

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE BOVINA”**

Por

**MORALES MORALES, Cintia Jimena
PENÉN ROJO, Luciana María**

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias.
Orientación:
Higiene, Inspección – Control y Tecnología de los Alimentos de Origen Animal.

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PAGINA DE APROBACION

PÁGINA DE APROBACIÓN

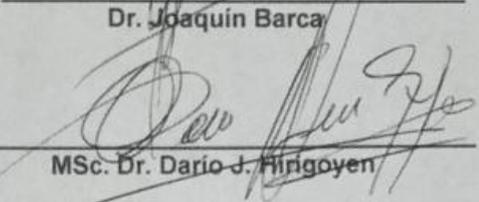
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



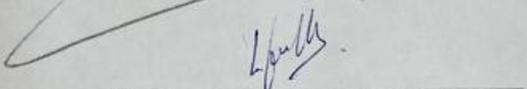
Dr. Joaquín Barca

Segundo miembro (tutor):



MSc. Dr. Darío J. Pirigoyen

Tercer miembro:

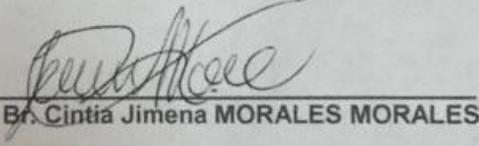


Dra. Lucía Grille

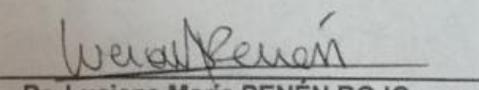
Fecha:

28 de julio del 2023

Autores:



Br. Cintia Jimena MORALES MORALES



Br. Luciana María PENÉN ROJO

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y amigos por su apoyo

A los amigos y compañeros que nos regaló la facultad

Al MSc. Dr. Darío J. Hirigoyen por su apoyo y enseñanza

Al Prof. José Fuentes por su apoyo, colaboración en el estudio estadístico y en la realización de este trabajo.

Al Laboratorio COLAVECO y a todo su equipo de trabajo, por su buena disposición, compañerismo y colaboración.

Extendemos un especial agradecimiento a Diego Arenas Carbajal, quien fue analista en calidad de leche del Laboratorio COLAVECO, por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Extendemos un especial agradecimiento a Marina Constantin, quien fue Química del Laboratorio COLAVECO, por su dedicación, compromiso, apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDOS

Página

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
TABLA DE CONTENIDOS	4
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1 INTRODUCCION	9
1.1 Producción lechera en Uruguay	9
1.2 Tendencias de consumo humano en lácteos	10
1.3 Composición y clasificación de la materia grasa de leche bovina.....	11
1.4 Mecanismo de síntesis de la grasa de la leche en rumiantes	11
1.5 Métodos analíticos para la extracción de AG en leche bovina.....	12
1.6 Equipos analíticos.....	12
2 HIPÓTESIS	13
3 OBJETIVO.....	13
3.1 Objetivo General.....	13
4 MATERIALES.....	13
4.1 Criterios de selección de las muestras.	13
4.1.1 Criterios de selección de las muestras para obtener la mayor variabilidad.....	13
4.2 Extracción de grasa.....	14
4.3 Esterificación de los Ácidos grasos.	15
4.4 Ajuste de Equipos	15
4.5 Análisis Estadístico.....	16
5 MÉTODOS.....	16
5.1 Equipos Analíticos.....	16
5.1.1 Condiciones operativas del equipo GC, ajustado y utilizado como marco de referencia.....	16
5.1.2 Condiciones técnicas y operativas del equipo FTIR	17
5.2 Registro de datos	18
5.3 Método Procedimental.....	18
6 RESULTADOS	18
6.1 Estadística descriptiva	18
6.1.1 Comparación de datos procesados entre los dos equipos.....	20
6.2 Tratamiento del primer conjunto de datos del equipo GC en función de FTIR para cada grupo de AG.....	21

6.3	Tratamiento del segundo conjunto de datos del equipo GC en función de FTIR para cada grupo de AG.....	21
7	DISCUSIÓN.....	22
8	CONCLUSIONES	23
9	BIBLIOGRAFÍA.....	23
10	ANEXOS.....	26
10.1	ANEXO 1. Certificación del material de referencia utilizado para el ajuste del GC... 26	
10.2	ANEXO 2. Certificación del material de referencia secundario utilizado para el equipo FTIR.	35
10.3	ANEXO 3A. Registro de datos del primer conjunto de muestras (N: 44) para los grupos de AG de leche bovina obtenidos por FTIR y GC	35
10.3	ANEXO 3B. Registro de datos del segundo conjunto de muestras(N: 8) para los grupos de AG de leche bovina obtenidos por FTIR y GC	36
10.4	ANEXO 4: Gráficos de GC vs FTIR con los valores de los grupos de AG del primer conjunto de muestras utilizadas para el ajuste de curvas del FTIR (N=44).	36
10.5	ANEXO 5. Gráficos de GC vs FTIR con los valores de los grupos de AG del segundo conjunto de muestras utilizadas para validar el ajuste del FTIR (n=8)	38

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Pagina

TABLA 1. Estadística descriptiva del perfil de AG de muestras de leche de ambos conjuntos (primero y segundo) en GC. Adaptado de Soyeurt et al., 2011.....	19
TABLA 2. Estudio de dos variables (promedio y desvío estándar residual) de los grupos de AG del primer y segundo conjunto de datos para cada equipo (GC-FTIR). (Anexo 2 (A y B)).....	20
TABLA 3. Nivel de dispersión del primer conjunto de datos de los grupos de AG obtenidos por GC.....	21
FIGURA 1. Presenta un cromatograma de gases típico registrado en las condiciones descritas anteriormente.....	17

RESUMEN

La Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR) presenta ventajas significativas en contraste con el método de referencia, la Cromatografía Gaseosa (GC). Estas ventajas incluyen una velocidad superior, costos reducidos y la posibilidad de procesar grandes volúmenes de muestras por minuto con una preparación sencilla de homogeneización y un baño termostático para las muestras de leche fluida. Por estas virtudes, es que la tesis tuvo como objetivo general crear y optimizar curvas de ajuste en el equipo FTIR utilizando muestras de leche bovina individual de sistemas nacionales. Se busca obtener un método preciso y eficiente para determinar el perfil de ácidos grasos (AG) y sus variaciones mediante el uso de espectros validados por el método de referencia (GC). Las muestras de leche bovina para iniciar la prueba analítica (N: 372), fueron remitidas a COLAVECO, un laboratorio privado habilitado para calificar la leche para el pago. Del total de muestras de los 6 establecimientos (A, B, C, D, E, F) debido a circunstancias externas y problemas logísticos en el laboratorio, se procesaron un total de 160 muestras, a las cuales se les implementó el método de extracción de grasa de leche por química húmeda de acuerdo con la norma ISO 14156:2001 y la esterificación siguiendo la norma ISO 15884:2002, para realizar la determinación del perfil de AG por GC. Después de la inyección de estas muestras en el cromatografía de gases (GC), se procedió a realizar la integración de los cromatogramas correspondientes a 52 muestras. Estos valores obtenidos se utilizaron para crear dos conjuntos de datos distintos: uno inicial (primer conjunto de datos) con 44 muestras (N: 44) con el fin de evaluar y ajustar las curvas en el FTIR, y otro conjunto secundario (segundo conjunto de datos) compuesto por 8 muestras (N: 8) para validar el rendimiento del equipo en cuestión. Luego se realizó un análisis exploratorio de los datos, definiéndose un modelo estadístico para hacer un ajuste mínimo cuadrático, considerando un modelo lineal simple. Los resultados en los gráficos reflejaron valores por encima y por debajo de la línea de tendencia, dividiéndolo en dos partes. Se calculó el R² con resultados bajos, traducándose a valores que no se ajustan a un modelo lineal simple. Concluyendo, surgieron resultados preliminares promisorios que ameritan continuar el estudio, aumentando el número de muestras para el ajuste requerido.

SUMMARY

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) offers significant advantages in contrast to the reference method, Gas Chromatography (GC). These advantages include higher speed, reduced costs, and the ability to process large sample volumes per minute with simple homogenization and a thermostatic bath for fluid milk samples. For these virtues, the general objective of the thesis was to create and optimize fitting curves in the FTIR equipment using individual bovine milk samples from national systems. The aim is to obtain a precise and efficient method for determining the fatty acid (FA) profile and its variations using spectra validated by the reference method (GC). Bovine milk samples for the analytical test (N: 372) were submitted to COLAVECO, a private laboratory authorized to grade milk for payment. Out of the total samples from the 6 establishments (A, B, C, D, E, F), due to external circumstances and logistical problems in the laboratory, a total of 160 samples were processed. These samples underwent the milk fat extraction method using wet chemistry according to ISO 14156:2001 and esterification following ISO 15884:2002 to determine the FA profile by GC. After injecting these samples into the gas chromatograph (GC), the corresponding chromatograms for 52 samples were integrated. The obtained values were used to create two different datasets: an initial one (first dataset) with 44 samples (N: 44) to evaluate and adjust the curves in FTIR, and a secondary dataset (second dataset) consisting of 8 samples (N: 8) to validate the performance of the equipment in question. Subsequently, an exploratory data analysis was conducted, defining a statistical model for a least squares fit, considering a simple linear model. The results in the graphs reflected values above and below the trendline, dividing it into two parts. The R² was calculated with low results, indicating values that do not fit a simple linear model. In conclusion, promising preliminary results emerged that warrant further study by increasing the number of samples for the required adjustment.

1 INTRODUCCION

1.1 Producción lechera en Uruguay

El sector lácteo ocupa un rol importante en la estructura económica de Uruguay, siendo uno de los rubros que genera mayor valor agregado.

Dada su ubicación geográfica, el país tiene excelentes condiciones naturales de suelo y clima que lo hacen apto para la producción de leche y le otorgan ventajas comparativas. Según la encuesta lechera del 2014 de INALE (Instituto Nacional de la Leche), existen 20 mil personas vinculadas al trabajo lechero, donde el predominio de los tambos es el trabajo familiar. En la industria la mayoría son trabajadores permanentes.

El tambo promedio tiene 150 vacas en ordeño (VO) y 250 hectáreas, con una producción de 18 litros de leche por vaca por día. Según datos preliminares del SNIG (Sistema Nacional de información Ganadera), basados en la Declaración Jurada de DICOSE 2021, las existencias de los vacunos lecheros disminuyeron, ubicándose en 707.535 cabezas.

En Uruguay se producen 2200 millones de litros de leche por año, donde el 90% es procesado por nuestra industria, contando con una mejora continua de los procesos con creciente incorporación tecnológica y estándares de calidad acorde a los mercados más exigentes (INALE).

Los sistemas lecheros en Uruguay se caracterizan por ser sistemas basados en pastoreo (pasto 55%, suplementación con forrajes 19% y concentrados 25%), con una carga animal promedio de 1,15 vacas lecheras por hectárea, alojadas en instalaciones a cielo abierto. (INALE).

Distinguiéndose de los sistemas de confinamiento, los sistemas agropecuarios basados en pastos ofrecen la notable ventaja de permitir que las vacas manifiesten conductas propias de su especie, lo que, a su vez, conlleva una mejora apreciable en el bienestar animal. Sin embargo, esta modalidad de producción se encuentra en condiciones climáticas extremas, tales como lluvias torrenciales y barro durante el invierno, así como al estrés térmico durante los meses estivales. (Grille et al., 2023).

En el contexto de Uruguay, la mayoría de los establecimientos lecheros optan por mantener a las vacas en un estado de confinamiento en potreros al aire libre cuando no se encuentran pastando, situación que conlleva la carencia de áreas de sombra destinadas al descanso y la alimentación de los animales. Asimismo, en sistemas basados en pastoreo, la administración de suplementos alimenticios se efectúa en espacios abiertos, desprovistos de resguardo frente a las inclemencias climáticas, siendo de notar que solo un 22% de las explotaciones lecheras dispone de instalaciones específicas para la provisión de estos suplementos. (Grille et al., 2023)

Según el estudio realizado por Fariña y Chilbrotos en el año 2022, se evidencia que las industrias lácteas en Uruguay se sustentan predominantemente en sistemas de pastoreo, caracterizados por el empleo de cargas ganaderas relativamente reducidas y niveles intermedios de utilización de alimentos concentrados. Dadas las particularidades climáticas y edáficas inherentes a esta región, se vislumbra la posibilidad de lograr un aumento sustancial en la producción de forraje por hectárea, lo que en última instancia podría propiciar un incremento tanto en el número de cabezas de ganado como en la productividad, medida en términos de producción de leche por hectárea. El presente estudio ha revelado que los sistemas agrícolas fundamentados en pasturas en Uruguay tienen la capacidad de experimentar un incremento significativo en la producción de leche, sin menoscabar su

competitividad, mediante la duplicación del consumo de forraje gracias a la implementación de tasas de almacenamiento superiores
Cuentan con una genética reconocida internacionalmente, además de tener una trazabilidad del 100% del ganado registrado.

1.2 Tendencias de consumo humano en lácteos

La composición de la grasa láctea desempeña un papel fundamental en la determinación del valor nutricional de la leche para los seres humanos, debido a su contenido energético y las propiedades bioactivas de ciertos AG que promueven la salud humana. (Grille et al., 2023)

La leche es un alimento de consumo masivo a nivel mundial y la industria láctea internacional se ha focalizado en valorizar e innovar productos por las propiedades de algunos componentes lácteos en la promoción de aspectos beneficiosos para la salud e incluso terapéuticos de la leche (Bauman, Mather, Wall, y Lock, et al., 2006). La investigación nacional respecto a la calidad de la leche se ha estado limitando a los términos porcentuales de sus grandes componentes como lo son la proteína y grasa, y no a la maximización de estos componentes nutracéuticos de forma natural, es decir, hoy, el agregado de alguno de estos elementos es netamente a nivel industrial, cabe destacar que aquellas estrategias donde se usa el agregado de alguna sustancia van en contra de la imagen de “Uruguay Natural” (decreto N° 328029), lo cual creemos que es de gran importancia para un país netamente exportador. Actualmente, el mercado internacional ha incrementado la demanda de alimentos de alta calidad en lo que refiere a nutrición y seguridad. Por lo tanto, se ha comenzado a generar desarrollo biotecnológico con el interés de manipular y alterar el valor nutricional de la leche para cumplir con los regímenes dietarios de los consumidores y utilizar la leche o los productos lácteos como un sistema de transporte de sustancias nutracéuticas que son conocidos por sus beneficios en la salud humana. (Jenkins y McGuire, 2006). El interés creciente sobre los aspectos saludables y terapéuticos de la leche (Bauman et al., 2006), así como modificaciones tecnológicas y sensoriales de los productos lácteos, genera oportunidades para la “leche de diseño”, como incluir AG más saludables, tales como el ácido linoleico conjugado (CLA) y Ω -grasas, perfiles mejorados de aminoácidos, más proteína, menos lactosa, y la ausencia de la β lactoglobulina (β -LG), son algunas oportunidades para alterar la composición de la leche (Cuadro III). Como resultado se obtendrán mejores beneficios para la salud humana y aumento de la rentabilidad de los productos manufacturados. (Sabikhi, 2004). Estudios epidemiológicos no han encontrado ninguna asociación o una asociación beneficiosa leve entre consumo de leche y productos lácteos con variables de riesgo de aterosclerosis (Bauman, et al., 2006). La alimentación pastoril sitúa al sistema productivo regional en una posición ventajosa respecto a la producción de leche en otros países basada en estabulación. Esta área de investigación ha tenido un gran desarrollo en la última década, ya que es posible a través de la alimentación y el manejo, mejorar la calidad de la leche y tener un impacto natural sobre la salud humana.

Generar información respecto de cómo se afecta la calidad de la leche es de gran interés tanto para la salud de los consumidores, así como para el posicionamiento de Uruguay como país exportador de lácteos frente a un mercado internacional competitivo y fluctuante. En este encuadre productivo, es necesario determinar cómo

afecta esta tendencia a la intensificación de la lechería nacional a la calidad del producto.

1.3 Composición y clasificación de la materia grasa de leche bovina

La materia grasa de la leche se dispone como pequeñas gotas de grasa (glóbulos de grasa) en forma de emulsión en agua, sin embargo, los glóbulos son mucho más complejos que simples gotas de grasa emulsionadas. La zona que está en contacto con el agua se denomina membrana, está constituida por muchos componentes y su estructura es de gran complejidad. Esta membrana representa solo el 2% del total de grasa, a su vez, no toda la materia grasa organizada en estos glóbulos tiene el mismo punto de fusión y por tanto podemos encontrar diferentes estados físicos en el mismo. La composición de la grasa láctea es un 97-98% triacilglicéridos (una molécula de glicerol y tres AG), el porcentaje restante se constituye de esteroides esterificados y no esterificados de fosfolípidos y otros componentes. Más de 400 AG han sido identificados en la grasa láctea, la mayoría de estos se encuentra en cantidades mínimas y sólo el 15% en cantidades superiores al 1% (Jensen, Ferris, y Lammi-Keefe, 1991).

Los AG pueden clasificarse de acuerdo con el largo de la cadena carbonada en: cadena corta (4-12 átomos de carbono), media (14-16 átomos de carbono) o larga (18 a 22 átomos de carbono). Según el grado de saturación, pueden clasificarse en saturados (AGS; sin enlace doble) e insaturados (AGI: 1 a 4 enlaces dobles), dentro de estos últimos se pueden dividir en mono insaturados (AGMI; 1 enlace doble) y poli insaturados (AGPI; 2 a 4 enlaces dobles) (Soyeurt et al., (2006). Los AG mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1cis) se reconocen generalmente como las fracciones de AG de mayor concentración en la grasa láctea bovina.

1.4 Mecanismo de síntesis de la grasa de la leche en rumiantes

El rumen es un lugar de gran actividad metabólica donde las bacterias presentes provocan cambios dramáticos en los lípidos de la dieta, es aquí que surge la divergencia entre el perfil de AG ingeridos (mayoritariamente insaturados) y el perfil de AG que sale del rumen (mayoritariamente saturados). Los dos procesos principales que ocurren a este nivel son la lipólisis y la biohidrogenación de los AG insaturados (Bauman et al., 2006). A su vez, las bacterias sintetizan AG de Novo a partir de precursores carbonados.

Según su origen, encontramos en la secreción láctea aquellos sintetizados en el propio tejido mamario, denominados AG de Novo tomados desde lipoproteínas y AG no esterificados (NEFA), circulantes en el torrente sanguíneo que llegan a la glándula mamaria y se denominan preformados (Bauman y Davis, 1974), siendo su origen de la absorción de lípidos a nivel del tracto digestivo y de la movilización de grasa de reservas corporales del animal (Barber, Clegg, Travers, y Vernon, 2007).

Los AG sintetizados de Novo en la glándula mamaria (todos los de cadena corta y el 50% de cadena media) surgen a partir de precursores como el acetato y beta hidroxibutirato (BHB) (Chilliard et al., 2000). Éstos derivan de la degradación y fermentación de carbohidratos y proteínas de la dieta y son utilizados en el citoplasma de la célula epitelial mamaria para sintetizar AG de cadena corta, media (C4:0 al C14:0) y aproximadamente la mitad del AG palmítico (C16:0). Este proceso anabólico en la glándula mamaria involucra principalmente dos enzimas: acetil-coA carboxilasa (ACC) quien lleva adelante la formación de malonil-10 CoA a partir del acetato, y la AG sintasa quien condensa el malonil-coA con acetil-CoA o butiril-CoA

a partir de acetato o BHB (Barber et al., 2007). Esta reacción produce C14:0 y en mayor medida C16:0.

Los AG de cadena larga son potentes inhibidores de la síntesis de Novo mediante acción directa sobre la enzima ACC, cuanto más largos en su cadena carbonada y mayor el grado de insaturación, mayor es el efecto inhibitorio (Chilliard et al., 2000), por lo tanto, cuando este tipo de AG llega a la glándula mamaria (sean de origen dietario y/o de movilización de reservas), la fracción de AG sintetizados de Novo experimenta una disminución en leche. (Chilliard et al., 2000).

1.5 Métodos analíticos para la extracción de AG en leche bovina

Para un análisis de la composición total de lípidos de la leche, es necesario seleccionar el método apropiado de extracción de lípidos para evitar la pérdida de algunos de estos componentes o alterar las propiedades químicas. Los métodos estándar de extracción de grasa láctea, como el Röse-Gottlieb (Organización Internacional de Normalización, ISO 2001), así como el propuesto por Hara y Radin (1978) tienen resultados satisfactorios para la extracción de lípidos neutros pero presentan importantes desventajas debido a pérdidas de algunos fosfolípidos y esfingolípidos (Avalli y Contarini, 2005; Feng, Lock, y Garnsworthy, 2004). Estos métodos se realizan de forma manual, lo que implica una serie de pasos difíciles, que consumen tiempo e insumen disolventes peligrosos en grandes cantidades necesarias para eliminar la grasa de la matriz de la muestra. Además, son incompatibles con la extracción de lípidos con un amplio rango de hidrofobicidad como los fosfolípidos o resultan en menores recuperaciones de grasa (Avalli et al., 2005; Gallier, Gragson, Cabral, Jiménez-Flores, y Everett, 2010).

Uno de los métodos más utilizados para la extracción y purificación de lípidos es el procedimiento de Folch (Folch, Lees, y Stanley, 1957), aunque este método es muy eficaz para extraer lípidos polares, también se asocia con un bajo rendimiento de muestras, un tiempo prolongado y un gran consumo de disolvente.

El método de extracción de lípidos y compuestos liposolubles conforme a la norma ISO 14156:2001 demuestra ser superior a todos los esquemas de extracción de grasa láctea nombrados previamente. Este enfoque se destacó por su seguridad y la capacidad de preservar la calidad de la muestra sin pérdidas significativas. Esta ISO fue realizada a partir de muestras de leche cruda con conservante lactopol sometidas al agregado de diferentes sustancias y soluciones como etanol 96% ± 2%, Hidróxido de amonio 28-30%, éter etílico puro para análisis (PPA), n-Pentano PPA y Sulfato de sodio, en diferentes fases y procedimientos con el fin de separar en su totalidad la fase acuosa y obtener únicamente la grasa de cada muestra.

1.6 Equipos analíticos

El Cromatógrafo de gases es el método de referencia para la determinación cualitativa y cuantitativa del perfil de AG de una muestra (Smith, 2020). Es una técnica precisa, pero presenta como desventajas que es costosa, requiere que las muestras de AG sean preparadas previamente y una vez realizada la inyección en el equipo demora 30 minutos en brindar el cromatograma completo, lo que lo hace difícil para el registro rutinario de la leche bovina. (Soyeurt et al., 2011).

En la industria láctea la valoración de los parámetros composicionales de la leche, requiere un método rápido, económico, preciso y con ventajas significativas de procesar un volumen amplio de muestras de forma reiterada y frecuente como es la tecnología del FTIR. (Rutten, Bovenhuis, Hetingga, van Valenberg, y van Arendonk, (2009). Este equipo a diferencia del GC, no requiere la preparación de la muestra,

por lo que los productos pueden ser analizados sin alterar sus propiedades fisicoquímicas utilizando la muestra de leche fluida (Soyeurt et al., 2011).

2 HIPÓTESIS

El método de FTIR presenta ventajas comparativas con el método GC para determinar y cuantificar rápidamente los AG presentes en la leche bovina.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo General

Crear y optimizar curvas de ajuste en el equipo FTIR utilizando muestras de leche bovina individual provenientes de sistemas productivos nacionales.

Obtener un método preciso y eficiente para determinar el perfil de AG y sus variaciones mediante el uso de espectros validados por el método de referencia GC.

4 MATERIALES

4.1 Criterios de selección de las muestras.

Se utilizaron muestras de leche remitida al Laboratorio COLAVECO ubicado en la ciudad de Nueva Helvecia, en el dpto. de Colonia, provenientes de 6 establecimientos lecheros seleccionados dentro del marco del proyecto “Mejor Leche”, para medir AG en el equipo FTIR.

Las muestras de leche se recolectaron durante el período de agosto a octubre del año 2020, con la supervisión de personal capacitado y entrenado en todos los predios, que se adherieron a criterios específicos con el propósito de asegurar que la muestra fuera representativa del volumen total de leche de origen, manteniendo sus atributos originales, y sea acondicionada y preservada apropiadamente hasta su posterior procesamiento en el laboratorio, manteniendo intactas todas sus características originales.

El total de muestras de los 6 establecimientos fue de N: 372, de estas fueron procesadas N: 160 con ambas técnicas ISO (14156:2001-15884:2002) e inyectadas en el GC. Debido a circunstancias externas y problemas logísticos en el laboratorio, se le realizó la integración de los cromatogramas a un total de 52 muestras. Los valores obtenidos se utilizaron para crear dos conjuntos de datos distintos: uno inicial (primer conjunto de datos) con 44 muestras (N: 44) correspondientes a 5 establecimientos diferentes (A (N: 9), B (N: 9), C (N: 9), D (N: 9), E (N: 8)) con el fin de evaluar y ajustar las curvas en el FTIR, y otro conjunto secundario(segundo conjunto de datos) compuesto por 8 muestras (N: 8) de otro establecimiento (F) para validar el rendimiento del equipo en cuestión.

4.1.1 Criterios de selección de las muestras para obtener la mayor variabilidad

Los datos a recoger debían referirse al momento del muestreo de cada animal.

1. Número de partos: Basado en que la paridad influye en las relaciones de los componentes, se eligieron primíparas y multíparas (Artegoitia et al., 2012); Lainé et al., 2017).

2. Días de lactancia: Se tomaron muestras con hasta 305 días aproximadamente, pudiendo surgir que algunas vacas tengan más días de lactancia, y se descartaron muestras de los primeros 5 días de parida (Artegoitia et al., 2012); Lainé et al., 2017).
3. Condición corporal: Se solicitó el puntaje de condición corporal (CC), de los animales de los que provenían las muestras.
4. Regionalidad: Se procuró incluir un área de dispersión amplia.
5. Alimentación: Se contemplaron sistemas de alimentación diferente. La alimentación se basó en sistema pastoril, ensilaje y concentrado, pudiendo estar incluidas todas o combinadas. En todos los casos se consignó el porcentaje de cada componente en el total y las cantidades asignadas.
6. Toma de muestras: Las muestras individuales se tomaron con medidor automático (Taverna, Páez, Resconi, Fabro, y Speranza, (2005). (Soyeurt et al., 2011).
7. Salud de ubre y Sanidad: Se descartaron las muestras provenientes de vacas con mastitis clínica al momento del muestreo o que hayan sido recientemente tratadas (Colă y Colă, 2017).

4.2 Extracción de grasa

Luego de analizar las muestras seleccionadas en equipo FTIR, seguimos el método de extracción de lípidos y compuestos liposolubles de leche, conforme a la norma ISO 14156:2001. Las muestras se colocaron en un Baño de Agua Termoestabilizado $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para alcanzar una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se mezclaron por inversión repetidamente y se colocaron en un recipiente con agua fría para descender la temperatura a $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez alcanzada dicha temperatura, se tomaron 10 ml (*) de la muestra de leche (con conservante lactopol), y se colocaron en un embudo de decantación de 100 ml. Los siguientes pasos fueron realizados utilizando una Campana de extracción PEL-EKO APARATURA. Se adicionó (*) 8 ml de etanol $96\% \pm 2\%$ (96 ml de etanol puro con 4 ml de agua destilada) y 2 ml Hidróxido de amonio 28-30 %. Para la primera extracción se agregó (*) 10 ml de éter etílico puro para análisis (PPA) y posteriormente se agitó el embudo de decantación vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó estacionar hasta que se alcanzó la separación de fases. Luego se agregó (*) 10 ml de n-Pentano PPA y se mezcló cuidadosamente. Se dejó estacionar para alcanzar la separación de fases y se descartó la fase acuosa. Para la segunda extracción se adicionó (*) 10 ml de solución de sulfato de sodio (1 litro de agua destilada con 100 g de sulfato de sodio anhidro en polvo) al contenido del embudo y se mezcló cuidadosamente. Se dejó estacionar para alcanzar la separación de fases y se descartó la fase acuosa. Para la tercera extracción se agregó (*) nuevamente 10 ml de solución de sulfato de sodio y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se dejó estacionar para alcanzar la separación de fases y se descartó la fase acuosa. Luego de las extracciones se transfirió la fase orgánica remanente a un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se adicionó de 0.5 a 1 grs de sulfato de sodio anhidro PPA en polvo y se mezcló el contenido del matraz, dejándolo estacionar por 10 minutos. Se filtró el contenido del matraz de 50 ml utilizando un embudo de plástico con filtro Whatman 1, a un matraz Erlenmeyer de 125 ml para llevarlo a baño de agua termoestabilizado $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se evaporó todo el solvente (aproximadamente 45 minutos). Para finalizar el procedimiento se procedió a realizar la extracción de grasa con una pipeta automática de 200 μl para

colocarla en vial Eppendorf de 1 ml previamente rotulado. Las muestras de grasa resultantes fueron conservadas a una temperatura de -20 °C.

4.3 Esterificación de los Ácidos grasos.

Para llevar a cabo esta técnica, seguimos la Norma ISO 15884:2002. Inicialmente, partimos de muestras de grasa extraídas de la leche y almacenadas a -20 °C, se utilizó un baño de agua termoestabilizado a $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ para llevar las muestras a una temperatura de 35 °C a 40 °C. Luego, utilizando una Balanza Ohaus de precisión con una cubeta redonda de 16 milímetros de diámetro y tapa redonda previamente rotulados para su identificación, se procedió a masar las muestras de grasa (aproximadamente 50 mg) para un registro individual. Para comenzar con la esterificación se le adiciono (*) a las cubetas con las muestras de grasa, 2.5 ml de Hexano 95 % y se mezcló, luego se le agregó (*) 0.1 ml de KOH en metanol 2 M y se colocó las cubetas en Vortex Mixer durante 1 minuto. Posteriormente se dejó estacionar las cubetas por 5 minutos a temperatura ambiente, agregando luego 0.25 grs de NaHSO₄ cristal y mezclamos. Por último, se llevó las cubetas a una centrífuga TecnoLab 80 2b 1000 RPM durante 3 minutos a temperatura ambiente. Con las muestras resultantes se realizó el filtrado con cartucho filtrante PVDF 0.45 µm (Millipore Millex-HV) y se colocaron en viales previamente rotulados de 1,5 ml.

(* Para la adición de soluciones y reactivos se utilizó pipeta automática de 10 ml)

4.4 Ajuste de Equipos

El material de referencia utilizado para ajustar ambos equipos analíticos proviene de laboratorios externos calificados internacionalmente. Para ajustar el GC, se utilizó material de referencia del Laboratorio Sigma Aldrich, USA (F.A.M.E. Mix Supelco 37 Component (C4 - C24); Methyl trans-vaccenate; Linoleic acid, conjugated methyl ester) (ANEXO 1). Mientras que, para ajustar el equipo FTIR, se realizaron dos calibraciones. La primera, una calibración inicial con curvas de origen que el fabricante proporciona al laboratorio; y la segunda, una calibración con material de referencia secundario obtenido del laboratorio Actalia Cecalait, Francia (15 AG (C4:0-C18:3n3); SFA, UFA, MUFA, PUFA; De novo (C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C12:0; C14:0; C14:1; C15:0); Mixes (C16:0; C16:1; and C17:0); Preformed (C18:0; C18:1; C18:2; and C18:3)) (ANEXO 2). Con la primera calibración se validaron las curvas creadas de fábrica, mientras que la segunda se verificaron dichas curvas. Además, se llevaron a cabo diferentes ensayos con el material de referencia secundario, cuyas características se detallan a continuación:

Precisión: para estimar el grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos bajo condiciones establecidas.

Exactitud: Con el propósito de estimar la cercanía entre el valor de referencia y el valor encontrado al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

Linealidad: efectuada con 10 muestras de leche y alcanzando un radio (r) que sea <2%.

Acarreo: mediante el análisis de 20 muestras de agua y leche usando la secuencia: agua-agua, leche-leche, agua-agua, etc., donde se evalúa la eficiencia del enjuague,

Repetibilidad: La diferencia absoluta entre dos resultados independientes de una muestra, obtenido usando un mismo método, sobre idéntico material, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo, dentro de un corto intervalo de tiempo, y no debiendo superar un rango previamente establecido.

Reproducibilidad intralaboratorio: La diferencia absoluta entre dos resultados simples e independientes de una muestra, obtenidos usando: mismo método, idéntico

material de testeo, mismo laboratorio, diferentes operadores e instrumentos y en distintos momentos (pocas horas).

Reproducibilidad: La diferencia absoluta entre dos resultados simples e independientes obtenidos utilizando el mismo método, sobre idéntico material de testeo en diferente laboratorio.

4.5 Análisis Estadístico

El tratamiento estadístico realizado se estructuró en dos fases distintas:

Exploración de Datos: Se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos, incluyendo su estudio detallado y la generación de gráficos representativos.

Modelo y Objetivo: Se definió un modelo y sus supuestos asociados para alcanzar el objetivo planteado.

Utilizando los valores del perfil de AG obtenidos mediante el equipo GC y aquellos obtenidos a través de FTIR, se aplicó un ajuste de mínimos cuadrados, utilizando un modelo lineal simple. Luego, se calculó el desvío estándar residual para ambos equipos, permitiendo así una conversión de los resultados del FTIR a la misma escala que el equipo de referencia, GC.

5 MÉTODOS

5.1 Equipos Analíticos

5.1.1 Condiciones operativas del equipo GC, ajustado y utilizado como marco de referencia.

El cromatógrafo de gases (modelo Agilent Technologies 7890 A y un Espectrómetro de Masas de Impacto Electrónico (Agilent Technologies 5975 C)) estaba equipado por una columna cromatográfica (TR-FAME -ThermoScientific) con una longitud de 100 m, un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de film de 0.25 μm . Las condiciones para los análisis cromatográficos fueron los siguientes: gas carrier hidrógeno de alta pureza N-50, flujo: 1 ml / minuto, temperatura del inyector: 250 °C, temperatura del detector: 255 °C y condiciones de separación utilizadas fueron $T_i = 70$ °C durante 1 minuto, Rampa 1= 5 °C / minuto – hasta 100 °C, Rampa 2= 10 °C / minuto – hasta 160 °C, Rampa 3= 5 °C / minuto – hasta 175 °C y Rampa 4= 5 °C / minuto – hasta 225 °C. El volumen inyectado fue de 1 μl con jeringa Agilent de 10 μl .

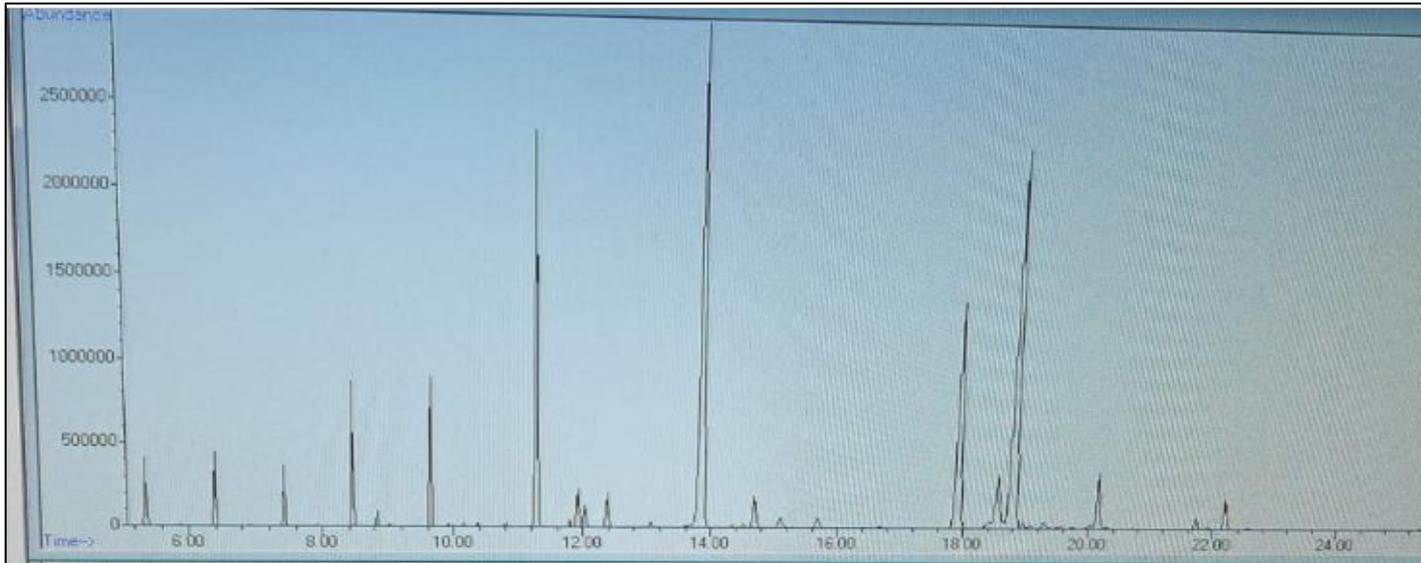


Figura 1: Picos estudiados en el cromatograma.

La Figura 1 presenta un cromatograma de gases típico registrado en las condiciones descritas anteriormente.

5.1.2 Condiciones técnicas y operativas del equipo FTIR

Este equipo (Automated Combiscope FTIR A600 HP) realiza el análisis composicional de las muestras de leche cruda, al absorber la onda infrarroja de los enlaces químicos y estructurales de las moléculas. Esta onda pasa a través de la célula que contiene la muestra. Debido a las vibraciones moleculares, más o menos energía infrarroja será absorbida por los enlaces moleculares específicos en varias longitudes de onda. Basado en la cantidad de energía absorbida, el interferómetro generará un interferograma. El interferograma se convertirá entonces en un espectro infrarrojo, lo cual, combinado con un modelo matemático, predecirá la composición química de la muestra.

Las muestras de leche cruda remitidas fueron preservadas con solución de 0.02 % a 0.06 % de Bronopol (Lactopol). Se conservaron en cámara de frío (2 a 4 °C) hasta su procesamiento, dentro de las 24 horas. Previo al análisis las muestras fueron llevadas a una temperatura de 40 °C ± 1 °C y mezcladas vigorosamente por inversión.

El equipo FTIR cuenta con un homogeneizador en dos etapas que funciona a una presión total de aproximadamente 190 bar y un bucle controlado de temperatura incorporado para mantener constante la temperatura de la muestra. La celda de medición es una celda autocontenida de fluoruro de calcio, 36 micras. Tiene montados calentadores laminares con un componente resistivo, y un sensor laminado entre dos láminas de aluminio. Con una longitud de trayectoria de 36 micras, resulta la mejor característica de transmisión para infrarrojo medio y la mejor sensibilidad para componentes de baja concentración. El sensor de conductividad calcula la depresión del punto de congelación en leche cruda (alrededor de 6,8 milisegundos). Los instrumentos infrarrojos tienen diferentes sistemas de calibración

que el fabricante provee al laboratorio junto con las instrucciones para ajustar el instrumento.

5.2 Registro de datos

El equipo FTIR genera valores de AG individuales (ácido palmítico (C16); ácido esteárico (C18); ácido oleico (C18:1C9) y agrupados por familias (ácidos grasos saturados (SFA); ácidos grasos insaturados (UFA); ácidos grasos monoinsaturados (MUFA); ácidos grasos poli insaturados (PUFA); ácidos grasos insaturados con doble enlace (Cis); ácidos grasos Trans (Trans)). El GC brinda valores de AG individuales. Se generaron 2 grupos de valores de AG individuales para cada muestra (g AG/50mg de materia grasa en GC) y (AG/ml de leche en FTIR) y se registraron en base de datos.

Con los datos del GC se realizó la misma agrupación de familias de AG que brindó inicialmente el FTIR, para hacer la comparación entre equipos.

5.3 Método Procedimental

1. Se seleccionaron 6 establecimientos lecheros del proyecto “Mejor Leche”
2. Todas las muestras de leche bovina remitidas al laboratorio fueron analizadas en primera instancia por el equipo FTIR. Luego se procedió a rotular y guardar las muestras escogidas en el freezer, para ulteriores análisis. Las muestras seleccionadas se descongelaron y se procedió a la extracción de grasa mediante el método de acuerdo a la norma ISO 14156:2001, con un tiempo máximo para su uso antes de la esterificación en freezer de 30 días. Luego se procedió a esterificar siguiendo la norma ISO 15884:2002.
3. Lectura del perfil de AG en GC. Obtención de reporte porcentaje de AG.
4. Ajuste y evaluación del FTIR acoplado el primer conjunto de datos con los porcentajes de AG por método de referencia (GC) a las curvas obtenidas inicialmente por FTIR.
5. Validación del ajuste del equipo FTIR con el segundo conjunto de datos.

6 RESULTADOS

6.1 Estadística descriptiva

Tabla 1

Estadística descriptiva del perfil de AG de muestras de leche de ambos conjuntos (primero y segundo) en GC

AG	Primer conjunto de datos(n: 44)					Segundo conjuntos de datos(n:8)				
	Prom	Desv Est	RSD	Mínimo	Maxim o	Prom	Desv Est	RSD	Mini mo	Maxim o
C4:0	2,01	0,28	13,81	1,86	13,15	1,94	0,11	5,46	1,73	2,06
C6:0	1,72	0,26	14,84	1,60	11,59	1,61	0,10	6,12	1,43	1,70
C8:0	1,23	0,22	17,21	1,11	12,75	1,10	0,06	5,80	1,00	1,17
C10:0	3,03	0,57	18,37	2,68	12,62	2,44	0,22	9,11	2,01	2,77
C12:0	3,60	0,67	18,21	3,10	13,07	3,06	0,23	7,51	2,78	3,40
C14:0	12,10	1,64	13,38	11,07	13,41	11,70	0,85	7,25	10,03	12,91
C14:1 cis9	0,84	0,25	30,44	0,63	26,38	1,05	0,24	22,80	0,60	1,26
C15	1,09	0,20	17,92	0,97	13,27	1,29	0,11	8,63	1,09	1,46
C16:0	28,64	3,07	10,54	25,67	36,03	31,19	2,74	8,79	25,69	34,53
C16:1 cis9	1,01	0,68	76,27	0,49	78,45	1,68	0,23	13,88	1,25	1,87
C17:0	0,41	0,09	22,56	0,35	20,33	0,50	0,06	11,33	0,39	0,56
C18:0	11,19	2,08	19,67	7,57	17,81	9,95	1,85	18,55	7,53	12,99
C18:1 11trans (TVA)	3,21	1,22	47,37	1,45	16,47	3,95	0,75	19,04	2,44	4,79
C18:1 cis9	20,33	2,27	11,89	15,45	23,95	20,80	3,45	16,59	17,53	27,66
C18:2 cis 9,trans 11 (CLA)	0,42	0,37	125,33	0,00	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:3 cis9 cis 12 cis 15 C22:5 cis5	0,35	0,15	44,19	0,21	19,08	0,71	0,12	17,55	0,53	0,85
cis8 cis11 cis14 cis17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Grasas saturadas (%)	65,01	4,76	7,22	61,38	69,23	64,77	2,80	4,32	59,78	68,00
Grasas monoinsaturadas (%)	25,30	2,54	10,50	20,90	29,84	27,48	2,80	10,20	24,70	32,38
Grasas poliinsaturadas (%)	0,75	0,51	76,03	0,34	98,76	0,71	0,12	17,55	0,53	0,85

Nota. CLA:acido linoleico conjugado; TVA:acido transvaccenico; PROM:promedio; DESV EST: desvío estándar; RSD: desvío estándar relativa. Valores expresados en g/100g de materia grasa

En la Tabla 1 se presentan los valores obtenidos mediante el método GC a partir de muestras del primer y segundo conjunto de datos, en un equipo previamente ajustado por material de referencia.

Si comparamos el perfil de AG entre ambos conjuntos de datos, se percibe una variación más amplia de valores mínimos y máximos de AG en el primer conjunto en contraste con el segundo conjunto de datos.

El porcentaje de RSD en el segundo conjunto de datos es menor que en el primero, presentando además una menor variabilidad de datos, a excepción del AG C18:1 cis-9.

6.1.1 Comparación de datos procesados entre los dos equipos

Se realizó el estudio de dos variables estadísticas básicas (Promedio y Desvío Estándar) de todos los AG (ácidos grasos saturados (SFA); ácidos grasos insaturados (UFA); ácidos grasos monoinsaturados (MUFA); ácido grasos poli insaturados (PUFA); ácido palmítico (C16); ácido esteárico (C18); ácido oleico (C18:1C9); ácidos grasos insaturados con doble enlace (Cis); ácidos grasos Trans (Trans)) del primer y segundo conjunto de datos y su comportamiento en cada equipo, encontrándose diferencias y similitudes (Anexo 2 (A y B)). Los grupos de AG que presentaron diferencias significativas en sus valores fueron: los Cis y Trans, con resultados mayores de materia grasa en equipo GC.

TABLA 2

Comparación de dos Variables Estadísticas en muestras de ácidos grasos entre el Primer y Segundo conjunto de datos

		Primer conjunto de datos																
	SFA FTIR	SFA GC	UFA FTIR	UFA GC	MUFA FTIR	MUFA GC	PUFA FTIR	PUFA GC	C16:0 FTIR	C16:0 GC	C18:0 FTIR	C18:0 GC	C18:1 cis9 FTIR	C18:1 cis9 GC	CIS FTIR	CIS GC	TRANS FTIR	TRANS GC
PROM	2.3	2.3	0.9	0.8	0.8	0.7	0.1	0.1	0.8	1	0.5	0.4	0.5	0.6	0.6	0.7	0.0	0.1
DESV EST	0.5	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3	0.0	0.0	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.0	0.3	0.0	0.1
		Segundo conjunto de datos																
	SFA FTIR	SFA GC	UFA FTIR	UFA GC	MUFA FTIR	MUFA GC	PUFA FTIR	PUFA GC	C16:0 FTIR	C16:0 GC	C18:0 FTIR	C18:0 GC	C18:1 cis9 FTIR	C18:1 cis9 GC	CIS FTIR	CIS GC	TRANS FTIR	TRANS GC
PROM	2.6	2.2	1.1	1.0	0.9	0.9	0.2	0.1	0.9	1.0	0.5	0.3	0.6	0.7	0.1	2.6	0.0	0.4
DESV EST	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.3	0.0	0.0

NOTA: DESV EST: desvío estándar; PROM: promedio; SFA: ácidos grasos saturados; UFA: ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poli insaturados; C16: ácido palmítico; C18: ácido esteárico; C18:1C9: ácido oleico; Cis: ácidos grasos insaturados con doble enlace; Trans: ácidos grasos Trans. Valores expresados en g/100 g de materia grasa.

6.2 Tratamiento del primer conjunto de datos del equipo GC en función de FTIR para cada grupo de AG.

Para el primer conjunto de datos se realizaron gráficos con valores de cada grupo de AG (saturados, UFA, MUFA, C16, C18, C18cis9, Cis, Trans) obtenidos por equipo GC y FTIR. Se calculó el valor de R2 para ver que tanto se ajustaban esos valores a un modelo lineal simple, así poder estimar y evaluar la variabilidad de datos entre ambos equipos con respecto a las líneas de tendencia resultantes. Se pudo desasir curvas con pendientes negativas y R2 con valores bajos. (ANEXO 3A)

Con el propósito de analizar el comportamiento de las distintas muestras al pasarlas por ambos equipos se estudió el análisis de dos variables básicas, desvío estandar (DESV EST) y desvío estándar residual (RSD), cuyos resultados se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 3

Nivel de dispersión del primer conjunto de datos de los grupos de AG obtenidos por GC

Acidos grasos(g/100g)	Desv Est	RSD
Grasas saturadas (%)	4,76	4,42
Grasas insaturadas (%)	2,65	1,56
Grasas monoinsaturadas (%)	2,54	1,44
Grasas poliinsaturadas (%)	0,51	0,39
C16:0	3,07	1,87
C18:0	2,08	1,28
C18:1 cis9	2,27	1,35
Cis	6,38	3,20
Trans	2,26	2,00

Nota: Desv Est: desvío estándar; RSD: desvío estándar residual. Valores expresados en g/100g de materia grasa

Los valores de desvio estandar residual (RSD) son relativamente más bajos que los valores de desvio estandar (DESV EST).

6.3 Tratamiento del segundo conjunto de datos del equipo GC en función de FTIR para cada grupo de AG.

Luego de acoplar el primer conjunto de datos con los porcentajes de AG del GC a las curvas obtenidas inicialmente por FTIR, se procedió a validar el intento de ajuste de calibración del FTIR con el segundo conjunto de datos. Se realizaron gráficos con valores de cada grupo de AG obtenidos por ambos equipos y también se calculó el

valor de R2 para ver que tanto se ajustaban esos valores a un modelo lineal simple, así poder estimar y evaluar la variabilidad de datos entre equipos con respecto a las líneas de tendencia resultantes. Se pudo desasir curvas con pendientes negativas y R2 con valores bajos. (ANEXO 3B)

7 DISCUSIÓN

El desarrollo de este ensayo pretende contribuir con la validación de las curvas de origen del FTIR creadas de fábrica y verificadas con material de referencia secundario, para ajustarlas de acuerdo a los valores de perfil de AG de leches bovinas nacionales. Para ello, se utilizaron muestras de leche individual obtenidas de sistemas pastoriles uruguayos y fueron analizadas mediante el método de referencia GC. Al ajustar las curvas del FTIR con las muestras de leche nacional, se pueden obtener controles internos más precisos. Esto es ventajoso ya que los materiales de referencia internacionales son costosos, llevan tiempo y dificultades logísticas, y sus resultados pueden no estar alineados con los valores adecuados según nuestros sistemas productivos y ganado vacuno. Además, el desarrollo de estos controles internos permite verificar constantemente la calidad de las mediciones complementarias con los materiales externos disponibles.

Según los artículos científicos consultados para este trabajo, factores como la raza (Carroll et al. 2006), la condición corporal (Roche et al. 2007), la paridad (Kelsey, Corl, Collier, y Bauman, 2003), la lactancia (Gross et al., 2011) y el sistema de producción (Croissant et al. 2007)(Mendoza et al., 2016) pueden afectar la variabilidad de los perfiles de AG entre leches. Para los productores, es importante conocer el perfil de AG de la leche bovina de su establecimiento para poder aprovechar al máximo sus beneficios en la preparación de productos lácteos. Por esta razón, se busca ajustar las curvas originales creadas de fábrica y verificarlas con material de referencia secundario con muestras de leche bovina individual de sistemas pastoriles nacionales.

En el laboratorio, las muestras de leche fluida se analizaron en el equipo FTIR mediante una preparación sencilla de homogeneización y baño termostático. En contraste, el equipo GC requiere que las muestras de AG se preparen previamente con normas ISO para su lectura. Debido a esta diferencia, se espera que los modelos basados en leche (g/mL) del FTIR sean más precisos que los modelos basados en grasa (g/50mg) del GC. Esto se debe a que, en el FTIR, la predicción de AG es una combinación de la cantidad y la composición de la grasa, mientras que en el GC, la predicción es el porcentaje de AG de cada muestra ((Rutten et al., 2009) y Soyeurt et al., (2006)).

En la Tabla 1 se puede observar una variabilidad entre ambos conjuntos de datos, que podría deberse a dos factores: el tamaño de cada conjunto (primer N: 44, segundo N: 8) y la procedencia de las muestras, que podrían afectar el resultado final. Además, en el primer conjunto de datos se notaron diferencias en las variables de promedio y RSD (desvío estándar relativa), especialmente en el ácido linoleico conjugado (CLA), con un valor promedio de 0.42% y una RSD del 125,33%. Esto se podría deber a que la integración de los cromatogramas en GC se realiza de forma manual por diferentes operarios.

En el análisis de los grupos de AG se observa variabilidad en los valores entre los equipos, particularmente en AG CIS y TRANS (Tabla 2). Esto podría deberse a que en este ensayo el equipo FTIR utilizó AG con concentraciones muy cercanas al

límite de detección, lo que afectó su capacidad para detectar concentraciones bajas. Además, el tipo de muestra procesada es diferente en cada equipo: el FTIR procesa leche fluida, mientras que el GC procesa muestras de AG. El procesamiento manual de las muestras también puede afectar su composición e integridad, lo que se refleja en los resultados.

En el tratamiento del primer conjunto de datos, se observaron valores dispersos en los gráficos, por encima y por debajo de la línea de tendencia. El cálculo del coeficiente de determinación (R^2) dio resultados muy bajos, lo que indica que los valores no se ajustan a un modelo lineal simple. Varios factores podrían estar influyendo en esto, como el número y manejo de los animales de la muestra de leche, factores biológicos y ambientales, o el procesamiento de las muestras antes de su análisis en GC. En la Tabla 3 se muestra que los valores de RSD (desvío estándar residual) resultaron ser más bajos que los valores de DESV EST, lo que podría significar que la predicción (a partir de FTIR) es más precisa que la variabilidad natural de los análisis en GC.

En el tratamiento del segundo conjunto de datos, se dividieron los gráficos en dos partes: valores por encima y por debajo de la línea de tendencia. Los coeficientes de determinación (R^2) también resultaron muy bajos, lo que indica que los valores no se ajustan a un modelo lineal simple. Es posible considerar que la reducida cantidad de observaciones podría ejercer una influencia significativa sobre los resultados finales.

Para lograr un modelo lineal simple normal en los valores del perfil de AG en una muestra de leche bovina analizados en GC y FTIR, se necesitaría un mayor número y volumen de observaciones. En el ensayo realizado, el volumen de las muestras de leche bovina remitidas al laboratorio fue insuficiente para realizar repeticiones en ambos equipos. Esto se debe a que las muestras contenían aproximadamente 30 ml, de los cuales se utilizaban 8 ml para el análisis FTIR y 10 ml para el procesamiento de la extracción de los AG según la norma ISO 14156:2001. En algunos casos, se requirió la repetición de la extracción para obtener los 50 mg de AG establecidos en la norma ISO 15884:2002 para la esterificación.

8 CONCLUSIONES

En el presente estudio, se ha demostrado la viabilidad de mejorar la precisión de las curvas espectrales mediante el empleo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para estimar el perfil de ácidos grasos en muestras individuales de leche bovina procedentes de sistemas de producción nacionales. Para lograr un ajuste óptimo del equipo FTIR, se requiere obtener un mayor número de observaciones en condiciones experimentales controladas y una cantidad más significativa de cada muestra, lo que permitirá la realización de múltiples repeticiones del análisis en ambos equipos, dando lugar a resultados de mayor precisión. Este enfoque contribuirá a fortalecer la construcción de curvas y llevar a cabo validaciones más sólidas.

9 BIBLIOGRAFÍA

Artegoitia, V., Meikle, A., Olazabal, L., Damián, J.P., Adrien, M.L., Mattiauda, D.A., ...Carriquiry, M. (2012). Milk casein and fatty acid fractions in early lactation are

- affected by nutritional regulation of body condition score at the beginning of the transition period in primiparous and multiparous cows under grazing conditions. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(5), 919-932.
- Avalli, A., y Contarini, G. (2005). Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*, 1071, 185–190.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T., y Vernon R.G. (2007). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1347(2/3), 101–126.
- Bauman, D.E., Mather, I.H., Wall, R.J., y Lock, A.L. (2006). Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 1235–1243.
- Carroll, S. M., Depeters, E.J., Taylor, S.J., Rosenberg, M., Perez-Monti, H., and Capps, V.A. (2006). Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Animal Feed Science Technol.* 131: 451-73.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., y Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, 49, 181–205.
- Colă, M., y Colă, F. (2017). Reserches Regarding the profile of fatty acids in the milk resulting from cows diagnosed with sub-clinical mastitis. *Proceedings International Multidisciplinary Scientific GeoConference*, 17(61), 939-946.
- Croissant, A. E., Washburn, S. P., Dean, L. L., and Drake, M. A. (2007). Chemical Properties and Consumer Perception of Fluid Milk from Conventional and Pasture-Based Production Systems. *J. Dairy Sci.* 90:4942–4953 doi:10.3168/jds.2007-0456.
- Fariña, S.R., y Chilbroste, P. (2019). Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. *Agricultural Systems*. doi: 10.1016/j.agsy.2019.05.001.
- Feng, S., Lock, A. L., y Garnsworthy, P. C. (2004). A rapid method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 3785–3788.
- Folch, J., Lees, M., y Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Gallier, S., Gragson, D., Cabral, C., Jiménez-Flores, R., y Everett, D. W. (2010). Composition and fatty acid distribution of bovine milk phospholipids from

- processed milk products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10503–10511.
- Grille, L., Escobar, D., Méndez, M.N., Adrien, M.de L., Olazabal, L., Rodríguez, V., Pelaggio, R., Chilibroste, P., Meikle, A., 5 and Damián, J.P. (2023). Different Conditions during Confinement in Pasture-Based Systems and Feeding Systems Affect the Fatty Acid Profile in the Milk and Cheese of Holstein Dairy Cows. *Animals* 2023, 13, 1426. Doi: 10.3390/ani13081426.
- Instituto Nacional de la Leche. (s.f.). *Uruguay lechero*. Recuperado de <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>
- Jensen, R. G., Ferris, A. M., y Lammi-Keefe, C. J. (1991). The composition of milk fat. *Journal of Dairy Science*, 74, 3228–3243.
- Jenkins, TC y McGuire, MA (2006). Principales avances en nutrición: impacto en la composición de la leche. *Revista de ciencia láctea* , 89(4), 1302-1310.
- Kelsey, J. A., Corl, B. A., Collier, R. J., and Bauman, D. E. (2003). The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2588–2597.
- Lainé, C., Bastin, C., Grelet, H., Hammami, F. G., Colinet, L. M., Dale, A., ...Gengler, N. (2017). Assessing the effect of pregnancy stage on milk composition of dairy cows using mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 100, 2863–2876 doi: 10.3168/jds.2016-11736.
- Mendoza, A., Cajarville, C., and Repetto, J.L. (2016). Short communication: Intake, milk production, and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets combining fresh forage with a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 99:1938–1944.
- Organización Internacional de Normalización. (2001). *Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds (ISO 14156:2001; IDF 172:2001)*. Ginebra: ISO.
- Organización Internacional de Normalización. (2002). *Milkfat. Preparation of fatty acid methyl esters (ISO 15884:2002; IDF 182:2002)*. Ginebra: ISO.
- Roche, J.R., Lee, J.M., Macdonald, K.A., and Berry D.P. (2007). Relationships Among Body Condition Score, Body Weight, and Milk Production Variables in Pasture-Based Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:3802–3815.
- Rutten, M. J. M., Bovenhuis, H., Hettinga, A. K., van Valenberg, H. J. F., y van Arendonk, J. A. M. (2009). Predicting bovine milk fat composition using infrared

spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 6202–6209.

Smith, R.W. (2020) Gas chromatography (GC). *Encyclopedia of Science*. Hackensack: Salem Press.

Soyeurt, H., Dehareng, F., Gengler, N., McParland, S., Wall, E., Berry, D. P., ... Dardenne, P. (2011). Mid-infrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries. *JournalofDairyScience*, 94, 1657-1667. doi: 10.3168/jds.2010-3408

Taverna, M., Páez, R., Resconi, V., Fabro, M., y Speranza, J. (2005). *Procedimiento de muestreo de leche en el tambo y de medición de volumen y temperatura*. Rafaela: INTA.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1. Certificación del material de referencia utilizado para el ajuste del GC.

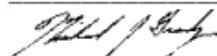
Certificate of Analysis

Product Name:

Linoleic acid, conjugated methyl ester

Product Number: O5632
Batch Number: MKCJ1812
Brand: SIGMA
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 04 FEB 2019

Test	Specification	Result
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
¹³ C NMR Identity	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	> 99 %	100 %



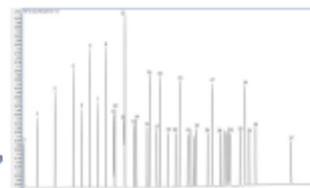
Michael Grady, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis - Certified Reference Material

Supelco 37 Component FAME Mix

Product no.: CRM47885
Lot no.: LRAC3241
Expiry Date: April 2022
Manufacturing Date: April 2019
Storage: Freeze
Solvent/Matrix: METHYLENE CHLORIDE
Certificate version: LRAC3241.02 (Note: Certificates may be updated due to the availability of new data. Check our website at: www.sigmaaldrich.com for the most current version.)



Certified Values:

Analyte	Units	Certified Value	Raw Material Purity, %	Raw Material Lot
METHYL BUTYRATE (C4:0)	µg/ml	401 ± 31	99.9	MKCF9233
METHYL HEXANOATE (C6:0)	µg/ml	401 ± 27	99.9	MKBZ3038V
METHYL OCTANOATE (C8:0)	µg/ml	401 ± 25	99.9	MKBZ3038V
METHYL DECANOATE (CAPRATE) (C10:0)	µg/ml	401 ± 23	99.9	LC04160
METHYL UNDECANOATE (C11:0)	µg/ml	200 ± 15	99.0	BCBN7141V
METHYL LAURATE (C12:0)	µg/ml	401 ± 22	99.5	LB97659
METHYL TRIDECANOATE (C13:0)	µg/ml	200 ± 15	99.5	BCBV4347
METHYL MYRISTATE (C14:0)	µg/ml	401 ± 23	100.0	LC17239
MYRISTOLEIC ACID METHYL ESTER (Methyl myristoleate) (C14:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	U-36M-F28-C
METHYL PENTADECANOATE (C15:0)	µg/ml	200 ± 15	99.7	BCBR2231V
CIS-10-PENTADECENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-10 pentadecenoate) (C15:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	U-38M-M15-C
METHYL PALMITATE (C16:0)	µg/ml	615 ± 39	99.0	LC17089
METHYL PALMITOLEATE (METHYL CIS 9-HEXADECENOATE) (C16:1)	µg/ml	201 ± 16	100.0	SLBX9802
METHYL HEPTADECANOATE (C17:0)	µg/ml	200 ± 16	96.4	BCBR1790V

Sigma-Aldrich RTC, 2931 Soldier Springs Rd. Laramie, WY 82070, USA;
 Tel. 1 307-742-5452; Fax 1 855-831-9211; www.sigmaaldrich.com
 Sigma-Aldrich RTC is a subsidiary of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.



CIS-10-HEPTADECENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-10-heptadecenoate) (C17:1)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBX7914
METHYL STEARATE (C18:0)	µg/ml	401 ± 27	99.1	LC13654
TRANS-9-ELAIDIC ACID METHYL ESTER (Methyl trans-9 elaidate) (C18:1)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-47M-M31-C
CIS-9-OLEIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-9 oleate) (C18:1)	µg/ml	401 ± 29	99.6	MKCJ0804
LINOLELAIDIC ACID METHYL ESTER (Methyl linolelaidate) (C18:2)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBZ6933
METHYL LINOLEATE (C18:2)	µg/ml	200 ± 15	99.0	BCBT9852
METHYL ARACHIDATE (C20:0)	µg/ml	401 ± 30	99.0	0000007888
GAMMA-LINOLENIC ACID METHYL ESTER (Methyl γ-linolenate) (C18:3)	µg/ml	200 ± 16	99.6	MKCD9174
METHYL CIS-11 EICOSENOATE (C20:1)	µg/ml	200 ± 15	99.0	MKCJ2391
METHYL LINOLENATE (C18:3)	µg/ml	200 ± 14	99.0	SLBX5834
METHYL HENEICOSANOATE (C21:0)	µg/ml	201 ± 14	99.6	LC08970
CIS-11,14-EICOSADIENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-11,14-eicosadienoate) (C20:2)	µg/ml	201 ± 16	99.0	U-68M-A4-D
METHYL BEHENATE (C22:0)	µg/ml	401 ± 29	99.6	SLBW0605
CIS-8,11,14-EICOSATRIENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-8, 11, 14-eicosatrienoate) (C20:3)	µg/ml	199 ± 15	99.0	U-69M-N30-C
METHYL ERUCATE (CIS-13-DOCOSENOATE) (Methyl cis-13-docosenoate) (C22:1)	µg/ml	200 ± 16	99.4	BCBX7574
CIS-11,14,17-EICOSATRIENOIC ACID METHYL ESTER (Methyl cis-11, 14, 17- eicosatrienoate) (C20:3)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-70M-S20-C
METHYL TRICOSANOATE (C23:0)	µg/ml	200 ± 15	99.6	SLBZ1076

METHYL CIS-5,8,11,14-EICOSATE TRAENOATE (Methyl arachidonate) (C20:4)	µg/ml	200 ± 14	100.0	LC15184
CIS-13,16-DOCOSADIENOI C ACID METHYL ESTER (Methyl cis-13, 16- docosadienoate) (C22:2)	µg/ml	201 ± 15	99.0	U-81M-M22-C
METHYL LIGNOCERATE (Methyl tetracosanoate) (C24:0)	µg/ml	401 ± 30	100.0	SLBZ6342
METHYL CIS-5,8,11,14,17-EICOS APENTAENOATE (C20:5)	µg/ml	200 ± 16	99.0	U-99M-JY30-C
METHYL NERVONATE (Methyl cis-15-tetracosenoate) (C24:1)	µg/ml	200 ± 14	99.8	BCBX0854
METHYL CIS-4,7,10,13,16,19-DO COSAHEXAENOATE (C22:6)	µg/ml	200 ± 15	100.0	SLBZ9656

Elution details:

EO	RT(MIN)	ANALYTE
1	7.33	Methyl butyrate (C4:0)
2	8.37	Methyl hexanoate (C6:0)
3	9.79	Methyl octanoate (C8:0)
4	11.26	Methyl decanoate (C10:0)
5	11.94	Methyl undecanoate (C11:0)
6	12.58	Methyl laurate (C12:0)
7	13.21	Methyl tridecanoate (C13:0)
8	13.86	Methyl myristate (C14:0)
9	14.51	Methyl myristoleate (C14:1)
10	14.56	Methyl pentadecanoate (C15:0)
11	15.31	Methyl cis-10 pentadecenoate (C15:1)
12	15.36	Methyl palmitate (C16:0)
13	16.1	Methyl palmitoleate (C16:1)
14	16.27	Methyl heptadecanoate (C17:0)
15	17.12	Methyl cis-10 heptadecenoate (C17:1)
16	17.33	Methyl stearate (C18:0)
17	17.89	Methyl trans-9 eladiate (C18:1)
18	18.16	Methyl cis-9 oleate (C18:1)
19	18.78	Methyl linoleaidate (C18:2)
20	19.4	Methyl linoleate (C18:2)
21	19.72	Methyl arachidiate (C20:0)
22	20.37	Methyl-gamma-linolenate (C18:3)
23	20.6	Methyl cis-11-eicosanoate (C20:1)
24	20.89	Methyl linolenate (C18:3)
25	21	Methyl heneicosanoate (C21:0)
26	21.96	Methyl cis-11,14-eicosadienoate (C20:2)
27	22.33	Methyl behenate (C22:0)
28	22.96	Methyl cis-8, 11, 14-eicosatrienoate (C20:3)
29	23.24	Methyl erucate (C22:1)
30	23.48	Methyl cis-11, 14, 17- eicosatrienoate (C20:3)
31	23.63	Methyl tricosanoate (C23:0)
32	23.72	Methyl cis-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoate (C20:4)
33	24.54	Methyl cis-13, 16- docosadienoate (C22:2)
34	24.93	Methyl lignocerate (C24:0)
35	25.27	Methyl cis-5, 8, 11, 14, 17- eicosapentaenoate (C20:5)
36	25.76	Methyl nervonate (C24:1)
37	28.6	Methyl cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoate (C22:6)

Additional Information:

Method Parameters:
Column: SP 2560, 100 m, 0.25 mm, 0.20 µm (Column #218)
Inlet Temp: 220 °C, Split mode with 35:1 split ratio
Oven Temp Program: 100 °C (4 min) @ 25 °C/ min to 200 °C (8 min) and @ 5 °C/ min to 250 °C (6 min)
Injection volume: 1 µ L
Column Flow: 2.4 mL/min
Detector: MSD in FS mode (m/z 40-400), Scan rate: 4 Hz. Solvent delay: 7.20 min, Transfer line: 250 °C

Metrological traceability:

Traceable to the SI and higher order standards from NIST through an unbroken chain of comparisons. The balance used to weigh raw materials is accurate to +/-0.0001 g and calibrated regularly using mass standards traceable to NIST. All dilutions were performed gravimetrically. Additionally, individual analytes are traceable to NIST SRMs where available and specified above.

Measurement method:

Where applicable, the assigned value is based on a purity determination by mass balance and gravimetrically prepared value.

Intended use:

Intended for R&D and Analytical Use only. Not for drug, household or other uses.

Packaging:

1 ML IN AMBER AMPULE

Instructions for handling and correct use:

Use on the as is basis. The internal pressure of the container may be slightly different from the atmospheric pressure at the user's location. Open slowly and carefully to avoid dispersion of the material.

Health and safety information:

All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel. Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.

Accreditation:

Sigma-Aldrich RTC is accredited by the US accreditation authority ANAB as a registered reference material producer AR-1470 in accordance with ISO 17034. 12-Apr-2021

Certificate issue date:



Andy Ommen - QC Manager

Mark Pooler - QA Supervisor

Details on metrological traceability:

This standard has been gravimetrically prepared using balances that have been fully qualified and calibrated to ISO 17025 requirements. All calibrations utilize NIST traceable weights which are calibrated externally by a qualified ISO 17025 accredited calibration laboratory to NIST standards. Qualification of each balance includes the assignment of a minimum weighing by a qualified and ISO 17025 accredited calibration vendor taking into consideration the balance and installed environmental conditions to ensure compliance with USP tolerances of NMT 0.10% relative error. Fill volume to predetermined specifications is gravimetrically verified throughout the dispensing process using qualified and calibrated balances. Further traceability to a corresponding Primary Standard may be achieved through a direct comparison assay. Where a Primary Standard is available, the assay value will be included in the specified section of the COA.

Associated uncertainty:

Ucrm - Uncertainty values in this document are expressed as Expanded Uncertainty (Ucrm) corresponding to the 95% confidence interval. Ucrm is derived from the combined standard uncertainty multiplied by the coverage factor k, which is obtained from a t-distribution and degrees of freedom. The components of combined standard uncertainty include the uncertainties due to characterization, homogeneity, long term stability, and short term stability (transport). The components due to stability are generally considered to be negligible unless otherwise indicated by stability studies. The mathematical representation of the Ucrm calculation is as follows:

$$U_{CRM} = \sqrt{U_{char}^2 + U_{homogeneity}^2 + U_{stability}^2}$$

Homogeneity assessment:

Homogeneity was assessed in accordance with ISO Guide 35. Completed units were sampled using a random stratified sampling protocol. The results of chemical analysis were then compared by Single Factor Analysis of Variance (ANOVA). The uncertainty due to homogeneity was derived from the ANOVA. Heterogeneity was not detected under the conditions of the ANOVA.

Stability assessment:

Significance of the stability assessment will be demonstrated if the analytical result of the study and the range of values represented by the Expanded Uncertainty do not overlap the result of the original assay and the range of its values represented by the Expanded Uncertainty. The method employed will usually be the same method used to characterize the assay value in the initial

Certificate of analysis revision history:

Certificate version	Date	Reason for version
LRAC3241.01	19-Jul-2019	Original Release Date
LRAC3241.02	12-Apr-2021	ELUTION TIMES ADDED

Disclaimer: The purchaser is required to determine the suitability of this product for any particular application. Sigma-Aldrich RTC makes no warranty of any kind, express or implied, other than its products meet all quality control standards set by Sigma-Aldrich RTC. We do not guarantee that the product can be used for any particular application.

The vibrant M, Supelco, TraceCERT and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. © 2018 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All Rights Reserved.

The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the US and Canada.



Certificate of Analysis

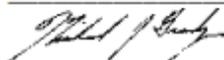
Product Name:

Methyl trans-vaccenate - ≥99% (capillary GC), liquid

Product Number: V1381
Batch Number: MKCK7622
Brand: SIGMA
CAS Number: 6198-58-9
MDL Number: MFCD00064484
Formula: C19H36O2
Formula Weight: 296.49 g/mol
Storage Temperature: Store at -20 °C
Quality Release Date: 20 AUG 2019



Test	Specification	Result
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Appearance (Color)	Colorless to Faint Yellow	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity by Gas Chromatography	≥ 99 %	99 %



Michael Grady, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

10.2 ANEXO 2. Certificación del material de referencia secundario utilizado para el equipo FTIR.



COLAVECO

Parque El Retiro - Entre Calle Brasil y C. Hugo s/n
Aeropuerto de Carrasco
70300 NUEVA HELVECIA
URUGUAY

Poligny, Tuesday, 26 October, 2021

SECONDARY REFERENCE MATERIALS FATTY ACID IN MILK 11/2021														
	C4:0 • (g/l)	C6:0 • (g/l)	C8:0 • (g/l)	C10:0 • (g/l)	C12:0 • (g/l)	C14:0 • (g/l)	C14:1 total (g/l)	C16:0 • (g/l)	C16:1 total (g/l)	C17:0 total (g/l)	C18:0 • (g/l)	C18:1 9c • (g/l)	C18:1 total • (g/l)	C18:2 total (g/l)
Selon NF ISO 15885/FIL 184														
ETG II AGIR 1	0,92	0,58	0,33	0,71	0,82	2,89	0,24	7,20	0,44	0,38	2,48	5,24	6,83	1,02
ETG II AGIR 2	1,16	0,73	0,42	0,89	1,04	3,65	0,30	9,09	0,56	0,47	3,13	6,61	8,61	1,29
ETG II AGIR 3	1,40	0,88	0,51	1,08	1,26	4,41	0,36	10,97	0,67	0,57	3,78	7,99	10,40	1,55
ETG II AGIR 4	1,64	1,03	0,59	1,26	1,47	5,17	0,43	12,86	0,79	0,67	4,43	9,36	12,19	1,82
ETG II AGIR 5	1,86	1,17	0,67	1,43	1,67	5,87	0,48	14,61	0,89	0,76	5,03	10,63	13,85	2,07
	C18:3 n-3 (g/l)	SFA • (g/l)	UFA • (g/l)	MUFA • (g/l)	PUFA • (g/l)	De novo (g/l)	Mixed (g/l)	Preformed (g/l)						
Selon NF ISO 15885/FIL 184														
ETG II AGIR 1	0,21	17,24	9,21	7,79	1,31	7,08	8,11	10,66						
ETG II AGIR 2	0,27	21,83	11,66	9,87	1,66	8,97	10,27	13,50						
ETG II AGIR 3	0,32	26,29	14,04	11,89	2,00	10,80	12,37	16,25						
ETG II AGIR 4	0,38	31,11	16,61	14,06	2,37	12,78	14,63	19,23						
ETG II AGIR 5	0,43	35,41	18,91	16,01	2,70	14,55	16,66	21,89						

De novo "class" corresponds to sum of C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C14:1 and C15:0

Mixed "class" corresponds to sum of C16:0, C16:1 and C17:0
Preformed "class" corresponds to sum of C18:0, C18:1, C18:2 and C18:3

Mean of 8 results from 4 expert laboratories after elimination of aberrant values and checked by 15 results by 3 laboratories by automatic instruments for • the criteria

10.3 ANEXO 3A. Registro de datos del primer conjunto de muestras (N: 44) para los grupos de AG de leche bovina obtenidos por FTIR y GC

ID	SFA FTIR	SFA GC	UFA FTIR	UFA GC	MUFA FTIR	MUFA GC	PUFA FTIR	PUFA GC	C16:0 FTIR	C16:0 GC	C18:0 FTIR	C18:0 GC	C18:1 C9 FTIR	C18:1 C9 GC	Cis Fat FTIR	Cis Fat GC	Trans Fat FTIR	Trans Fat GC
326	18,60	18,18	7,43	7,73	6,29	7,05	1,01	0,66	7,31	9,31	3,12	1,87	4,21	5,64	0,41	6,93	0,10	0,59
440	24,93	17,80	7,56	6,35	6,28	5,70	1,13	0,65	9,84	9,80	3,74	1,39	3,94	5,33	0,41	7,34	0,12	0,42
562	30,11	17,91	11,09	7,46	9,40	6,86	1,40	0,60	12,29	8,14	5,46	2,99	6,81	5,53	0,78	6,82	0,10	0,62
329	16,83	17,99	6,39	7,26	5,49	6,45	0,8	0,82	6,45	9,86	3,01	2	3,93	5,52	0,35	7,04	0,05	0,06
600	31,85	17,88	11,98	6,58	9,85	5,83	1,91	0,72	12,24	7,98	5,42	2,63	6,68	5,39	0,82	6,29	0,18	0,13
410	28,96	19,93	7,86	5,79	6,5	5,22	1,16	0,57	12,29	10,7	4,09	1,29	3,96	3,82	0,42	5,17	0,14	0,47
390	33,19	18,22	12,23	6,89	10,13	6,42	1,83	0,46	12,62	10,04	5,82	1,38	6,84	4,71	0,82	6,82	0,21	0,68
519	19,91	18	7,35	7,43	6,17	6,89	1,06	0,53	7,71	9,73	3,38	2,24	3,65	5,26	0,36	6,6	0,15	0,93
426	18,56	17,75	7,48	7,85	6,32	7,1	0,99	0,75	7,46	9,48	3,03	2,07	4,17	5,17	0,42	6,76	0,08	0,06
31	19,15	31,34	5,72	13,21	4,76	12,43	0,87	0,78	6,63	13,300	3,26	4,250	2,92	4,840	0,25	8,540	0,07	6,970
65	29,56	30,06	10,46	10,23	8,041	9,53	1,82	0,69	10,62	12,860	5,03	3,390	4,92	6,670	0,58	8,540	0,26	1,692
21	29,56	30,05	9,85	10,36	8,02	9,99	1,62	0,37	10,11	12,570	6,04	6,410	4,7	7,840	0,54	8,773	0,22	1,590
44	28,2	31,89	7,15	8,35	5,8	19,29	1,14	0,32	10,09	15,660	5,13	4,180	2,99	5,900	0,31	6,956	0,15	1,395
16	19,15	30,49	5,72	8,89	4,76	7,75	0,87	1,14	6,63	12,340	3,26	3,290	2,92	5,420	0,25	6,876	0,07	1,519
50	19,13	29,78	6,66	10,09	5,7	9,31	0,83	0,78	6,72	12,390	3,85	4,740	3,6	6,460	0,33	8,183	0,09	1,908
26	19,43	29,13	6,52	11,05	5,19	1,45	1,2	0,60	6,41	12,590	3,51	4,220	3,25	7,800	0,31	9,275	0,1	1,779
36	23,57	27,33	9,65	11,75	7,95	11,09	1,52	0,66	7,88	11,750	4,93	4,650	5,15	8,500	0,57	9,755	0,17	1,998
99	35,35	23,42	10,01	10,14	8,08	8,64	1,75	1,50	7,99	10,440	5,22	4,215	5,24	7,518	0,61	9,523	0,18	1,635
10	26,3	23,01	11,01	10,77	8,79	9,18	2,07	1,60	7,61	8,957	5,56	5,022	5,23	8,240	0,63	10,260	0,28	1,453
36	29,28	24,40	10,72	9,10	8,72	8,26	1,78	0,84	9,87	10,527	5,85	4,573	5,5	7,154	0,65	8,983	0,22	1,378
118	26,88	21,59	13,09	11,27	10,8	9,67	1,97	1,60	8,73	9,413	6,76	5,700	7,26	8,785	0,87	10,677	0,22	2,168
121	24,97	23,22	11,03	10,24	8,99	8,74	1,84	1,50	7,99	8,698	5,7	5,616	6,06	8,284	0,69	9,790	0,21	1,120
15	23,02	22,19	10,6	10,87	8,83	9,19	1,62	1,68	7,58	8,078	4,89	6,121	5,37	8,727	0,64	10,351	0,2	0,290
83	26,16	24,02	9,9	9,13	8,12	7,77	1,59	1,36	8,38	9,352	5,61	5,522	4,97	7,049	0,58	8,563	0,19	2,012
97	15,48	22,84	6,36	10,24	5,38	8,60	0,9	1,64	4,9	9,043	3,1	5,197	3,68	7,840	0,33	8,633	0,06	2,003
111	15,9	25,16	6,07	8,64	4,91	7,38	1,03	1,26	4,99	10,088	3,14	4,107	3,08	6,551	0,28	8,212	0,07	1,551
1200	19,07	17,95	10,37	10,60	8,89	9,83	1,52	0,77	5,95	7,416	4,64	4,575	6,11	8,180	0,65	9,182	0,19	1,437
1146	20,43	18,10	10,97	3,01	8,99	2,06	1,85	0,94	6,36	6,838	4,39	3,883	5,63	0,093	0,65	1,364	0,25	1,645
1180	22,35	19,03	10,79	9,83	8,98	9,21	1,71	0,62	6,89	7,972	4,42	2,663	6,02	7,237	0,69	8,682	0,2	1,148
1203	23,3	19,44	10,72	2,89	8,73	2,09	1,79	0,80	8,17	7,905	4,72	3,727	6,02	0,086	0,68	1,566	0,18	1,322
1156	26,21	18,50	13,88	10,23	11,12	8,86	2,37	1,37	8,13	7,968	5,67	2,794	7,12	7,036	0,88	8,218	0,32	1,369
1155	24,06	17,97	9,89	10,80	8,11	9,43	1,63	1,37	7,66	8,135	4,75	2,918	5,15	7,586	0,59	8,715	0,19	1,442
1213	20,15	19,60	9,28	8,57	7,61	7,84	1,54	0,72	6,67	8,199	4,04	3,565	4,91	7,152	0,54	8,500	0,17	0,000
1115	25,13	18,57	13,54	2,63	11,17	2,38	2,17	0,25	7,86	7,121	5,73	3,917	7,58	0,000	0,89	0,924	0,29	1,708
1217	28,95	19,00	12,09	3,29	9,76	2,06	2,08	1,23	9,48	7,757	5,74	3,876	6,26	0,000	0,78	1,734	0,23	1,203
335	26,42	24,36	11,53	9,65	9,39	8,79	1,96	0,86	8,74	10,519	5,39	3,898	5,96	7,930	0,7	9,435	0,29	0,197
528	31,93	23,67	15,18	3,60	12,28	2,73	2,62	0,87	10,11	9,923	7,05	4,660	8,01	0,000	1	1,351	0,34	2,246
56	25,22	24,85	9,58	11,69	7,32	10,54	1,96	1,15	8,66	10,604	4,12	4,431	3,63	8,061	0,48	9,664	0,27	2,022
254	16,75	25,01	8,3	11,15	6,95	10,19	1,23	0,97	5,5	10,300	3,75	5,295	4,82	9,333	0,47	10,968	0,13	0,184
109	14,15	25,99	5,71	11,25	4,61	9,79	1	1,46	4,37	9,853	2,54	5,408	2,8	8,064	0,23	9,785	0,1	1,465
62	23,04	25,58	8,78	1,73	7,06	0,47	1,51	1,26	8,23	9,819	3,98	4,973	3,97	0,000	0,44	1,604	0,21	0,127
51	20,36	23,21	9,08	2,03	7,19	0,64	1,67	1,39	6,56	9,066	3,64	5,003	3,97	0,000	0,45	1,752	0,24	0,278
131	19,59	24,55	9,11	11,24	7,51	10,32	1,46	0,92	6,3	11,024	4,13	3,404	5,21	7,806	0,55	9,916	0,14	1,322
87	31,11	26,20	12,26	10,99	9,97	10,34	2	0,65	10,73	10,515	6,47	5,090	6,74	7,686	0,79	9,109	0,23	1,884

SFA: ácidos grasos saturados; UFA: ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; C16: ácido palmítico;

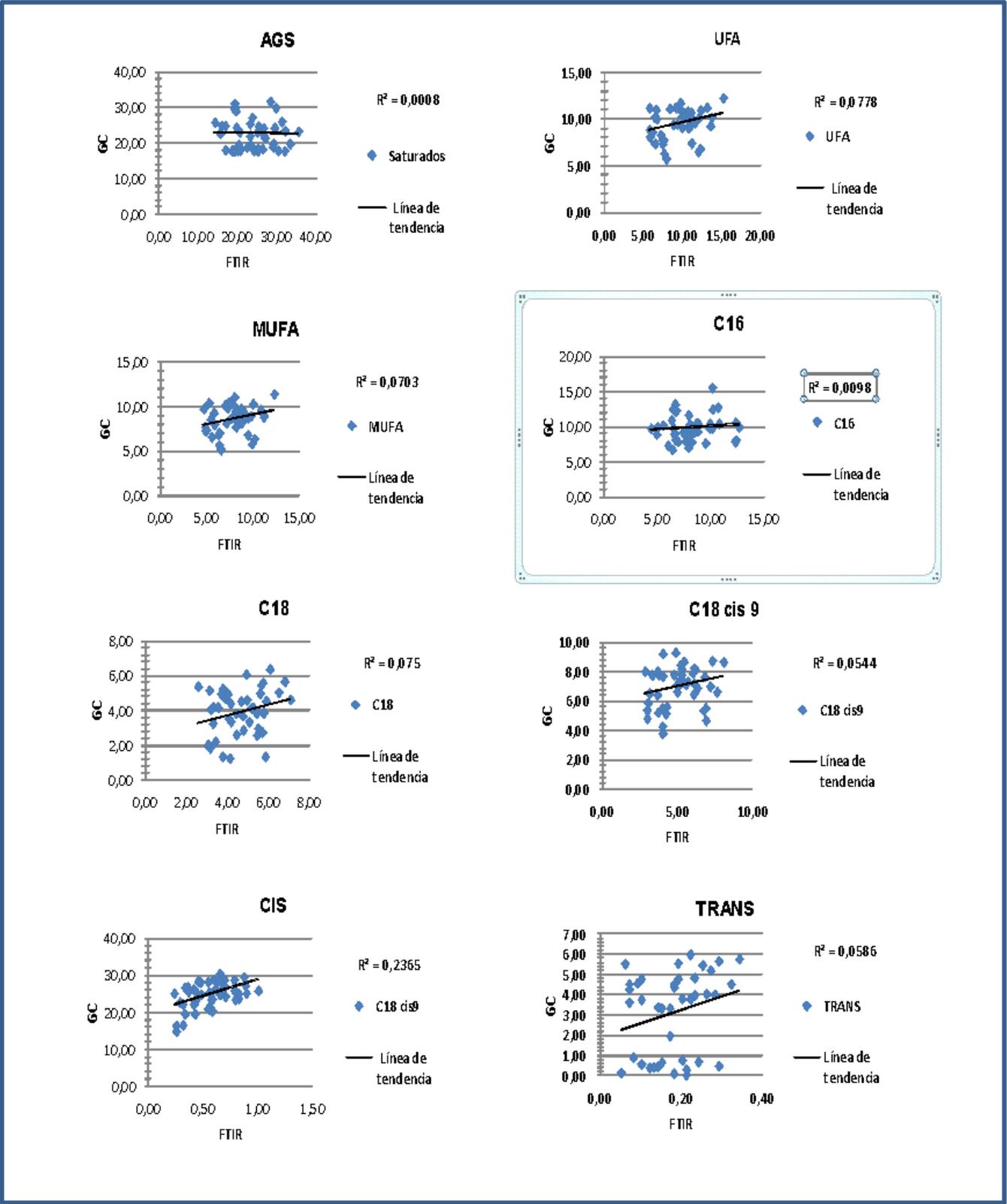
C18: acido esteárico; C18:1C9: acido oleico; Cis: ácidos grasos insaturados con doble enlace; Trans: ácidos grasos Trans.
Valores de materia grasa expresados en g/l.

10.3 ANEXO 3B. Registro de datos del segundo conjunto de muestras(N: 8) para los grupos de AG de leche bovina obtenidos por FTIR y GC

ID	SFA FTIR	SFA GC	UFA FTIR	UFA GC	MUFA FTIR	MUFA GC	PUFA FTIR	PUFA GC	C16:0 FTIR	C16:0 GC	C18:0 FTIR	C18:0 GC	C18:1C9 FTIR	C18:1C9 GC	Cis Fat FTIR	Cis Fat GC	Trans Fat FTIR	Trans Fat GC
187	23,04	22,27	9,32	9,11	7,96	8,44	1,21	0,67	9,31	11,238	4,48	2,501	5,57	6,032	0,62	23,566	0,09	3,859
13	24,32	21,37	10,01	10,55	8,13	9,50	1,74	1,04	8,08	10,46	4,88	2,712	5,67	6,896	0,65	27,272	0,15	4,498
157	26,27	20,73	13,56	11,25	11,36	10,49	2,03	0,76	8,4	9,769	5,91	3,195	7,92	8,037	0,92	29,906	0,27	3,968
79	27,35	20,01	14,88	12,01	12,31	11,00	2,35	1,01	8,56	8,529	6,87	4,314	9,06	9,184	1,07	33,158	0,25	3,012
181	26,69	22,08	11,01	9,92	9,13	9,00	1,69	0,92	9,28	10,343	5,65	3,548	6,24	6,528	0,71	24,709	0,2	5,168
152	28,86	22,50	11,30	9,41	9,46	8,76	1,66	0,64	9,88	10,67	6,31	3,724	6,47	6,184	0,71	23,792	0,23	4,543
30	23,84	22,02	9,35	9,89	7,9	9,12	1,26	0,77	8,83	10,374	4,73	3,635	5,43	6,57	0,6	24,705	0,13	5,079
96	27,96	22,78	10,91	9,26	9,07	8,41	1,64	0,86	10,15	11,465	5,4	2,799	5,93	5,819	0,68	23,373	0,21	4,527

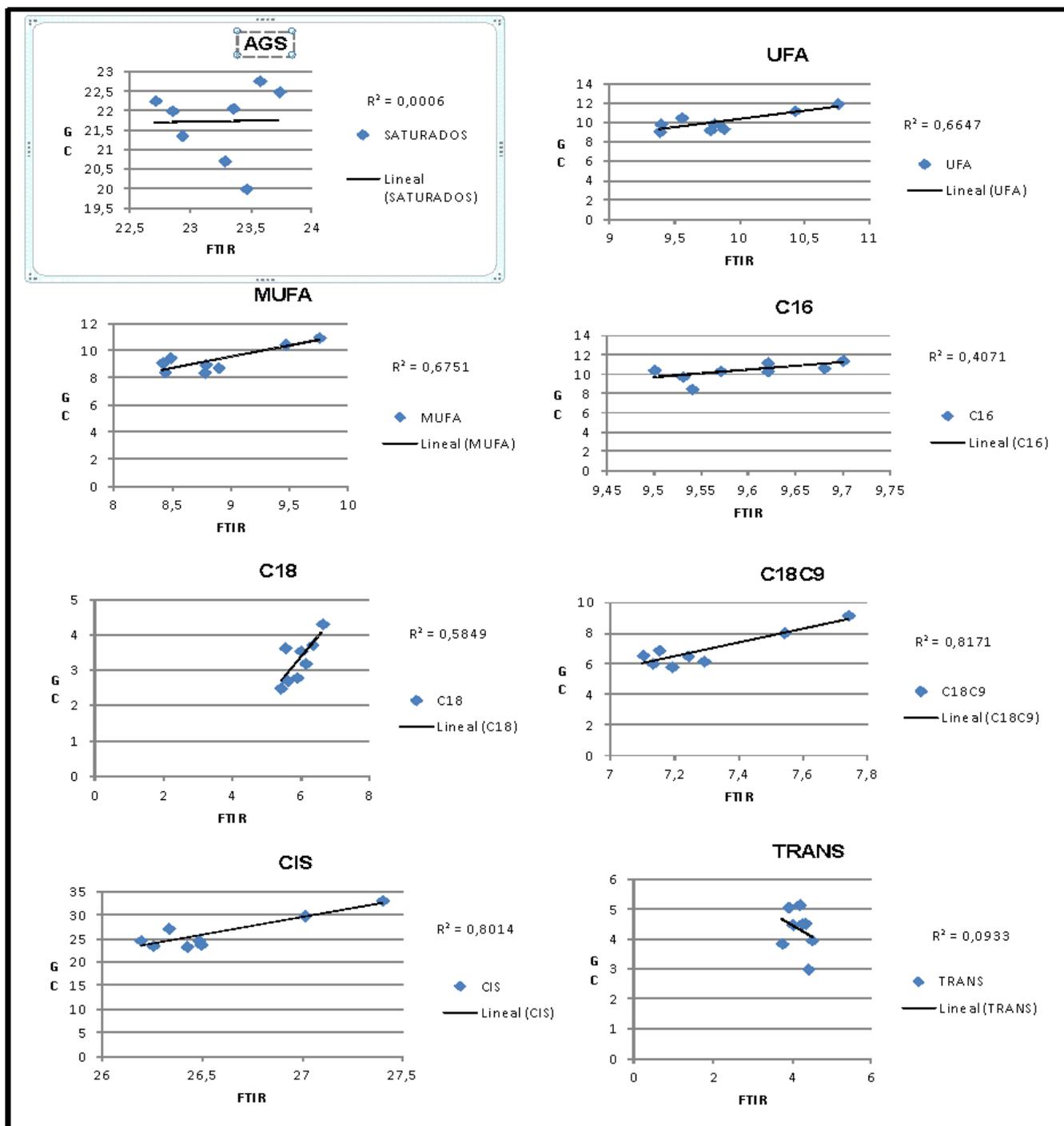
SFA: ácidos grasos saturados; UFA: ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; C16: acido palmítico; C18: acido esteárico; C18:1C9: acido oleico; Cis: ácidos grasos insaturados con doble enlace; Trans: ácidos grasos Trans.
Valores de materia grasa expresados en g/l

10.4 ANEXO 4: Gráficos de GC vs FTIR con los valores de los grupos de AG del primer conjunto de muestras utilizadas para el ajuste de curvas del FTIR (N=44).



SFA: ácidos grasos saturados; UFA: ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; C16: ácido palmítico; C18: ácido esteárico; C18:1C9: ácido oleico; Cis: ácidos grasos insaturados con doble enlace; Trans: ácidos grasos Trans. Valores de materia grasa expresados en g/l

10.5 ANEXO 5. Gráficos de GC vs FTIR con los valores de los grupos de AG del segundo conjunto de muestras utilizadas para validar el ajuste del FTIR (n=8)



SFA: ácidos grasos saturados; UFA: ácidos grasos insaturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; C16: ácido palmítico; C18: ácido esteárico; C18:1C9: ácido oleico; Cis: ácidos grasos insaturados con doble enlace; Trans: ácidos grasos Trans. Valores de materia grasa expresados en g/l.