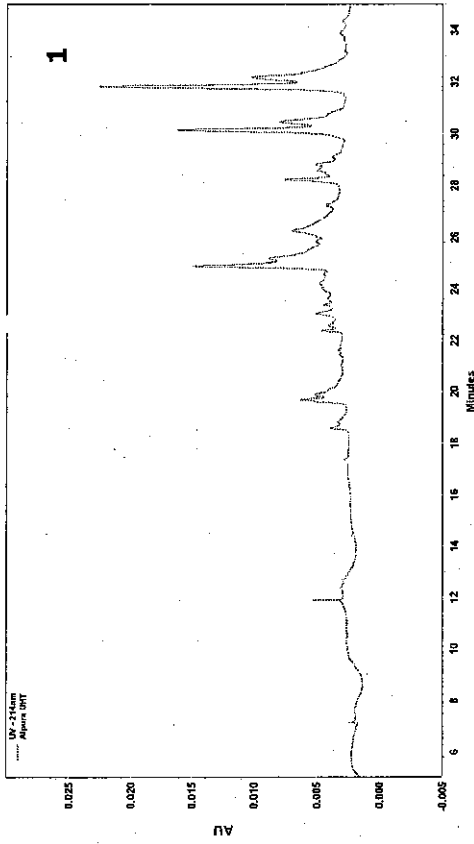
- Sabor durazno
- Sabor mango



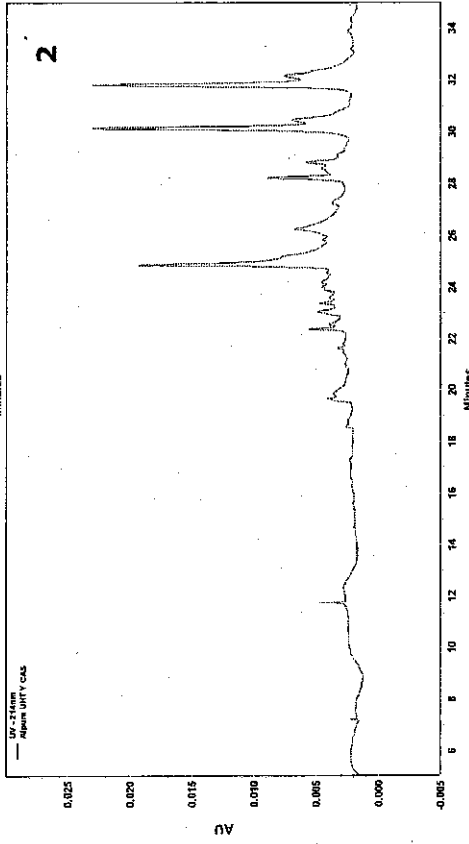
**3. Nisecas
(NIZO Food Research; Holanda)
30 g muestra 100 ml⁻¹**

**Mezclas de leche UHT (UHT) y
Caseinatos (Cas)
COMPOSICIÓN**

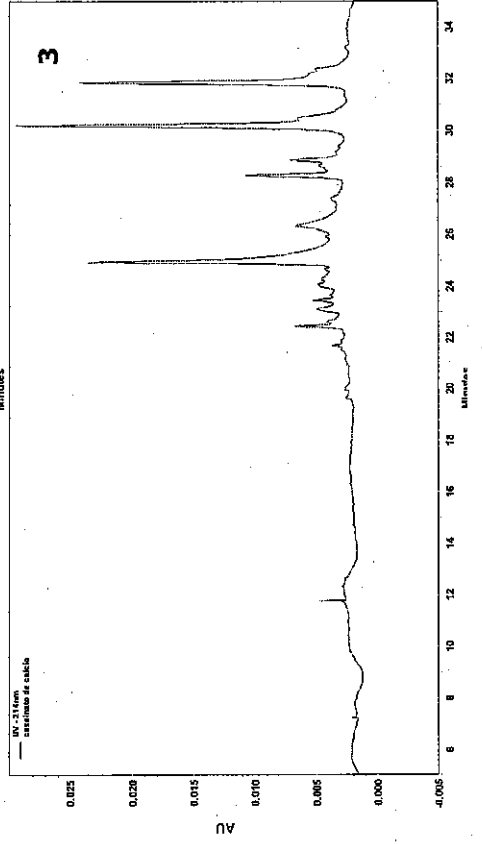
**1. Leche UHT (UHT)
10.3 mg prot ml⁻¹**



2. UHT 50 % + CAS 50%

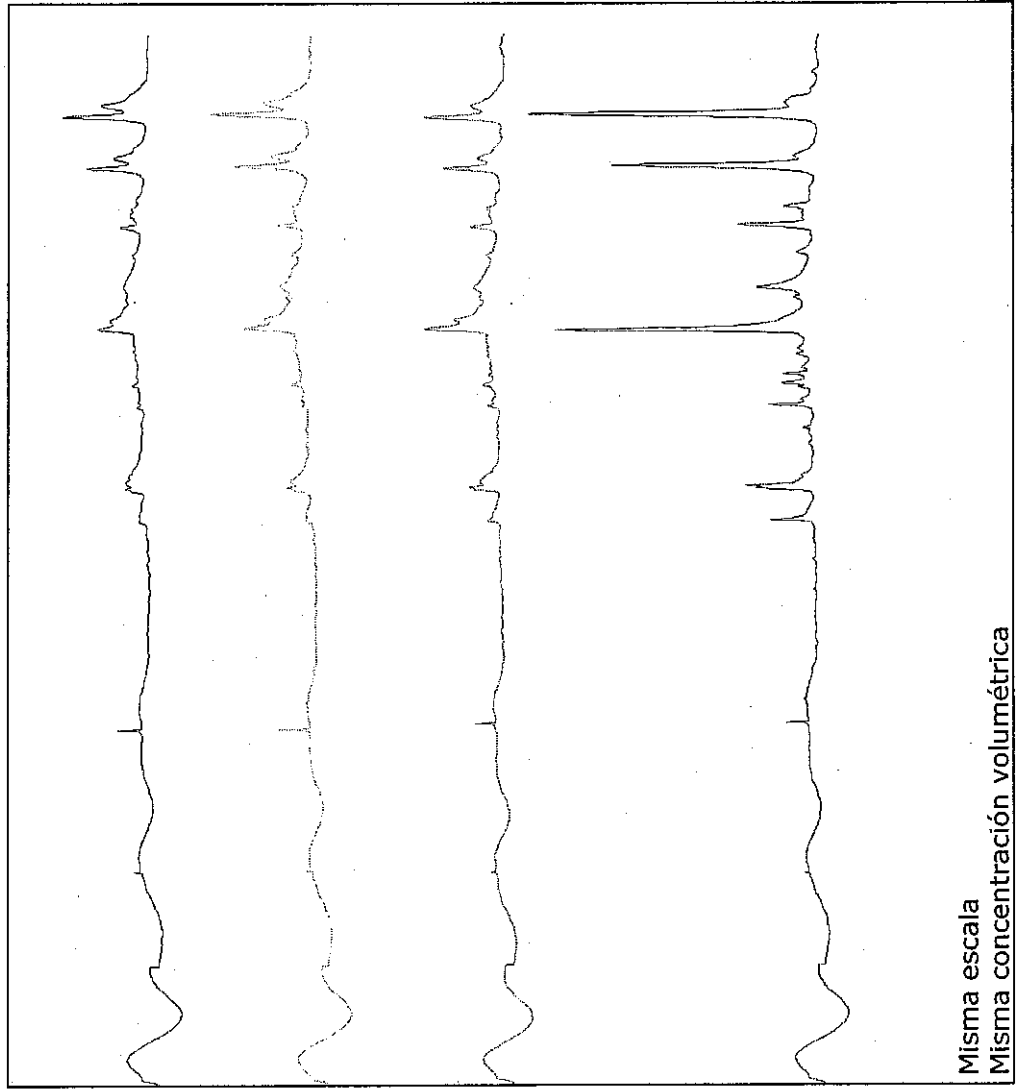


**3. Caseinato de calcio Lactonat
EC (mín. 88.5% Proteína)
10.0 mg prot ml⁻¹**



Efecto del tratamiento térmico

Análisis de Leche UHT



N
Fórmula láctea con grasa vegetal
7.3 mg prot ml⁻¹

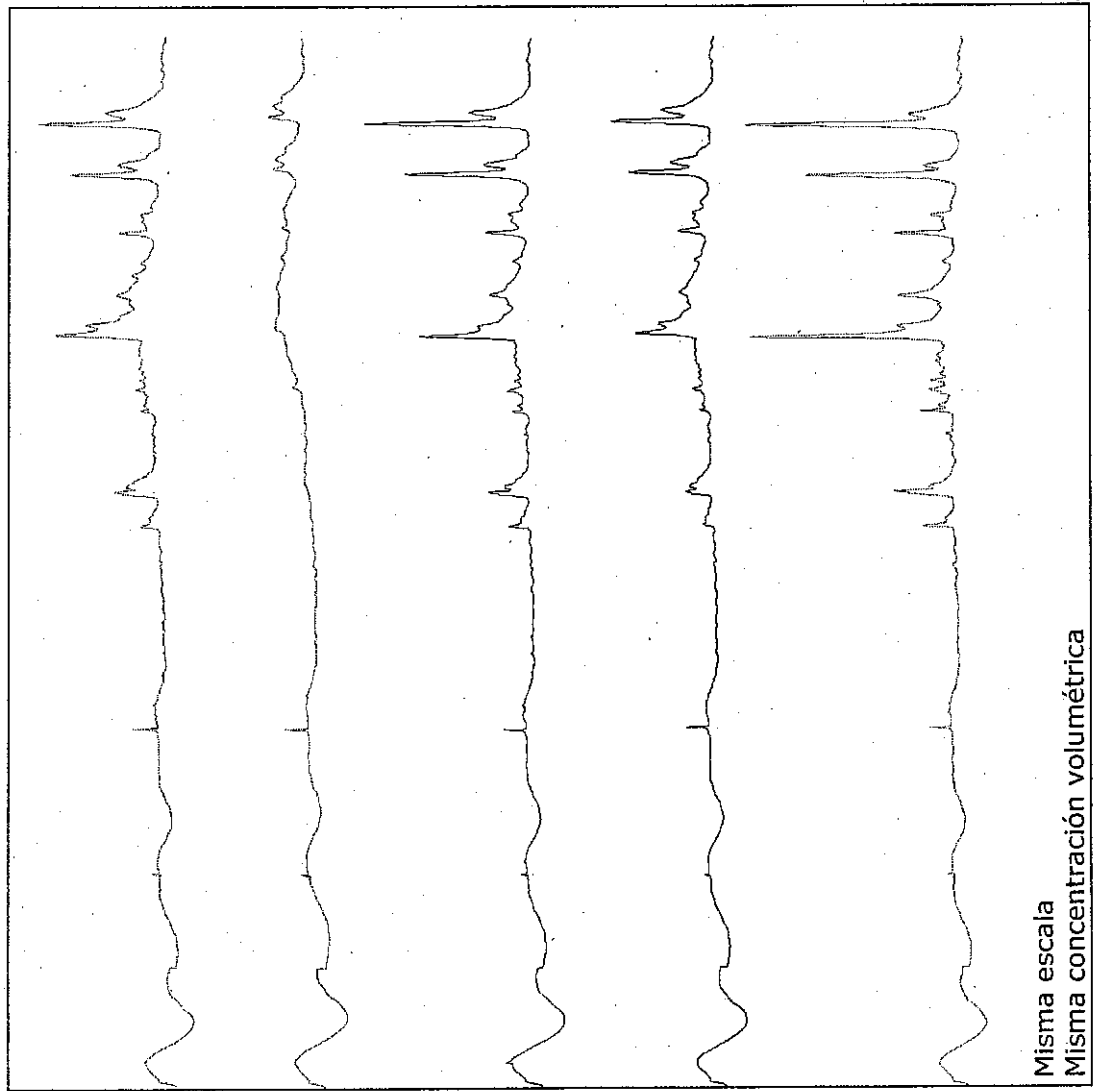
S
Leche descremada
10.8 mg prot ml⁻¹

A
Leche entera
10 mg prot ml⁻¹

S
Leche entera
10.5 mg prot ml⁻¹

Efecto del tratamiento térmico

Análisis de Leche UHT



Ch
Leche descremada
10 mg prot ml⁻¹

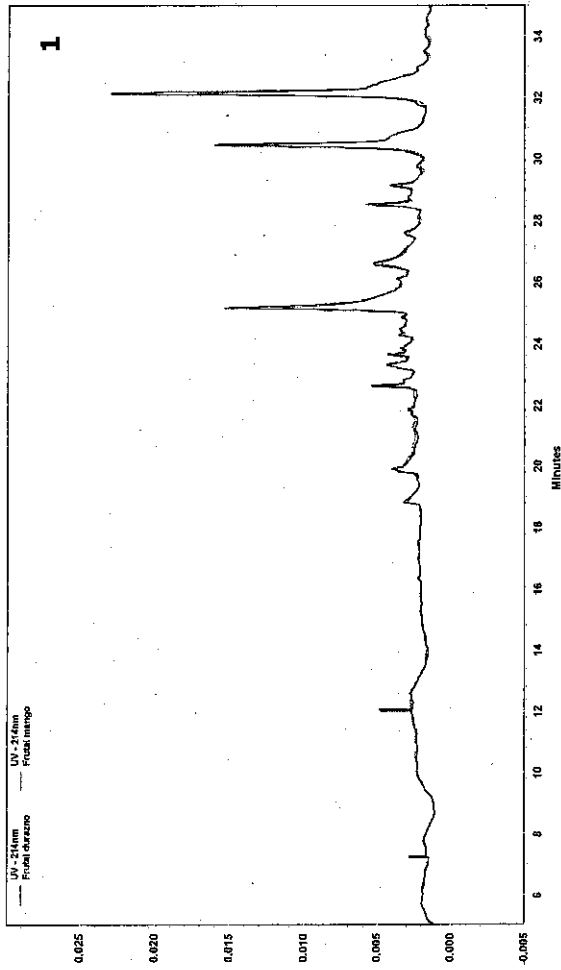
B
Leche entera orgánica
11 mg prot ml⁻¹

L
Leche entera
10.4 mg prot ml⁻¹

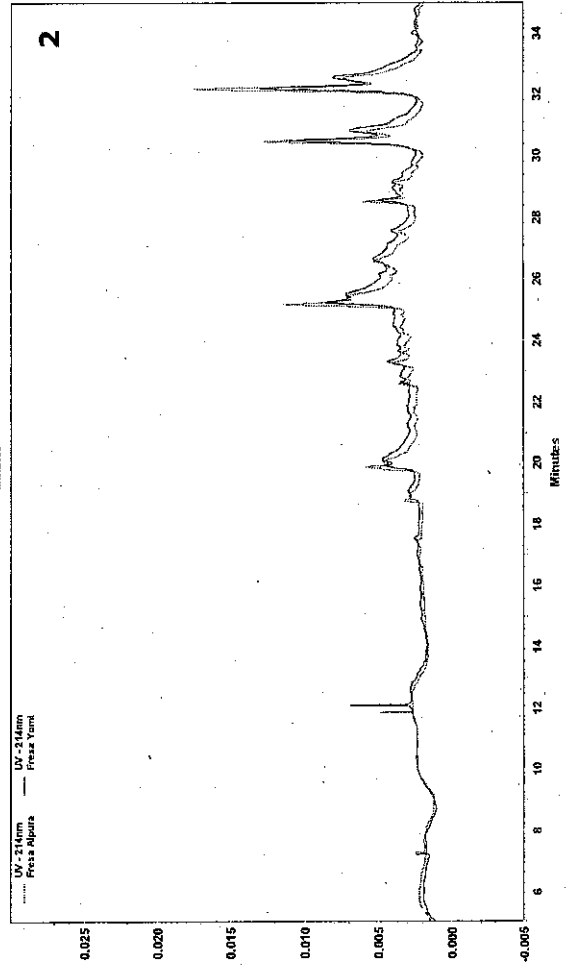
M
Leche entera rehidratada
10.4 mg prot ml⁻¹

A
Leche parcialmente descremada
10.3 mg prot ml⁻¹

ANÁLISIS DE LECHES UHT CON SABOR



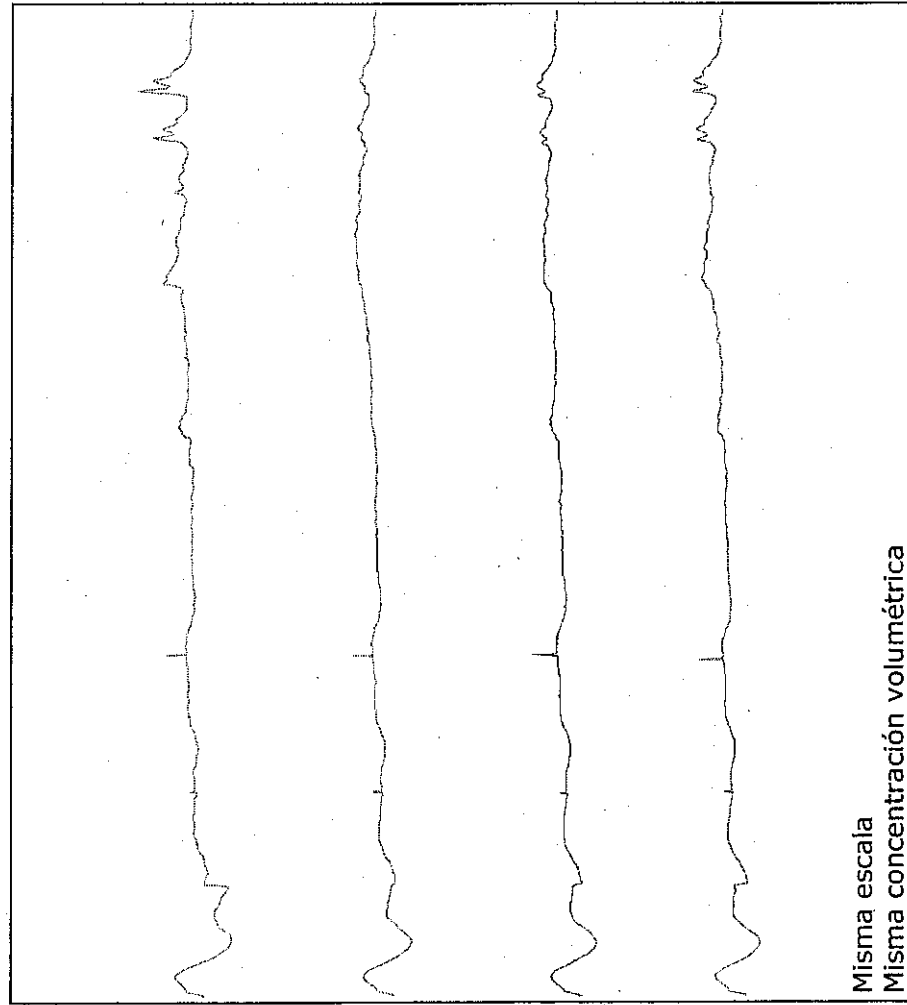
1. A
 Producto lácteo combinado
 7.44 mg prot ml⁻¹
- Sabor durazno
 - Sabor mango



2. Leche semidescremada
 10 mg prot ml⁻¹
- Sabor fresa
 - Sabor fresa

Efecto del tratamiento térmico

Análisis de leches UHT sabor chocolate



H

Leche descremada rehidratada
8.5 mg prot ml⁻¹

B

Leche semidescremada
11.4 mg prot ml⁻¹

G

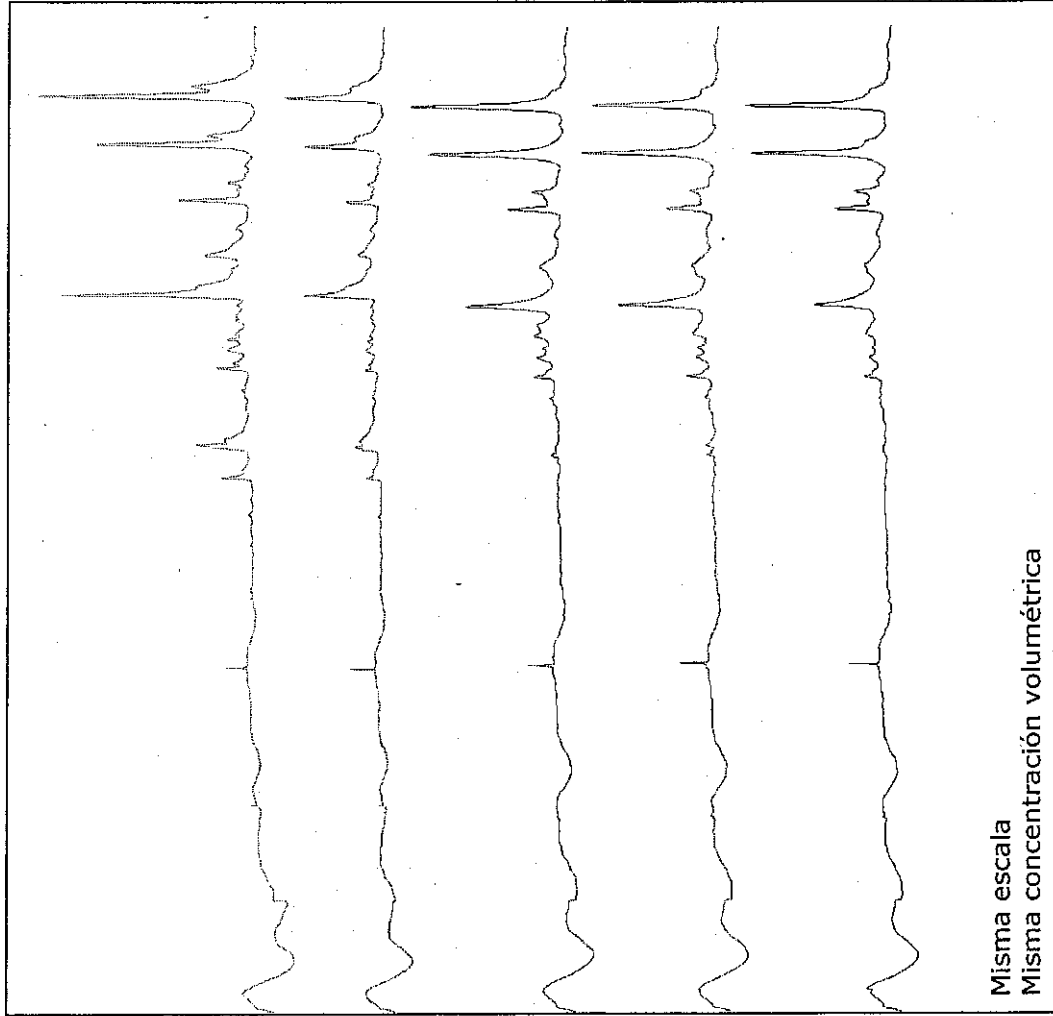
Alimento lácteo con grasa vegetal
8.3 mg prot ml⁻¹

N

Leche parcialmente descremada
10.5 mg prot ml⁻¹

Efecto del tratamiento térmico

Análisis de productos en polvo



N
(15 %; 11.6 mg prot ml⁻¹)

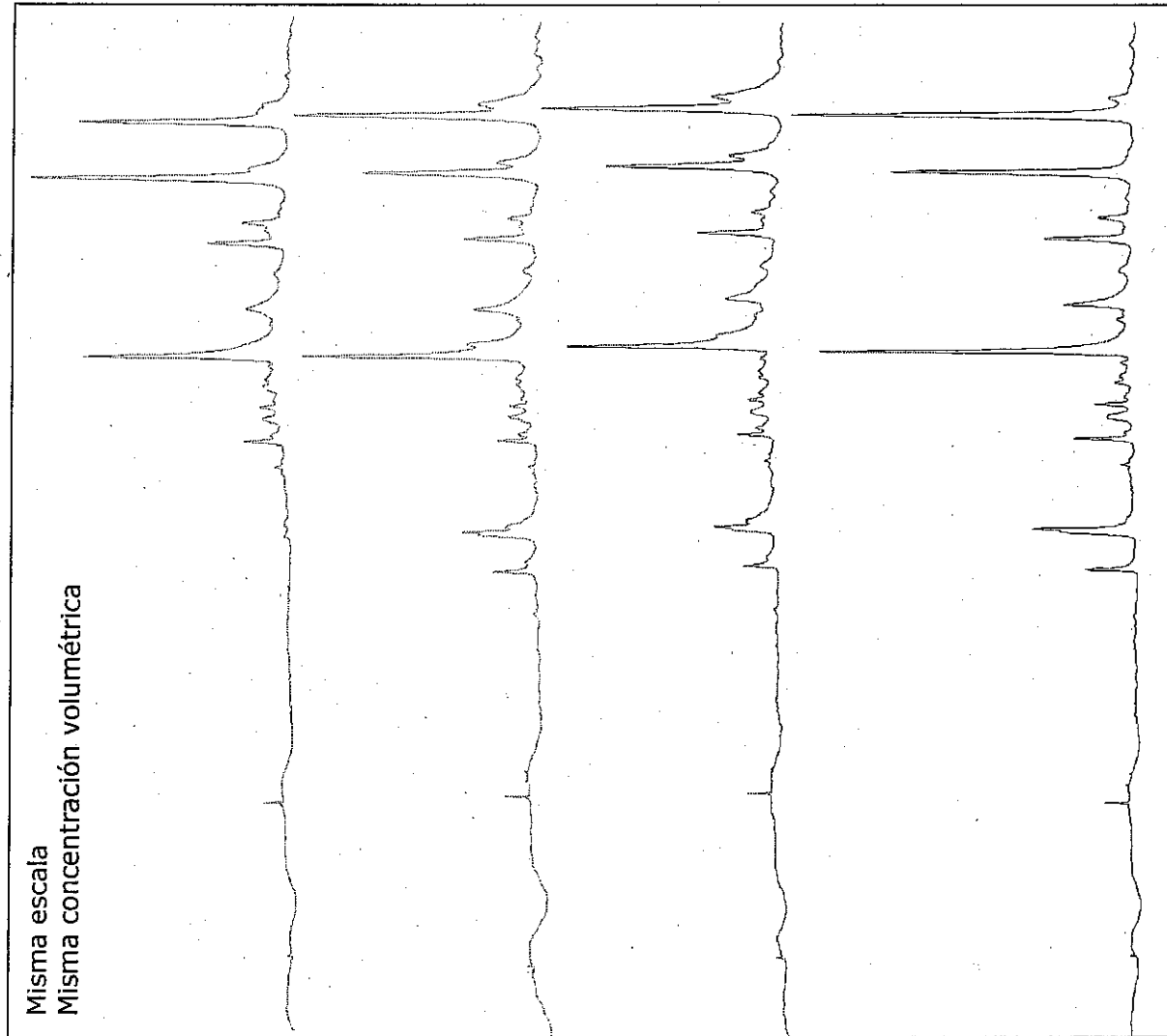
C
Alimento lácteo
(15%; 7.5 mg prot ml⁻¹)

Caseína (10 mg ml⁻¹)

Caseinato de calcio
(10 mg ml⁻¹)

Caseinato de sodio
(10 mg ml⁻¹)

Comparación del efecto del tratamiento térmico



Caseinato de calcio
Lactonat (10 mg ml⁻¹)
Área total^a = 1 846 294

Leche UHT
(10.3 mg prot ml⁻¹)
Área total = 1 996 568

Leche en polvo N
(11.6 mg prot ml⁻¹)
Área total = 2 249 384

Leche pasteurizada A
(10.3 mg prot ml⁻¹)
Área total = 2 079 434

^a Integración manual "línea recta"

Conclusiones

- El principal problema de la NOM 155-SCFI-2003 es que durante la separación electroforética se precipitan las proteínas de la leche debido a la baja concentración de urea (3 M) en el medio de separación.
- Además el descremado mediante centrifugación previo al análisis genera la formación de tres fases: la fase más ligera que corresponde a la grasa, una fase acuosa y un precipitado que contiene la mayor fracción proteínica.
- Basados en la literatura científica se modificó el método 8.7 de la NOM 155-SCFI-2003, y se obtuvo el perfil electroforético característico de las proteínas de la leche de vaca.

Conclusiones

- Se logró separar, identificar y cuantificar las principales proteínas de la leche de vaca mediante electroforesis capilar de zona.
- La metodología analítica propuesta es sencilla y repetible.
- Los diferentes tratamientos térmicos como la ultrapasteurización y secado por aspersión generan cambios conformacionales e irreversibles en las proteínas de la leche, y aunque las proteínas permanecen en solución tanto en el buffer de muestra como en el de separación, se pierde eficiencia (picos anchos) y señal (área total).
- Es indispensable que en la metodología se incluya otras mediciones para fortalecer el análisis y que son:
 - pH, densidad, porcentaje de nitrógeno proteínico y contenido total de Ca^{2+} , lactosa y furasina.

Conclusiones

- Es evidente que el daño generado a las proteínas de la leche es mayor en los productos UHT que el observado en la leche en polvo, en consecuencia resulta interesante conocer el impacto del tratamiento térmico sobre las propiedades nutricionales de los productos analizados y que es más evidente en los alimentos lácteos con sabor en donde el producto final resulta de la combinación de diferentes procesos.
- Con la metodología propuesta se puede identificar si las leche de vaca fluida bronca o pasteurizada está adulterada con productos que han sido sometidos a tratamientos térmicos
 1. modificación de la relación de áreas entre α_{s1} -CN, β -CN A¹ y β -CN A²
 2. lactosilación de β -Lg

Conclusiones

- Las proteínas de origen vegetal como las de la soya no pueden ser detectadas ya que son insolubles en el buffer de muestra.
- En ningún producto analizado se detectó una concentración superior de proteínas de suero con respecto al contenido total de caseínas.
- Al no detectar las proteínas del suero en los productos lácteos UHT, es factible que se formulen con caseinatos o mezclas de caseinatos con leche fresca.

Recomendaciones

- Es indispensable contar con estándares certificados de proteínas lácteas para diseñar métodos de análisis cuantitativos para poder determinar con mayor confianza el grado de adulteración de un producto lácteo.
- Se requiere validar del método propuesto.