



GUÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE GRASA TOTAL EN AGUACATE HASS

Borrador

INM/GTT-O/02

Sujeto a variación de condiciones de medición.
NO ADOPTAR

Bogotá D.C.

2021-XX-XX

Versión No.1

Guía para la determinación de grasa total en aguacate Hass por secado en estufa convencional
INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGÍA

EDICIÓN Y REDACCIÓN

Silvia Lorena Ramírez Marín
Grupo de Metrología en Análisis Orgánico, INM

Ivonne Alejandra González Cárdenas
Grupo de Metrología en Análisis Orgánico, INM

Carlos Alberto Fuenmayor
Grupo de Investigación Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de Nuevos
Productos, ICTA, Universidad Nacional de Colombia

Caroll Edith Cortes
Laboratorio Análisis Físicoquímico de Alimentos, ICTA, Universidad Nacional de Colombia

Jasmin García Piñeros
Laboratorio Análisis Físicoquímico de Alimentos, ICTA, Universidad Nacional de Colombia

AGRADECIMIENTOS

Esta guía es el resultado del trabajo conjunto entre el Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA y miembros de la Red Colombiana de Metrología -RCM. Fue realizada con el apoyo del proyecto ColombiaMide “Calidad para la competitividad- Reduciendo las brechas de calidad en Micro, Pequeñas y Medianas Empresas MIPYME”, la profesora Coralia Osorio, Diana Ayala y Dayana Vega del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA de la Universidad Nacional de Colombia, los laboratorios y entidades colaboradoras que aportaron en forma de sugerencias y comentarios que sirvieron de insumo para la construcción del documento que se pone al servicio de la cadena productiva del aguacate Hass en Colombia.

Por lo anterior agradecemos a quienes hicieron de este proyecto una realidad.

CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	5
2. ALCANCE	5
3. ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	5
4. DEFINICIONES	5
5. MARCO CONCEPTUAL	7
6. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES	9
6.1. Equipos	9
6.2. Materiales	9
7. CONSIDERACIONES PREVIAS	10
8. PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE MATERIA SECA.....	10
8.1. Condiciones ambientales	11
8.2. Tarado de las cápsulas	11
8.3. Preparación de la muestra	12
8.4. Medición del contenido de materia seca.....	14
8.5. Cálculos y tratamiento de datos	16
9. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN	17
9.1. Definición de mensurando.....	17
9.2. Planteamiento del modelo matemático.....	17
9.3. Identificación de fuentes de incertidumbre	18
9.4. Incertidumbre estándar	18
9.5. Cálculo de coeficientes de sensibilidad	18
9.6. Incertidumbre estándar combinada	19
9.7. Incertidumbre expandida de medición.....	20
10. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	20
11. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS.....	21
12. CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN.....	21
13. TRAZABILIDAD METROLÓGICA.....	21
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

PRESENTACIÓN

El proyecto ColombiaMide “Calidad para la competitividad- Reduciendo las brechas de calidad en Micro, Pequeñas y Medianas Empresas MIPYME” es parte del apoyo complementario implementado entre la Unión Europea y el Ministerio de Comercio, Industria y Turismo en Colombia. ColombiaMide está orientado a mejorar las capacidades metrológicas y de calidad de MIPYME de dos cadenas de valor. El proyecto se encuentra en ejecución desde mayo 2019 por el Instituto Alemán de Metrología (Physikalisch-Technische Bundesanstalt – PTB por su nombre en alemán), con el apoyo del Instituto Nacional de Metrología (INM) e ICONTEC como beneficiarios del proyecto. Para ver los avances del proyecto, consulte la página web: <http://colombiamide.inm.gov.co/>

Las líneas de acción previstas para ejecutar en ColombiaMide son:

- *Línea de acción 1:* identificación de las necesidades de calidad focalizadas en metrología en dos cadenas de valor en dos regiones priorizadas
- *Línea de acción 2:* transferencia de buenas prácticas para los usos de estándares y medición para MIPYME en las regiones priorizadas
- *Línea de acción 3:* desarrollo y mejora de las capacidades técnicas de entidades públicas y privadas para la calibración y ensayo que ofrece capacidad instalada en las regiones priorizadas
- *Línea de acción 4:* apoyar el desarrollo y fortalecimiento de la capacidad metrológica del INM basados en la priorización de necesidades de las regiones y las cadenas de valor
- *Línea de acción 5:* promover el diálogo para lograr la integración de la calidad en las políticas regionales de desarrollo

En el marco de la línea 1, se identificó la necesidad de mejorar las mediciones relacionadas con la medición de grasa total, la cual es una característica que puede emplearse como criterio para determinar el grado de madurez de cosecha, siendo una herramienta apropiada para tomar la decisión del momento óptimo de la recolección de los frutos.

Por lo anterior, se desarrolló esta guía a través del trabajo conjunto entre el Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA, miembros de la Red Colombiana de Metrología - RCM (Grupo de Trabajo Técnico Temático de Metrología Química) y el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia – ONAC, con el fin de armonizar el método de medición para la determinación del contenido de grasa en aguacate variedad Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass), propendiendo por la uniformidad y la coherencia técnica, fundamentales para garantizar la comparabilidad de mediciones de mensurandos fuertemente dependientes del procedimiento de medición, como el caso presente.

En este sentido, lo consignado en esta guía se constituye en un referente para:

- a. El Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC.
- b. Los laboratorios de ensayo que empleen el método o aspectos técnicos consignados en esta guía.

1. OBJETIVO

Definir el protocolo de análisis para la determinación del contenido de grasa total en aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass), por medio del método gravimétrico en frutos con una firmeza superior a 8.348 N (criterio por definir), mediante la extracción con solvente, con el fin de asegurar la validez de los resultados y trazabilidad metrológica al Sistema Internacional de Unidades (SI).

2. ALCANCE

Esta guía de medición está dirigida a los laboratorios de ensayo interesados en realizar el proceso de medición de grasa total como control de calidad del fruto de aguacate Hass o como herramienta para la implementación del servicio de medición. También se encuentra dirigida al Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC como herramienta de evaluación.

El método analítico presentado en esta guía aplica para la determinación, evaluación de incertidumbre y trazabilidad metrológica en la medición de grasa total en muestras de aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass) con una firmeza superior a 8.348 N (criterio por definir), por método gravimétrico mediante extracción con solvente.

Nota 1: El intervalo de firmeza se estableció a partir de mediciones realizadas a diferentes frutos de aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass) en su parte más ancha, con una sonda cilíndrica de 6 mm, las bajo las siguientes condiciones:

Velocidad (mm / s)	10.00
Profundidad de penetración (mm)	10.00
Trigger force (g)	25.00

3. ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
HR	Humedad Relativa
U	Incertidumbre expandida

4. DEFINICIONES

Aguate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass): es el fruto de *Persea americana* Mill, cuya cáscara es de textura rugosa o semirrugosa, característica uniforme en toda la superficie, su forma es variada desde semiredonda hasta aplanada. Su color característico va del verde mate al negro. Su pulpa es verde amarillento, suave y de textura no fibrosa (tipo mantequilla) (1).

Blanco de reactivos: son los reactivos utilizados durante el proceso analítico (incluyendo disolventes utilizados para extracción o disolución), estos son analizados para determinar si contribuyen a la respuesta de la medida (2).

Epicarpio, epicarpo, exocarpio o exocarpo: (del griego epi: sobre y karpos: fruto), es la epidermis exterior del ovario. Estructuralmente corresponde a la epidermis del envés de la hoja carpelar del pistilo. En algunos frutos, se le puede desprender manualmente y se le conoce con el “nombre coloquial” de cáscara, piel, o pellejo (3).

Grasa Total: el residuo obtenido bajo las condiciones especificadas en esta guía, expresada como porcentaje en fracción másica (4).

Pedúnculo: tallo por el cual el fruto se adhiere a la planta (5).

Testa: tegumento exterior, generalmente coloreado, que envuelve la semilla (3).

Los conceptos presentados a continuación se tomaron del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) 3ª Edición, 2012 (6)

Calibración: operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.

Evaluación tipo A de la incertidumbre de medida: evaluación de una componente de la incertidumbre de medida mediante un análisis estadístico de los valores medidos obtenidos bajo condiciones de medida definidas.

Evaluación tipo B de la incertidumbre de medida: evaluación de una componente de la incertidumbre de medida de manera distinta a una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida. Por ejemplo: evaluación basada en informaciones, asociadas a valores publicados y reconocidos; – asociadas al valor de un material de referencia certificado, obtenidas a partir de un certificado de calibración, datos de mediciones anteriores, experiencia o conocimiento general del comportamiento propiedades de materiales. e instrumentos y especificaciones del fabricante, entre otros.

Condición de Repetibilidad: condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo.

Factor de Cobertura: número mayor que uno por el que se multiplica una incertidumbre típica combinada para obtener una incertidumbre expandida.

Incertidumbre de medición: parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza.

Magnitud: propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.

Mensurando: magnitud que se desea medir.

Sistema Internacional de Unidades (SI): sistema de unidades basado en el Sistema Internacional de Magnitudes, con nombres y símbolos de las unidades referentes a las siete magnitudes básicas: longitud, masa, tiempo, corriente eléctrica, temperatura termodinámica, cantidad de sustancia e intensidad luminosa.

Trazabilidad metrológica: propiedad de un resultado de medición por la cual dicho resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medición.

Verificación: aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados.

5. MARCO CONCEPTUAL

El territorio colombiano cuenta con la ubicación geográfica, condiciones climáticas y la disponibilidad de recursos necesarios para proyectarse como uno de los más grandes productores de aguacate Hass en el mundo (7), además, cuenta con una gran ventaja con respecto a otros países productores y es el hecho de que la capacidad productiva del país permite exportar frutos de aguacate Hass durante todo el año (8). Debido a lo anterior, en la actualidad, el fruto de aguacate colombiano se posiciona como uno de los principales productos en la canasta agroexportadora del país gracias a su sabor, inocuidad y calidad. A pesar de la situación sanitaria ocasionada por el virus SARS Cov – 2, el producto colombiano se ubica como el principal en el mercado europeo en el 2021, superando la participación de los frutos provenientes de Perú, México y Chile, según un estudio realizado por el CIRAD (Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo de Francia)(9).

En los próximos años, se espera un crecimiento en la producción de aguacate Hass y para que las proyecciones se vuelvan una realidad el sector aguacatero del país debe superar algunos desafíos, como son la creación de estrategias que permitan el cumplimiento de los requisitos de los mercados internacionales promoviendo la tecnificación de los cultivos, diversificación de mercado, admisibilidad sanitaria (10) y mejorando la reputación agrícola en el contexto mundial. Para ello se han venido desarrollando programas que fomentan la certificación de predios productores bajo Buenas prácticas agrícolas (BPA), Global GAP, certificación orgánica, entre otros, que permiten la disminución de pérdidas del fruto por un manejo irracional de plaguicidas o aspectos referentes a la calidad del aguacate Hass y así mejorar la competitividad y la productividad.

El sabor y la textura determinan la calidad de consumo, y esta última se encuentra muy relacionada con el contenido de aceite del fruto, el cual aumenta a medida que se va dando el proceso de maduración, son esos atributos los que han llevado el aguacate colombiano a las mesas de los consumidores en diferentes países a nivel mundial (13).

La calidad del fruto de aguacate Hass está dada el tamaño, forma, color de la cascara, la ausencia de defectos internos y externos, la textura y el sabor del aguacate, y es la calidad, el factor determinante en la aceptación del producto colombiano en el exterior. La calidad del fruto depende de factores asociados a las prácticas agrícolas que se dan en la etapa de precosecha y postcosecha, en muchos casos se generan defectos causados por trastornos fisiológicos, contaminación microbiana y el grado inadecuado de madurez de la fruta en el momento de la cosecha (11), que pueden generar pardeamiento de la pulpa de la fruta, decoloración del mesocarpio y desarrollo de pudrición (12).

La maduración del fruto del aguacate Hass comienza una vez se cosecha el fruto debido posiblemente a la interrupción del transporte de componentes que viajan de las hojas al fruto e inhiben el proceso (14). Después de la cosecha, se da un aumento de la tasa de respiración y la producción de etileno, ocasionando cambios en el color de la cascara y la firmeza, este último parámetro es relevante en términos de calidad y almacenamiento. El ablandamiento del mesocarpio del fruto se da por solubilización y despolimerización de la pectina de la pared celular a causa de mecanismos enzimáticos (15). En este proceso se da un aumento en el contenido de aceite y una reducción de la humedad del fruto (16) por lo que la determinación de contenido graso en el fruto es indicador adecuado de madurez, ya que a diferencia de otras frutas en las que el contenido de azúcar aumenta durante el proceso de maduración es el contenido lipídico el que se incrementa en el aguacate.

A pesar de que el aguacate Hass, se ha convertido en un producto relevante en la economía nacional, los productores aún no cuentan con información precisa para realizar la determinación de los indicadores de madurez, debido a que el avance del desarrollo del fruto no se puede identificar con un cambio en su apariencia física (14) y el contenido y la composición de los lípidos presentes en el fruto pueden cambiar, por la ubicación del cultivo, la luz, el clima, la variedad, el número de días entre la floración y la fructificación (17), por lo que algunas empresas han recurrido a su experiencia estableciendo valores de materia seca, como medida indirecta del contenido de aceite entre el 23 % y el 30 % (18), a pesar de que el Codex Alimentarius, CODEX STAN 197-1995, especifica que los frutos de aguacate variedad Hass, deberán alcanzar un contenido mínimo de materia seca en la cosecha del 21 % (19).

Por lo anterior, se hace indispensable definir metodologías que permitan la medición de una forma adecuada de los indicadores de madurez como el contenido de grasa en el fruto, y con ello aumentar la rentabilidad de un producto de calidad y permitan el fortalecimiento de este creciente sector en el país.

El proceso de medición del contenido de grasa total incluye la preparación, el tratamiento de las muestras y su determinación, simultáneamente a la determinación de su humedad para hacer el reporte del valor del contenido de grasa total en la muestra en base seca.

En la determinación del contenido de grasa total en aguacate Hass, se somete la muestra a un proceso de secado, seguido de una hidrólisis ácida y posteriormente a una extracción de grasa por medio de un solvente en ebullición por un tiempo determinado. Del extracto resultante se evapora el solvente por calentamiento, el residuo se seca a una temperatura aproximada de 100 °C por dos horas y finalmente se pesa para determinar gravimétricamente el contenido de grasa total presente en la muestra.

6. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

6.1. Equipos

- Balanza analítica con división de escala mínima de 0.1 mg.
- Horno o estufa de secado convencional: horno de convección y de calentamiento eléctrico, con capacidad de alcanzar 100 °C, de manera tal que permita controlar que la variación de temperatura durante el análisis no exceda los 5 °C.
- Plancha de calentamiento.
- Procesador de alimentos.
- Termohigrómetro.
- Equipo de extracción con solventes: Equipo de extracción continuo con más de 5 posiciones.

6.2 Materiales

- Recipientes de secado: Cajas de Petri de vidrio de borosilicato.
- Erlenmeyer de vidrio de borosilicato de capacidad de 250 mL.
- Vidrio de reloj de 100 mm de diámetro.
- Embudo de vidrio de borosilicato de 100 mm de diámetro y cuello largo.
- Recipientes de extracción de vidrio (equipo de extracción con solventes).
- Dedales de extracción de celulosa (dimensiones adecuadas para el equipo que se va a usar)
- Algodón desengrasado.
- Papel Filtro: Whatman No. 1, libre de grasa.
- Pinzas metálicas de crisol.
- Desecador con material desecante.

- Rallador de alimentos con un orificio entre 7 mm y 8 mm.
- Elemento de corte (p.ej. Cuchillo).
- Perlas de ebullición.

6.3 Reactivos

- Bencina de petróleo (40-60) °C: Mezcla de diferentes hidrocarburos líquidos con un intervalo de ebullición 40 °C - 60 °C.

Nota 2: El hexano también puede ser utilizado como solvente de extracción..

- Agua Destilada
- Solución de ácido Clorhídrico (HCl) 8 N: preparada a partir de una dilución de ácido clorhídrico grado analítico al 37 % con agua destilada.
- Solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.1 N.

7. CONSIDERACIONES PREVIAS

- El material desecante del desecador debe encontrarse activado o regenerado previamente.
- La estufa/horno de secado debe tener una capacidad de recuperación de temperatura, después de apertura (p. ej. Para ingresar las muestras) de máximo 30 minutos.
- Durante el secado de las muestras ó los extractos, no abrir la estufa/horno, ni introducir material o productos húmedos diferentes a las muestras que se están analizando.
- Los recipientes de extracción deben ser manipulados con pinzas de crisol.
- Asegurar que el flujo del agua de refrigeración del equipo de extracción con solventes sea el adecuado, para evitar evaporación del solvente.
- Realizar seguimiento de las condiciones ambientales durante el proceso de pesaje, y asegurar que se encuentren dentro de los parámetros establecidos en el numeral 8.1. En caso de no cumplirse, repetir el análisis.

8. PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE GRASA TOTAL

La determinación del contenido de grasa total en aguacate Hass (*Persea americana*. Mill. Var. Hass), se realiza en diferentes etapas haciendo un seguimiento de las condiciones ambientales en cada una

de ellas; en primera instancia se realiza el tarado de los recipientes de vidrio utilizados en la extracción de grasa, posteriormente se lleva a cabo la preparación de la muestra y el desarrollo experimental para la medición del contenido de grasa total; por último, se lleva a cabo el tratamiento de los datos obtenidos y evaluación de la incertidumbre. Para poder reportar el valor obtenido del contenido de grasa total en base seca se debe hacer de manera simultánea la determinación de humedad de la muestra a analizar.

8.1. Condiciones ambientales

Las mediciones se deben realizar en condiciones de humedad relativa menores al 65 % HR. Se sugiere realizar este procedimiento a temperaturas no mayores a 25 °C.

8.2 Determinación de Humedad

Para realizar la determinación de humedad sobre una muestra del aguacate Hass al que se le hará la medición de grasa total, se recomienda seguir la metodología propuesta en la guía de medición para la determinación de materia seca en aguacate Hass por secado en estufa convencional.

8.3. Tarado de los recipientes de extracción

8.3.1 Lavar los recipientes de vidrio sobre los cuales se realizará la extracción, con agua y jabón neutro, adicionar las perlas de ebullición y secar.

Nota 3: se recomienda marcar los recipientes antes del tarado.

8.5.1 Lavar los recipientes de secado, con agua y jabón neutro, adicionar las perlas de ebullición y secar.

8.3.2 Programar la estufa/horno a la temperatura de secado de la muestra a 100 °C, por lo menos 30 minutos antes de iniciar el tarado de las cápsulas.

8.3.3 Disponer los recipientes de vidrio, en la estufa/horno a 100 °C durante mínimo 60 minutos.

8.3.4 Transcurrido este tiempo, transferir los recipientes de vidrio, rápidamente, a un desecador; dejar allí hasta que alcancen temperatura ambiente (aproximadamente 60 minutos).

8.4. Preparación de la muestra

8.4.1. Tomar los frutos de aguacate que tengan una firmeza superior a la definida en el alcance de esta guía (*de preferencia en buen estado físico, sin signos de daño mecánico o presencia de plagas*) y cortarlos longitudinalmente.

Nota 4: por facilidad en el rallado, antes del corte longitudinal se recomienda cortar el fruto por la parte superior a 1 cm o 2 cm del pedúnculo como se observa en la figura 1-a.

8.4.2. Retirar la mayor parte de la cáscara (epicarpio) como se observa en la figura 1-b.

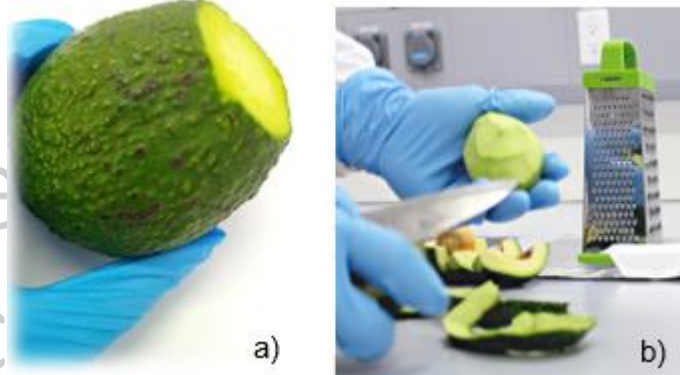


Figura 1. a) Corte del pedúnculo. b) Proceso de pelado del aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass).

8.4.3. Remover la semilla y la testa, asegurando retirarla completamente.

Nota 5: procure retirar por completo los componentes diferentes a la pulpa del fruto de aguacate ya que la medición del contenido de grasa total se puede ver afectada si quedan restos de éstos en la muestra.

8.4.4. Rallar la pulpa del fruto.

Nota 6: una vez rallada la muestra, se sugiere almacenarla en un recipiente plástico con tapa (se recomienda que la cantidad de muestra no supere el 50 % de la capacidad del recipiente para facilitar la homogenización).

8.5. Secado de la muestra

Para la determinación del contenido de grasa total, la muestra de aguacate Hass debe secarse previamente y deben realizarse al menos, cuatro réplicas de medición (criterio por definir).

8.5.2 Programar la estufa/horno de secado a 70 °C (criterio por definir), por lo menos 30 minutos antes de disponer la muestra.

8.5.3 Homogenizar la muestra **siempre** antes de realizar el pesado; para ello, agitar por inversión manual la muestra rayada.

Nota 7: esta agitación debe realizarse suavemente con el propósito de evitar deterioro de la muestra en estudio.

8.5.4 Pesar como mínimo 65 g (criterio por definir) de muestra homogenizada procurando que la muestra se distribuya de manera homogénea en todo el recipiente de secado.

Nota 8: se sugiere utilizar tantos recipientes sean necesarios para que la muestra quede repartida en todo el recipiente y que la muestra no supere los 0.5 cm de altura en ningún punto del recipiente

8.5.5 Colocar el recipiente de secado con la muestra, en el centro de la estufa/horno de secado y secar por 16 horas.

8.5.6 Transcurrido este tiempo, llevar rápidamente a un desecador y dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

8.5.7 Disminuir el tamaño de partícula de la muestra, por medio de una molienda simple en un procesador de alimentos, y continuar con la hidrólisis ácida (numeral 8.6).

Nota 9: Se recomienda realizar la molienda el menor tiempo posible para evitar que la muestra adquiera humedad y en intervalos de tiempo cortos para evitar el aumento de temperatura de la muestra.

Nota 10: una vez molida la muestra, se sugiere almacenarla en un recipiente con tapa (se recomienda que la cantidad de muestra no supere el 50 % de la capacidad del recipiente para facilitar la homogenización) e inmediatamente proceder a realizar la hidrólisis ácida.

8.6. Hidrólisis ácida

8.6.1 En un erlenmeyer pesar entre 2- 3 g de muestra seca, obtenida en el numeral 8.5.

8.6.2 Registrar el valor de la masa de la muestra seca, este será “Masa de la muestra seca” (M_2).

8.6.3 Adicionar lentamente y con agitación constante, 45 mL de agua en ebullición al erlenmeyer que contiene la muestra.

Nota 11: se recomienda agitar manualmente para evitar la pérdida de muestra en los agitadores.

8.6.4 Adicionar 55 mL de la solución de ácido clorhídrico 8 N.

Nota 12: se sugiere adicionar algunas perlas de ebullición y asegurarse que queden bien distribuidas para evitar ebullición turbulenta, salpicaduras y pérdida de muestra.

- 8.6.5 Tapar rápidamente el erlenmeyer con un vidrio de reloj.
- 8.6.6 Calentar a ebullición durante 15 minutos.
- 8.6.7 Pasado ese tiempo, suspender el calentamiento y lavar el vidrio de reloj con 100 mL de agua destilada, recogiendo el resultado del lavado dentro del erlenmeyer.
- 8.6.8 Filtrar el contenido del erlenmeyer.
- 8.6.9 Lavar con agua destilada caliente las paredes del erlenmeyer y adicionar el lavado al residuo que se encuentra en el papel filtro para lograr una transferencia cuantitativa.
- 8.6.10 Lavar con agua destilada caliente el residuo, hasta que no se detecten cloruros con ayuda de la solución de nitrato de plata (AgNO_3) 0.1 N.

Nota 13: Para evaluar la presencia de cloruros, se toman entre 5 a 10 gotas del filtrado en un tubo de ensayo (o vidrio de reloj) limpio y seco y se le adiciona 1 gota de la solución de AgNO_3 0.1 N, si se observa turbidez o algún precipitado es necesario continuar con el lavado.

- 8.6.11 Programar la estufa/horno de secado a 100 °C (criterio por definir), por lo menos 30 minutos antes de disponer el residuo.
- 8.6.12 Finalizado el lavado del residuo, doblar cuidadosamente el papel filtro, asegurando de que no exista ninguna pérdida de la muestra hidrolizada que contiene la grasa a ser extraída.
- 8.6.13 Introducir el papel filtro dentro de un dedal de celulosa.
- 8.6.14 Colocar el dedal con la muestra y erlenmeyer por separado en la estufa/horno y secar por 16 horas.
- 8.6.15 Transcurrido el tiempo, disponer la muestra y el erlenmeyer en un desecador hasta que alcancen temperatura ambiente.

8.7. Medición del contenido de grasa total

Por cada grupo de mediciones se recomienda incluir un (1) blanco de extracción.

8.7.1 Pesar los recipientes de extracción vacíos (tarados según el numeral 8.3).

Nota 14: si el sistema de extracción a emplear recomienda el uso de perlas de ebullición, estas también deberán pesarse junto con el recipiente de extracción a usar.

8.7.2 Registrar el valor de masa y el número de identificación del recipiente de extracción. Esta masa será denominada como “Masa de recipiente de extracción vacío” (M_1), en el caso del blanco será denominada como “Masa del recipiente de extracción del blanco vacío” (M_{bi}).

8.7.3 Colocar en la boca de los dedos algodón desengrasado.

8.7.4 Iniciar el reflujo de enfriamiento a través del equipo.

8.7.5 Lavar el erlenmeyer con 100 mL (criterio por definir) de bencina de petróleo en tres porciones, recibiendo el lavado en el recipiente de extracción.

Nota 15: Adicionar el volumen de bencina de petróleo a los recipientes de extracción en el menor tiempo posible para evitar pérdidas por evaporación.

8.7.6 Colocar los dedos bajo la columna de extracción del equipo.

8.7.7 Ubicar cada recipiente en los espacios designados en el equipo de extracción y ajustar todo el sistema.

8.7.8 Encender el equipo y ajustar las condiciones de extracción acorde con el programa de extracción descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Programa de extracción de grasa en aguacate Hass

Parámetro	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Inmersión	80 (criterio por definir)	90 (criterio por definir)
Goteo	120 (criterio por definir)	30 (criterio por definir)

8.7.9 Al finalizar el programa, dejar enfriar los recipientes de extracción hasta una temperatura inferior a 40 °C y llevar, con precaución, a una cabina de extracción hasta la evaporación casi total del solvente.

8.7.10 Apagar el equipo y luego detener el reflujo de enfriamiento.

8.7.11 Llevar los recipientes de extracción con el residuo a la estufa a 102 °C por un periodo de dos (2) horas.

Nota 16: no sobrepasar el tiempo de secado ya que se generan productos de oxidación.

8.7.12 Transcurrido este tiempo, llevar los recipientes de extracción rápidamente a un desecador y dejar enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente por 60 minutos).

8.7.13 Pesar los recipientes de extracción con la fracción de grasa y registrar el valor “Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa” (M_3), en el caso del blanco será denominada como “Masa del recipiente de extracción del blanco con la fracción de grasa” (M_{bf}).

8.8. Cálculos y tratamiento de datos

El contenido de grasa total en base seca se expresa como porcentaje en fracción másica, empleando la ecuación 2. Para ello, se utiliza el valor de humedad y la masa del residuo obtenido de la extracción de la muestra y el blanco, calculado con la ecuación 1.

$$M_B = M_{bf} - M_{bi} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

M_B = (g/100 g) masa de grasa del blanco (residuo final).

M_{bf} = (g) Masa del recipiente de extracción del blanco vacío.

M_{bi} = (g) Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa del blanco (residuo final).

$$\% G = \left(\frac{M_3 - M_1 - M_B}{M_2 \times \left(1 - \left(\frac{\%H}{100} \right) \right)} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$\% G$ = (g/100 g) contenido de grasa.

$\% H$ = (g/100 g) humedad.

M_1 = (g) Masa del recipiente de extracción vacío (incluido perlas de ebullición si es requerido).

M_2 = (g) Masa de la muestra seca.

M_3 = (g) Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa (residuo final).

M_B = (g/100 g) Masa de residuo del blanco (residuo final).

Para el tratamiento de los datos obtenidos durante la determinación de materia seca, se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Calcular el promedio y la desviación estándar de las réplicas realizadas.
- Calcular el coeficiente de variación de las réplicas.
- Evaluar la incertidumbre de la medición, siguiendo con los lineamientos del numeral 9.

9. EVALUACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

La estimación de la incertidumbre asociada a la determinación de grasa en aguacate Hass se realiza con base en los lineamientos presentados en la Guía para la Estimación de la Incertidumbre GUM (20). Los pasos para la estimación se presentan en los siguientes numerales:

9.1. Definición de mensurando

El mensurando está definido como el contenido de grasa total en Aguacate Hass (*Persea americana* Mill. Var. Hass) expresado en fracción másica.

9.2. Planteamiento del modelo matemático

El modelo matemático que representa el porcentaje de grasa está definido por la siguiente ecuación:

$$\% G = \left(\frac{M_3 - M_1 - (M_{bf} - M_{bi})}{M_2 \times \left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} \right) \times 100 \times R \times T \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

- % G* Resultado en porcentaje de la medición.
M₃ Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa (residuo final).
M₂ Masa muestra seca.
M₁ Masa del recipiente de extracción de la muestra vacío.
M_{bi} Masa del recipiente de extracción del blanco vacío.
M_{bf} Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa del blanco (residuo final).
R Repetibilidad.
T Temperatura del horno (obtención del residuo).
% H Humedad

Los términos R y T se incluyen en el modelo de cálculo con el fin de incorporar el aporte de la repetibilidad y la temperatura a la incertidumbre de medición. Para efectos de cálculo del contenido de grasa total, valor de R y T es 1.

9.3. Identificación de fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre asociadas a la determinación del contenido de grasa en aguacate Hass se presentan a continuación.

- u (M₃) Masa recipiente de extracción y la fracción de grasa (residuo final).
- u (M₂) Masa muestra seca.
- u (M₁) Masa del recipiente de extracción de la muestra vacío.
- u (M_{bf}) Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa del blanco (residuo final).
- u (M_{bi}) Masa del recipiente de extracción del blanco vacío.
- u (R) Repetibilidad.
- u (T) Temperatura (obtención del residuo).
- u (H) Humedad.

9.4. Cálculo de coeficientes de sensibilidad

Los coeficientes de sensibilidad se obtienen derivando el modelo matemático en función de cada una de las variables que son fuente de incertidumbre. Para esto se emplea la siguiente ecuación general:

Las variables del contenido de grasa total se encuentran definidas en el numeral 9.3.

$$C_i = \frac{\Delta \%G(M_i, R, T, H)}{\Delta V \text{ variable}} = \frac{d \%G(M_i, R, T, H)}{dV \text{ variable}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Nota 17: el coeficiente de sensibilidad asociado con la incertidumbre de la temperatura de secado puede evaluarse de manera experimental observando el cambio en el contenido de materia seca cuando se emplean temperaturas en un intervalo representativo al que se somete la muestra durante la medición. (21)

9.5. Incertidumbre estándar

La incertidumbre estándar para cada una de las fuentes en la determinación de grasa se evalúa por medio de las ecuaciones dadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Ecuaciones para calcular la incertidumbre estándar para cada una de las fuentes de aporte

Fuente de Incertidumbre	Tipo de evaluación	Ecuaciones
Masa recipiente de extracción y la fracción de grasa (M_3) ¹	Tipo B	$u(M_n) = \sqrt{u^2(R) + u^2(E)}$ Ecuación 5
Masa muestra (M_2) ¹		
Masa del recipiente de extracción de la muestra vacío (M_1) ¹		
Masa del recipiente de extracción y la fracción de grasa del blanco (M_{bf}) ¹		
Masa del recipiente de extracción del blanco vacío (M_{bi}) ¹		
Repetibilidad ²	Tipo A	$u(R) = \frac{\text{desviación estándar}}{\sqrt{n}}$ Ecuación 6
Temperatura (estufa/horno) ³	Tipo B	$u(T) = \frac{\Delta T}{\sqrt{3}}$ Ecuación 7
Humedad	Tipo B	$u(H) = \sqrt{(C_{i_{M_3}} u(M_3))^2 + (C_{i_{M_2}} u(M_2))^2 + (C_{i_{M_1}} u(M_1))^2 + (C_{i_R} u(R))^2 + (C_{i_T} u(T))^2 + (C_{i_{W_{cte}}} u(MS_{cte}))^2}$ Ecuación 8

¹. Las incertidumbres estándar de las masas del recipiente vacío, muestra y residuo están conformadas por la combinación de la incertidumbre por resolución ($u(R)$) y la del error ($u(E)$) de la balanza utilizada.

². Dado que su evaluación es experimental, este puede expresarse como la dispersión de n observaciones independientes (21).

³. ΔT hace referencia a la variación de temperatura especificada por el fabricante a la temperatura de trabajo (obtención del residuo).

9.6. Incertidumbre estándar combinada

La expresión general para estimar la incertidumbre estándar combinada para la determinación del contenido de grasa consiste en la raíz de la suma de cuadrados del producto entre el coeficiente de sensibilidad y la incertidumbre estándar de cada fuente de incertidumbre, como se presenta a continuación por medio de la siguiente ecuación.

$$u = \sqrt{(C_{i_{M_3}} u(M_3))^2 + (C_{i_{M_2}} u(M_2))^2 + (C_{i_{M_1}} u(M_1))^2 + (C_{i_{M_f}} u(M_{bf}))^2 + (C_{i_{M_i}} u(M_{bi}))^2 + (C_{i_R} u(R))^2 + (C_{i_T} u(T))^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

9.7. Incertidumbre expandida de medición

La incertidumbre expandida se obtiene al multiplicar la incertidumbre estándar combinada por un factor de cobertura (k), según la ecuación 9.

$$U = k \times u \quad \text{Ecuación 10}$$

El valor k se obtiene del valor tabulado para una distribución *t-Student* a un nivel de confianza definido (95 %) y un número de grados efectivos de libertad obtenido de las diferentes fuentes de incertidumbre con base en la ecuación de *Welch-Satterthwaite*, la cual se presenta a continuación:

$$v_{eff} = \frac{u(y)^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i(y)^4}{v_i}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

u(y)	Incertidumbre estándar combinada para las n fuentes.
u _i (y)	Incertidumbre estándar para la fuente i.
v _i	Grados de libertad para la fuente i.
v _{eff}	Grados de libertad efectivos.

10. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

El informe de ensayo debe cumplir con los requisitos indicados en ISO/IEC 17025, versión vigente. Los resultados se deben presentar de manera clara, inequívoca y objetiva. Se debe incluir toda información necesaria para la interpretación de los resultados de medición y una descripción del método utilizado (ISO/IEC 17025, versión vigente). El laboratorio debe tener en cuenta los requisitos expuestos en numeral relacionados con el informe de resultados de la norma ISO/IEC 17025, versión vigente, para la elaboración del informe de resultados. Se recomienda incluir en el informe de ensayo lo siguiente: (22)

- 1. Condiciones ambientales:** En esta sección se reporta: el valor máximo de humedad relativa (HR) y la temperatura, medidas durante la determinación de grasa total.

- 2. Resultado de medición:** Se debe reportar el valor promedio de al menos cuatro réplicas de medición (criterio por definir) realizadas corregidas por la humedad, acompañado de su incertidumbre expandida asociada, factor de cobertura y declaración del nivel de confianza.

11. ASEGURAMIENTO DE LA VALIDEZ DE LOS RESULTADOS

Con los resultados obtenidos de las cuatro mediciones de grasa total (criterio por definir), **bajo condiciones de repetibilidad**, calcular el coeficiente de variación (% CV) de las determinaciones de la misma muestra.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación debe ser menor o igual a 3.0 %.

Verificación para incumplimiento de criterio: Repetir el ensayo. Si persiste, revisar las condiciones ambientales bajo las cuales se realizó la medición, la homogeneidad de la muestra.

12. CALIBRACIÓN DE INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

- Antes de iniciar las actividades de pesaje verificar que la balanza seleccionada cuenta con calibración vigente y mantenimiento adecuado, según lo estipulado por el laboratorio.
- La balanza y las pesas de verificación deberán contar con certificado de calibración vigente.
- Los equipos empleados, cuando aplique, deben contar con calibraciones, calificación, caracterización, verificaciones y/o mantenimientos vigentes.

13. TRAZABILIDAD METROLÓGICA

El contenido de grasa en aguacate Hass se determina como una relación de masas, de allí que la trazabilidad metrológica está dada hacia el kilogramo, como la unidad de masa en el Sistema Internacional, y de acuerdo con esto, la cadena de trazabilidad metrológica se fundamenta en los patrones de masa.

Por lo anterior, el laboratorio debe asegurar que la balanza usada en la medición está calibrada por un ente certificado y el certificado expedido se encuentre vigente; dicho certificado debe identificar la trazabilidad metrológica a patrones nacionales o internacionales de medición y su incertidumbre de medición. Con eso se establece la cadena de trazabilidad hasta el kilogramo.

En la cadena de trazabilidad se establece la secuencia que relaciona el valor del resultado y su incertidumbre con la unidad del Sistema Internacional; en cada etapa, se deberá especificar el valor o

alcance y la incertidumbre de medición en donde se evidencie la cadena ininterrumpida de calibraciones, así como la documentación que se encuentre asociada (certificados, informes, procedimientos, entre otros).

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NMX-FF-016-SCFI-2016. Productos alimenticios no industrializados para uso humano-fruta fresca-Aguacate (Persea americana Mill). Especificaciones. [Internet]. Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Economía. 2016. p. 1–7. Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5445368&fecha=21/07/2016
2. H. Cantwell. Blanks in Method Validation Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods [Internet]. 2019. Available from: www.eurachem.org.
3. Sandoval Lopez JA. Morfología Vegetal, FRUTOS II [Internet]. 2010 [cited 2021 Aug 5]. Available from: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/34651>
4. International Organization for Standardization. ISO 3947:1977 Almidones, nativos o modificados — Determinación del contenido de grasa total [Internet]. [cited 2021 Aug 5]. Available from: <https://www.iso.org/standard/9595.html>
5. ICONTEC. NTC 6345:2019 Frutas frescas. Aguacate variedad Hass. Especificaciones. 2019. p. 24.
6. JCGM. JCGM 200:2012, International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 2012.
7. Sociedad de Agricultores de Colombia. El aguacate Hass: Un fenómeno de la agricultura colombiana-Separata especial. Rev Nac Agric [Internet]. 2020;1000(035–0222):23–39. Available from: <https://sac.org.co/wp-content/uploads/2020/03/Revista-SAC-1000.pdf>
8. ASOHOFrucol - FNFH. El aguacate continúa ocupando el primer lugar de las exportaciones hortifrutícolas colombianas. Frutas y Hortalizas. 2020;No 75.
9. ASOHOFrucol - FNFH. Colombia: principal proveedor de aguacate Hass en Europa en 2021 Foto: Frutas y Hortalizas. 2020;No. 74(Año):1–48.
10. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Cadena productiva Aguacate - Cifras sectoriales [Internet]. 2020. p. 5. Available from: <https://sioc.minagricultura.gov.co/Aguacate/Documentos/2020-12-31 Cifras Sectoriales.pdf>
11. Ramírez-Gil JG, Henao-Rojas JC, Morales-Osorio JG. Postharvest diseases and disorders in avocado cv. Hass and their relationship to preharvest management practices. Heliyon [Internet]. 2021;7(1):e05905. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05905>
12. Gwanpua SG, Qian Z, East AR. Modelling ethylene regulated changes in ‘Hass’ avocado quality. Postharvest Biol Technol [Internet]. 2018;136(October 2017):12–22. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.10.002>

13. Cañete ML, De Los Cobos RP, Hueso JJ. Influence of harvest date on sensory quality attributes of avocado 'Hass.' *Acta Hort.* 2018;1194:1127–31.
14. Ozdemir F, Topuz A. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chem.* 2004;86(1):79–83.
15. Defilippi BG, Ejsmentewicz T, Covarrubias MP, Gudenschwager O, Campos-Vargas R. Changes in cell wall pectins and their relation to postharvest mesocarp softening of "Hass" avocados (*Persea americana* Mill.). *Plant Physiol Biochem.* 2018;128(April):142–51.
16. Carvalho CP, Velásquez MA, Van Rooyen Z. Determinación del índice mínimo de materia seca para la óptima cosecha del aguacate 'Hass' en Colombia. *Agron Colomb.* 2014;32(3):399–406.
17. Ferreyra R, Sellés G, Saavedra J, Ortiz J, Zúñiga C, Troncoso C, et al. Identification of pre-harvest factors that affect fatty acid profiles of avocado fruit (*Persea americana* Mill) cv. "Hass" at harvest. *South African J Bot.* 2016;104:15–20.
18. Rodriguez P, Henao JC, Correa G, Aristizabal A. Identification of harvest maturity indicators for 'hass' avocado adaptable to field conditions. *Horttechnology.* 2018;28(6):815–21.
19. Codex Alimentarius. NORMA DEL CODEX PARA EL AGUACATE (CODEX STAN 197-1995). 1997. p. 5.
20. JCGM 100:2008. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. *Int Organ Stand Geneva ISBN.* 2010;50(September):134.
21. Ellison SLR, Williams A. Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, Guía CG 4 EURACHEM / CITAC. *Eurachem/Citac.* 2012;3rd Editio:133.
22. NTC-ISO-IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. 2017.

NO ADOPTAR

Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM
Subdirección de Metrología Química y Biología, Red Colombiana de Metrología.
Av. Cra 50 No 26-55 Int. 2 CAN - Bogotá, D.C. Colombia
Conmutador: (571) 254 22 22
E-mail: contacto@inm.gov.co

www.inm.gov.co
www.rcm.gov.co

ColombiaMide es una apuesta que se da gracias a la cooperación entre la Unión Europea y el Ministerio de Comercio Industria y Turismo en Colombia, orientado a mejorar las capacidades metrológicas y de calidad en Mipymes en dos cadenas productivas, ejecutado por el Instituto Alemán de Metrología (PTB), con el apoyo del INM e Icontec como beneficiarios del proyecto.

Sujeto a variación de
condiciones de
medición.
NO ADOPTAR