


| | | |
|---------------|---|--|
| aoxlab | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble




AOXLAB S.A.S.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-058 Procedimiento de ensayo de Determinación de Fibra dietaria

Copia controlada No.: 1


| | Nombre | Puesto o función | Firma | Fecha |
|------------------------------------|--------------------------------|----------------------|--|------------|
| Elaboró: | Laura Stefanía Guerra Foronda | Director Técnico |  | 2024-04-29 |
| Revisó: | Angela P. Patiño Pérez | Directora de Calidad |  | 2024-04-29 |
| Aprobó: | Laura Stefanía Guerra Foronda | Director Técnico |  | 2024-04-29 |
| Localización del documento: | Plataforma SGC | | | |

Control de Cambios

| Estado | Fecha de inicio de vigencia | Revisión | Descripción del cambio realizado | Realizó | Revisó | Aprobó |
|----------|-----------------------------|----------|--|---------|--------|--------|
| Obsoleto | 2018-01-26 | 1 | Ninguno (versión original). | JMF/WFR | YELP | YELP |
| Obsoleto | 2022-08-23 | 2 | Cambio de formato. Se adiciona el apartado de preparación de la muestra. | SVA | APPP | DPP |
| Obsoleto | 2022-09-22 | 3 | Se modifica el procedimiento de proteína, agregándole la tabla para curva de proteína en fibra | GQB | APPP | DPP |
| Obsoleto | 2023-02-10 | 4 | Se modifica las condiciones de secado de la muestra de acuerdo con lo establecido en AOAC 985.29. se cambia la redacción del procedimiento de pretratamiento de las muestras | MAAC | APPP | DPP |
| Vigente | 2024-04-26 | 5 | Se modifica el alcance. Se incluyen equipos, reactivos y soluciones. Se especifica | LSGF | APPP | LSGF |


| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

| | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|
| | | | número de tamiz en 4.5.2.3. Se ajusta 4.5.3 con la limpieza y preparación de los crisoles. Se ajusta procedimiento, de acuerdo con los métodos de referencia. Se ajusta rampa de calentamiento para proteína. Se actualizan responsabilidades. | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. OBJETIVO Y ALCANCE. | 5 |
| 1.1 Objetivo. | 5 |
| 1.2 Alcance. | 5 |
| 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES. | 5 |
| 2.1 Definiciones. | 5 |
| 2.2 Notaciones. | 6 |
| 3. REFERENCIAS. | 6 |
| 4. DESARROLLO | 8 |
| 4.1 EQUIPOS DE MEDICIÓN. | 8 |
| 4.2 CONDICIONES GENERALES | 8 |
| 4.2.1 Inspección visual. | 8 |
| 4.2.2 Estabilización. | 9 |
| 4.2.3 Verificación de equipos. | 9 |
| 4.2.4 Manejo de la muestra. | 9 |
| 4.3 Medidas de seguridad. | 9 |
| 4.4 Instrucciones De Ensayo. | 10 |
| 4.4.1 Reactivos y/o soluciones | 10 |
| 4.4.2 Pretratamiento de la muestra | 11 |
| 4.4.2.1 Desengrasado de muestras | 11 |
| 4.4.2.2 Desazucarado de muestras. | 12 |
| 4.4.2.3 Molienda y tamizado. | 12 |
| 4.4.3 Limpieza y preparación de los crisoles de filtración | 12 |
| 4.4.4 PROCEDIMIENTO | 13 |
| 4.4.4.1 Incubación | 13 |
| 4.4.4.2 Determinación fibra dietaria insoluble (FDI) | 14 |
| 4.4.4.3 Determinación fibra dietaria soluble (FDS) | 15 |
| 4.4.4.4 Determinación fibra dietaria Total (FDT) | 15 |
| 4.5 Cálculos y reporte | 16 |
| 4.6 Control de la calidad | 17 |
| 6. FORMATOS RELACIONADOS. | 20 |
| 7. ANEXOS. | 20 |

| | | |
|---|--|--|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

1. OBJETIVO Y ALCANCE.

1.1 Objetivo.

Describir los pasos para realizar la determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble de acuerdo con los lineamientos establecidos en los documentos AOAC 985.29 [2], AOAC 991.42 [3]. AOAC 991.43 [4], AOAC 993.19 [5] y el kit de Fibra dietaria K-TDFR-100A/K-TDFR-200A 04/17 [6], así como con los requisitos establecidos por la norma ISO/IEC 17025:2017 [1].

1.2 Alcance.

| Prueba o ensayo | Norma o método de referencia | Técnica o Método |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Determinación de Fibra Dietaria | AOAC 985.29 | Gravimétrico-Enzimático |
| | AOAC 991.42 | Gravimétrico-Enzimático |
| | AOAC 991.43 | Gravimétrico-Enzimático |

Este método se aplica a matrices alimentarias y otros productos que lo requieran.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Calibración [6].


Operación que, bajo condiciones especificadas, en un primer paso, establece una relación entre los valores de las magnitudes con su incertidumbre de medición provista por patrones de medición y las indicaciones correspondientes con incertidumbres de medición asociadas y, en segundo paso, usa esta información para establecer una relación para obtener un resultado de medición de una indicación.

Desviación Estándar Relativa (DSR%) [6].

Estimador del grado de dispersión de medidas repetidas. Se calcula como

$$DSR \% = \frac{D.S.}{\bar{x}} \times 100$$

Donde D. S. es la desviación estándar de las réplicas y \bar{x} es el promedio de estas

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

Error relativo porcentual (E. R. %) [6].

Estimador del sesgo de una medición. Se calcula como

$$b\% = E.R.\% = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

Donde x_{ref} es el valor teórico o aceptado como verdadero y \bar{x} es el promedio de estas

Ensayo/prueba [7].

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento

Procedimiento [7].

Forma especificada para llevar a cabo una actividad o un proceso.

Fibra dietaria [8].

Es el conjunto de componentes de la dieta de origen vegetal, que son resistentes a las enzimas digestivas del ser humano, y químicamente estaría representado por la suma de los polisacáridos que no son almidones ni lignina. Forman parte de la fibra dietaria convencional componentes estructurales de la pared de las células vegetales: celulosa, hemicelulosa, sustancias pépticas y lignina; y no estructurales, como: gomas, mucílagos, polisacáridos de algas y celulosa modificada. Podemos clasificar a la fibra de acuerdo con su solubilidad en agua en fibra insoluble (FI) (celulosa, gran parte de las hemicelulosas y lignina) y soluble (FS) (pectinas, gomas, mucílagos, ciertas hemicelulosas, polisacáridos de algas y celulosa modificada).

2.2 Notaciones.


Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.


“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

“Ítem”: se refiere a los objetos o materiales bajo ensayo.

3. REFERENCIAS.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

- [1] ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories / Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- [2] TOTAL DIETARY FIBER. Assay procedure K-TDFR-100A/K-TDFR-200A 04/17 Megazyme Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, A98 YV29, IRELAND. ©2017
- [7] ISO 9000:2015 Quality management systems -- Fundamentals and vocabulary/ Sistemas de gestión de la calidad-- Fundamentos y vocabulario.
- [6] VIM: 2012, International vocabulary of metrology -- Basic and general concepts and associated terms.
- [8] Kritchevsky, D. 1988. Dietary Fiber. (Ann. Rev. Nutr. 8:30-328)
- [9] AOAC Official Method 985.29 22nd Ed. (2023) Total Dietary Fiber in Foods Enzymatic–Gravimetric Method
- [10] AOAC Official Method 991.43 22nd Ed. (2023) Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fiber in Foods Enzymatic–Gravimetric Method, MES–TRIS Buffer
- [11] AOAC Official Method 991.42 22nd Ed. (2023) Insoluble Dietary Fiber in Foods and Food Products: Enzymatic–Gravimetric Method, Phosphate Buffer

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

4. DESARROLLO

4.1 EQUIPOS DE MEDICIÓN.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

| Equipos y materiales |
|---|
| Balanza analítica con resolución de 0.1 mg |
| Baño María con capacidad de mantener $95 \pm 1^\circ\text{C}$ y ajustable a 60°C |
| Sistema de vacío, equipado con bomba de vacío, Erlenmeyer de filtración de 1 L y adaptadores para crisoles |
| Beakers de diferentes tamaños |
| Mufla con capacidad de temperatura de $525 \pm 5^\circ\text{C}$ |
| Estufa de secado, con capacidad de temperatura de 105°C y $130^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ |
| pH metro |
| Desecador con deshidratante adecuado (sálico gel con indicador, oxido de calcio o equivalente) |
| Plancha de agitación magnética |
| Titulador potenciométrico |
| Digestor de grafito |
| Transfer pipeta de 200 μL |
| Scrubber |
| Destilador Kjeldahl |
| Crisoles de filtración, con tamaño de poro de 40-60 μm (Porosidad No. 2) |
| Frascos schott 100 mL con tapa |
| Tamiz malla N° 40 – 425 μM ASTM |


4.2 CONDICIONES GENERALES

4.2.1 Inspección visual.

Al recibirse la muestra en el Laboratorio, ésta es inspeccionada a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio".

Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Se debe contar con al menos 100 gramos de muestra para realizar este análisis.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de Laboratorio.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

4.2.2 Estabilización.

Los ítems de ensayo, patrones y controles de calidad deben atemperarse con suficiente antelación de tal manera que se encuentren en equilibrio térmico con el ambiente en el cual se ejecutarán los ensayos.

La balanza analítica y otros equipos electrónicos que realicen mediciones de alguna magnitud correspondiente a condiciones de influencia en la ejecución del ensayo deben encenderse por lo menos media hora antes de su uso. Así mismo, deben verificarse los equipos, de acuerdo con lo establecido en el numeral siguiente.

4.2.3 Verificación de equipos.

Antes de iniciar el ensayo, debe verificarse que el estado de funcionamiento de los equipos sea adecuado. Esto puede llevarse a cabo revisando que cuenten con la etiqueta de mantenimiento vigente y que estos no tengan alguna etiqueta que lo identifique como "Fuera de servicio". Además, en el caso en el cual se lleve el control de uso, deben registrarse los últimos registros consignados en el formato FOR-TC-017, con el propósito de verificar que no se han registrado fallas en el funcionamiento. Si algún equipo es utilizado para la medición de alguna magnitud de influencia en el ensayo, este debe estar calibrado. Por tanto, se debe verificar la etiqueta de calibración adherida a este, y comprobar que se encuentre vigente.

Así mismo, debe verificarse que se haya realizado y registrado la verificación diaria de la balanza analítica en el formato FOR-TC-005


Además de lo anterior, debe verificarse la fecha de expiración de los patrones, materiales de referencia y controles de calidad empleados en el ensayo con el fin de evitar el uso de materiales vencidos.

4.2.4 Manejo de la muestra.

La ejecución de este análisis no requiere precauciones especiales para el manejo de los ítems de ensayo. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

4.3 Medidas de seguridad.

Durante el almacenamiento y ensayo de la muestra, esta debe permanecer herméticamente cerrada, con el fin de no alterar la humedad original que contiene la muestra durante estas actividades. La identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, deben realizarse de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

Sí la muestra es líquida, mezclar hasta homogeneidad aparente mediante agitación magnética, y con la ayuda de un gotero o una pipeta tomar la cantidad necesaria de muestra, mientras se continúa con la agitación.

Sí la muestra es sólida, moler o triturar en su totalidad hasta homogeneidad aparente.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC-015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XII.

4.4 Instrucciones De Ensayo.

4.4.1 Reactivos y/o soluciones

4.4.1.1 Agua desionizada tipo II

4.4.1.2 Solventes: hexano, bencina o solvente 10:20

4.4.1.3 Etanol 96 %

4.4.1.4 Solución de Etanol 85%: Adicionar 895 mL de etanol al 95% o 885,5 mL de etanol al 96% en un balón de 1 L. Completar el volumen con agua tipo II y homogeneizar.

4.4.1.5 Solución de Etanol 78%: Adicionar 821 mL de etanol al 95% o 812 mL de etanol al 96% en un balón de 1 L. Completar el volumen con agua tipo II y homogeneizar.

4.4.1.6 Acetona grado reactivo

4.4.1.7 Kit de análisis de fibra dietaria (Megazyme)

Almacenar entre 0°C - 5°C

El kit contiene:


- α -amilasa termoestable (3000 U/mL)
- Proteasa purificada (50 mg/mL; 350 Tyrosina U/mL)
- Amiloglucosidasa purificada (3300 U/mL en almidón soluble).

4.4.1.8 MES: 2(N-morpholino) ethanesulfonic acid

4.4.1.9 TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

4.4.1.10 Solución Buffer 0.05 M MES/M TRIS, pH 8,2 a 24°C

Pesar 19.52 g del reactivo MES y 12.2 g del reactivo TRIS, solubilizar inicialmente con 1.7 L de agua tipo II. Ajustar el pH a 8.2 utilizando NaOH 6M. Aforar la solución a 2L con agua tipo II. Si la temperatura del buffer es 20°C, ajustar el pH a 8.3; y si la temperatura es 28 °C, ajuste el pH a 8.1. Finalmente homogeneizar bien la solución.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

4.4.1.11 Ácido Clorhídrico 37%

4.4.1.12 Solución de HCl 15%

En un balón de 1L adicionar 400 mL de agua tipo II, adicionar 405 mL de ácido clorhídrico 37%, y mezclar. Aforar con agua tipo II hasta un 1L y homogeneizar bien la solución

4.4.1.13 Celite grado analítico

4.4.1.14 Solución de ácido clorhídrico 0.561 N

En un balón de 1 L adicionar 400 mL de agua tipo II, adicionar 93.5 mL de ácido clorhídrico 6 N o 47 ml de ácido clorhídrico 12N, mezclar. Aforar con agua tipo II hasta un 1L y homogeneizar bien la solución

4.4.1.15 Solución de NaOH 1M

En un balón de 1 L adicionar 400 mL de agua tipo II, adicionar 167 mL de ácido clorhídrico 6 N y mezclar. Aforar con agua tipo II hasta un 1L y homogeneizar bien la solución.

4.4.2 Pretratamiento de la muestra

Para preparar la muestra, debe realizarse una revisión documental para conocer el contenido aproximado de humedad, azúcar y grasa de la muestra. Dicha información debe emplearse para tomar una porción analítica tal que proporcione como mínimo 3 gramos de la muestra pretratada.

El primer paso del pretratamiento es secar la porción de muestra pesada en el beaker o frasco, a 105°C durante toda la noche, o por lo menos 5 horas. Si no se requiere desengrasar ni desazucarar, en este punto se continúa con el proceso de incubación.


Las muestras con un contenido mayor del 10% de grasa deben de ser desengrasadas, realizando el procedimiento descrito en 4.4.2.1

Las muestras con un contenido mayor del 5% de azúcar deben de ser desazucaradas de acuerdo con el procedimiento descrito en 4.4.2.2

Nota: Antes de realizar el procedimiento de secado, desengrasado o desazucarado de la muestra, consultar con el líder del laboratorio y el director técnico para tomar decisiones conforme a la composición de la muestra y determinar los pasos a seguir, contemplando consideraciones especiales que puedan tener las muestras.

4.4.2.1 Desengrasado de muestras

- Verificar que la muestra contenga un porcentaje de grasa mayor al 10%. Con el fin de conocer el porcentaje de grasa teórico en la muestra se puede remitir a

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

las fichas técnicas, tablas nutricionales o literatura, verificar el nombre de la muestra, apariencia física y composición.

- Tomar la muestra resultante del proceso de secado y realizar 3 lavados de la muestra con solvente, 25 mL por gramo de muestra.
- Filtrar la muestra y secar a 105°C.
- Enfriar en el desecador, pesar el beaker y registrar para realizar la corrección correspondiente.

4.4.2.2 Desazucarado de muestras.

- Verificar que la muestra contenga un porcentaje de azúcares mayor al 5%. Con el fin de conocer el porcentaje de azúcares teórico en la muestra se puede remitir a las fichas técnicas, tablas nutricionales o literatura, verificar el nombre de la muestra, apariencia física y composición.
- Tomar la muestra resultante de los procesos anteriores y realizar entre 2 y 3 lavados de la muestra con etanol al 85%, se adicionan 10 mL de etanol por gramo de muestra.
- Filtrar la muestra y secar a 105°C.
- Enfriar en el desecador, pesar el beaker y registrar para realizar la corrección en el valor de fibra dietaria.


4.4.2.3 Molienda y tamizado.

Una vez terminado todo el pretratamiento, y la muestra se encuentre seca, esta debe macerarse o molerse hasta pasar por un tamiz de 0.3 – 0.5 mm (tamiz No. 40). Esto es muy importante, ya que asegura la correcta acción de las enzimas agregadas durante el proceso analítico. En caso de que la muestra no pueda ser calentada, se debe congelar para proceder con la homogeneización de la muestra.

Si luego del proceso de desengrasado, desazucarado o secado, no se logra obtener como mínimo 2 gramos de muestra debido a la alta cantidad de grasa y/o azúcares y/o humedad, se procede a reportar la fibra dietaria menor del límite de cuantificación.

4.4.3 Limpieza y preparación de los crisoles de filtración

- Los crisoles de calcinación deben de estar limpios. Para ello, después de cada uso, lavarlos con abundante agua y jabón.
- Adicionar agua caliente a los crisoles para remover la mayor cantidad de residuos posibles.
- Realizar un segundo lavado con HCl al 15%, sumergiéndolos en esta solución por un tiempo no mayor a 30 minutos. Lavar muy bien con abundante agua.
 NOTA: Esta solución se puede reutilizar.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |


- Llevar los crisoles al sistema de filtración y adicionarles agua tipo II realizando lavados hasta no observarse presencia de jabón o suciedad.
- Secar los crisoles a estufa 105°C durante 5 horas como mínimo.
- Llevar a mufla a 525°C toda la noche, o mínimo 3 horas. Apagar la mufla y enfriar hasta mínimo 200°C para sacar los crisoles. Enfriar en el desecador e identificar adecuadamente.
- Pesar 1 gramo de celite en cada uno de los crisoles que se vayan a utilizar y llevarlos a estufa a 130°C por 3 horas.
- Llevar los crisoles al desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, pesar y registrar m_1 en el FOR-TC-049

4.4.4 PROCEDIMIENTO

4.4.4.1 Incubación

NOTA: utilizar un termómetro tipo sonda para medir la temperatura interna de las muestras y garantizar la temperatura durante los procesos de incubación.

- Pesar por duplicado $1,0000 \pm 0,005$ g de muestra (m_2) en un frasco schott de 100 mL.
- Adicionar 40 mL de solución buffer MES/TRIS a pH adecuado a cada frasco, y dispersar completamente la muestra usando agitación magnética. Esta operación puede tomar varios minutos y es indispensable para prevenir la formación de grumos, los cuales harían que el material de ensayo sea inaccesible a las enzimas.
- Adicionar 50 μ L de α -amilasa, mientras se agita suavemente.
- Tapar cada frasco con su tapa correspondiente e incubar en un baño de agua a 95-100°C durante 30 minutos con agitación continua. Empezar a contar el tiempo de incubación una vez el baño alcance los 95°C.
- Después de este tiempo, retirar las muestras del baño y enfriar hasta 60°C. Raspar con una espátula cualquier anillo formado y disperse cualquier gel en el fondo del beaker.
- Lavar las paredes del frasco con 10 mL de agua desionizada usando una pipeta para evitar que quede muestra sin digerar.
- Una vez las muestras se encuentran a 60°C, adicionar 100 μ L de Proteasa a cada una, tapar e incubar en un baño de agua a $60^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ con agitación continua por 30 minutos. Empezar a contar el tiempo de incubación una vez el baño alcance los 60°C.
- Pasado este tiempo, sacar el frasco del baño y adicionar 5 mL de solución de HCl 0,561 N con agitación constante. ajustar el pH de la muestra entre 4,1-4,7 (sin dejar enfriar) usando soluciones de HCl 0,561 M o NaOH 1M. **Es importante**

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

dejar el frasco fuera del baño de agua a 60°C el menor tiempo posible, de tal manera que el enfriamiento de la muestra no afecte la medición del pH.


- Adicionar 200 µL de Amiloglucosidasa con agitación constante, tapar e incubar en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos manteniendo agitación. Empezar a contar el tiempo de incubación una vez el baño alcance los 60°C.
- Si se desea determinar la cantidad de fibra dietaria soluble e insoluble, continuar con el procedimiento según el numeral 4.4.4.2 y 4.4.4.3. Si se desea cuantificar la fibra dietaria total, pasar al numeral 4.4.4.4.

4.4.4.2 Determinación fibra dietaria insoluble (FDI)

- Tomar los crisoles previamente pesados con el celite, ubicarlos en el sistema de filtración y adicionar aproximadamente 3 mL de agua para redistribuir la cama de celite, aplicando vacío.
- Después de la incubación, retirar los frascos del baño de agua y filtrar cada muestra al vacío, usando los crisoles del paso anterior, e identificarlos. Lave con un poco de agua el frasco y agregue este lavado al crisol.
- Lave el residuo en el crisol con dos porciones de 10 mL de agua destilada a 70°C.
- Guardar los filtrados y aguas de lavado para la determinación de fibra dietaria soluble, y continuar el proceso en el numeral 4.5.6.
- Lavar nuevamente el residuo en el crisol con dos porciones de 10 mL de Etanol al 78%, dos porciones de 10 mL de etanol al 96% v/v y dos porciones de 5 mL de acetona.

NOTA: demoras en los lavados de los residuos de la FDI pueden causar valores inflados de FDI.

- Secar los crisoles que contienen los residuos durante la noche a 103°C. Enfriar los crisoles en desecador y registrar el peso.
- Tomar uno de los crisoles con residuo y llevar a la mufla a 525°C durante 5 horas. Una vez pasado este tiempo, se enfría a temperatura ambiente dentro del desecador y se pesa para cuantificar el contenido de cenizas. El registro de este peso se realiza en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de las cenizas.
- El residuo en el otro crisol es utilizado para analizar proteína según el PROC-TC-052 "Procedimiento de Determinación de Proteínas-Método Kjeldahl", usando 6,25 como factor de conversión para calcular los gramos de proteína. El volumen de titulación es registrado en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de la información de proteínas.


| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

4.4.4.3 Determinación fibra dietaria soluble (FDS)

- Precalentar etanol al 96% a 60 °C.
- Tomar cada filtrado obtenido de 4.4.4.2 y las aguas de lavado y transferir a un beaker tarado de 600 mL.
- Ajustar el peso del filtrado y las aguas de lavado a 80 g con agua tipo II.
- Adicionar un total de 320 mL de etanol al 96% precalentado a 60°C al beaker, usar una porción de este etanol para lavar el Erlenmeyer de filtración y adicionar al beaker.
- Dejar en reposo por 60 minutos a temperatura ambiente.
- Pasado este tiempo, tomar los crisoles previamente pesados con el celite, ubicarlos en el sistema de filtración y adicionar aproximadamente 3 mL de etanol al 78% para redistribuir la cama de celite, aplicando vacío y filtrar cada mezcla al vacío. Lavar el beaker con un poco de etanol al 78% y con la ayuda de una espátula de silicona y adicionar al crisol.
NOTA: si se forman geles en el crisol que atrapen el líquido, rompa la película con una espátula.
- Realizar lavados del residuo en el crisol, usando dos porciones de 15 mL de Etanol 78%, dos porciones de 15 mL de Etanol 96% y dos porciones de 5 mL de acetona.
- Secar los crisoles que contienen los residuos durante la noche a 103°C. Enfriar los crisoles en desecador y registrar el peso.
- Tomar uno de los crisoles con residuo y llevar a la mufla a 525°C durante 5 horas. Una vez pasado este tiempo, se enfría a temperatura ambiente dentro del desecador y se pesa para cuantificar el contenido de cenizas. El registro de este peso se realiza en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de las cenizas.
- El residuo en el otro crisol es utilizado para analizar proteína según el PROC-TC-052 "Procedimiento de Determinación de Proteínas-Método Kjeldahl", usando 6,25 como factor de conversión para calcular los gramos de proteína. El volumen de titulación es registrado en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de la información de proteínas.

4.4.4.4 Determinación fibra dietaria Total (FDT)

- Después de la incubación realizada en el numeral 4.5.4, retirar los frascos del baño de agua, adicionar la muestra en un beaker de 600 mL, a cada beaker adicionar 225 mL de Etanol 96% precalentado a 60°C y dejar en reposo durante 60 minutos a temperatura ambiente (esta cantidad puede variar dependiente de la cantidad de muestra, el ratio de etanol a la muestra debe ser de 4:1).


| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

- Tomar los crisoles previamente pesados con el celite, ubicarlos en el sistema de filtración y adicionar aproximadamente 3 mL de etanol al 78% para redistribuir la cama de celite, aplicando vacío y filtrar cada mezcla al vacío. Lavar el beaker con un poco de etanol al 78% y con la ayuda de una espátula de silicona y adicionar al crisol.
NOTA: si se forman geles en el crisol que atrapen el líquido, rompa la película con una espátula.
- Realizar lavados del residuo en el crisol, usando dos porciones de 15 mL de Etanol 78%, dos porciones de 15 mL de Etanol 96% y dos porciones de 5 mL de acetona.
- Secar los crisoles que contienen los residuos durante la noche a 103°C. Enfriar los crisoles en desecador y registrar el peso.
- Tomar uno de los crisoles con residuo y llevar a la mufla a 525°C durante 5 horas. Una vez pasado este tiempo, se enfría a temperatura ambiente dentro del desecador y se pesa para cuantificar el contenido de cenizas. El registro de este peso se realiza en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de las cenizas.
- El residuo en el otro crisol es utilizado para analizar proteína según el PROC-TC-052 "Procedimiento de Determinación de Proteínas-Método Kjeldahl", usando 6,25 como factor de conversión para calcular los gramos de proteína. El volumen de titulación es registrado en el FOR-TC-049 en el apartado destinado para el registro de la información de proteínas.
- NOTA: para la digestión de las proteínas usar la siguiente rampa de calentamiento:

| ETAPAS DE LA RAMPA DE CALENTAMIENTO | TEMPERATURA (°C) | TIEMPO (HH:MM) |
|-------------------------------------|------------------|----------------|
| 1 | 170°C | 00:30 |
| 2 | 250°C | 01:00 |
| 3 | 300°C | 00:30 |
| 4 | 330°C | 00:30 |
| 5 | 370°C | 02:00 |

4.5 Cálculos y reporte

Todos los datos consignados en el FOR-TC-049, se ingresan en el cuadro de mando SOFT-TC-031 Cuadro de mando para el ensayo de Fibra dietaria, ubicado en la ruta de acceso L:\LABORATORIO\REGISTROS\REGISTROS RT\Cuadros de Mando\Cuadros de Mando AÑO\FISICOQUÍMICA\ALIMENTOS\FIBRA DIETARIA

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

En el cuadro de mando de Excel están programados los cálculos:

$$\% \text{ fibra dietaria} = \frac{\frac{R1+R2}{2} - C - P - B}{\frac{M1+M2}{2}} \times 100$$

Donde:

M1 y M2 = Peso de las porciones de muestra, en gramos

R1 = Peso del residuo de M1, en gramos

R2 = Peso del residuo de M2, en gramos

C = Peso de las cenizas, en gramos

P = Peso de las proteínas, en gramos

B = peso del Blanco, que se calcula así:

$$B = \frac{BR1 + BR2}{2} - BC - BP$$

Donde:

BR1 y BR2 = peso de los respectivos residuos duplicados del blanco, en gramos

BC = Peso de las cenizas del blanco, en gramos


BP = Peso de la proteína del blanco, en gramos

Estos cálculos pueden ser simplificados usando el Mega-Calc™ de Megazyme, descargable del sitio web de Megazyme (www.megazyme.com).

4.6 Control de la calidad

El tipo, periodicidad y criterios de aceptación para los resultados obtenidos de los ensayos para el control de calidad se resumen en la tabla siguiente:

| CONTROL | PERIODICIDAD | CRITERIO |
|------------------------------|--|--|
| Blanco de reactivos. | Cada que se realice el análisis | Menor o igual a la mitad del límite de cuantificación. |
| Controles del kit de enzimas | Cada que se abra un kit nuevo de enzimas (si el kit dura mpas de 6 meses, analizarlo cada 6 meses) | El % de recuperación debe estar dentro de los rangos especificados en el kit de control de fibra dietaria. |

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

| | | |
|-------------------------|--|--|
| Duplicado de muestra | Cada análisis se debe de preparar un duplicado por montaje | RSD no mayor del 10 %. |
| Material de referencia* | Cada que se realice el análisis | El resultado del ensayo debe estar en el intervalo de valores establecidos como aceptables en el certificado del material. |

*El material de referencia será utilizado si se encuentra disponible en el mercado. De igual manera se puede realizar el análisis con muestras retenidas, como por ejemplo pruebas interlaboratorio.

El seguimiento de los resultados obtenidos del control de calidad listado en la tabla control debe realizarse y analizarse mediante el uso de cartas control, de acuerdo con los lineamientos establecidos en el procedimiento PROC-TC-077.

Estos datos son registrados en las cartas control, lo que permite realizar el análisis de tendencias, de acuerdo con PROC -TC – 077.


5. RESPONSABILIDADES.

Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

Director de Calidad.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Revisar los resultados obtenidos del aseguramiento de calidad del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.


| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

Líder de Laboratorio.

- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar el análisis de los resultados de control de calidad de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-077
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

| | | |
|---|--|---|
|  | Procedimiento de ensayo Determinación de Fibra dietaria total, soluble o insoluble AOXLAB S.A.S | Identificación: PROC-TC-058 |
| | | Revisión: 5 |
| | | Inicio de vigencia: 2024-04-29 |

6. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-031 "Cuadro de mando para el ensayo de Fibra dietaria"

FOR-TC-049 "Formato para el registro de datos primarios del ensayo de Fibra dietaria".

7. ANEXOS.

No aplica.