



# **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS SEGÚN LA AOAC 991.43**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**CURSO: 2018 – 2019**

**Alumna: Patricia Otal Moral**  
**Tutor académico: Pedro Antonio Caballero Calvo**  
**Directora del trabajo: Sandra Gómez Juez**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. VALIDACIÓN DE UN ENSAYO FÍSICO-QUÍMICO.....	3
1.1.1. Intervalo o rango de trabajo.....	3
1.1.2. Límite de cuantificación (LOQ).....	3
1.1.3. Exactitud.....	3
1.1.4. Incertidumbre.....	5
1.2. DETERMINACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS.....	6
1.2.1. Métodos enzimático-gravimétricos.....	7
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. REACTIVOS.....	8
3.2. EQUIPOS DE MEDIDA Y SOFTWARE.....	9
3.3. MATERIALES DE REFERENCIA E INTERCOMPARATIVO.....	10
3.4. MÉTODO DE VALIDACIÓN.....	11
3.4.1. Protocolo de validación.....	11
3.4.2. Proceso analítico.....	11
3.4.3. Determinación de fibra dietética total.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. CELITE 545.....	14
4.2. MATERIAL MRAIB0441 (PAN).....	15
4.3. MATERIAL MRAIB0455 (CEREALES CON VITAMINAS).....	16
4.4. MATERIAL MRAIB0430 (GALLETA MANTEQUILLA).....	17
4.5. MATERIAL MRAIB0452 (BIZCOCHO).....	19
4.6. MATERIAL MRAIB0469-1 (PISTACHOS).....	20
4.7. MATERIAL INTERCOMPARATIVO 333077 (PASAS).....	21
4.8. ESTUDIO DE NUEVOS PARÁMETROS EN EL PROCESO ANALÍTICO.....	23
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26



## **RESUMEN**

En el presente trabajo se describe el desarrollo de la validación de un método analítico, para la determinación de la fibra dietética en alimentos según la AOAC 991.43, así como el diseño de su procedimiento analítico para la empresa AGROLAB IBÉRICA S.L.U. La validación se llevó a cabo para 6 materiales de referencia y un intercomparativo durante un período de 10 días, siendo las matrices alimentarias del tipo cereales y derivados, bollería, pan y frutos secos. Los parámetros de validación estudiados fueron la precisión, la exactitud y la incertidumbre bajo condiciones de reproducibilidad. No se obtuvieron los resultados esperados de fibra dietética, incumpliendo el rango óptimo de los parámetros anteriores. Se hace necesaria una modificación y un replanteamiento del proceso analítico a distintos niveles enfocado a una validación posterior.

## **ABSTRACT**

The present work describes the development of the validation of an analytical method, for the determination of dietary fiber in food according to AOAC 991.43, as well as the design of its analytical procedure for the company AGROLAB IBÉRICA S.L.U. The validation was carried out for 6 reference materials and one intercomparative over a period of 10 days, being the food matrices of the type cereals and derivatives, pastries, bread and nuts. The validation parameters studied were precision, accuracy and uncertainty under reproducibility conditions. The expected results of dietary fiber were not obtained, breaching the optimal range of the above parameters. It is necessary to modify and rethink the analytical process at different levels focused on a subsequent validation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La validación de un método de ensayo es una actividad que contribuye a garantizar la vigencia de los resultados de un laboratorio, debiendo confirmar que este se comporta de forma adecuada en todo el rango de matrices de ensayo. Es un proceso que comprende un conjunto de pruebas sistemáticas y programadas que han de tener en cuenta todas las etapas del análisis de rutina incluyendo la preparación de las muestras (extracción, pre-concentración, etc.) y cualquier tratamiento aplicado a las mismas. Por tanto, una validación permite comprobar las características de medición en las que se basa un ensayo para su uso pretendido (AOAC, 2002).

La demanda de un método analítico preciso para la determinación de la fibra dietética total (FDT) en alimentos se ha incrementado en los últimos años, respondiendo a la necesidad de profundizar en el conocimiento del valor nutricional de los alimentos, tanto por parte de la industria alimentaria como por parte del consumidor final.

El concepto de *fibra dietética* (FD) ha cambiado considerablemente en los últimos años, estando actualmente definido por la Comisión del Codex Alimentarius de la siguiente manera: "La fibra dietética está compuesta de polímeros de carbohidratos con diez o más unidades monoméricas que no son hidrolizadas por las enzimas endógenas en el intestino delgado de los humanos". La decisión con respecto a la inclusión de oligosacáridos no digeribles en la definición se dejó a las autoridades nacionales (Codex Alimentarius, 2008). Es un componente de la dieta que puede proporcionar beneficios para la salud cuando se consume regularmente (Tobaruela et al. 2018), como son la prevención de la presencia de enfermedades (diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, etc). De igual modo tiene efectos sobre las propiedades funcionales, tecnológicas y organolépticas de los alimentos (Matos & Chambilla, 2010).

Existen dos estrategias para llevar a cabo una validación. La primera de ellas se centra en el uso de resultados de diferentes interlaboratorios, participantes en estudios colaborativos para un determinado analito en una matriz dada. Esta será empleada en el desarrollo de metodologías de gran alcance a partir de un método normalizado disponible, siendo el caso del presente trabajo. La segunda estrategia consiste en una validación de forma individual sin considerar resultados previos de otros laboratorios. (Morillas, 2016).

La necesidad de llevar a cabo la validación para su cuantificación en el laboratorio de Burgos para la empresa AGROLAB GROUP, viene dada por dos factores: el reconocimiento como laboratorio acreditado para un determinado análisis, demostrando su capacidad técnica para realizarlo; y el consiguiente beneficio económico por llevar a cabo el mencionado análisis, ya que actualmente, este es destinado al laboratorio de Tarragona, único en España validado para dicho análisis.

## **1.1. VALIDACIÓN DE UN ENSAYO FÍSICO-QUÍMICO**

En la validación de un método de ensayo físico-químico (FQ) se evalúan una serie de parámetros estadísticos, como son: selectividad, rango de trabajo, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez, precisión, veracidad (sesgo o bias) e incertidumbre. Estos son esenciales para agrupar los datos obtenidos y realizar un análisis objetivo de las diferencias entre conjuntos de datos. El laboratorio es el que decide cuáles son los que deben ser investigados para validar el método. A continuación se presentan las seleccionadas en este caso.

### **1.1.1. Intervalo o rango de trabajo**

Intervalo en el que el parámetro analítico puede ser determinado con una veracidad y precisión establecidas y proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. Los ensayos para calcularlo deben realizarse para diferentes niveles de concentración, incluyendo el límite de cuantificación del método (Morillas Bravo, 2016).

### **1.1.2. Límite de cuantificación (LOQ)**

LOQ es la cantidad de analito presente derivada de la menor señal analítica que puede ser medida con precisión y exactitud. Está relacionado con la sensibilidad del método (Morillas Bravo, 2016).

### **1.1.3. Exactitud**

La exactitud indica la proximidad entre el resultado obtenido por un método y el valor "real". Es un parámetro cualitativo y para describir el error asociado a un resultado, hace falta un parámetro que permita medir la exactitud cuantitativamente. Este parámetro es el error, que se divide en dos componentes: la veracidad y la incertidumbre.

- **Veracidad**

Parámetro que expresa la proximidad de la media de una serie de resultados obtenidos, al valor real. Se expresa en términos de error o bias, definido como la diferencia entre el resultado de medida y el valor real. Se relaciona con errores sistemáticos y guarda una relación inversa con la veracidad del método. Debe calcularse sobre un mínimo de 10 resultados con las ecuaciones 1, 2 y 3, que permiten calcular el error o sesgo, el error relativo porcentual y la recuperación aparente respectivamente. Este último término se expresa en términos de porcentaje y se define como la cantidad del analito recuperada en la porción de muestra que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo (OSA, 2017).

$$\text{bias} = \bar{V} - V_{\text{ref}} \quad (1).$$

$$\text{bias (\%)} = \frac{\bar{V} - V_{\text{ref}}}{V_{\text{ref}}} \times 100 \quad (1).$$

$$R (\%) = \frac{\bar{V}}{V_{\text{ref}}} \times 100 \quad (2).$$

Donde:

- V es el valor obtenido en el laboratorio.
- Vref es el valor de referencia del material de referencia (MR).
- $\bar{V}$  es el valor medio de los resultados obtenidos.

Las validaciones con R (%) <60–70% indican pérdida de analito y deben estar sujetas a investigaciones que conduzcan a mejoras y las R (%) >110% sugieren la necesidad de mejores extracciones del mismo (AOAC, 2002).

- **Precisión**

Es el grado de concordancia entre los valores obtenidos por medidas repetidas en la misma muestra o similar, dando cuenta de su proximidad y relacionándose con errores aleatorios. Se determina como desviación estándar del conjunto de valores, guardando relación inversa con la precisión. Se divide en dos parámetros: repetibilidad (desviación estándar tras analizar una misma muestra varias veces en un tiempo corto sin cambiar de equipo medida, reactivos o analista); y reproducibilidad (desviación estándar tras analizar varias veces la muestra en días distintos, variando equipo, reactivos o analistas). En esta validación se trabaja en condiciones de reproducibilidad.

Su determinación debe realizarse en el rango de trabajo a varios niveles de concentración, incluyendo el LOQ (Morillas Bravo, 2016). La desviación estándar de reproducibilidad ( $S_{RW}$ ) ((3) se calcula sobre un mínimo de 10 resultados, expresada como desviación estándar relativa ( $S_{RW}(\%)$ ) o coeficiente de variación ( $CV\%$ ) ((4):

$$S_{RW} = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3).$$

$$CV\% = S_{RW(\%)} = \frac{SRW}{\bar{x}} \times 100 \quad (4).$$

Donde:

- $x_i$ : cada uno de los resultados obtenidos
- $\bar{x}$ : valor medio de los resultados obtenidos.
- $n$ : número de mediciones realizadas en condiciones de reproducibilidad.
- $u_{RW}$ : incertidumbre típica de reproducibilidad dentro del laboratorio.

#### 1.1.4. Incertidumbre

La incertidumbre expandida ( $U$ ) ((5) proporciona el intervalo en el que se espera encontrar el valor verdadero con una determinada probabilidad. Esta se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada ( $u_c$ ) ((6) por un factor de cobertura ( $k$ ). Las ecuaciones 8 y 9 expresan la incertidumbre típica del bias y la del MR respectivamente.

$$U = u_c \times k \quad (5).$$

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_{bias}^2} \quad (6).$$

$$u_{bias} = \sqrt{bias(\%)^2 + \left(\frac{s \text{ bias}(\%)}{\sqrt{n}}\right)^2 + u_{cref}(\%)^2} \quad (7).$$

$$u_{cref} = \frac{V_{max} - V_{min}}{4} / \sqrt{n} \quad (8).$$

Donde:

- $u_{RW}$ : incertidumbre típica de reproducibilidad dentro del laboratorio =  $S_{RW}$ .
- $u_{bias}$ : incertidumbre típica del bias (sesgo).

- $S_{bias}$  (%): desviación estándar de las mediciones realizadas sobre el material de referencia.
- n: número de repeticiones realizadas.
- $u_{Cref}$ : incertidumbre típica del material de referencia.
- $k = 2$ , implicando una probabilidad del 95% de contener el valor verdadero, asumiendo una distribución normal.
- $V_{max}$  y  $V_{min}$ : valores máximos y mínimos obtenidos del MR.

Esta estimación se debe hacer a todas las matrices a las que aplique el método y en los distintos rangos. La combinación de las componentes de incertidumbre debidas a la veracidad del método (error sistemático) y la reproducibilidad (error aleatorio) puede dar una aproximación aceptable en la estimación de la incertidumbre de un método analítico.

## 1.2. DETERMINACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA EN ALIMENTOS

Los métodos analíticos se pueden clasificar en normalizados, normalizados modificados y no normalizados. En el primer caso, el método de ensayo se aplica exactamente como está descrito en referencias reconocidas internacional, nacional o regionalmente. En el segundo caso, se lleva a cabo una modificación en el proceso y los no normalizados, son métodos de ensayo sin referencias reconocidas internacionalmente (OSA, 2017).

La Comisión del Codex Alimentarius recomienda distintos métodos bien establecidos de análisis de FD, separándolos en cuatro grupos: métodos generales oficiales que no miden la fracción de menor peso molecular; métodos generales oficiales que miden las fracciones de peso molecular superior e inferior; métodos específicos oficiales, desarrollados para cuantificar componentes específicos de FD individuales; y otros métodos (métodos no oficiales) (Codex Alimentarius, 2009).

En el caso de los oficiales, los más empleados son los generales de AOAC 985.29 y AOAC 991.43 enzimático-gravimétricos, siendo los empleados en este proyecto. Sin embargo, no cuantifican los compuestos presentes en la fracción de FD de bajo peso molecular (LMWDF, por sus siglas en inglés), o el almidón resistente en su totalidad (Tobaruela et al. 2018).

Así, el desarrollo de nuevos métodos comenzó a resolver tales deficiencias, como son los enzimático-gravimétricos AOAC 2009.01 y AOAC 2011.25, que cuantifican la mayoría de los componentes del FD incluidos en la definición propuesta por el Codex Alimentarius, junto con la fracción LMWDF. El primero de ellos cuantifica la FDT, incluyendo tanto la fibra dietética de peso molecular más alto (HMWDF) como la LMWDF. El segundo es una extensión del método anterior que cuantifica la FDT y sus fracciones insolubles y solubles por separado: fibra dietética soluble de alto peso molecular (HMWSDF), y fibra dietética soluble de bajo peso molecular (LMWSDF). En cuanto a las matrices alimentarias de análisis de la fibra, la evaluación de su contenido en frutas utilizando los dos últimos métodos aún es limitada y está subestimada cuando se analiza con métodos "tradicionales". Por ello se considera que los métodos AOAC 985.29 y 991.43 no pueden cuantificar los fructanos (fructooligosacáridos) de esta matriz alimentaria (Tobaruela et al. 2018) no siendo estudiadas, por tanto, en el presente trabajo.

### **1.2.1. Métodos enzimático-gravimétricos**

Se basan en digerir las proteínas e hidratos de carbono con enzimas, pudiendo determinarse la fibra insoluble sola o por precipitación con alcohol, incluyendo la fibra soluble y determinándose separadas o juntas. Los métodos más adecuados son el de Prosky et al., 1988 (Método AOAC 985.29) y Lee et al., 1992 (Método AOAC 991.43) (citado por FAO 1997), que han sido reconocidos como métodos oficiales de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), para la determinación de la fibra dietética total, fibra insoluble y soluble. Las principales ventajas de estos métodos son su relativa exactitud y precisión; y comparados a otros procedimientos, son simples, económicos y sencillos, sin requerir una alta inversión de capital. Sin embargo, no dan información detallada sobre los componentes de la FDT (Araya, 1997).

Estos métodos se consideran los más adecuados en el análisis de rutina para el etiquetado de la fibra y propósitos de control de calidad. El Reglamento (UE) nº 1169/2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, introduce un etiquetado obligatorio sobre información nutricional para la mayoría de los alimentos transformados cuyos elementos a declarar son: valor energético, grasas, grasas saturadas, hidratos de carbono, azúcares, proteínas y sal. Se puede complementar voluntariamente con los valores de otros nutrientes como: ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, azúcares polialcoholes, almidón, fibra alimentaria, vitaminas o minerales (AECOSAN, 2017).

## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal la validación y puesta a punto de un método de cuantificación del contenido en fibra dietética enfocado a una posterior acreditación. Los objetivos específicos de este estudio son los siguientes:

- Conocer el procedimiento de validación de métodos físico-químicos de la FDT así como la implantación y desarrollo de la puesta a punto de los mismos.
- Determinar del contenido en FDT alimentaria mediante un procedimiento práctico en el laboratorio en distintas matrices alimentarias.
- Realizar el análisis estadístico y tratamiento de datos obtenidos en el proceso experimental, así como la determinación de la incertidumbre.

Adicionalmente, con este trabajo se ha fomentado el desarrollo de ciertas competencias generales y específicas, siendo las más significativas las citadas a continuación:

- Conocer los fundamentos y aplicaciones de las diferentes técnicas de extracción de fibras empleadas en la labor investigativa.
- Desarrollar habilidades relacionadas con el trabajo empresarial en equipo, la búsqueda de bibliografía especializada y una correcta comunicación oral y escrita.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. REACTIVOS

Para el desarrollo del estudio se han empleado los siguientes reactivos: etanol absoluto ( $\text{H}_3\text{CCH}_2\text{OH}$ , 99,9% pureza, VWR), acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ , 100% pureza, VWR), éter de petróleo 40/60 (99% pureza, VWR), éter dietílico ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ , 99% pureza, MERK-MILLIPORE), Celite 545 (H33152, FOSS), ácido 2-morfolinoetanol sulfónico monohidratado (MES) ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ , 99% pureza, PANREAC), tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ , 100% pureza, VWR), hidróxido de sodio 1 M (NaOH, 99% pureza, VWR), ácido clorhídrico 1 M (HCl, 99% pureza, SCHARLAU), ácido clorhídrico 0,1 M (HCl, 99% pureza, SCHARLAU), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95% pureza, VWR), patillas catalizadoras (3,5 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ /0,4 g  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , FOSS), azul de bromotimol ( $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$ , 99% pureza, ALFA AESAR), ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2% pureza, VWR), hidróxido de sodio (NaOH, 32% pureza, VWR) y tierra de diatomeas (99% pureza, VWR).

Los kits de ensayos enzimáticos comerciales se adquirieron a Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Irlanda) con  $\alpha$ -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa (Megazyme, 2017) y la solución de Buffer MES-TRIS a pH = 8,2 que se preparó a partir de  $9,76 \pm 0,05$  g MES y  $6,1 \pm 0,05$  g TRIS en 800 ml de agua destilada con NaOH 1 N hasta alcanzar pH = 8,2 y posterior dilución a 1 litro con agua destilada.

Las soluciones de etanol al 95%, 85% y 78%, se prepararon con 950 ml, 850 ml y 780 ml de etanol absoluto respectivamente y se enrasaron a 1 litro de agua destilada. El ácido clorhídrico 0,325 M se preparó a partir de 325 ml HCl 1 M y con agua destilada hasta enrase de 1 litro. El naranja de metilo al 0,1% se elaboró disolviendo en agua destilada 0,1 g de naranja de metilo con posterior enrase hasta 100 ml con agua destilada.

### 3.2. EQUIPOS DE MEDIDA Y SOFTWARE

Para las distintas etapas del análisis se emplearon los siguientes equipos: rampa de filtrado, con su respectiva bomba de vacío y kitsatos; equipo de filtración FIBERTEC™ 1023 (FOSS, Hillerød, Dinamarca), con sus respectivos embudos de filtrado (FOSS, Hillerød, Dinamarca); digestor KJELDAHLTHERM® (GERHARDT, Königswinter, Alemania) acoplado a un sistema depurador de vapores que trabaja en las siguientes condiciones: 1 hora a 300°C y 2 horas y 20 minutos a 420°C; equipo de destilación VAPODEST® (GERHARDT, Königswinter, Alemania) con valorador automático controlado por un programa informático, empleando los siguientes programas:

- **Programa 1:** 82 ml H<sub>2</sub>O, 80 ml NaOH (32%), tiempo de destilado = 4 min, “online titration= pH 1”, tiempo de succión = 35 s, tiempo de recuperado de succión = 25 s, 70 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2%), “plausability criteria blank 0-0.3. Factor de conversión del %N a % proteína = 6,25.
- **Programa 2:** 82 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml NaOH (32%), tiempo de destilado = 4 min 30 s, “online titration= pH 1”, tiempo de succión = 35 s, tiempo de recuperado de succión = 25 s, 70 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2%), “plausability criteria blank 0-0.3. Factor de conversión del %N a % proteína = 6,25.
- **Programa 3:** 105 ml H<sub>2</sub>O, 80 ml NaOH (32%), tiempo de destilado = 6 min 30 s, “online titration= pH 1”, tiempo de succión = 25 s, tiempo de recuperado de succión = 25 s, 70 ml de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (2%), “plausability criteria blank 0-0.3. Factor de conversión del %N a % proteína = 6,25.

Las muestras se pesaron en balanzas analíticas y granatarias de 0,1 mg y 0,01 g de precisión respectivamente. En la digestión enzimática, se emplearon baños de agua de  $98\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$  con movilidad. Así mismo se usaron placas calefactoras, estufas de secado a  $103\pm 2^{\circ}\text{C}$  y a  $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ , muflas a  $525\pm 5^{\circ}\text{C}$ , un desecador, una nevera de refrigeración a  $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ , termómetros, un pH-metro Hanna y crisoles de vidrio filtrantes de porosidad nº 4 y 2 (FOSS, Hillerød, Dinamarca).

### 3.3. MATERIALES DE REFERENCIA E INTERCOMPARATIVO

Los materiales de referencia (MR) pueden ser cualquier material, en este caso matrices alimentarias, en los que se emplea como valor de referencia de la validación, el obtenido tras ser sometidos a análisis de interlaboratorios (valor asignado), permitiendo la posterior evaluación y comparación con el del laboratorio que quiere validar.

Estos se exponen en la Tabla 1, indicando dos rangos de trabajo, el primero es el asignado por los interlaboratorios tras el estudio realizado, y el segundo, el fijado por el laboratorio que está haciendo la validación. Este último se fija tras llevar a cabo un determinado número de análisis, cuyos resultados obtenidos, permitan determinar la incertidumbre de trabajo. En este caso, el rango de trabajo se fijó previamente en otro laboratorio de la misma empresa en un 10%, siendo el adoptado en este estudio.

Tabla 1. Materiales de referencia del proceso, con los valores asignados y rangos de aceptación.

MR	Referencia	Interlab*	Valor asignado (%)	Rango trabajo interlab*. (%)	Rango trabajo 10% (%)
Galleta de mantequilla	MRAIB0430	BIPEA	2,30	(1,60 - 3)	(2,07 - 2,53)
Pan	MRAIB0441	LGC	2,90	(1,90 – 3,90)	(2,61 - 3,19)
Biscocho	MRAIB0452	FAPAS	3,37	(2,45 – 4,29)	(3,03 – 3,71)
Cereales con vitaminas	MRAIB0455	BIPEA	7,80	(5,50 – 10,10)	(7,02 – 8,58)
Pistachos	MRAIB0469	BIPEA	8,30	(11,10 - 5,50)	(7,47 – 9,13)
Plato preparado con carne	MRAIB0472	BIPEA	3,50	(2,40 – 4,60)	(0,99 – 1,21)
Cereal	MRAIB0476	BIPEA	10,50	(7,60 – 13,30)	(9,45 – 11,55)

\* Interlab.= Interlaboratorio.

A su vez se validó un material intercomparativo 333077 (pasas), participando en el estudio de interlaboratorios sin conocer previamente del valor real en fibra. Tras su determinación se comunicó y determinó con el conjunto, siendo su valor asignado de 4,1% con un rango de trabajo de 3,69 % – 4,51%.

### 3.4. MÉTODO DE VALIDACIÓN

El trabajo de validación está precedido de una fase de desarrollo que consiste de tres pasos: establecimiento del protocolo, realización de la validación y realizar un informe.

#### 3.4.1. Protocolo de validación

Se ha de definir el responsable de la misma, en este caso la Directora Técnica del laboratorio. Se llevó a cabo el método de ensayo certificado por la AOAC 991.43. Durante la validación se hizo preciso determinar la reproducibilidad del proceso, por lo que se repitió el mismo análisis en días diferentes.

#### 3.4.2. Proceso analítico

Las muestras se recibieron homogenizadas y trituradas. Se pesó por duplicado (**Mm1** y **Mm2**) en un crisol de placa porosa nº4, la cantidad de muestra indicada en la Tabla 2 según el tipo de matriz a analizar. De igual modo se indicó si existía necesidad o no de someter a las matrices a un proceso de extracción de grasa/azúcar, en función de su contenido en la formulación. Además se preparó por duplicado (**Mb1** y **Mb2**) una muestra que sirvió como control de calidad, empleando Celite 545 ( $1 \pm 0,5$  g).

Tabla 2. Necesidad de extraer azúcar/grasa de matrices alimentarias (AOAC.991.43, 1995).

Tipo de matriz	Peso (g)	Extracción azúcar/grasa
Cereales, harina y derivados (pan).	$1 \pm 0,2$ g	NO
Galletas, bollería, cereales.	$1 \pm 0,2$ g	SI (>10% en grasa/azúcar)
Frutos secos.	$0,5 \pm 0,1$ g	

- **Desengrasado/desazucarado**

Se trata de una etapa de extracción de grasa y/o azúcar empleando una rampa de filtrado conectada a una bomba de vacío. Su objetivo es eliminar interferentes en la posterior cuantificación de fibra. Los crisoles porosos con la muestra se colocaron sobre la rampa de filtrado y seguidamente se añadieron 20 ml de etanol al 85%, para eliminar los azúcares y 20 ml de éter dietílico y de éter de petróleo para eliminar las grasas.

- **Digestión enzimática**

Las muestras se depositaron desde los crisoles a matraces Erlenmeyers y mediante un kit enzimático se llevó a cabo su digestión por ruptura del almidón y de las proteínas.

Se añadieron 40 ml de solución buffer MES-TRIS, 50  $\mu$ l de  $\alpha$ -amilasa y se incubaron con agitación (30-50 rpm) durante 30 minutos en un baño a  $98 \pm 2^\circ\text{C}$ . Seguidamente se enfriaron y se añadieron 100  $\mu$ l de proteasa, para posteriormente incubarlas de igual modo a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ . Después se añadieron 10 ml de HCl 0,325 N y se ajustaron a pH  $4,5 \pm 0,2$  con NaOH/HCl 1 M. Finalmente se adicionaron 300  $\mu$ l de amiloglucosidasa, y se incubaron en las mismas condiciones. Esta etapa facilita la posterior digestión proteica.

- **Sistema de filtrado de muestras**

Previo al filtrado de la muestra, se le adicionaron 225 ml de Etanol 95% a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$ , y se mantuvieron 1 hora en reposo, lo que permitió la precipitación de la fibra soluble y la eliminación de interferentes. Para el filtrado se depositó la muestra en unos embudos conectados con un crisol de placa porosa nº 2 que contenía Celite 545. Seguidamente se limpió el residuo con 45 ml y 20 ml de Etanol al 78% y al 95% respectivamente y 30 ml de acetona. Finalmente se secaron en la estufa a  $103^\circ\text{C}$  durante la noche. Tras esto se pesaron (**Mrs**), y se separaron en dos grupos: las llevadas a calcinación a  $525^\circ\text{C}$  que se volvieron a pesar al finalizar el tratamiento (**Mrc**); y las que se digirieron y destilaron.

- **Determinación de proteínas por el método Kjeldahl**

Para determinar la fracción proteica es necesaria una determinación previa del nitrógeno orgánico de la muestra para su posterior conversión en proteína de la siguiente forma:

- **Digestión proteica**

El residuo obtenido en etapas anteriores se pasó a un tubo de destilación junto con 2 pastillas catalizadoras y 18 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , insertándolo en el equipo de digestión. Finalmente, el nitrógeno orgánico total contenido en la muestra se convirtió en sulfato de amonio (JP Selecta S.A, s.f.).

- **Destilado y valoración de proteínas**

La mezcla digerida se neutralizó con una base (NaOH 32%) y se destiló, recogiendo el destilado en una solución de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  2%). Los aniones del borato formado se valoraron con HCl 0,1M ( $V_{\text{HCl}}$ ) estandarizado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra (JP Selecta S.A, s.f.). El punto final de la valoración se estableció mediante la medida del pH = 4,65.

### 3.4.3. Determinación de fibra dietética total

El resultado de FDT se obtuvo a partir de la diferencia de las dos fracciones separadas para la detección de fibra + proteína (%F+P) ((9) y para la detección de proteína (%P) ((10). Todos los resultados se expresaron sobre la sustancia natural y se les restó el valor del blanco control.

$$\% F + P = \frac{Mrs - Mrc}{Mm1} \times 100 \quad (9).$$

$$\% P = \frac{VHCl \times 0,1 \times 6,25 \times 0,014}{Mm2} \times 100 \quad (10).$$

Donde 6,25 es el factor de conversión de nitrógeno a proteínas; 0,1 es la molaridad del HCl y 0,014 es el peso molecular del nitrógeno x factor de conversión de mg a g.

Todos los resultados se expresan sobre la sustancia natural a partir de las ecuaciones 12 y 13 referentes a la FD de la muestra control y del MR respectivamente.

$$\%FD_b = \%F+P - \%P \quad (11).$$

$$\%FD_m = \%F+P - \%P \quad (12).$$

Donde %FD<sub>b</sub> es la FD del blanco en % y %FD<sub>m</sub> la FD de la muestra en %.

A su vez se calcularon los parámetros indicados anteriormente: exactitud, %recuperación, precisión, %CV e incertidumbre. Para que el método sea considerado exacto y preciso, ha de cumplirse lo indicado en la Figura 1.

Concentración	Límites de recuperación	CV (%)
100 %	98-101%	2 %
10 %	95-102%	3 %
1 %	92-105%	4 %
0.1 %	90-108%	6 %
0.01%	85-110%	8 %
10 ug/g (ppm)	80-115%	11 %
1 ug/g	75-120%	16 %
10 ug/kg (ppb)	70-125%	32 %

Figura 1. Criterio de aceptación del %R y del %CV (AOAC, 2002).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se trabajó con un límite de cuantificación del 1% y un intervalo de trabajo en un 10%, como se ha indicado anteriormente. Esto quiere decir que, respecto al valor real del analito, todos los resultados obtenidos en el laboratorio serán aceptables siempre que estén dentro del 10% de dicho valor asignado.

##### 4.1. CELITE 545

En la Tabla 3 se presentan los valores de los blancos empleados como controles de calidad, en este caso Celite 545, junto a las muestras durante el análisis.

*Tabla 3. Resultados del Celite 545 para una validación de 10 días. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.*

Día	Mb1 (g)	Mb2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FD <sub>b</sub>
1	1,0021	1,0020	31,3386	31,3157	2,285	2,589	2,261	0,024
2	1,0088	1,0069	30,9859	30,9653	2,042	1,752	1,522	0,520
3	1,0023	1,0025	31,9939	31,9745	1,936	1,733	1,513	0,423
4	1,0027	1,0023	31,0303	31,0121	1,815	1,811	1,581	0,234
5	1,0026	1,0023	32,4689	32,4462	2,264	1,937	1,691	0,573
6	1,0020	1,0024	30,9878	30,9679	1,986	1,596	1,393	0,593
7	1,0023	1,0023	32,1002	32,0781	2,205	1,862	1,626	0,579
8	1,0025	1,0028	32,0762	32,0553	2,085	1,882	1,642	0,443
9	1,0022	1,0023	31,1703	31,1491	2,115	1,845	1,611	0,505
10	1,0024	1,0023	31,1376	31,1172	2,035	1,905	1,663	0,372

**Mb:** Masa blanco. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FD<sub>b</sub>:** contenido en FD de la muestra control.

Como se puede observar, se obtuvieron valores dispares en los análisis realizados en 10 días consecutivos, lo que afecta al resultado de FDT como se verá a continuación. Además, al ser una muestra sin analito, se esperaban resultados próximos a 0, sin embargo todos lo exceden, especialmente en los días 2, 5, 6, 7 y 9. Los resultados obtenidos podrían deberse a una obtención en exceso de cenizas (**%F+P**) tras el calcinado por a una pérdida de muestra a lo largo del análisis, lo que hace disminuir la **Mrc** y, por tanto, aumentar el contenido final del **%F+P**.

#### 4.2. MATERIAL MRAIB0441 (PAN)

En la tabla 4 se recogen los valores de la FDT y los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de pan. Además en la figura 2 se representa el valor de la FDT a lo largo de los 10 días.

Tabla 4. Resultados para la validación de la muestra MRAIB0441 (pan) con un contenido en fibra de 2,9% y un intervalo de aceptación entre 2,61% y 3,19%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FD <sub>b</sub> -%FD <sub>m</sub>	Bias (%)
1	1,0026	1,0031	32,5935	32,5378	5,556	3,120	2,722	2,834	2,81	-20,31
2	0,9916	0,9934	31,3108	31,2573	5,395	2,871	2,529	2,867	2,35	R (%)
3	0,9983	0,9984	30,9494	30,8981	5,139	2,455	2,152	2,987	2,56	79,69
4	1,0063	1,0070	31,3091	31,2589	4,989	2,173	1,888	3,100	2,87	CV (%)
5	1,0016	1,0017	32,2841	32,2319	5,212	2,460	2,149	3,063	2,49	26,09
6	0,9998	1,0008	30,9177	30,8713	4,641	2,055	1,797	2,844	2,25	u <sub>bias</sub> (%)
7	0,9998	0,9987	32,2767	32,2267	5,001	2,355	2,063	2,938	2,36	20,31
8	0,9956	0,9958	31,1107	31,0577	5,323	4,741	4,166	1,158	0,71	u <sub>c</sub> (%)
9	1,0052	1,0058	31,4547	31,4022	5,223	2,521	2,193	3,030	2,52	20,32
10	1,0030	1,0045	30,9243	30,8724	5,174	3,007	2,619	2,555	2,18	U (%)
<b>PROMEDIO</b>									<b>2,31</b>	40,65

**Mm:** Masa muestra. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FDm:** contenido en FD de la muestra.

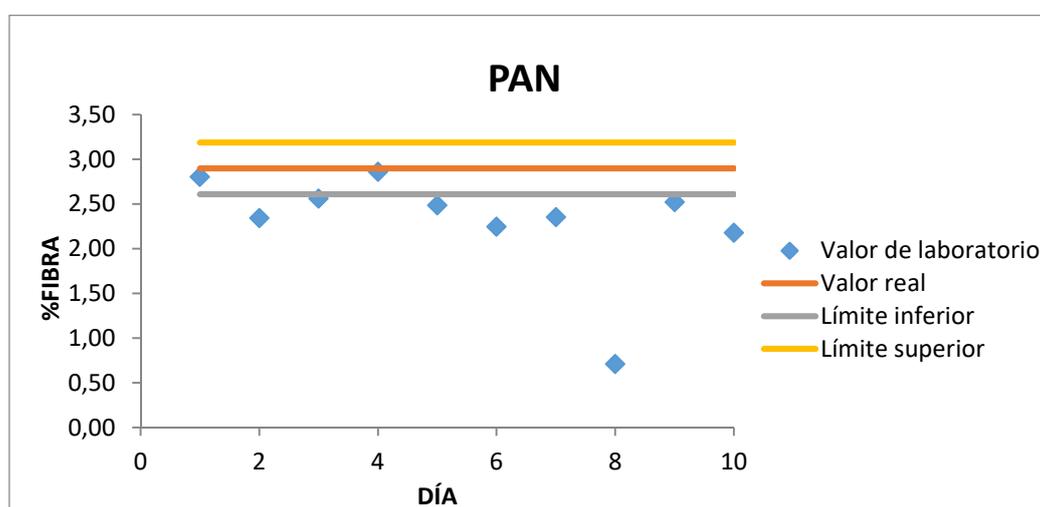


Figura 2. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra MRAIB0441 (pan) con un contenido en fibra de 2,9% y un intervalo de aceptación entre 2,61% y 3,19%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

En la muestra MRAIB0441 (pan), se observó un valor promedio de FDT inferior al de referencia, estando por debajo del límite inferior del rango de trabajo, siendo esto muy pronunciado en el día 8 por un gasto excesivo de HCl en la valoración automática.

Solo se obtuvieron dos valores aceptables en los días 1 y 4. Relativo al análisis estadístico, se observó una R (%) inferior a los límites de aceptación, resultado relacionado con el bias (%) con una tendencia de recuperación negativa, lo que indica una pérdida de muestra durante el análisis. En cuanto al CV (%), la variabilidad de datos está muy por encima del rango de aceptación. La incertidumbre mostró un intervalo muy grande de valores entre los que se esperaba encontrar el real de la FDT, por lo que al presentarse tan alta, no aportó información relevante al resultado.

#### 4.3. MATERIAL MRAIB0455 (CEREALES CON VITAMINAS)

En la tabla 5 se recogen los valores de la FDT así como los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de cereales con vitaminas. Además representa la FDT, como se observa en las figura 3, en la que se representa el valor real de la FDT a lo largo de los 10 días de la validación.

Tabla 5. Resultados para la validación de la muestra MRAIB0455 (cereales con vitaminas) con un contenido en fibra de 7,80% y un intervalo de aceptación entre 7,02% y 8,58%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FDb-%FDm	Bias (%)
1	0,9951	0,9950	31,415	31,2568	15,898	10,336	9,089	6,808	6,78	-14,66
2	1,0088	1,0094	32,0192	31,8738	14,413	9,134	7,918	6,495	5,98	R (%)
3	0,9979	0,9963	32,3940	32,2421	15,222	8,736	7,672	7,550	7,13	85,34
4	1,0015	1,0024	31,5832	31,4287	15,427	8,263	7,213	8,214	7,98	CV (%)
5	1,0012	1,0008	31,666	31,5189	14,692	8,537	7,464	7,228	6,66	8,71
6	1,0005	1,0013	31,9375	31,7876	14,983	9,181	8,023	6,960	6,37	u <sub>bias</sub> (%)
7	1,0014	1,0020	32,3155	32,1636	15,169	9,203	8,037	7,132	6,55	14,66
8	1,0021	1,0030	32,1811	32,0330	14,779	9,411	8,210	6,569	6,13	u <sub>c</sub> (%)
9	1,0005	1,0007	31,6045	31,4592	14,523	8,289	7,248	7,275	6,77	14,67
10	1,0017	1,0024	31,4450	31,2954	14,935	9,549	8,335	6,599	6,23	U (%)
<b>PROMEDIO</b>									<b>6,66</b>	<b>29,35</b>

**Mm:** Masa muestra. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FDm:** contenido en FD de la muestra.

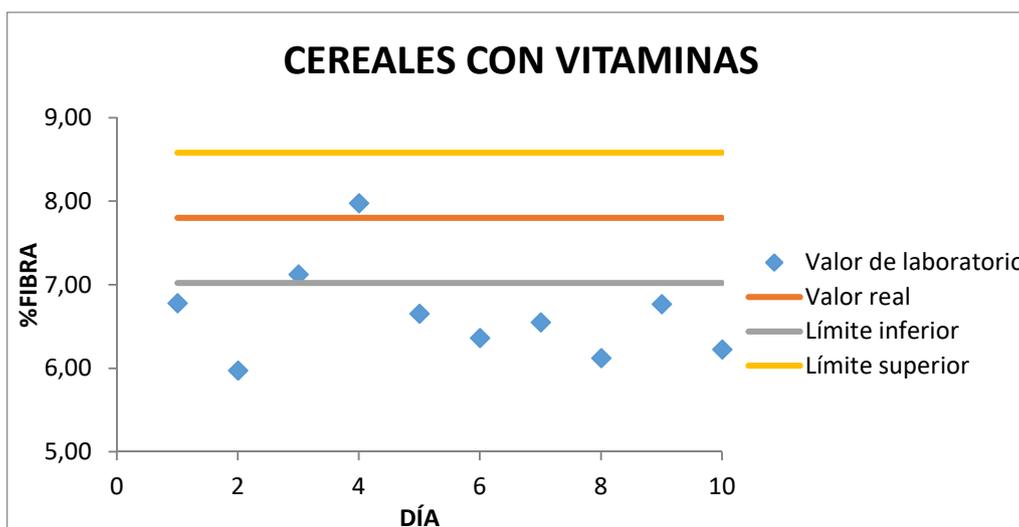


Figura 3. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra MRAIB0455 (cereales con vitaminas) con un contenido en fibra de 7,80% y un intervalo de aceptación entre 7,02% y 8,58%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

En la muestra MRAIB0455 (cereales con vitaminas), también se observó un valor promedio de FDT inferior al de referencia, y al del límite inferior del rango de trabajo, a excepción de los valores correspondientes a los días 3 y 4, en los que obtuvieron resultados muy próximos al valor real. En relación al análisis estadístico, se observó una R (%) inferior a los límites de aceptación, lo que se relaciona con el bias (%) en el que se observó una tendencia de recuperación negativa, lo que indica, como se ha visto en el caso anterior, una pérdida de muestra durante el análisis. En cuanto al CV (%); se esperaba un valor entre 3-4% (Figura 1), sin embargo la variabilidad de datos se encontró por encima del límite de aceptación. La U (%), igual que en el caso anterior, fue demasiado elevada, por lo que no aportó información relevante en el resultado.

#### 4.4. MATERIAL MRAIB0430 (GALLETA MANTEQUILLA)

En la tabla 6 se recogen los valores de la FDT así como los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de galleta con mantequilla. Además se representa la FDT, como se observa en las figura 4.

Tabla 6. Resultados para la validación de la muestra MRAIB0430 (galleta mantequilla) con un contenido en fibra de 2,30% y un intervalo de aceptación entre 2,07% y 2,53%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FDb-%FDm	Bias (%)
1	0,9938	0,9937	31,5983	31,5501	4,850	3,040	2,677	2,173	2,15	-14,06
2	1,0046	1,0036	30,9328	30,8842	4,838	2,656	2,316	2,522	2,00	R (%)
3	0,9996	1,0001	31,1724	31,1255	4,692	2,514	2,200	2,492	2,07	85,94
4	1,0014	1,0011	31,0893	31,0429	4,634	2,522	2,204	2,429	2,20	CV (%)
5	1,0002	1,0013	32,1910	32,1458	4,519	2,359	2,061	2,458	1,88	8,74
6	1,0017	1,0013	32,0787	32,0343	4,432	1,976	1,727	2,706	2,11	u <sub>bias</sub> (%)
7	1,0023	1,0025	31,2985	31,2531	4,530	2,423	2,115	2,415	1,84	14,06
8	0,9988	0,9978	31,1648	31,1227	4,215	2,464	2,161	2,054	1,61	u <sub>c</sub> (%)
9	0,9992	0,9998	31,3286	31,2821	4,654	2,528	2,212	2,441	1,94	14,06
10	0,9982	0,9980	31,1231	31,0784	4,478	2,437	2,137	2,341	1,97	U (%)
<b>PROMEDIO</b>									<b>1,98</b>	<b>28,13</b>

**Mm:** Masa muestra. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FDm:** contenido en FD de la muestra.

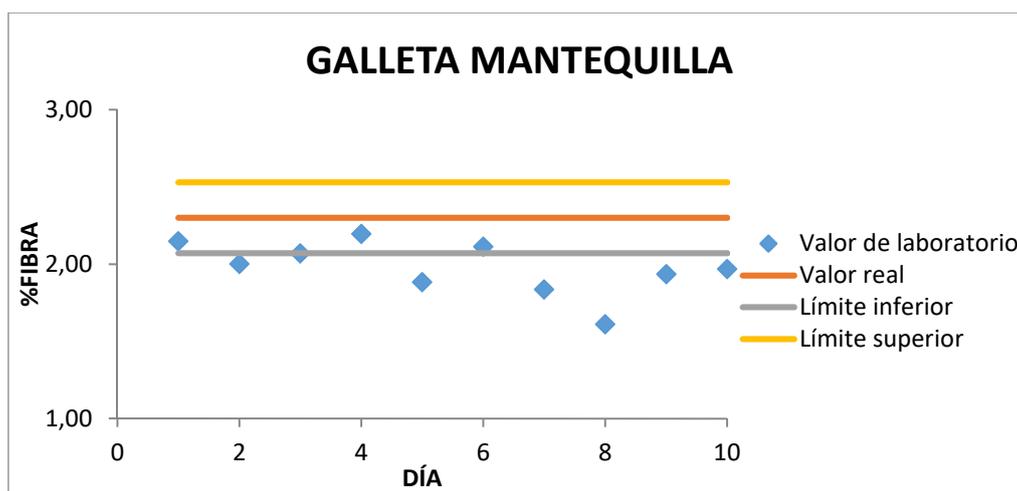


Figura 4. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra MRAIB0430 (galleta mantequilla) con un contenido en fibra de 2,30% y un intervalo de aceptación entre 2,07% y 2,53%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

La muestra identificada como MRAIB0430 (galleta mantequilla) fue una de las que obtuvo mejores resultados, correspondiéndose a los días 1, 3, 4 y 6 y, aunque el valor promedio de FDT fue inferior al de referencia, estuvo muy próximo al rango de trabajo. El volumen de HCl empleado en la valoración del día 6 fue bajo en comparación con otras medidas de composición similar. Relativo al análisis estadístico la R (%) siguió siendo inferior al rango de aceptación, con una tendencia negativa (bias (%)), y un CV (%) superior al deseado. Por último, la U (%) mostró un intervalo muy grande de valores entre los que se esperaba encontrar el real de fibra dietética de la muestra, por lo que al presentar una incertidumbre tan alta, no aportó información relevante en el resultado.

#### 4.5. MATERIAL MRAIB0452 (BIZCOCHO)

En la tabla 7 se recogen los valores de la FDT así como los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de bizcocho. Además representa la FDT, como se observa en las figura 5.

Tabla 7. Resultados para la validación de la muestra MRAIB0452 (bizcocho) con un contenido en fibra de 3,37% y un intervalo de aceptación entre 3,03% y 3,71%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FDb-%FDm	Bias (%)
1	1,0028	1,0033	31,8413	31,7869	5,425	2,769	2,415	3,010	2,99	-14,46
2	1,0020	1,0013	32,1447	32,0923	5,230	2,485	2,172	3,058	2,54	R (%)
3	1,0019	1,0018	31,8482	31,7914	5,669	2,395	2,092	3,577	3,15	85,54
4	1,0008	1,0015	31,9203	31,8656	5,466	2,128	1,859	3,606	3,37	CV (%)
5	1,0007	1,0007	30,8627	30,8081	5,456	1,991	1,741	3,715	3,14	10,30
6	1,0020	1,0008	31,1695	31,1208	4,860	2,006	1,754	3,106	2,51	U <sub>bias</sub> (%)
7	1,0010	0,9990	32,1616	32,1058	5,574	2,544	2,228	3,346	2,77	14,46
8	1,0035	1,0034	30,9295	30,8786	5,072	2,409	2,101	2,972	2,53	u <sub>c</sub> (%)
9	1,0000	1,0014	31,5150	31,4603	5,470	2,287	1,998	3,472	2,97	14,46
10	1,0024	1,0014	32,0981	32,0456	5,237	2,297	2,007	3,230	2,86	U (%)
<b>PROMEDIO</b>									<b>2,88</b>	<b>28,93</b>

Mm: Masa muestra. Mrs: Masa residuo seco. Mrc: masa residuo calcinado. %F+P: contenido en fracción fibra + proteína. V<sub>HCl</sub>: volumen empleado de HCl. %P: contenido en proteína. %FDm: contenido en FD de la muestra.

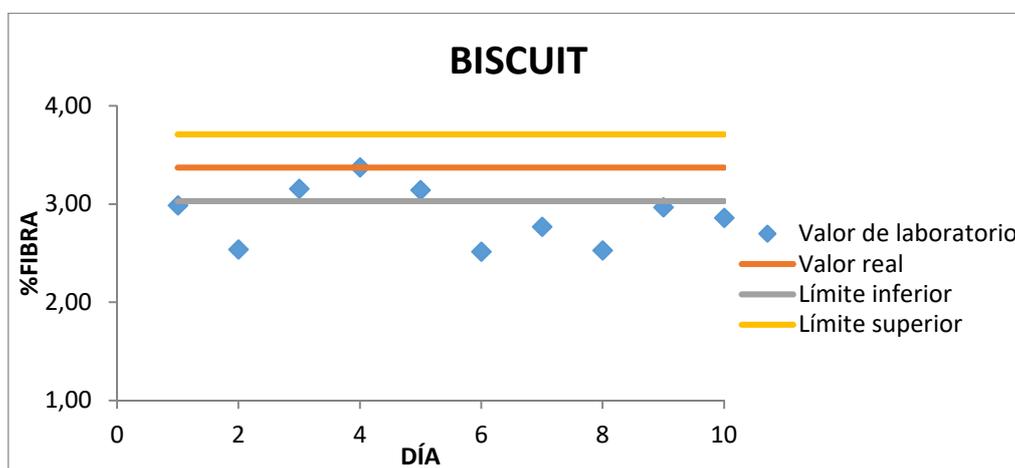


Figura 5. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra MRAIB0452 (bizcocho) con un contenido en fibra de 3,37% y un intervalo de aceptación entre 3,03% y 3,71%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

La muestra MRAIB0452 (bizcocho) presentó valores de FDT correctos en los días 3, 4 y 5, pero con la misma tendencia que en los anteriores MR. La R (%) siguió mostrándose inferior a los límites de aceptación, con una tendencia de recuperación negativa (bias (%)), y un CV (%), superior al deseado.

Relativo a la incertidumbre de la medida, fue demasiado alta, sin aportar información relevante en el resultado como se ha visto anteriormente. El volumen de HCl empleado en el día 5, fue inferior en comparación con otras medidas de composición similar.

#### 4.6. MATERIAL MRAIB0469-1 (PISTACHOS)

En la tabla 8 se recogen los valores de la FDT así como los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de pistachos. Además representa la FDT, como se observa en las figura 6.

Tabla 8. Resultados para la validación de la muestra MRAIB0469-1 (pistachos) con un contenido en fibra de 8,30% y un intervalo de aceptación entre 7,47% y 9,13%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FDb-%FDm	Bias (%)
1	0,5160	0,5159	32,3186	32,237	15,814	4,700	7,972	7,842	7,82	-11,18
2	0,9984	0,9985	31,4149	31,2784	13,672	7,536	6,604	7,068	6,64	R (%)
3	1,0013	1,0007	31,1654	31,0066	15,859	7,839	6,854	9,005	8,58	88,82
4	1,0017	1,0024	31,3704	31,2143	15,584	8,381	7,316	8,268	8,03	CV (%)
5	0,9991	1,0003	31,3218	31,1732	14,873	7,278	6,366	8,507	7,93	12,96
6	1,0027	1,0024	31,8649	31,7099	15,458	-	-	-	-	u <sub>bias</sub> (%)
7	1,0002	0,9992	32,0060	31,8754	13,057	7,536	6,599	6,458	6,02	11,19
8	1,0001	1,0001	31,0334	30,8809	15,248	7,467	6,533	8,716	8,27	u <sub>c</sub> (%)
9	1,0005	1,0011	32,6913	32,5488	14,243	8,669	7,577	6,666	6,16	11,23
10	0,9949	0,9956	32,2906	32,1482	14,313	8,030	7,057	7,256	6,88	U (%)
<b>PROMEDIO</b>									<b>7,37</b>	<b>22,47</b>

**Mm:** Masa muestra. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FDm:** contenido en FD de la muestra.

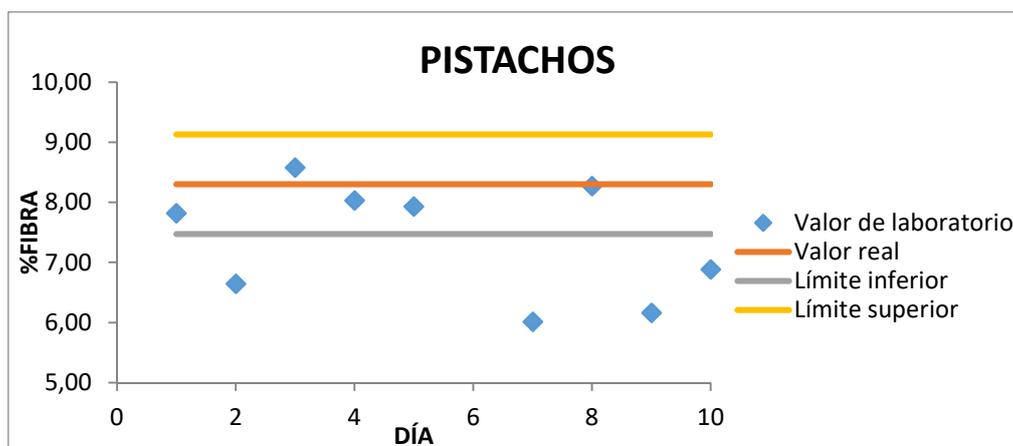


Figura 6. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra MRAIB0469-1 (pistachos) con un contenido en fibra de 8,30% y un intervalo de aceptación entre 7,47% y 9,13%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

La muestra identificada como MRAIB0469-1 (pistachos) fue con la que se obtuvieron mejores resultados, ya que el 50% de los mismos se encontraron dentro del límite de trabajo. Estos se corresponden con los días 1, 3, 4, 5 y 8. En el día 6, debido a un fallo en el destilador que impidió obtener el dato correspondiente al volumen de HCl empleado en la valoración, no se pudo calcular la FDT. Este error de valoración en el día 6 también se observó en el MRAIB0430, al igual que el valor promedio de FDT inferior al de referencia, y al del límite inferior del rango de trabajo. La recuperación de este MR sigue mostrándose inferior a los límites de aceptación, con una tendencia negativa (bias (%)) y el CV (%), fue superior al deseado. Por último, el valor de la U (%) fue demasiado alto, por lo que tampoco aportó información relevante en el resultado.

#### 4.7. MATERIAL INTERCOMPARATIVO 333077 (PASAS)

En la tabla 9 se recogen los valores de la FDT así como los parámetros estadísticos indicados anteriormente en condiciones de reproducibilidad para la muestra de pasas. Además representa la FDT, como se observa en las figura 7.

*Tabla 9. Resultados para la validación de la muestra 333077 (pasas) con un contenido en fibra de 4,10% y un intervalo de aceptación entre 3,69% y 4,51%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.*

Día	Mm1 (g)	Mm2 (g)	Mrs (g)	Mrc (g)	%F+P	V <sub>HCl</sub> (ml)	%P	%FDm	%FDb-%FDm	Bias (%)
1	1,0052	1,0056	31,4487	31,3740	7,431	3,210	2,793	4,638	4,61	3,23
2	0,9926	0,9938	31,2372	31,1644	7,334	2,675	2,355	4,979	4,46	<b>R (%)</b>
3	0,9107	0,9124	32,2964	32,2281	7,500	2,621	2,514	4,986	4,47	103,23
4	0,9944	0,9960	31,4437	31,3683	7,582	2,913	2,559	5,023	4,79	<b>CV (%)</b>
5	0,9995	0,9993	31,3260	31,2516	7,444	2,467	2,160	5,284	4,71	12,26
6	0,9918	0,9912	31,4993	31,4211	7,885	4,502	3,974	3,910	3,32	<b>u<sub>bias</sub> (%)</b>
7	0,9982	0,9985	31,4473	31,3754	7,203	2,969	2,602	4,601	4,02	3,23
8	1,0045	1,0043	32,2762	32,1992	7,666	2,862	2,494	5,172	4,59	<b>u<sub>c</sub> (%)</b>
9	0,9869	0,9861	31,2860	31,2164	7,052	3,247	2,881	4,171	3,67	3,27
10	1,0057	1,0051	31,4751	31,4066	6,811	3,163	2,754	4,058	3,69	<b>U (%)</b>
<b>PROMEDIO</b>									<b>4,23</b>	<b>6,55</b>

**Mm:** Masa muestra. **Mrs:** Masa residuo seco. **Mrc:** masa residuo calcinado. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **V<sub>HCl</sub>:** volumen empleado de HCl. **%P:** contenido en proteína. **%FDm:** contenido en FD de la muestra.

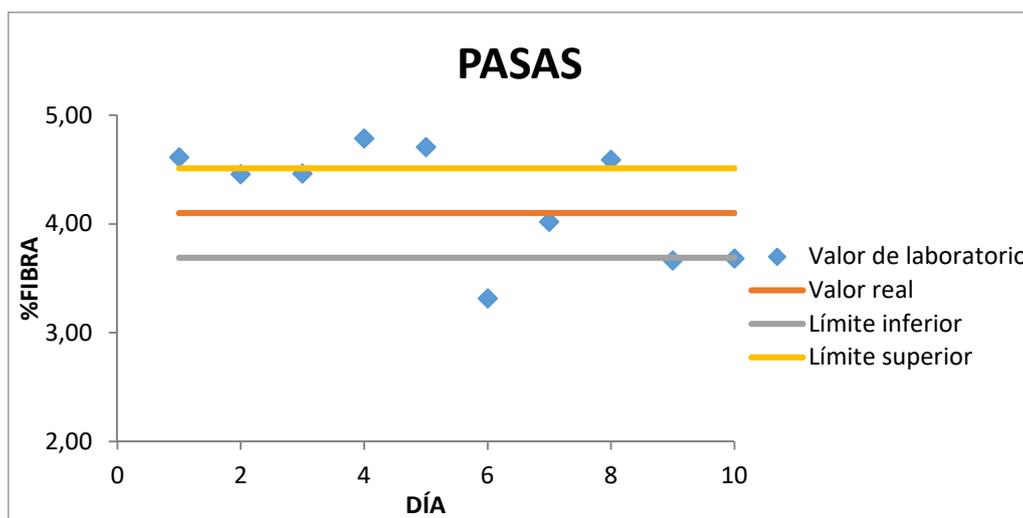


Figura 7. Variabilidad de la FDT en la validación de la muestra 333077 (pasas) con un contenido en fibra de 4,10% y un intervalo de aceptación entre 3,69% y 4,51%. Condiciones de destilado: HCl 0,1 M, programa 1.

La tendencia observada en el material intercomparativo, 333077 (PASAS), fue diferente a la de los anteriores MR, ya que se encontraron valores que en su mayoría, fueron superiores al de referencia, estando el promedio dentro del rango de trabajo. El volumen de HCl gastado en la valoración en el día 6, fue nuevamente superior en comparación con otras medidas de composición similar.

Relativo al análisis estadístico, se observó una R (%) dentro de los límites de aceptación, resultado relacionado con el error (bias %) en el que se observó una tendencia de recuperación positiva. En cuanto al CV (%), hay una variabilidad de datos muy por encima del límite de aceptación, como se puede observar en el gráfico anterior. La incertidumbre mostró un intervalo muy grande en el que se esperaba encontrar el valor verdadero, por lo que no aportó información relevante.

El conjunto de resultados mostró la necesidad de estudiar cambios en el proceso analítico que permitieran obtener resultados satisfactorios para la FDT evitando la pérdida de muestra. Adicionalmente se detectaron problemas en la destilación automática debidas al equipo, impidiendo una correcta obtención de la FDT, así como dificultad en el ajuste del pH de las muestras control. Dicho esto, se optó por modificar el proceso y estudiar un único MR en distintas condiciones, como se indica a continuación, con el fin de resolver los problemas detectados de forma que se consigan resultados aceptables para poder validarlo posteriormente.

#### 4.8. ESTUDIO DE NUEVOS PARÁMETROS EN EL PROCESO ANALÍTICO

Las modificaciones indicadas a continuación se aplican a la extracción de FDT en una única muestra, el material de referencia MRAIB0476-1 (cereal), limitando de esta forma posibles errores debidos a las distintas composiciones en la formulación de las matrices. Cada uno de los tratamientos y condiciones anteriores se exponen en las Tablas 10-12.

Para el análisis de la muestra control se aumentó la **Mb1** y **Mb2** a  $1,5 \pm 0,5$  g, con el objetivo de reducir la pérdida de muestra que producía la disminución del **Mrc**. Adicionalmente se planteó una alternativa al Celite 545, la tierra de diatomeas, propuesta también en la AOAC 991.43. En el análisis de los MR para **Mm1** y **Mm2** se pesaron  $0,5 \pm 0,2$  g;  $1 \pm 0,2$  g y  $1,5 \pm 0,2$  g, para comparar los resultados finales y el error por la pérdida de muestra.

Para resolver los problemas de ajuste del pH se empleó un nuevo lote del mismo Celite 545 y se comparó con la tierra de diatomeas. En cuanto al problema del bajo contenido en FDT de los MR, previo a la calcinación se llevó a cabo una ruptura de la capa superior del residuo, mejorando la penetración del calor en la muestra. Esto permitió obtener una menor cantidad de residuo (**Mrc**), traducido en un aumento del **%F+P** de la muestra y por tanto del contenido de FDT. Adicionalmente se modificaron las condiciones de calcinado y de destilado con un objetivo comparativo.

En la tabla 10 se recogen los valores de la FDT en condiciones de repetibilidad para la muestra del cereal empleando una muestra control de tierra de diatomeas y Celite 545 con una rampa calcinado a  $525^{\circ}\text{C}$  durante 5 h y el programa 2 del destilado.

*Tabla 10. Validación del material de referencia MRAIB0476-1 con un contenido en fibra de 10,5% y un intervalo de trabajo entre 9,45% y 11,55%. Condiciones: tierra de diatomeas + Celite 545, rampa calcinado ( $525^{\circ}\text{C}$ -5 h) y programa 2 de destilado.*

<b>Mm1 (g)</b>	<b>Mm2 (g)</b>	<b>%F+P</b>	<b>%P</b>	<b>%FDb (*)</b>	<b>%FDm</b>	<b>%FDm - %FDb</b>
1,0019	1,0017	14,443	3,686	T. Diatom. (0,30)	10,761	10,46
1,0004	1,0005	14,024	3,627	Celite 545 (0,34)	10,398	10,06

**Mm:** Masa muestra. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **%P:** contenido en proteína. **%FDb:** contenido en FD de la muestra. **%FDm:** contenido en FD de la muestra. T. Diatom: tierra de diatomeas.  
 (\*) Blanco T. Diatom: **%F+P** = 1,418 // **%P** = 1,114  
 Blanco Celite 545: **%F + P** = 1,418 // **% P** = 1,076

En la tabla 11 se recogen los valores de la FDT en condiciones de repetibilidad para la muestra del cereal empleando una muestra control de tierra de diatomeas y Celite 545 con una rampa calcinado a 525°C durante 5 h y el programa 3 del destilado.

Tabla 11. Validación del material de referencia MRAIB0476-1 con un contenido en fibra de 10,5% y un intervalo de trabajo entre 9,45% y 11,55%. Condiciones: tierra de diatomeas + Celite 545, rampa calcinado (525°C-5 h) y programa 3 de destilado.

Mm1 (g)	Mm2 (g)	%F+P	%P	%FDb (*)	%FDm	%FDm - %FDb
1,0021	1,0027	14,609	3,857	T. Diatom. (0,71)	10,753	10,04
1,0023	1,0028	14,058	3,633	Celite 545 (0,57)	10,424	9,85

**Mm:** Masa muestra. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **%P:** contenido en proteína. **%FDb:** contenido en FD de la muestra. **%FDm:** contenido en FD de la muestra. T. Diatom: tierra de diatomeas.  
 (\*) Blanco T. Diatom: **%F+P** = 1,717 // **%P** = 1,003  
 Blanco Celite 545: **%F+P** = 1,425 // **%P** = 0,852

En la tabla 12 se recogen los valores de la FDT en condiciones de repetibilidad para la muestra del cereal empleando una muestra control de tierra de diatomeas y Celite 545 con una rampa calcinado a 525°C durante 12 h y el programa 2 del destilado.

Tabla 12. Validación del material de referencia MRAIB0476-1 con un contenido en fibra de 10,5% y un intervalo de trabajo entre 9,45% y 11,55%. Condiciones: tierra de diatomeas + Celite 545, rampa calcinado (525°C-12 h) y programa 2 de destilado.

Mm1 (g)	Mm2 (g)	%F+P	%P	%FDb (*)	%FDm	%FDm - %FDb
1,0032	1,0040	14,274	2,478	T. Diatom. (0,51)	11,800	11,29
1,0032	1,0036	14,085	3,568	Celite 545 (0,41)	10,520	10,11

**Mm:** Masa muestra. **%F+P:** contenido en fracción fibra + proteína. **%P:** contenido en proteína. **%FDb:** contenido en FD de la muestra. **%FDm:** contenido en FD de la muestra. T. Diatom: tierra de diatomeas.  
 (\*) Blanco T. Diatom: **%F+P** = 1,631 // **%P** = 1,122  
 Blanco Celite 545: **%F+P** = 1,405 // **%P** = 0,996

Todos los resultados expuestos siguieron el mismo comportamiento, ya que gracias a las nuevas **Mb1** y **Mb2** se obtuvieron valores de **%F+P** relativos a los blancos, más bajos por la reducción del error debido a la pérdida de muestra, disminuyendo el valor final de **%FDb**. Esto permitió obtener una mayor **FDT**, incrementada también por la ruptura de la capa superior del residuo antes de la calcinación, aumentando **%F+P** de las muestras. Los valores de **FDT** se mostraron más estables y próximos al real, estando dentro del rango de trabajo. También se observó menor error en aquellos MR en los que se pesaron  $1 \pm 0,5$  g y  $1,5 \pm 0,5$  g. Además de lo anteriormente comentado, se resolvió el problema relacionado con el ajuste de pH.

La solución a los problemas detectados en la valoración automática, debido al alto gasto del HCl, no aparecen solucionados en el presente documento ya que no se pudieron resolver durante el período de estancia en la empresa para realizar el desarrollo experimental del trabajo de fin de máster.

## 5. CONCLUSIONES

La ejecución del presente trabajo permite la obtención de las siguientes conclusiones:

- Tras llevar a cabo la validación para los distintos MR se observó el mismo comportamiento en todos ellos, caracterizado por una pérdida de muestra durante el análisis. Esto se comprobó tras un estudio estadístico en el que se observaron tendencias de recuperación negativas, datos que sirvieron para descartar estos resultados como óptimos y plantearse el estudio de mejoras en el proceso analítico.
- Con el objetivo de resolver los problemas detectados durante el proceso de validación llevado a cabo, se implementaron una serie de modificaciones en el método analítico que resolvieron la mayor parte de los errores detectados.
- Resulta necesario revisar el funcionamiento del valorador automático, siendo preciso realizar una valoración manual hasta el correcto funcionamiento del equipo.
- La puesta a punto del método analítico para la determinación de fibra dietética total en alimentos requerirá la realización de nuevos ensayos de validación una vez que se revise el funcionamiento del valorador automático, tanto para los materiales de referencia empleados en este estudio, como para todos aquellos que quieran incluirse en una futura validación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN. Seguridad alimentaria. (2017). Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/nutricional.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/nutricional.htm) Acceso 8.06.2019.
- AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. (2002). Disponible en: [https://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SL\\_V\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SL_V_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf) Acceso 15.07.2019.
- AOAC.991.43. Official methods of analysis. Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. (1995). Disponible en: [https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal\\_data/sources/files/multimedia/pdfs/annexg.pdf](https://acnfp.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/annexg.pdf) Acceso 15.07.2019.
- Araya, H., Beecher, G. R., Burlingame, B., Chateaufneuf, R, Cotier, P. J., et al. (1997). Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición. Santiago, FAO.
- Codex Alimentarius. (2008). Report of the 30th Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Ciudad del Cabo, Sudáfrica, 3-7 noviembre, 2008. ALINORM 09/32/26.
- Codex Alimentarius. (2009). Report of the 31st Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses, Düsseldorf, Alemania, 2-6 noviembre, 2009. ALINORM 09/32/26.
- JP Selecta S.A. - Notas de aplicaciones. Método Kjeldhal. (s.f.). Disponible en: <http://www.grupo-selecta.com/notasdeaplicaciones/sin-categoria/metodo-kjeldahl/> Acceso 1.06.2019.
- Matos, A., & Chambilla, E. (2010). Importancia de la Fibra Dietética, sus Propiedades Funcionales en la Alimentación Humana y en la Industria Alimentaria . *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1, 4-14.
- Megazyme. Total dietary fiber. assay procedure. (2017). Disponible en: [https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-tdfr\\_data.pdf](https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-tdfr_data.pdf) Acceso 1.06.2019.
- Morillas, P.P., Barwick, V., Ellison, S. L. R., Engman, J., Gjengedal, E. L. F., Oxenbøll, U, et al. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos - Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados. *Eurachem*, 1, 10-38.
- Organismo Salvadoreño de acreditación (OSA). G 9.6 Validación de métodos analíticos físico-químicos. (2017). Disponible en: <http://www.osa.gob.sv/descarga/validacion-de-metodos-analiticos-fisicoquimicos/> Acceso 15.06.2019.
- Tobaruela, E. C., Santos, A. O., Almeida-Muradian, L. B., Araujo, E. S., Lajolo, F. M., & Menezes, E. W. (2018). Application of dietary fiber method AOAC 2011.25 in fruit and comparison with AOAC 991.43 method. *Food Chemistry*, 238, 87-93.