



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CIBA, TLAXCALA



“DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES Y ADULTERACIÓN DE LA LECHE EMPLEANDO LA ESPECTROSCOPIA DE FTIR”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA

PRESENTA:

I. Q. ALICIA ORTIZ RAMÍREZ

DIRIGIDA POR:

DR. RAÚL DELGADO MACUIL

DRA. MYRNA SOLIS OBA

JULIO 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tlaxcala el día 24 del mes Junio del año 2009, la que suscribe Alicia Ortiz Ramirez alumna del Programa de Maestría Tecnología Avanzada con número de registro A070477, adscrito a CIBA Tlaxcala, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Raúl J. Delgado Macuil y la Dra. Ma. Myrna Solís Oba y cede los derechos del trabajo intitulado Determinación de los componentes y adulteración de la leche empleando la espectroscopia de FTIR, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: orami_ali@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

I. Q. Alicia Ortiz Ramirez.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional, y al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada por haber prestado sus instalaciones para realizar el presente trabajo así como el apoyo brindado mediante las becas otorgadas: PIFI e Institucional.

A cada una de las personas involucradas en este trabajo, a mi director de tesis El Dr. Raúl Delgado, a mi codirectora la Dra. Myrna Solís, al Dr. Marlon Rojas, al Dr. Víctor Eric López, al Dr. Raúl René Robles, a la Dra. Maricarmen Cruz, gracias por su apoyo.

Agradezco al Mtro. Valentín, y el Mtro. Abdú por sus enseñanzas y amistad.

Gracias a todos mis compañeros con quienes compartí muchos de los conocimientos impartidos durante mi estancia en el CIBA y buenos momentos, quienes gracias a su apoyo y amistad me dieron la oportunidad de conocerlos y de seguir adelante en momentos difíciles.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de estar aquí y llegar a una etapa muy importante en mi vida profesional.

A mis padres por el apoyo y estar a mi lado durante el desarrollo de este trabajo.

A mi mami por ser la persona más inteligente, honesta y hermosa, Gracias por estar en mi vida.

A mi padre por enseñarme a ser una persona honesta y responsable, Gracias por estar en mi vida.

A Mar por ser mi mano derecha, Gracias por existir en mi vida y por todo el amor.

Al Dr. Raúl Gracias por los conocimientos adquiridos a lo largo de este trabajo, y ser una inspiración en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRAC	2
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN	4
CAPITULO 2 ANTECEDENTES	7
2.1 COMPOSICION DE LA LECHE	7
2.2 FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICION DE LA LECHE	13
2.3 TIPOS DE LECHE	15
2.4 PRODUCTOS DE LECHE	16
2. 5 SUERO DE LECHE	18
2.6 PRUEBAS FISICOQUIMICAS DE LA LECHE	19
2.7 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	21
2.7.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR FTIR	22
2.7.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR MILKOSCAN	24
2.8 QUIMIOMETRÍA	26
2.8.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO	29
CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 ANÁLISIS PRELIMINAR	30
3.1.1 ANÁLISIS DE LECHE CRUDA, ENTERA Y SEMIDESCREMADA	30
3.2 PRUEBAS FISICOQUIMICAS	31
3.2.1 DETERMINACIÓN DE GRASA POR MÉTODO GERBER (NOM 155 SCFI 2003, AOAC 2000.18)	31
3.2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR MÉTODO DE MICRO KJELDAHL (NOM 155 SCFI 2003, AOAC 991.20)	32
3.2.3 DETERMINACIÓN DE LACTOSA POR EL MÉTODO FEHLING (AOAC 974.06)	33
3.3 ANALISIS CON FTIR Y MILKOSCAN	34
3.3.1 ADULTERACIÓN CON SUERO EN POLVO.	34
3.3.2 ADULTERACIÓN CON SUERO LÍQUIDO (PANELA Y OAXACA)	36
CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1 ANALISIS PRELIMINARES	37
4.1.1 LECHE CRUDA Y HERVIDA	37
4.1.2 LECHE CRUDA, ENTERA Y SEMIDESCREMADA	39
4.2 PRUEBAS FISICOQUIMICAS Y POR MILKOSCAN	42
4.3 FTIR Y MILKOSCAN	45
4.3.1 ADULTERACIONES CON SUERO EN POLVO	45
4.3.2 ADULTERACIONES CON SUERO LÍQUIDO	56
4.3.2.1 SUERO DE QUESO TIPO PANELA	60
4.3.2.2 SUERO DE QUESO TIPO OAXACA	67
4.4 CURVA DE CALIBRACION	74
CAPÍTULO 5 ANALISIS ESTADISTICO	77
5.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR	77
5.2 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	80
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. ESQUEMA DEL PRINCIPIO DE OPERACIÓN DEL FTIR.	23
FIGURA 2.2.- ESPECTRO DE INFRARROJO DE LA LECHE, MOSTRANDO SUS REGIONES MÁS CARACTERÍSTICAS.	24
FIGURA 2.3.- ESQUEMA GENERAL DE FUNCIONAMIENTO DEL MILKOSCAN.	25
FIGURA 3.1.-	31
FIGURA 3.2.-	36
FIGURA 4.1- REGIÓN DEL ESPECTRO DE 930-1200 cm^{-1} , PARA MUESTRAS DE LECHE HERVIDA Y CRUDA.	38
FIGURA 4.2- REGIÓN DEL ESPECTRO DE AMIDA II, PARA MUESTRAS DE LECHE HERVIDA Y CRUDA.	39
FIGURA 4.3- REGIÓN DEL ESPECTRO DE AMIDA I, PARA MUESTRAS DE LECHE HERVIDA Y CRUDA.	39
FIGURA 4.4.- ESPECTRO DE COMPARACIÓN DE 3 LECHE, LECHE SEMI MARCA ALPURA, LECHE CLÁSICA MARCA ALPURA Y LECHE CRUDA.	40
FIGURA 4.5.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTOSA.	43
FIGURA 4.6.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.	44
FIGURA 4.7.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GRASA.	44
FIGURA 4.8.- ESPECTROS DE 3 TIPOS DE SUERO DE LECHE.	47
FIGURA 4.9.- ESPECTRO DE LECHE ADULTERADA CON SUERO 1.	48
FIGURA 4.10.- ESPECTRO DE LECHE ADULTERADA CON SUERO 2.	48
FIGURA 4.11.- ESPECTRO DE LECHE ADULTERADA CON SUERO 3.	49
FIGURA 4.12. ESPECTROS DE INFRARROJO DE LECHE ADULTERADA CON EL SUERO.	50
FIGURA 4.13. ESPECTROS DE INFRARROJO, REGIÓN DE LAS PROTEÍNAS.	52
FIGURA 4.14. ESPECTROS EN LA REGIÓN DE LOS 900-1800 cm^{-1} , QUE INCLUYE LA REGIÓN DE LA LACTOSA, LAS PROTEÍNAS Y LOS LÍPIDOS.	54
FIGURA 4.15. ESPECTROS EN LA REGIÓN DE LA AMIDA I Y AMIDA II (PARA EL CASO DE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE	55
FIGURA 4.16.- ESPECTRO DE LOS CAMBIOS EN LA REGIÓN DE LOS ENLACES C-H.	56
FIGURA 4.17. COMPARACIÓN ENTRE LOS ESPECTROS DE LOS 2 SUEROS LÍQUIDOS EMPLEADOS PARA ADULTERACIÓN DE LECHE Y EL ESPECTRO DE LA LECHE.	57
FIGURA 4.18. REGIÓN DE LA GRASA PARA LOS ESPECTROS DE SUEROS LÍQUIDOS Y LECHE.	58

FIGURA 4.19. COMPARACIÓN ENTRE EL ESPECTRO DEL GLUCOMACROPÉPTIDO Y LOS DIFERENTES LOTES DE LECHE UTILIZADAS.	59
FIGURA 4.20. COMPARACIÓN ENTRE EL ESPECTRO DEL GLICOMACROPÉPTIDO Y LOS DIFERENTES SUEROS UTILIZADOS (P, Q, SON SUEROS DE PANELA Y QUESILLO RESPECTIVAMENTE).	60
FIGURA 4.21. ESPECTROS DE SUERO DE QUESO TIPO PANELA, REGIÓN DE LACTOSA, PROTEÍNAS Y GRASA.	61
FIGURA 4.22. ESPECTROS REGIÓN DE LACTOSA DE MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO PANELA.	63
FIGURA 4.23. ESPECTROS REGIÓN DE PROTEÍNAS DE MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO TIPO PANELA.	64
FIGURA 4.24. ESPECTROS REGIÓN DE GRASA DE MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO TIPO PANELA.	65
FIGURA 4.25. COMPARACIÓN DE ANÁLISIS POR FTIR Y MILKOSCAN DE LACTOSA DE LAS ADULTERACIONES CON SUERO DE QUESO TIPO PANELA.	66
FIGURA 4.26. COMPARACIÓN DE ANÁLISIS POR FTIR Y MILKOSCAN DE PROTEÍNAS DE LAS ADULTERACIONES CON SUERO DE QUESO TIPO PANELA.	66
FIGURA 4.27. COMPARACIÓN DE ANÁLISIS POR FTIR Y MILKOSCAN DE GRASA DE LAS ADULTERACIONES CON SUERO DE QUESO TIPO PANELA.	67
FIGURA 4.28.- ESPECTROS DE SUERO DE QUESO TIPO QUESILLO, REGIÓN DE LACTOSA, PROTEÍNAS Y GRASA.	68
FIGURA 4.29. REGIÓN DE LACTOSA PARA LOS DIFERENTES ESPECTROS DE LA MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA (O QUESILLO).	70
FIGURA 4.30. REGIÓN DE PROTEÍNAS PARA LOS DIFERENTES ESPECTROS DE LA MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA (O QUESILLO).	71
FIGURA 4.31. REGIÓN DE LA GRASA PARA LOS DIFERENTES ESPECTROS DE LA MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA (O QUESILLO).	71
FIGURA 4.32. COMPARACIÓN DE ABSORCIÓN PARA FTIR Y EL PORCENTAJE OBTENIDO PARA LACTOSA, DE LAS MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA.	72
FIGURA 4.33. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS PARA -■-FTIR Y -◆-MILKOSCAN, DE LAS MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA.	73
FIGURA 4.34. COMPARACIÓN DEL ANÁLISIS DE GRASA PARA -■-FTIR Y -◆-MILKOSCAN, DE LAS MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO DE QUESO TIPO OAXACA.	73
FIGURA 4.35. CURVA DE CALIBRACIÓN GENERAL PARA LAS PROTEÍNAS.	75
FIGURA 4.36. ESPECTROS FTIR, REGIÓN DE PROTEÍNAS, DE DIFERENTES MUESTRAS DE LECHE, LECHE ADULTERADA Y SUEROS.	75
FIGURA 4.37. CURVA DE AJUSTE A LA CURVA DE FTIR.	76
FIGURA 5.1. COMPARACIÓN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR PARA LA LACTOSA, DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR FTIR Y POR MILKOSCAN.	78
FIGURA 5.2. COMPARACIÓN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE	79

PROTEÍNA, POR FTIR Y POR MILKOSCAN.	
FIGURA 5.3. COMPARACIÓN DE LAS DESVIACIONES ESTÁNDAR MEDIDOS PARA LA GRASA, DE LOS RESULTADOS POR FTIR Y POR MILKOSCAN.	80
FIGURA 5.4. ANÁLISIS DE PCA PARA LAS MUESTRAS DE SUEROS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.	81
FIGURA 5.5. ANÁLISIS DE PCA PARA LA DISCRIMINACIÓN ENTRE MUESTRAS DE LECHE Y SUERO.	82
FIGURA 5.6. ANÁLISIS DE PCA PARA LA DISCRIMINACIÓN ENTRE LECHE Y LECHE ADULTERADA CON SUERO.	83
FIGURA 5.7. ANÁLISIS DE PCA PARA MUESTRAS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO.	83

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1.- COMPOSICIÓN DE LA LECHE VACUNA DE LAS RAZAS OCCIDENTALES	8
TABLA 2.2.- RESUMEN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS EN LA LECHE BOVINA.	9
TABLA 2.3 ESPECIFICACIONES DE LECHE PASTEURIZADA ULTRAFILTRADA Y MICROFILTRADA DE ACUERDO CON LA NOM 155 SCFI 2003.	16
TABLA 2.4 PRUEBAS FISICOQUÍMICAS UTILIZADAS EN ESTE PROYECTO PARA LA DETERMINACIÓN DE LACTOSA GRASA Y PROTEÍNAS.	20
TABLA 4.1.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LOS 3 TIPOS DE LECHE POR MILKOSCAN.	41
TABLA 4.2.- ESPECIFICACIONES DE LECHE SEMIDESCREMADA (NOM-155-SCFI-2003)	42
TABLA 4.3.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LECHE SEMIDESCREMADA, PARA LACTOSA, PROTEÍNAS Y GRASA.	42
TABLA 4.4.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS (POR MILKOSCAN Y MÉTODOS FISICOQUÍMICOS) DEL ANÁLISIS DE LECHE SEMIDESCREMADA.	45
TABLA 4.5.- COMPOSICIÓN DE SUEROS EN POLVO POR MILKOSCAN.	46
TABLA 4.6.- ANÁLISIS DE LECHE ADICIONADA CON CONCENTRACIONES ALTAS DE SUERO.	50
TABLA 4.7.- ANÁLISIS POR MILKOSCAN DE ADULTERACIÓN A CONCENTRACIONES BAJAS DE SUERO.	51
TABLA 4.8. RESULTADOS DE ANÁLISIS POR MILKOSCAN.	53
TABLA 4.9. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE CADA UNO DE LOS COMPONENTES.	53
TABLA 4.10.- RESULTADOS DE ANÁLISIS POR MILKOSCAN DE SUERO DE QUESO TIPO PANELA.	61
TABLA 4.11.- RESULTADOS POR MILKOSCAN DEL ANÁLISIS DE LECHE ADULTERADA CON SUERO LÍQUIDO DE QUESO TIPO PANELA.	62
TABLA 4.12.- RESULTADOS DE MILKOSCAN PARA EL SUERO LÍQUIDO DE QUESO TIPO QUESILLO.	69
TABLA 4.13.- COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE MUESTRAS DE LECHE CON SUERO LÍQUIDO DE QUESO TIPO QUESILLO ANALIZADAS POR MILKOSCAN.	69
TABLA 4.14. VALORES DE ABSORBANCIA DE LAS MUESTRAS CON ADULTERACIONES ALEATORIAS DE SUERO EN LECHE.	76

Resumen

En la industria láctea y alimentaria en general, por los grandes volúmenes de producción que se manejan, son de gran ayuda técnicas de monitoreo más rápidas, eficientes y que sean aplicadas en línea; para determinar la composición del producto, detectar posibles adulteraciones y como sistemas de control de calidad de las empresas.

En este trabajo se presenta una metodología alternativa, basada en la espectroscopia de infrarrojo, para identificar los principales componentes de la leche así como para determinar la presencia de suero de queserías en leche (suero de queso tipo panela y Oaxaca).

Inicialmente se comparó la correspondencia de los resultados obtenidos por el equipo MilkoScan con los métodos químicos de Fehling, Kjeldahl y Gerber, que marcan la norma NOM-155-SCFI-2003 y la AOAC, para determinar las cantidades de proteínas, lactosa y grasa en la leche semidescremada. Los resultados obtenidos permitieron comprobar que la sensibilidad del equipo MilkoScan para la lactosa y proteínas fue muy buena, en tanto que para el caso de grasas el método Gerber presentó una menor variabilidad.

Una vez determinada la correspondencia entre las técnicas especificadas en la normatividad actual; se compararon las respuestas obtenidas mediante las técnicas espectroscópicas de infrarrojo, vibracional por el equipo de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y por filtros mediante MilkoScan. Los resultados obtenidos con MilkoScan, nos permitieron relacionar de manera directa la variación en porcentaje de los componentes de la leche, con el cambio en la absorción de los resultados de FTIR. Se identificaron los principales componentes (proteínas, lactosa y grasa) de las diversas muestras analizadas: leche, suero de queso tipo Oaxaca en polvo, sueros de queso tipo Oaxaca y Panela líquidos, leche enriquecida con suero en polvo y leche adulterada con diferentes cantidades de los 2 sueros líquidos. Los espectros obtenidos por FTIR permitieron determinar cómo es que influye la adición de suero, tanto líquido como en polvo, en la absorción de los espectros de leche; lo que permitió realizar la curva de calibración para la región que presentó la mejor correlación entre ambas técnicas, proteínas.

Al aplicar el método quimiométrico de componentes principales (PCA) a los datos de absorción de FTIR, se pudo obtener una mejor discriminación entre las diversas muestras de leche y suero; pero sobre todo, mediante la conjunción de ambas técnicas es posible diferenciar con mayor precisión, entre muestras de leche pura y muestras de leche adulterada con suero líquido de queserías.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se comprueba que la técnica de FTIR (en paralelo con PCA) es un método alternativo, rápido y eficaz, para identificar tanto componentes como la presencia de suero en la leche.

Palabras claves: FTIR, ATR, MilkoScan, suero de leche, PCA.

Abstract

In the milky industry, by the great volumes of production that are handled, techniques of monitoring faster, efficient and that could be applied at line are helpful; in order to determine the product composition, to detect possible adulterations and for quality control systems of the companies.

In this work an alternative methodology is present, based in infrared spectroscopy, to identify the main components of milk as well as to determine the whey presence in milk.

Initially the correspondence of the results obtained by MilkoScan equipment with the chemical methods of Fehling, Kjeldahl and Gerber was compared, as the NOM-155-SCFI-2003 and the AOAC said, to determine the amounts of proteins, lactose and fat in partially skimmed milk. The obtained results allowed verifying that the sensitivity of MilkoScan equipment for lactose and proteins was very good, whereas for the case of fats the Gerber method show a lower variability.

Once determined the correspondence between the specified techniques in the actual normativity; the results obtained by two infrared spectroscopic techniques were compared, vibrational by Fourier Transformed Infrared (FTIR) and by filters by MilkoScan. The MilkoScan results, allowed us to relate of direct way the percentage variation of the components of milk, with the absorption changes in FTIR. The main components (proteins, lactose and fat) of the several analyzed samples were identified: milk, whey in dust of Oaxaca cheese, liquid whey of Oaxaca cheese and Panela cheese, milk enriched with whey in dust and milk adulterated with different amounts from 2 liquids whey. The spectra obtained by FTIR allowed to determinate the influences of the whey addition, as in liquid as in dust, in the absorption of the milk spectrum; this allowed to us obtain the calibration chart for the region that present the best correlation between both infrared techniques, proteins.

When the analysis of principal components quimiometric method (PCA) was applied to the data of absorption of FTIR, a better discrimination could be obtained between the diverse samples of milk and whey; but mainly, by the conjunction of both techniques it is possible to differentiate more accurately, it enters samples of pure milk and milk samples adulterated with liquid whey obtain by the cheeses factories.

With the results obtained in the present work, it is possible verified that the FTIR technique (in parallel with PCA) is an alternative method, fast and effective, to identify the whey presence in milk samples.

Keywords: FTIR, ATR, MilkoScan, whey, PCA

CAPÍTULO 1

Introducción

La leche es uno de los alimentos que debido a su contenido de nutrientes tales como: proteínas, grasa, carbohidratos y minerales como el calcio, representa un aporte importante de estos constituyentes a la dieta básica del ser humano.

Para los mamíferos representa el único alimento durante la primera etapa de su vida. La leche es uno de los alimentos naturales más preciados y ha sido el componente básico de diversos alimentos humanos, como el queso, yogurt, mantequilla, crema, etcétera [1, 2].

Dado que la leche más consumida es la de origen bovino, en el presente trabajo se hablara de ella. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA); informó que el crecimiento en la producción nacional mexicana de este alimento llego a ser para el 2008 de 10,500 millones de litros [3]. Aunque es del dominio público, que una de las prácticas más comunes en la producción e industria de la leche, es la adición de algún tipo de sustancia para aumentar su volumen [4], por lo que es necesario establecer con certeza dichas propiedades que se relacionada con su composición.

Llevar al consumidor productos que no cumplan con las normas nacionales o internacionales establecidas y cuyas denominaciones no correspondan a la forma en que son presentados, es considerado un fraude. Se considera adulterado un producto cuando su naturaleza o composición no correspondan a aquellas con que se etiquete, es por eso que es importante conocer los diferentes constituyentes de la leche y las cantidades de sus componentes [5].

Dentro de las sustancias más comunes para adulteración de la leche se encuentra el agua y en algunas ocasiones el suero de leche [6, 7].

Al agregar suero liquido la composición de la leche se ve afectada disminuyendo sus valores de grasa, proteínas y en menor medida lactosa, aumentando el porcentaje de agua; lo cual representa un fraude al vender un producto que no cumple con las especificaciones requeridas bajo norma. Este fraude debe recibir especial atención tanto por parte de las autoridades sanitarias como de las industrias procesadoras, en virtud de las repercusiones de índole legal y económica que representan.

Los métodos que se aplican desde hace tiempo para poder detectar algunos tipos de adulteración en la leche están basados en diferentes propiedades como el punto de congelación (Crioscópico), índice de refracción (Refractométrico) y peso específico (Lactométrico) de la leche; estos métodos clásicos sirven para la detección de agua adicionada a la leche. Pero también muchos de los

métodos para detectar adulteraciones presentan ciertas desventajas como son el tiempo de análisis y el costo; además de que algunos de ellos presentan poca exactitud, como los que se mencionan a continuación.

Como ejemplo la determinación de agua por el método lactométrico, que se fundamenta en el peso específico de la leche (28 a 33 °C), solo revela la adulteración cuando el porcentaje de agua es muy grande (mayor del 15%). Esta misma desventaja la presenta el método refractométrico, que solo permite detectar la adulteración por agua en un porcentaje mayor del 10 o 15%. El método crioscópico es aplicado para determinar si la leche ha sido adulterada con agua [8]. Este método se basa en el punto crioscópico de la leche (0.510 a - 0.536 ° C). El descenso normal de este punto se debe principalmente a la lactosa y sales minerales que se encuentran en solución. En cambio la acidificación, debida a la fermentación de la lactosa, aumenta el descenso crioscópico, lo que se refleja en la aglomeración de un número mayor de moléculas; es por esta razón que el método crioscópico solo puede ser aplicado a leches frescas o con una acidez no mayor de 0.18 a 1% [9].

En la industria láctea y alimentaria en general son de gran ayuda técnicas de monitoreo más rápidas, eficientes y que puedan ser aplicadas en línea; con la finalidad de poder determinar: la composición, el control de calidad, determinar posibles adulteraciones y encontrar posibles contaminantes en la leche [10].

Debido al avance de la tecnología, métodos instrumentales rápidos y precisos han sido gradualmente introducidos en la industria alimentaria en general, los cuales tiene muchas ventajas comparados con las técnicas establecidas en épocas pasadas [11].

Las técnicas ópticas han surgido como técnicas alternativas para solventar estos requerimientos, ya que son técnicas rápidas, precisas y que pueden ser aplicadas en línea. De hecho existen algunos trabajos donde la espectroscopia de reflectancia en la región del mediano infrarrojo, ha sido utilizada para analizar productos lácteos como por ejemplo el queso de leche de vaca, donde se determinó la presencia de sólidos totales, grasa y proteína [12].

Así también la espectroscopia de Infrarrojo aplicando Transformada de Fourier (FTIR) ha sido usada para la predicción de los principales aspectos nutricionales de la leche semi y descremada, apoyándose para esto con técnicas quimiométricas; como son los mínimos cuadrados parciales [13].

Algunas industrias líderes en la producción y uso de leche, utilizan equipos de espectroscopia de infrarrojo para el análisis cuantitativo de muestras, como es el caso del Milko-Scan. Esta técnica

ha sido utilizada para determinar grasa, proteína y lactosa en la leche cruda y sus resultados han sido comparados con los obtenidos mediante la espectroscopia de FTIR [14, 15].

Este trabajo se inicio analizando muestras de leche por métodos convencionales aplicando metodologías químicas de acuerdo con la norma NOM-155-SCFI-2003, posteriormente se analizaron estas mismas muestras por medio de Milkoscan para observar la correspondencia de la norma NOM-155-SCFI-2003 con la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004. Posteriormente se realizó un análisis únicamente con Milkoscan y con FTIR. Se analizaron muestras de leche adulteradas con suero en polvo y líquido a diferentes concentraciones y se procedió a generar las curvas de calibración basadas en las diferentes regiones del espectro de la leche (región de lactosa, de proteínas y grasa). Los resultados obtenidos de la leche y leche con suero por FTIR, se procesaron por métodos quimiométricos utilizando el método de Análisis de Componentes Principales (PCA).

CAPÍTULO 2

Antecedentes

2.1 COMPOSICION DE LA LECHE

La leche es un líquido blanquecino producto natural de la secreción de la glándula mamaria de diferentes animales. Es un fluido biológico complejo, la composición y características físicas varían de acuerdo con los requerimientos necesarios de cada especie [2]. Está compuesta por una mezcla compleja de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales.

Diversos animales son usados para la producción de leche para el consumo humano: vacas, cabras, ovejas, búfalos, camellos; todos forman la base del comercio de la producción de leche en varias partes del mundo. La producción de leche animal dominante en una región refleja las condiciones geográficas y climáticas. En muchas partes del mundo las vacas son de abrumadora importancia en la producción de leche [1,2].

Las características fisicoquímicas y de composición de la leche varían por la influencia de un sin número de factores: los asociados con el animal, entre ellos la raza, nivel de producción, número de lactación, edad y estado sanitario. Los que dependen de las condiciones de manejo, es decir alimentación, ordeño y alojamiento. Asimismo de los factores relacionados con el ambiente, estación del año y clima [16].

La fracción lipídica es la que tiene mayor variabilidad composicional, se conoce que el contenido de la grasa en la leche puede verse influenciado por diversos factores, como es el caso de la raza [17, 18] y estación del año [19]. Se observa que el factor más importante que afecta el contenido graso de la leche es la época del año, asociada con otros que no pueden separarse como: los diferentes tipos de alimentación, estado de lactación, periodos de luz y temperatura ambiental [20, 21].

TABLA. Composición de la leche vacuna de las razas occidentales.

Componente	Porcentaje medio	Intervalo para razas occidentales ^a
Agua	86.6	85.4-87.7
Grasa	4.1	3.4-5.1
Proteínas	3.6	3.3-3.9
lactosa	5.0	4.9-5.0
Cenizas	0.7	0.68-0.74

^a Las razas occidentales incluyen Guernsey, Jersey, Ayshire, Parda suiza, Shothorn y Holstein.

A continuación se muestra una tabla de los componentes más importantes de la leche y posteriormente se mencionan, de manera general.

TABLA 2. Resumen de los componentes mayoritarios en la leche bovina.

	Concentración (g/L)	Porcentaje aproximado
Sólidos totales		
proteínas		
caseínas	24-28	80
α -caseína	15-19	
β -caseína	9-11	
κ -caseína	3-4	
γ -caseína	1-2	
Proteínas del suero	5-7	20
β -Lactoglobulina	2-4	
α -Lactoalbúmina	1-1.5	
Proteosas-peptonas	0.6-1.8	
Albumina sérica	0.1-0.4	
Inmunoglobulinas	0.6-1.0	
Grasa		
Triacilglicerol (Triglicéridos)	30.7	95.80
1, 2-Diacilglicerol (diglicéridos)	0.72	2.25
Monoacilglicerol (monoglicéridos)	0.03	0.08
Ácidos grasos libres	0.09	0.028
Fosfolípidos	0.36	1.11
Colesterol	0.15	0.46
Esteres de colesterol	0.006	0.02
Sales	mg/100 mL	
Calcio Total	114-124	
Ion calcio	6-16	
Magnesio	11.7-13.4	
Citrato inorgánico	171-198	
Fosforo	53-72	
Sodio	48-79	
Potasio	116-176	
Cloruro	92-131	

Agua

Por ser el componente mayoritario, el agua es usada como solvente para los demás componentes. El contenido de agua tiene influencia en la textura y las propiedades físicas y mecánicas de los alimentos. El agua constituye el disolvente de la lactosa y las sales y es donde se encuentra la mayor parte; la parte restante, que es muy pequeña, esta retenida por sustancias en emulsión y en suspensión, esta parte no disuelve, está ligada a las proteínas mayormente. Las micelas contiene aproximadamente 70% de agua, donde la primera capa de moléculas de agua adyacentes a la cadena peptídica, están ligadas por enlaces de hidrogeno [22].

Carbohidratos

La lactosa (beta-D-galactopiranosil(1-4)-beta-D-glucopiranosido) es el carbohidrato en la leche vacuna. Está formado por glucosa y galactosa. La lactosa presenta 2 formas α y β y esta última es más soluble. La concentración de la lactosa varía entre un 40 % y 50 %. Debido a la regulación osmótica, el contenido en lactosa de la leche es inversamente proporcional al contenido de sales (sodio y potasio).

La lactosa es una fuente de energía en la dieta diaria y promueve la absorción de calcio, para los mamíferos en periodo de desarrollo constituye el 40 % de la energía consumida, se hidroliza por la lactasa (una β -galactosidasa) [23].

Proteínas

La leche contiene de 30 a 36 g/L de proteína total. Dentro de las más abundantes se encuentran: α_1 -caseínas, α_2 -caseínas, β -caseínas, κ - caseínas, β -lactoglobulinas y α -lactoalbúminas. Las proteínas de la leche se clasifican como caseínas o proteínas del suero. La caseína supone el 80 % de las proteínas de la leche, un distintivo clave de las caseínas es su alto contenido de residuos fosfoserilios y su moderadamente grande contenido de prolina; las proteínas restantes son retenidas en el suero del queso y estas proteínas contienen considerablemente mucho más residuos de cistina que las caseínas. La separación de las caseínas de las restantes proteínas se realiza mediante la precipitación a su punto isoeléctrico (pH 4.6) o por aglomeración de las micelas de caseína inducidas enzimáticamente, como en la fabricación de queso. La β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina, que son productos genéticos de la glándula mamaria, están contenidos en el suero, el cual contiene también albúmina sérica e inmunoglobulinas que proceden de la sangre. [22, 23]

Caseínas

Las caseínas constituyen el 80% de las proteínas en la leche. Estas proteínas fosforadas son globulinas. Las caseínas α , β y κ se diferencian en peso molecular y en la cantidad de grupos fosfatos que llevan unidos. Así la α -caseína tiene un peso molecular (PM en g/gmol) de 27,300 y un aproximado de 6 grupos fosfato por molécula, la β -caseína un PM de 24,100 y de 4 a 5 grupos fosfato por molécula y la κ -caseína un PM estimado de 8000 y 1.5 grupos fosfato por molécula [23].

Existe otra caseína que se encuentra en menor proporción, que es producto de la ruptura de algunas cadenas de la β -caseína, las proporciones de cada una son: α -caseína 50%, β -caseína 30%, κ -caseína 15% y γ -caseína 5% [22].

La caseína se encuentra en la leche como sal clásica. Las caseínas α y β son insolubles en la leche en presencia de calcio, debido a que el grupo fosfato es insoluble en presencia del calcio; pero gracias a la κ -caseína se solubiliza toda la estructura (submicela), quedando la parte hidrófoba hacia dentro de la micela y la parte hidrófila hacia fuera. Esto es porque la κ -caseína tiene carácter hidrófilo por la presencia de trisacáridos y el extremo hidrófilo una proporción alta de grupos carbonilos por los grupos ácidos de los aminoácidos como el glutámico y aspártico. Las submicelas se unen unas con otras para dar como resultado las micelas por la formación de fosfato cálcico, por el calcio disuelto en la leche. La suspensión de las micelas es debido a que los grupos ácidos de la κ -caseína quedan en la parte externa de la micela, la cual queda cargada negativamente y se produce repulsión entre micelas. Al bajar el pH (4.6) de la leche estos grupos se protonan y las micelas se precipitan [23].

Proteínas Séricas

Estas son moléculas solubles que aparecen en el suero, producto de la elaboración de queso. Contienen aminoácidos azufrados como la lisina y el triptófano que son de alto valor nutritivo. La secuencia de la distribución de los residuos hidrófobos, polares y cargados es bastante uniforme. Estas proteínas se pliegan intramolecularmente para alojar en su interior la mayoría de sus residuos hidrófobos, para que no ocurran interacciones con otras proteínas. La funcionalidad de la β -lactoglobulina está gobernada por la presencia de enlaces disulfuro (cuatro puentes) y grupos sulfhidrilo (uno libre que interacciona con la κ -caseína). El grupo sulfhidrilo interviene en el sabor a cosido de la leche. La β -lactoglobulina es una proteína globular, casi esférica y su estabilidad es tal que experimenta cambios estructurales irreversibles en el intervalo de temperatura de muchos procesos térmicos de la leche y productos lácteos [23].

La α -lactoalbúmina se desnaturaliza a una temperatura más baja que la β -lactoglobulina, la termodesnaturalización de la α -lactoalbúmina no es reversible. La α -lactoalbúmina tiene 8 residuos de cisteína por molécula, cuatro de estos aplicados en puentes disulfuro y tiene un alto contenido de triptófano (6%). [23].

Grasa

La molécula de grasa está formada por un núcleo de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. Los triglicéridos representan el 96-98% del total de lípidos de la leche, los cuales están presentes en forma de glóbulos de 2 a 6 μm de diámetro, recubiertos de un material membranoso derivado de la membrana de proteínas y fosfolípidos, que protege la grasa emulsionada del ataque de enzimas lipolíticas presentes en la leche. Los glóbulos de grasa son las partículas más grandes en la leche [24].

De la composición lipídica mas representativa en la leche se encuentran: triglicéridos (95.8%), diglicéridos (2.25%), monoglicéridos (0.08%), ácidos grasos libres (0.28%), fosfolípidos (1.11%), colesterol (0.46%), esteres del colesterol (0.02%) y el resto son hidrocarburos (trazas). Durante el almacenamiento de la leche, tiene lugar cierto grado de lipólisis, lo que se refleja en mayores concentraciones de ácidos grasos libres, mono y diglicéridos. En los lípidos bovinos se han identificado más de 400 ácidos grasos diferentes y al tener consideración de sus isómeros posiccionales, teóricamente es posible la existencia de 64 millones de especies de triglicéridos. De estos, 13 ácidos grasos están presentes a concentraciones superiores al 1% del peso total.

Los lípidos y ácidos grasos de la leche exhiben el mayor porcentaje de variabilidad y son los elementos que más fácilmente pueden ser alterados de todos los componentes de la leche (cambio o modificación), por factores ambientales o por la misma dieta del animal.

Los lípidos contenidos en la membrana de glóbulo graso constan del 20% de fosfolípidos, siendo los tipos principales: fosfatidiletanamina (22.3%), fosfatidilcolina (33.6%) y esfingomielina (35.3%) [23].

Vitaminas

La leche contiene vitaminas, todas ellas esenciales, pero en cantidades variantes y a veces insuficientes. El contenido de vitamina en la leche cruda puede ser modificado por diferentes tratamientos, como por ejemplo los tratamientos térmicos. Algunas son vitaminas liposolubles como: vitamina A, D, E, F, K y otras son vitaminas solubles en agua como: vitamina B2, B6, B1, B12, H, ácido pantotéico, fólico y la vitamina C [23].

Minerales

Los principales minerales constan de cloruros, fosfatos, citratos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. La digestibilidad del calcio y el fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran asociados a la caseína de la leche. En la leche, el 33% del calcio está solubilizado, el 45% está ligado en la leche en forma coloidal, y el resto ligado a la caseína. Los análogos de los fosfatos están en niveles del 33% (solubilizado), 38% (ligado en forma coloidal) y 20% (ligado a la caseína) con 1% ligado a lípidos (en la membrana de glóbulos grasos)[23].

2.2 FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICION DE LA LECHE

Dentro de los factores que afectan la composición de la leche se encuentran de manera muy general los siguientes:

Factores Raciales:

La grasa es el componente más variable entre y dentro de razas y la lactosa el menos variable o más estable. La raza que produce leche con el mayor tenor de grasa es la Jersey. También existen diferencias raciales en cuanto a la proporción de proteína total y tipo de proteína producida en la leche. Es así como las razas Jersey y Guernsey presentan los mayores porcentajes de proteína total, caseína y suero [16, 22, 23].

Factores de Lactancia y Ambientales:

El número ordinal de lactancia y/o la edad del mamífero, tiene un efecto significativo sobre el porcentaje y la producción total de grasa, el porcentaje de proteína de la leche y la composición de dicha proteína. Está confirmado que existe una disminución en el porcentaje de materia grasa de 0,2% al pasar de 5 lactancias. Para el caso de la proteína, se informa que su producción disminuye en vacas de más de 3 años de edad, observándose un 0,4% menos de producción en vacas de más de 5 lactancias. Esa caída parece ocurrir primeramente en la fracción de la caseína, aunque también se informa de una disminución en la fracción de la proteína del suero. Cuando se está produciendo calostro, se encuentran altas concentraciones de grasa (principal fuente de energía en las primeras etapas de vida del ternero), de proteína (especialmente de inmunoglobulinas, con un rol importante en la inmunidad pasiva del ternero), y de minerales (potasio, con efecto laxante sobre el ternero). Posteriormente, la materia grasa disminuye durante

los primeros 2 meses de lactancia y tiende a aumentar nuevamente en forma gradual y lenta conforme la lactancia progresa. Además de los cambios en el porcentaje de materia grasa, se observa una variación del tipo de ácidos grasos que la componen, es así como hay un predominio de los ácidos grasos de cadena corta e intermedia en la primera mitad de la lactancia.

A su vez, la proteína total cae abruptamente en pocos días, en la transición de calostro hacia leche y alcanza el mínimo alrededor de la 5a a la 10a semana de lactancia, correspondiendo con la máxima producción de leche, posteriormente el contenido de proteína tiende a aumentar gradualmente conforme progresa la lactancia o bien cuando la vaca queda gestante [16, 22, 23].

Hay un efecto de la estación del año sobre el porcentaje de grasa de la leche, donde los meses de verano se caracterizan por promediar 0,4% menos de grasa que los meses de invierno. También se observa una modificación en la composición de la grasa, en verano disminuye el ácido palmítico con relación al esteárico y los ácidos octadecanoicos. Se observa que tanto el porcentaje, como la producción de proteína son mayores durante el otoño e invierno que lo obtenido en primavera y verano.

Una ordeña completa incrementa el contenido graso de la leche en comparación a una ordeña incompleta. Al acortar el lapso de ordeña se afecta negativamente el porcentaje de grasa de la leche obtenida en esa ordeña.

Factores asociados a la condición sanitaria:

La mastitis generalmente produce una disminución del porcentaje de materia grasa, aún cuando ésta disminuye menos de lo que disminuye la proteína y la lactosa. La inflamación de la glándula mamaria provoca un cambio en la composición de la grasa: se observa un aumento en los ácidos grasos de cadena corta y libres y una disminución de los ácidos grasos de cadena larga y fosfolípidos [16, 22, 23].

El efecto sobre el porcentaje de proteína total es pequeño, sin embargo, las mastitis alteran drásticamente la composición de la proteína, disminuyendo las fracciones de: caseína, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina y aumentando las proteínas serícas.

Factores nutricionales y alimentarios:

Las típicas dietas formuladas para vacas de alta producción contienen una alta concentración de energía que suele provenir de fuentes de carbohidratos fácilmente fermentables más que de grasas y a menudo dichas dietas provocan una condición denominada síndrome de baja materia grasa de la leche. Este síndrome deriva de una alteración en el proceso fermentativo a nivel

ruminal con un cambio en el pH del rumen, como consecuencia una depresión en la digestión de la fibra y por ende un cambio en los productos de fermentación ruminal, disminuyendo el sustrato disponible para la síntesis de grasa a nivel de la glándula mamaria. El tipo de forraje, la calidad del forraje (madurez, contenido de fibra), el tamaño de partícula o de picado del forraje tiene gran influencia sobre el porcentaje de grasa de la leche. El estado de madurez del forraje es un factor importante en el momento de reunir un nivel adecuado de fibra en la dieta, ya sea, para mantener o incrementar el contenido de grasa láctea [16, 22, 23].

La fuente de carbohidratos dietarios, es otro factor a considerar, dado que pueden influir sobre la fermentación en el rumen y consecuentemente sobre el porcentaje de grasa láctea. Por ejemplo la menor o más lenta degradación ruminal del maíz en el rumen en comparación con la cebada, podría resultar en la producción de leche con un mayor contenido de grasa. Todos aquellos factores que influyen sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano afectan el contenido de proteína de la leche. Un insuficiente aporte de proteína dietaria reduce la producción de proteína láctea, pero este efecto puede ser minimizado con la incorporación a la dieta de alimentos con proteína de baja degradabilidad ruminal. Fuentes de energía que deriven en un incremento del ácido propiónico conducen a un mayor contenido de proteína en la leche [16, 22, 23].

2.3 Tipos de leche

La industria lechera ha diversificado sus productos, actualmente existen un gran número de tipos de leche, con diferentes cantidades y modificaciones de grasa, proteínas y carbohidratos. A continuación se indican los 3 principales tipos de leche.

Leche cruda

Es aquella leche que no ha sido sometida al proceso de pasteurización después de su ordeño. Por lo cual, se mantiene en refrigeración para disminuir la velocidad de crecimiento de bacterias.

Leche entera

Esta leche puede o no ser sometida a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen su inocuidad, además de que puede ser sometida a operaciones como la homogenización, clarificación y estandarización, de acuerdo con las normas y especificaciones de cada país [25], ver tabla 2.1.

TABLA 2.3 Especificaciones de leche pasteurizada, ultrafiltrada y microfiltrada, de acuerdo con la NOM 155 SCFI 2003.

Especificaciones	Leche entera	Leche semidescremada
Densidad 15 °C g/mL	1.029 min.	1.029
Grasas Butírica g/L	30 min.	16 min. 18 max.
Sólidos no Grasos de la Leche g/L	83 min.	83 min.
Lactosa g/L	43 min 50 max.	43 min 50 max
Proteínas propias de la leche g/L	30 min.	30 min.

Leche semidescremada

Al igual que la leche entera esta leche puede ser sometida a procesos térmicos y otros más. De acuerdo con la tabla 2.1, para esta leche se muestra que la cantidad de grasa es menor que en la leche entera, esto se debe a procesos como el desnatado, donde se encuentra la mayor parte de la grasa, entre otros; esto de acuerdo a cada empresa productora de este tipo de leche [25].

2.4 Productos de leche

Actualmente existe una gran variedad de productos derivados de la leche, por mencionar algunos de los más importantes se encuentran la mantequilla, la crema y el queso. Este último se obtiene por la coagulación de las proteínas por acción del cuajo (acción enzimática) o por acción de algún ácido. La parte coagulada es separada del suero y forma el queso después de remover el suero, su mayor composición es caseína y grasa de la leche.

Inicialmente para la fabricación de la mayoría de los quesos la coagulación de la caseína es inducida mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas (cuajos de distintos tipos) y calcio. La primera fase consiste de una reacción altamente específica entre el cuajo y la k-caseína que se encuentra principalmente en la superficie de las micelas de caseína. Hay un corte proteolítico en la k-caseína, que genera dos péptidos con propiedades muy distintas: el glicomacropéptido es hidrofílico y soluble, representa cerca del 4% de la caseína total [26], pasa a

formar parte del lactosuero y por tanto no contribuye al rendimiento. El otro fragmento se denomina para-k-caseína, es altamente hidrofóbico y permanece enlazado a las micelas.

El efecto inicial de esta reacción es una reducción drástica en la carga eléctrica negativa de la superficie de las micelas, que permite el acercamiento entre sí de las micelas modificadas y facilita así la segunda fase de agregación de las micelas para formar un gel, en la que el calcio (Ca^{++}) juega un papel importante como acelerador del proceso. De ahí en adelante, la fabricación de queso se puede considerar básicamente como la eliminación de agua, o concentración de sólidos, a partir del gel o coágulo formado mediante la acción del cuajo.

En la leche, las micelas de caseína contienen cerca de 2 gramos de agua por gramo de caseína. El grado al que se retiene la estructura de las micelas de caseína en su forma original depende en gran medida de la pérdida de fosfato de calcio y esta pérdida a su vez, depende del pH en el momento en el que se retira el lactosuero de la cuajada. Por eso, tratándose de quesos en general y ciertamente de quesos madurados, una de las maneras más importantes para eliminar el agua consiste en disminuir el pH de la cuajada [27].

Hay un gran número de tipos de quesos, todos ellos difieren en su modo de elaboración y en otros casos de su maduración.

Queso tipo panela

Este producto de la leche es un queso fresco elaborado con leche de vaca pasteurizada, que puede ser entera o parcialmente descremada. Su porcentaje de agua llega a ser del 58%. Gracias a la acción del cuajo es posible separar la cuajada, que después es calentada. Posteriormente es separada del suero y salada dejándola reposar al ambiente, la forma característica de este queso es debido a que la cuajada se pone en canastillas. De cada 100 litros de leche se obtienen 15 kilos de queso aproximadamente [28].

Queso tipo Oaxaca

El principio de la elaboración de este queso es leche cruda, que después puede tener 2 modos para acidificar la leche. Una forma es de manera natural, dejando reposar la leche, cabe mencionar que este procedimiento llega a ser de más de 24 horas esto también dependerá de la temperatura del lugar de elaboración, para que su flora bacteriana inicie su actividad de crecimiento, y así aumente la acidez de la leche. Otra manera es por medio de un ácido (muchos productores ocupan ácido acético glacial) el cual es agregado a la leche y actúa en cuestión de minutos. Después de la acidificación la leche es calentada y se le agrega el cuajo. Al comenzar la

separación es importante la agitación. Después de pasado el periodo de agitación al estar en reposo el cuajo se asienta y así es posible quitar la mayor parte del suero. Separada la cuajada se amasa y se le agrega agua caliente, después de esto es tiempo de estirar el cuajo, las tiras son depositadas en otro recipiente con agua fría donde se dejan reposar, estas tiras se cuelgan para retirar el exceso de agua. El salado de este queso es por contacto directo y frotación, donde por último se forman las bolas de queso. El rendimiento de este queso es de 10 kilos por cada 100 litros de leche aproximadamente [28].

2. 5 SUERO DE LECHE

El suero de leche, es un líquido obtenido de la coagulación de proteínas de la leche durante la fabricación de quesos; las proteínas de este, llamadas proteínas no coagulables, son aquellas que no coagulan por acción del cuajo y de la acidez y por eso forman parte del lactosuero. Estas proteínas representan el 21% de la proteína total de la leche [29].

Algunas de las propiedades del lactosuero están sujetas por las vías en las cuales las caseínas son coaguladas; ya sea por enzimas (proteasas que catalizan la hidrólisis enzimática), de origen animal, vegetal o microbiano; o por la obtención de caseínas mediante un ácido [30].

La manufacturación, tipo de queso y leche usada para la elaboración del queso genera variaciones en la composición del suero. Su composición fisicoquímica está estrechamente ligada a: las características de la cuajada obtenida en el proceso de elaboración del queso, que a su vez son afectadas por la composición del coagulo, la intensidad del trabajo mecánico, el pH y temperatura en el desuerado con las condiciones de coagulación, aspectos variables de acuerdo a la composición de la leche utilizada, la tecnología utilizada en la producción, y las costumbres propias del país. El suero está formado por: agua (93-95%), materia seca (5-6.5%), lactosa (3.8-4.5%), ácido láctico (hasta 0.8%), proteínas totales (0.8-1%), proteínas séricas (0.6-0.65%), ácido cítrico (0.1%) y minerales (0.5-0.7%) [31].

El suero más útil para obtener proteínas es aquel procedente de la coagulación de la caseína con enzimas (renina), se le conoce con el nombre de suero “dulce”, en cambio las obtenidas del suero “ácido” son de baja calidad [32].

Al principio de la elaboración del queso, el fosfato de calcio micelar se disuelve progresivamente a medida que baja el pH del gel formado mediante la acción del cuajo.

Durante la formación del gel enzimático, las micelas retienen casi en su totalidad su identidad estructural. Sin embargo, una vez que se corta la cuajada e inicia la expulsión de lactosuero, las

micelas están mucho más juntas entre sí, hasta que se fusionan durante el prensado y la maduración del queso. En contraste con las caseínas, las principales proteínas lactoséricas son proteínas altamente estructuradas y, por lo tanto, son susceptibles de ser desnaturalizadas. Por ejemplo, en su estructura terciaria, la β -lactoglobulina tiene una proporción considerable de hojas tipo β (43 % a 50 % de los componentes aminoácidos), 10 % a 15 % de hélice tipo α y 15 % a 20 % de dobleces tipo β . A pH de la leche fresca, entre 6.6 y 6.7, esta proteína existe en forma de dímero. El monómero está formado por 162 componentes aminoácidos y contiene dos puentes de disulfuro (-S-S-) y un grupo tiol (-SH) por molécula. Aunque es la más hidrofóbica de las proteínas lactoséricas, la β -lactoglobulina es muy soluble en agua debido a que la mayoría de los componentes no polares están en el interior de la proteína y a que la mayoría de los componentes polares están en la superficie. En su estructura nativa, su capacidad de retención de agua es muy moderada, del orden de 0.04 g/g de proteína [33].

En términos de masa, la β -lactoglobulina constituye cerca del 50 % de las proteínas lactoséricas. Por su parte, la α -lactalbúmina es una molécula formada por 123 componentes aminoácidos, contiene cuatro puentes disulfuro y es una glicoproteína que tiene cantidades variables de carbohidrato. Su estructura tiene menor grado de organización que la β -lactoglobulina: 30 % de hélice tipo α y 9 % de hojas tipo β . Por consiguiente es mucho más flexible, aunque sus puentes de azufre la mantienen en forma de un elipsoide compacto. La α -lactalbúmina tiene mayor capacidad de retención de agua (0.06 g/g de proteína) que la β -lactoglobulina. Esta proteína constituye cerca del 20 % de la masa de las proteínas lactoséricas [31].

2.6 PRUEBAS FISICOQUIMICAS DE LA LECHE

Los diversos componentes de la leche son determinados de acuerdo con las especificaciones fisicoquímicas que marca la Norma Oficial Mexicana la cual se basa en los métodos de prueba para demostrar el cumplimiento de la información nutrimental que da el productor de leche.

En este trabajo se utilizarán pruebas fisicoquímicas para la determinación de: contenido total de proteínas, lactosa y grasa butírica de la leche; las cuales se indican en la tabla 2.2, junto con el fundamento de la misma.

Tabla 2.2 Pruebas fisicoquímicas utilizadas en este proyecto para la determinación de lactosa, grasa y proteínas.

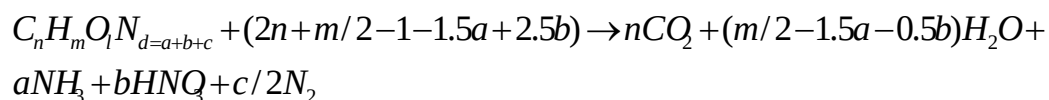
Componente	Método de prueba	Fundamento
Proteínas totales	Micro Kjeldahl	Descomposición de nitrógeno orgánico
Lactosa	Reductores Directos	Reducción de Cobre
Grasa Butírica	Gerber	Destrucción del estado globular de la Grasa

Los resultados de estas pruebas fisicoquímicas, con las que debe cumplir la leche de acuerdo a su denominación (semidescremada), serán comparados con los resultados de MilkoScan (porcentajes de lactosa, grasa y proteína de la leche), el cual es un método propuesto para la determinación de los principales componentes de la leche.

Determinación de proteínas por el método Kjeldahl

Los 3 pasos en el método Kjeldahl son la digestión de la materia orgánica en la leche, la separación por medio de la destilación del amonio y determinación de amonio por medio de una titulación. El amonio es producido por la digestión de las proteínas con ácido, la catálisis y un aditivo para incrementar el punto de ebullición de la mezcla. El nitrógeno total obtenido por la técnica Kjeldahl es multiplicado por 6.38 (un factor de conversión para la leche) para determinar el contenido de proteína [34]. Como consecuencia de su estructura a base de aminoácidos individuales, el contenido de nitrógeno de las proteínas varía entre unos límites muy estrechos (15 al 18% con valor promedio de 16%). Para la determinación analítica del contenido de proteína total se evalúa el contenido de nitrógeno después de eliminar la materia orgánica con ácido sulfúrico, aplicando al final un factor ($F=6.38$ para el caso de la leche). En la digestión después de que toda la materia orgánica fue destruida el nitrógeno pasa a la forma de sulfato amónico por degradación. El sulfato amónico se determina a continuación vía la liberación del NH_3 y destilación, por medio de una valoración ácido-base.

La degradación oxidativa acelerada catalíticamente de compuestos orgánicos con ácido sulfúrico a temperaturas comprendidas entre 360 y 410°C, se denomina tratamiento Kjeldahl. Las transformaciones químicas se resumen en:



Donde:

n, es el número de carbonos de las proteínas presentes en la reacción.

m, es el número de hidrógenos presentes en la reacción.

l, es el número de oxígenos presentes en la reacción.

La degradación de grupos con nitrógeno orgánico depende de la forma que tome el nitrógeno a través de diferentes etapas intermedias hasta sulfato amónico, ácido nítrico o nitrógeno elemental. Los grupos nitrogenados de moléculas orgánicas y sus correspondientes productos de degradación están representados por a, b y c [35].

En general, el procedimiento de Kjeldahl es peligroso, largo y de intensiva mano de obra. Aunque este método se ha convertido en el estándar de la industria alimentaria por su confiabilidad.

Determinación de Lactosa por el método de Reductores Directos

En este método se aprovecha la propiedad de la lactosa de ser un azúcar reductor directo, el cual reduce el cobre de sus sales alcalinas mediante la valoración volumétrica, donde se reduce la sal cúprica a sal cuprosa, es decir la valencia del cobre cambia de 2 a 1 [36].

Determinación de Grasa Butírica por el Método Gerber

Este método fue desarrollado por el año de 1892 como un método rápido para la determinación práctica de grasa. Este método es aplicable a leche con un contenido de grasa de 1 a 8% así como a leche ácida.

La grasa existe en forma de emulsión que se estabiliza por medios fosfolípidos y las proteínas de la membrana alrededor de la grasa. Este método se basa en la ruptura de esta emulsión (separación de las fases) por la adición de ácido sulfúrico concentrado, separándose así por centrifugación la grasa liberada; así esta puede ser pesada volumétricamente o gravimétricamente [35, 37].

2.7 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Debido a que existen reportes donde la técnica FTIR y el equipo Milko-Scan son sensibles para observar la presencia de compuestos (carbohidratos, proteínas y lípidos) y para la determinación

de la calidad o la adulteración en la leche [12, 13, 14, 38, 39]; estas técnicas se usaron en este trabajo para detectar la presencia de suero de leche como sustancia adulterante.

A continuación se presentan las características de estos equipos y sus principios básicos de operación.

2.7.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR FTIR

El espectro vibracional de infrarrojo de una molécula es considerado como su huella digital, por ser una propiedad física única y característica de cada molécula. Por esto, el espectro de infrarrojo puede ser usado para la identificación de muestras mediante la comparación de espectros de referencia conocidos. Este principio está basado en el hecho de que debido a las características estructurales de la molécula, el enlace entre moléculas o grupos funcionales unidos a la molécula, producen absorción característica y reproducible en la región infrarroja del espectro electromagnético. El espectro de infrarrojo se genera como una consecuencia de la absorción de la radiación electromagnética a frecuencias que se relacionan con la vibración de un conjunto específico de enlaces químicos dentro de la molécula [40].

Los átomos en la molécula no están estáticos, sino que vibran alrededor de su posición de equilibrio, la frecuencia de estas vibraciones dependen de la masa del átomo, de la longitud y de la fuerza de los enlaces. Las vibraciones moleculares están estimuladas por la radiación que absorben los enlaces presentes en la molécula, los cuales solo reaccionan a la frecuencia incidente asociada a la frecuencia natural de vibración del enlace mismo (en la región del infrarrojo) [41].

En la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) solo es usado un haz y todas las frecuencias requeridas, pasan a través de la muestra a analizar en el mismo instante de tiempo. La transformada de Fourier es utilizada como herramienta matemática para interpretar los datos y producir un espectro de manera casi inmediata, lo que la hace una técnica más sensible y por lo tanto más utilizada en los laboratorios químicos modernos [38].

El principio del FTIR

En la figura 1 se observa un esquema de cómo opera el equipo de FTIR, la luz infrarroja emitida por una fuente de radiación se dirige a un interferómetro, el cual modula la luz. Después del interferómetro la luz pasa a través del compartimiento de la muestra (y de la muestra misma) y es enviada hacia el detector. La señal medida por el detector se denomina interferograma.

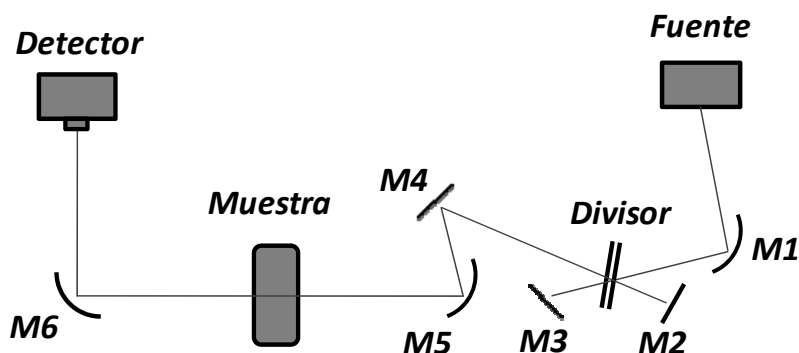


Figura 2.1. Esquema del principio de operación del FTIR.

La luz emitida por la fuente, es enviada por el espejo M1 hacia el divisor de haz, el cual envía el 50% de la luz hacia el espejo M2 y el otro 50% hacia el espejo M3, estos últimos (M2 y M3) modulan el haz y reenvían nuevamente los haces hacia el divisor de haz, el cual los hace interferir y después envía el resultado de esta interferencia hacia la muestra vía los espejos M4 y M5. Una vez que el haz pasa por la muestra el espejo M6 enfoca el haz hacia el detector. Después de pasar al detector, la información se procesa aplicando la transformada de Fourier [39].

Un estudio preliminar con el equipo de FTIR permite observar las regiones para los compuestos mayoritarios del espectro de la leche de vaca. La figura 2 muestra el espectro típico de la leche, donde se puede observar: la región de la lactosa ($800\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$) que se relaciona con las vibraciones del enlace C-O en carbohidratos mayormente de la lactosa [41, 42], la región de las proteínas ($1100\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) que es característica de los enlaces peptídicos [15], el pico de las grasas ($1680\text{ a }1800\text{ cm}^{-1}$) asociado a los grupos carbonilos presentes en los enlaces Ester [13]. Los picos de los CH's ($2700\text{ a }3100\text{ cm}^{-1}$) y finalmente el pico asociados a los OH ($3100\text{ a }3600\text{ cm}^{-1}$).

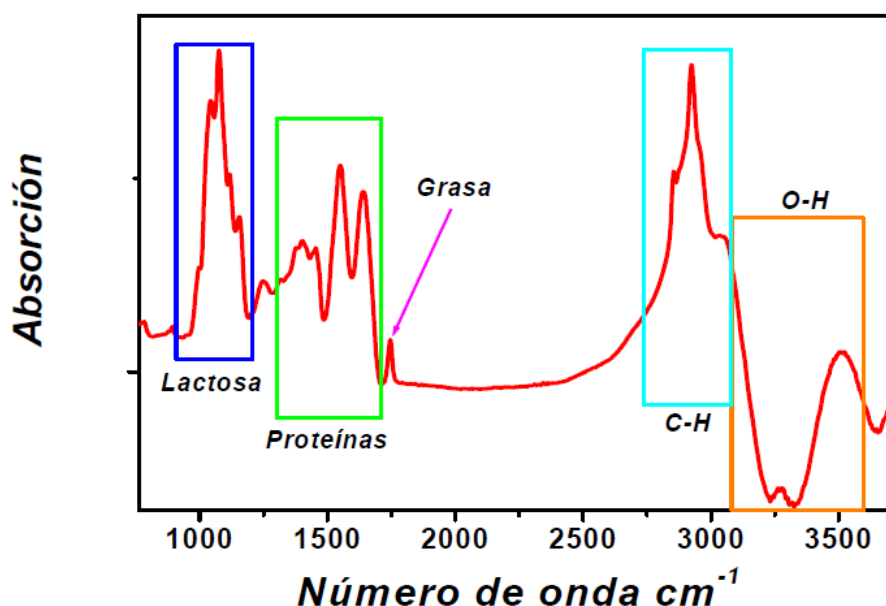


Figura 2.2.- Espectro de infrarrojo de la leche, mostrando sus regiones más características.

2.7.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO POR MILKO-SCAN

Existen otros aparatos que utilizan la espectroscopia de infrarrojo para el análisis cuantitativo de muestras, lo cual efectúan mediante filtros de longitud de onda, como es el caso del Milko-Scan. Estos filtros se encuentran localizados a números de onda específicos (para grupos CH, grupos carbonilo, enlaces peptídicos y grupos OH). Esta técnica ha sido utilizada para determinar grasa, proteína y lactosa en la leche cruda y sus resultados fueron comparados después con los obtenidos mediante la espectroscopia de FTIR [14, 15].

MilkoScan™ Minor se basa en la tecnología de filtro por infrarrojos, que sólo permite el paso de las longitudes de onda seleccionadas. Este principio se basa en el sistema de infrarrojos de rayo único diseñado por FOSS. Se utiliza una cubeta y no son necesarios espejos. Una fuente de infrarrojo genera una luz que abarca el rango de la región del infrarrojo. La luz pasa a través de diferentes filtros que sólo admiten ciertas longitudes de onda específicas, que se corresponden con las frecuencias de absorción de los componentes en cuestión. La luz pasa a través de una cubeta que contiene la muestra del producto y finalmente llega al detector.

MilkoScan Minor incorpora un intercambiador de calor, que permite el análisis de muestras en frío y un homogeneizador que reduce el tamaño de los glóbulos de grasa. Los termostatos mantienen la temperatura constante de filtros, cubeta, detector y homogeneizador, y eliminan así cualquier posible imprecisión. Se trata de un instrumento muy robusto, ya que contiene pocas partes móviles y ningún espejo. Todo esto se puede ver en el esquema de la figura 3.

A continuación se describen brevemente los filtros utilizados para cada región y el enlace al cual está asociada su operación.

Grasa

La absorción del filtro de grasa B se debe a las vibraciones en el enlace C-H de las cadenas de ácidos grasos. Por tanto, la medición está relacionada con el tamaño y con el número de moléculas de grasa presentes en la muestra. En el equipo de MilkoScan se utiliza el filtro de 2873 cm^{-1} ($3.48\text{ }\mu\text{m}$) para esta determinación, además del filtro de 1747 cm^{-1} ($5.723\text{ }\mu\text{m}$) para los grupos carbonilo presentes en los ésteres ligados a las moléculas de grasa [43, 44].

Lactosa

El grupo hidroxilo (OH) es característico de los carbohidratos y la absorción se produce por el enlace C-OH, para su determinación el filtro es colocado en 1040 cm^{-1} ($9.610\text{ }\mu\text{m}$) [43, 44].

Proteína

La absorción de la proteína se debe a las vibraciones en los enlaces N-H dentro de los enlaces péptidos. Aquí el filtro está colocado en 1547 cm^{-1} ($6.465\text{ }\mu\text{m}$) [43, 44].

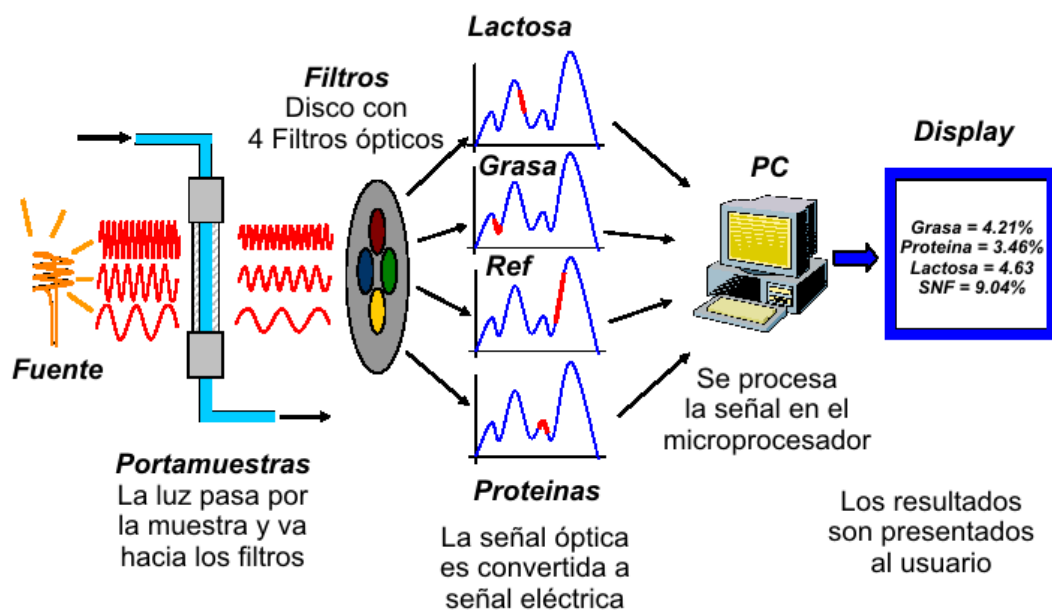


Figura 2.3.- Esquema general de funcionamiento del Milkoscan.

2.8 QUIMIOMETRÍA

La palabra quimiometría, resume el concepto que engloba la medida en química, la cual ha sido el campo de actuación de la química analítica. La quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos en información. Utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines. Por todo ello, la quimiometría se sitúa en un campo interdisciplinar. Los métodos quimiométricos, relacionan cada valor de concentración, con una serie de valores de la señal (espectro de Absorbancias), para la calibración y la predicción se plantean sistemas de matrices. Esto aumenta la exactitud de los resultados, y las posibilidades para resolver problemas, como muestras complejas, presencia de analitos desconocidos, solapamientos espectrales, o colinealidades.

2.8.1 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA),

Los métodos de reducción de variables sirven para transformar matemáticamente los datos a la forma más adecuada para la obtención de un modelo de calibración.

Donde una matriz X de datos, donde cada fila corresponde con el espectro de una muestra y cada columna es la absorbancia medida a un determinado número de onda (variable). Mediante este método se calcula el valor medio de cada variable de la matriz y se resta a cada punto de la columna. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables están referidos a dicho centro.

Este tratamiento permite mantener las unidades originales y equivale a tratar la matriz de una varianza-covarianza de las variables originales.

PCA

En este método se efectúa una reducción de variables mediante un análisis de componentes principales (PCA), esto se aplica en química con diferentes finalidades, una de ellas es destacar la clasificación de muestras y la reducción en la dimensionalidad de los datos. En esta técnica un número elevado de variables, más o menos correlacionadas, son transformadas en un número inferior de variables ortogonales (no correlacionadas) y que contiene la información principal del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo la contribución de ruido.

Se parte de una matriz de datos X donde cada fila es una muestra o un objeto, y cada columna una variable, que puede ser la absorbancia a una longitud de onda y tiempo determinados. Las dimensiones de esta matriz, si se han registrado m muestras y k variables, será $m \times k$.

Geométricamente, el PCA es un cambio en la dirección y dimencionalidad de los ejes. Busca las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas llamados componentes principales (PCs) para representarlas. El primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad; el segundo se escoge de tal forma que sea perpendicular al primero y que explique la máxima variabilidad una vez extraída la explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente. Para poder definir estos nuevos ejes se utilizan sus loadings que son los cosenos de los ángulos que forman con los ejes antiguos. Los scores son las coordenadas de las muestras en estos nuevos ejes

JUSTIFICACIÓN

La situación de la producción, transformación, distribución y consumo de la leche y productos lácteos ha cambiado drásticamente en los últimos años. El avance técnico y científico que vive la sociedad, se refleja también en el subsector lácteo. De esta manera, al ir creciendo las ciudades y desarrollándose el sector industrial también creció la demanda sobre la leche no solo para la población infantil, sino para el consumidor en general [46].

Uno de los factores a considerar para la determinación precisa de la calidad de la leche, es la creciente demanda y el incremento en el volumen de producción. El nivel de exigencia sobre una leche con características de inocuidad, así como una composición fisicoquímica que esté de acuerdo con las normas de los diferentes países; es un factor a considerar por parte de los productores [46].

En las industrias donde se utiliza la leche como materia prima principal, se presenta un gran problema al no tenerla en las condiciones y con las cantidades de sus componentes específicos para el producto a elaborar. Además de que en algunas industrias, resulta una pérdida de tiempo y dinero, el hacer pruebas tardadas y costosas para comprobar que la leche sea tal como los productores de leche la especifican.

Se sabe que muchos productores de leche agregan sustancias como el suero y agua para aumentar el volumen de la leche. El agregar suero a la leche, trae como consecuencia bajo rendimiento y aumento en el tiempo de elaboración de diferentes productos de leche como el queso. El suero, al ser una sustancia que tiene componentes de la leche como lactosa, grasa y proteínas pero en menor proporción, es difícil de detectar.

Métodos que presenten ventajas, como eficacia y rapidez para determinar la composición de la leche y así esta pueda ser utilizada para su venta o bien como materia prima para la elaboración de los diferentes productos provenientes de ella (tal como quesos, natillas, yogur, cremas, etc.), son de gran ayuda para tener análisis más confiables y en menor tiempo.

Es por eso que en el presente trabajo se estudió un método alternativo para determinar los componentes (lactosa, proteínas y grasa) de diferentes tipos de leche como son: leche cruda, leche entera y leche semidescremada, así como también para determinar la presencia de suero en leche. La espectroscopia de infrarrojo, en específico de FTIR, fue utilizada para comprobar que es un método que permite identificar los componentes principales de la leche: Lactosa, Proteínas y Grasa; apoyándonos en la determinación de los porcentajes de estos componentes por medio

del equipo MilkoScan. El tiempo para hacer este análisis es rápido, y su eficacia ha sido comprobada para determinar componentes de productos lácteos como el queso. Además de que el costo por medición es relativamente barato comparado con el método registrado para verificar la presencia de suero: HPLC; el cual además de ser caro es tardado.

Otras de las ventajas de analizar muestras de leche con FTIR, es que no tienen que ser tratadas con anterioridad, no es un método destructivo y no necesita reactivos, más que la muestra a analizar; lo cual representa un ahorro económico y la ventaja de que las muestras puedan ser analizadas al momento.

Cabe mencionar que países industrializados, en particular los integrantes de la comunidad europea, tienen actualmente un proyecto (contrato 533/1/5/374/90/4-BCR-F) cuya finalidad es la intercomparación entre los métodos químicos utilizados en la industria láctea y la espectroscopia vibracional de infrarrojo.

HIPÓTESIS

La espectroscopia de FTIR permite identificar los componentes mayoritarios de la leche así como posibles adulteraciones con suero.

OBJETIVO

Proponer una metodología rápida y eficaz basada en la espectroscopia vibracional de infrarrojo (FT-IR) y en métodos estadísticos; para determinar la posible adulteración de leche con suero.

Objetivos Específicos:

-  Definir metodología y regiones del espectro de FTIR para identificar lactosa, proteínas y grasa de la leche y cuantificación.
-  Evaluar la precisión del equipo de MilkoScan para detectar adulteración de leche con suero.
-  Comparar las ventajas y desventajas de emplear FTIR y MilkoScan para detectar adulteración de leche con suero.
-  Generar una metodología para detección de adulteración de leche, con suero de queserías, mediante la espectroscopia de infrarrojo.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe de manera detallada los procedimientos experimentales y los materiales utilizados para cada una de las técnicas empleadas durante el presente trabajo.

3.1 ANÁLISIS PRELIMINAR

3.1.1 Análisis de leche cruda, entera y semidescremada

Un lote de leche cruda (proporcionados por Lactoproductos la Providencia) fue dividido en 2 partes, una de ellas se hirvió por un periodo de 15 min a una temperatura de 65°C. De este lote se analizaron distintas muestras de leche cruda y hervida. A una temperatura de 20°C, las muestras fueron agitadas con vortex para ser homogenizadas.

Primero se tomaron 50 mL por muestra y se analizaron en el equipo de MilkoScan por duplicado. Posteriormente cada una de estas muestras fue analizada por duplicado en el equipo de FTIR (tomando como línea base el Agua) con un tiempo de medición de 60 segundos (lo que equivale a 60 muestreos) y línea base de 30 segundos, en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} . En la figura 3.1 se muestra el diagrama de bloques de este procedimiento experimental.

De acuerdo con el diagrama de la figura 3.1, los espectros mostrados en este trabajo son el resultado del promedio de todas las mediciones (ej. Para leche hervida: 4 muestras analizadas en FTIR y cada una de ellas con un tiempo de medición de 60 segundos, por lo que si se analizaron 60 veces cada una de las 4 muestras, el espectro final mostrado es el promedio de 240 mediciones).

Las mediciones de MilkoScan se tomaron por duplicado, al igual que los espectros de FTIR con un tiempo de medición de 60 segundos, hasta que se especifique lo contrario.

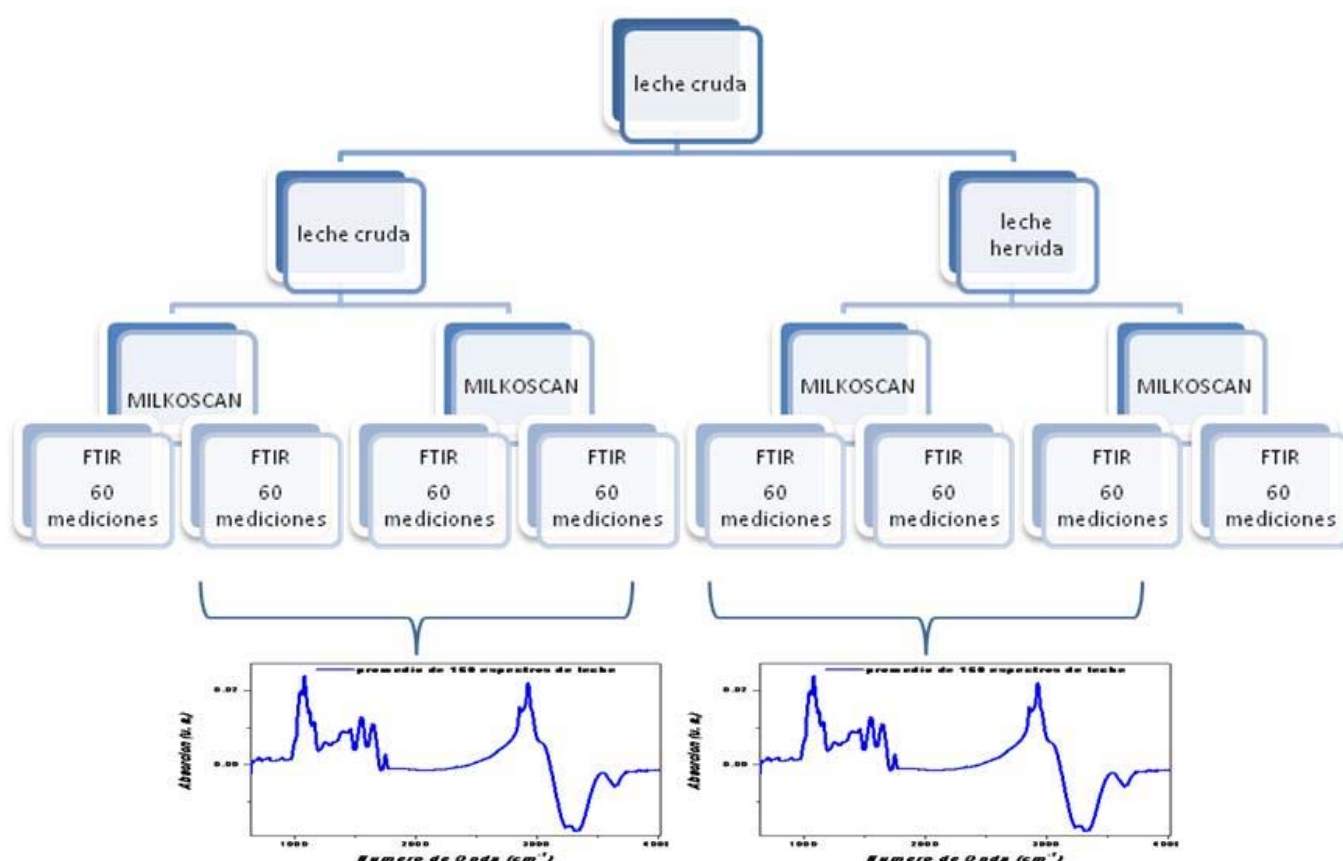


FIGURA 3.1 Diagrama a bloques del procedimiento experimental.

También se analizaron 2 tipos de leche comercial, leche entera y leche semidescremada (ambas de la marca Alpura) se tomaron distintos lotes de leche (alrededor de 7 para su comparación) y se tomaron muestras por duplicado, a una temperatura de 20°C y pH de 6.8, cada una de estas se midió por duplicado en FTIR (tomando como línea base el Agua) con un tiempo de medición de 60 segundos y 30 segundos de línea base. Esto con la finalidad de ver sus posibles diferencias.

3.2 PRUEBAS FISICOQUIMICAS

3.2.1 DETERMINACIÓN DE GRASA POR MÉTODO GERBER (NOM 155 SCFI 2003, AOAC 2000.18)

Los reactivos que se utilizaron para este análisis fueron grado analítico. Acido sulfúrico (H_2SO_4) aproximadamente al 96.9% con una densidad de 1.83 al 20 °C, el cual fue preparado al 90% con agua destilada. Alcohol isoamílico ($C_5H_{11}OH$) al 98.5%.

Se utilizó un butirómetro con rango de escala de 0 a 7% con división de 0.1%.

Al butirómetro se le agregaron 10 mL de ácido sulfúrico al 90% inclinando el butirómetro para no impregnar el cuello, posteriormente se le agregaron 10 mL de la muestra de leche (las muestras de una corrida fueron tomadas de un mismo lote de leche), esta se agregó lentamente inclinando la punta de la pipeta cuidando de no ser mezclada con el ácido, por último se agregó 1 mL de alcohol isoamílico

Se agitaron manualmente los 2 butirómetros por un periodo de 3 min aproximadamente hasta la mezcla del ácido y la leche, y la disolución de las proteínas. Posteriormente se realizaron inmersiones completas del butirómetro en baño maría (70 °C) con periodos de agitación manual de 10 min, esto por un periodo de 30 min aproximadamente. Después de esto se leyó en la escala del butirómetro el porcentaje de grasa visible.

El análisis se llevo a cabo por triplicado para cada una de las muestras de leche.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR MÉTODO DE MICRO KJELDAHL (NOM 155 SCFI 2003, AOAC 991.20)

Los reactivos utilizados en este análisis fueron grado reactivo. Acido sulfúrico (H_2SO_4) aproximadamente al 96.9% con una densidad de 1.83 al 20 °C. Sulfato de cobre ($CuSO_4$) a 99%; sulfato de potasio (K_2SO_4) a 100% aproximadamente; agua destilada; ácido bórico (H_3BO_3) a 99.7% el cual fue preparado al 4%; hidróxido de sodio (NaOH) que fue preparado al 40%; Rojo de metilo ($C_{15}H_{15}N_3O_2$); azul de metileno ($C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$); ácido clorhídrico (HCl) a 36.5-38%; fenolftaleína ($C_{20}H_{14}O_4$); solución estándar de hidróxido de sodio a 0.1N.

Se utilizo un micro digestor Kjeldahl y un destilador Kjeldahl.

DIGESTIÓN

Se mezclaron 2.5 g de $CuSO_4$ con 20 g de K_2SO_4 en un mortero y fueron triturados hasta formar un polvo homogéneo de color azul claro, a esta mezcla se llamo mezcla digestora. Se pesaron 4 g de mezcla digestora y se colocaron en cada uno de los matraces Kjeldahl, se agregó 10 mL de H_2SO_4 inclinando la pipeta para no impregnar en las paredes del matraz, posteriormente se agregaron 3 mL de la muestra de leche (las muestras de una corrida fueron tomadas de un mismo lote de leche). Los matraces se colocaron en el digestor con una temperatura inicial de 200°C aproximadamente, después de 30 min se aumentó la temperatura a 300°C aprox. y después de 20 min a 420°C. El tiempo total de la digestión fue de 4 a 4.5 hrs.

DESTILACIÓN

Se prepararon 2 soluciones indicadoras: 2 mL de rojo de metilo al 0.2% y 1 mL de azul de metileno al 0.2%, se mezclaron para formar el indicador Wesslob.

Enfriados los matraces (30°C aprox.) quedo una pastilla transparente de un color verde agua, a la cual se le adiciona 45 mL de agua destilada para disolverla, esta solución se coloco en el destilador y se encendió a una temperatura de 60°C, posteriormente se le agrego 35 mL de NaOH al 40%. El destilado se recibió en un matraz con 25 mL de H₃BO₃ y 3 gotas de solución Wesslob, por medio de una manguera que estuvo siempre en contacto con la solución de H₃BO₃, en el fondo del matraz. La destilación terminó cuando se recolectaron 250 mL de muestra.

Se preparo HCl al 40% que posteriormente fue valorado con un estándar de NaOH 0.1N.

A los matraces con el destilado se les agregaron 3 gotas de solución Wesslob y se titularon con HCl. El volumen gastado de HCl se registro para los cálculos del % de proteínas.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE LACTOSA POR EL MÉTODO FEHLING (AOAC 974.06)

Se utilizaron: solución Fehling A, solución Fehling B, solución de azul de metileno al 1%, lactosa pura anhidra e NaOH al 40% que se titulo con 5 mL de HCl para obtener su equivalente (5.8 mL).

Se pesaron 0.475 g de lactosa y se transfirieron a un matraz al cual se le añadió 50 mL de HCl, después de mezclar se paso a baño maría a 70°C se mantiene por 3 min y después se enfrió a chorro de agua, posteriormente esta mezcla se neutralizó con el NaOH (5.8 mL) y se aforó con agua hasta 100 mL. Se midieron 5 mL de Fehling A y 5 mL de solución Fehling B, se mezclaron y se pasaron a un matraz, se agregaron 100 mL de agua destilada, y 2 perlas de ebullición, esta solución fue de un color azul claro. El matraz se calentó hasta ebullición, (la mezcla de las soluciones Fehling se mantuvo en ebullición constante hasta terminar la titulación) y se tituló con la solución de lactosa antes preparada hasta que el color azul desapareció, se agregó 2 gotas de la solución de azul de metileno y se continuó la titulación hasta que apareció un color naranja y se presentó un precipitado de óxido cuproso. Se registró el volumen gastado de la solución de lactosa para ser utilizado como factor para el cálculo de % de lactosa (ecuación 1).

10 mL de Fehling = mL de solución azúcar * 5 = mg de lactosa invertida

$$\% \text{ reductores directos} = \frac{F * \text{Dilucion} * 10}{m} \quad (1)$$

F = equivalente en g de Fehling

m = muestra en g

Se midieron nuevamente 5 mL de Fehling A y 5 mL de Fehling B, se traspasaron a un matraz, se añadió 100 mL de agua destilada y se agregaron 2 perlas de ebullición y se calentó hasta

ebullición, esta solución se tituló con leche Semidescremada marca Alpura (las muestras de una corrida fueron tomadas de un mismo lote de leche). Se registro los mL de leche gastada para el cálculo del % de lactosa (ecuación 2).

Cada una de los análisis se realizó por duplicado.

3.3 ANALISIS CON FTIR Y MILKOSCAN

Se utilizó un equipo de espectrofotometría de infrarrojo de Transformada de Fourier (por sus siglas en ingles FTIR) (marca Bruker Modelo Vertex 70), con un cristal de Selenuro de Zinc (ZnSe), y en el modo de reflectancia total atenuada (por sus siglas en ingles ATR), en un rango de 600 a 4000 cm^{-1} y un tiempo de medición de 1 s/muestra.

Para un análisis cuantitativo se utilizó un sistema MilkoScan (equipo serie 133/B, Foss Electric, Denmark), el cual da el porcentaje de: grasa, proteína, lactosa y sólidos no grasos de la leche (STNG). El equipo MilkoScan trabaja en 4 modos de medición: leche cruda, leche descremada, leche procesada y crema. Para este análisis se optó por utilizar el modo de leche cruda, ya que en análisis previos con los modos de leche descremada, procesada, y cruda obtuvimos los mismos resultados.

Las diferentes muestras fueron colocadas por separado en el equipo para su medición en un rango de temperatura de 10-20 °C.

3.3.1 ADULTERACIÓN CON SUERO EN POLVO.

Se escogieron 3 tipos de sueros, 2 comerciales (SUERO 1: PROWINNER (CHOCOLATE); SUERO 2: VEYCO S. A. DE C. V) y un suero proporcionado por CIBA (SUERO 3, LACTOPRODUCTOS LA PROVIDENCIA) fueron disueltos en agua (5 g de suero/50 mL de agua). Se midieron 50 mL de cada muestra para su análisis en el equipo de MilkoScan y así obtener el porcentaje de sus componentes principales; y posteriormente se tomaron 20 μL de las muestras para su medición en el equipo de FTIR (tomando como línea base el agua) y se obtuvieron sus espectros de infrarrojo.

De acuerdo con los análisis de las diferentes leches, se escogió la leche Semidescremada para ser estudio de las adulteraciones con los sueros en polvo antes mencionados (suero1, suero 2, y suero 3).

Se agregaron cantidades diferentes de cada uno de los sueros en un rango de 0.014, 0.020, 0.025, 0.028, 0.040, 0.042, 0.050, 0.056, 0.060, 0.70, 0.75, 0.080, 0.100, 0.125 g de suero por

cada 50 mL de leche (a partir de ahora se entenderá "leche" como leche Semidescremada que fue la elegida para continuar con las adulteraciones). El suero fue completamente disuelto en la leche y agitado para que la solución fuera lo más homogénea posible. Los resultados de MilkoScan y los espectros de FTIR fueron comparados.

Después de revisar los espectros de leche adulterada con los 3 tipos de sueros utilizados en este trabajo, se escoge al suero 3 para hacer más análisis y cambiar las cantidades agregadas a la leche para ver la diferencia entre los espectros, a continuación se mencionan las cantidades de suero agregado.

Se pesaron diferentes cantidades de suero 3 (1, 2, 3, 4 y 5 g) que fueron agregados a las muestras de leche (1-5 g de suero /50 mL de leche). Estas muestras fueron analizadas con el equipo de MilkoScan y posteriormente por FTIR. Posteriormente se utilizaron menores cantidades de suero: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 g de suero /50 mL de leche, para ver la diferencia entre las muestras con mayor y estas con menor cantidad de suero agregado. Se analizaron estas muestras por MilkoScan y FTIR, de los resultados (porcentajes y los espectros) se hizo una comparación en las regiones del espectro donde hubo mayor diferencia.

Al analizar los espectros de FTIR se decidió que se aumentaría el número de muestras y tiempo de medición, para las muestras de leche con 0.1-0.5 g de suero/50 mL de leche, para ver cambios en los espectros (La disminución de ruido y mayor diferencia entre la absorción de las muestras). Es por eso que a partir de este análisis las muestras serán analizadas por duplicado en el MilkoScan y por triplicado en el FTIR a 150 seg/muestra, y el tiempo de línea base a 60 segundos.

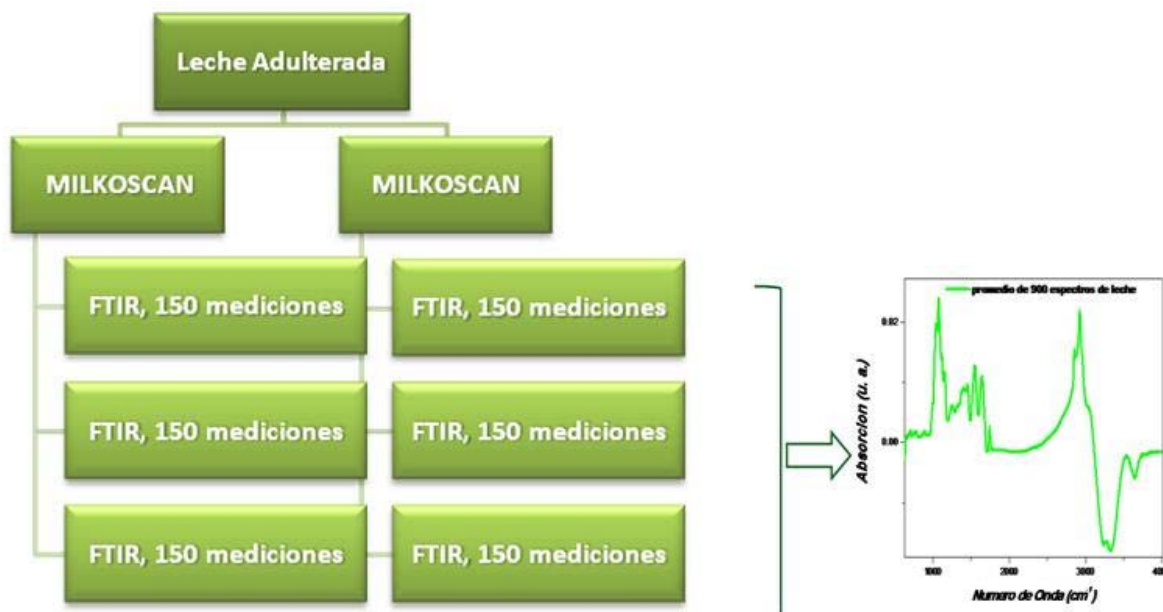


FIGURA 3.2 Diagrama a bloques del procedimiento experimental modificado a partir de los resultados experimentales previos.

3.3.2 ADULTERACIÓN CON SUERO LÍQUIDO (PANELA Y OAXACA)

Se analizaron 2 tipos de sueros, el Suero de queso panela y el suero de queso Oaxaca (Proporcionados por Lactoproductos la Providencia S. A.), por MilkoScan y por el equipo de FTIR (tomando como línea base el agua), a una temperatura de 25-30°C, pH de suero de queso panela de 6.5 y el pH de suero queso Oaxaca de 6.3.

Posteriormente se adulteró leche con diferentes cantidades de cada uno de los sueros (1-20 mL de suero /50 mL de leche), las muestras fueron disueltas y ligeramente agitadas por un periodo de 10 segundos, para una mejor homogeneidad. Estas muestras fueron analizadas con el equipo de MilkoScan y FTIR.

Cabe mencionar que en cada proceso de adulteración se analizaban también la leche (sin adulterar) y el suero, con la finalidad de determinar la homogeneidad de las muestras.

Posteriormente estas muestras fueron comparadas, tanto los porcentajes obtenidos por MilkoScan, así como las regiones de la leche (lactosa, proteínas y grasa) para ver las diferencias que presentan los espectros con las diferentes adulteraciones de suero (las diferentes cantidades y los diferentes sueros) y observar cambios que nos indiquen modificaciones en los componentes debido a esas adulteraciones.

CAPÍTULO 4

Resultados y Discusión

Para proponer un nuevo protocolo experimental basado en FTIR que permita detectar y cuantificar la presencia de suero en leche, se estudiaron diversas metodologías experimentales cuyos resultados permitieron hacer un análisis comparativo de los mismos. Para esto, se inició con análisis preliminares para determinar el tipo de leche a utilizar, así como los sueros a emplear como adulterantes.

Debido a que la finalidad es presentar una herramienta metodológica alternativa a los métodos experimentales actualmente utilizados por la industria láctea, los cuales son validados por normas oficiales; se inició comparando algunas de las metodologías (descritas en el capítulo 3) por la norma NOM-155-SCFI-2003 y los resultados del equipo de MilkoScan, el cual está basado en la

NMX-F-708-COFOCALEC-2004, posteriormente se compararon los resultados obtenidos por la metodología descrita en la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004 con los resultados de FTIR. Para finalmente obtener las curvas de calibración de las absorciones y porcentajes obtenidos.

4.1 ANALISIS PRELIMINARES

4.1.1 LECHE CRUDA Y HERVIDA

Los resultados obtenidos por FTIR para las muestras de leche cruda y hervida se muestran en la figura 4.1. Se observa la ausencia de picos en la zona de los 990 y 1040 cm^{-1} al hervir la leche los cuales corresponden a enlaces C-H en la región de lactosa, incluso en las muestras de leche hervida se pueden observar diferencias en los espectros de sus diferentes lotes, así como también en la zona de 1040 y 1120 cm^{-1} que corresponde a los enlaces C-C de la lactosa. En cambio los espectros de leche cruda se ven muy parecidos solo con algunas diferencias en la zona de 1160 cm^{-1} (C-H alcohol terciario).

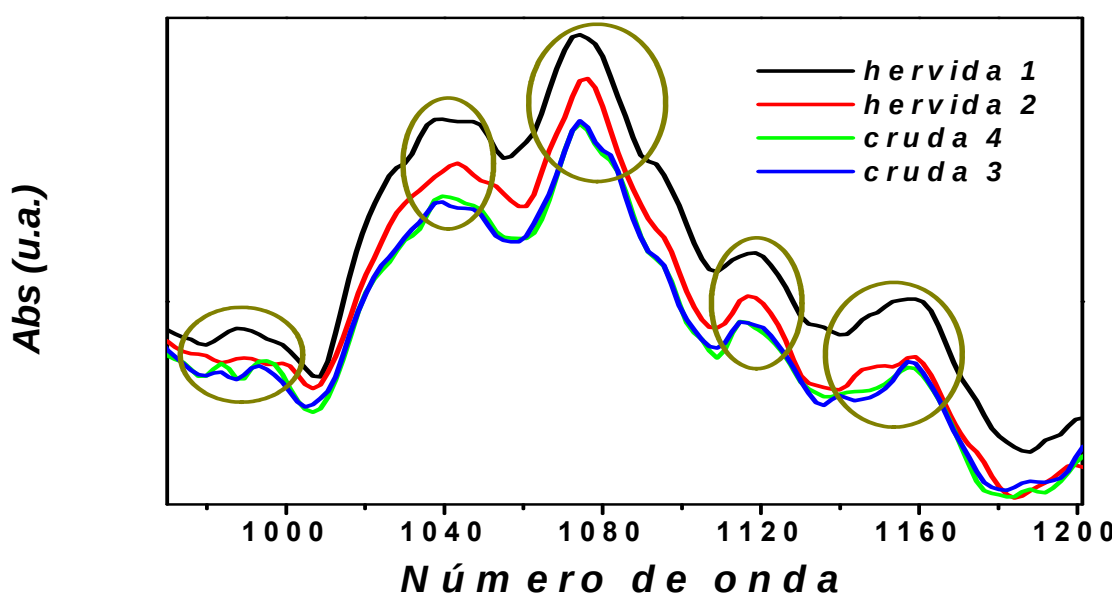


FIGURA 4.1- Región 930-1200 cm^{-1} del espectro de FTIR, para muestras de leche hervida y cruda.

Al hervir la leche las proteínas solubles son la que sufren un cambio debido a la desnaturalización por calor (específicamente la α -Lactoalbúmina una proteína soluble que es termolábil) [22, 23]. En la figura 4.2 se presenta la región caracterizada por los enlaces N-H y C-H (Amida II); en esta región (1440-1560 cm^{-1}) la leche hervida presenta a lo largo del espectro picos que no son

notorios en la leche cruda (1537 y 1555 cm^{-1}), se encuentran señalados los picos más intensos, lo que se atribuye al un cambio en la conformación de esta proteína, donde ocurre un cambio en su estructura terciaria y posiblemente en la secundaria. La figura 4.3 muestra la región de los enlaces C=O y C-N (Amida I) donde la leche hervida muestra un valle más profundo localizado en 1635 cm^{-1} y picos de mayor intensidad en 1632 y 1645 cm^{-1} que la leche cruda.

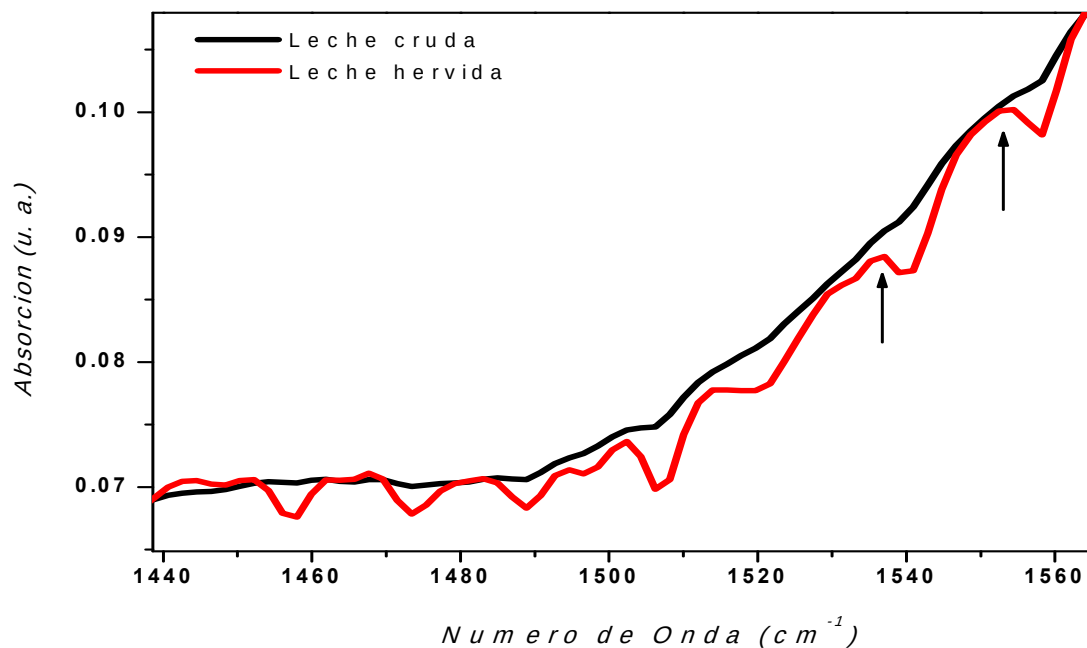


FIGURA 4.2- Región del espectro de Amida II, para muestras de leche hervida y cruda.

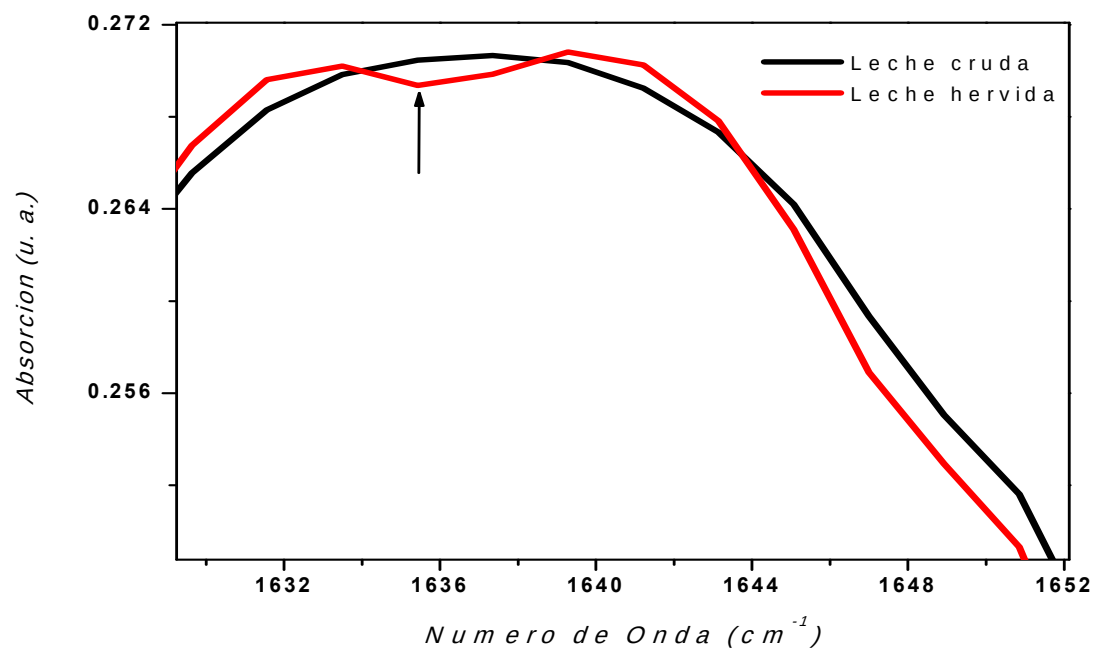


FIGURA 4.3- Región del espectro de Amida I, para muestras de leche hervida y cruda.

4.1.2 LECHE CRUDA, ENTERA Y SEMIDESCREMADA

También se analizaron 3 tipos de leches, como son leche cruda, leche semidescremada y entera, ambas de la marca Alpura. Como se puede ver en la figura 4.4, los espectros de las tres leches son muy similares, aunque la leche entera tiene una mayor absorción desde los 900 a 1700 cm^{-1} que corresponde a las regiones de lactosa (900-1200 cm^{-1}) y de las proteínas (1350-1700 cm^{-1}), lo que indica una mayor cantidad (tanto de moléculas como de enlaces) para la leche entera comparada con los espectros de la leche cruda y semidescremada.

La leche cruda presenta su mayor absorción en la región de los 1700 a 1800 cm^{-1} en respuesta a los esteres de la grasa, esto se debe a que la leche cruda tiene la mayor cantidad de grasa de las 3 leches comparadas; aunque con menor absorción en las regiones de lactosa y proteínas, aun menos que la leche semidescremada.

Como era de esperarse la leche semidescremada tiene una absorción pequeña en el pico de 1740 cm^{-1} debido al proceso a que son sometidas estas leches para reducir su contenido graso. Esto se corroborará más adelante con los resultados por MilkoScan.

De las figuras 4.1 a 4.4 se determina la importancia de un análisis detallado de los espectros de cada una de las muestras analizadas; sin descartar cualquier pico, valle o cambio en absorbancia; ya que estos cambios están en función de los diferentes tipos de leche y/o al tipo de adulteración que estuviera presente en la muestra. Así como el tiempo de muestreo, número de muestras y por otro lado aplicación de un análisis estadístico a los resultados.

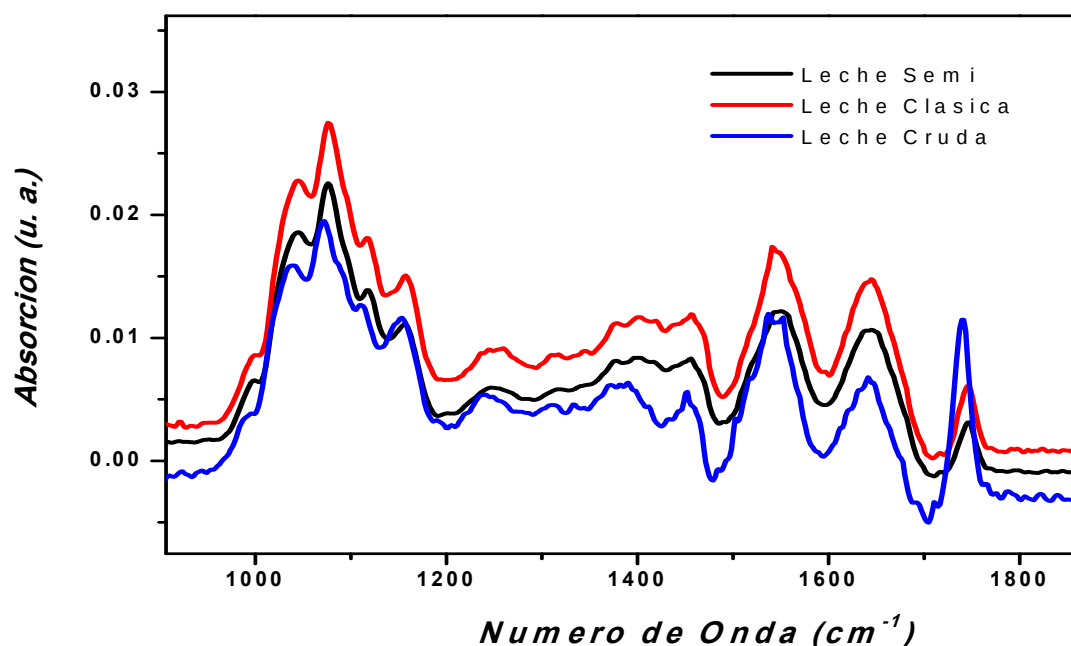


FIGURA 4.4.- Espectro de FTIR de las 3 leches, Leche semi marca Alpura, Leche entera marca Alpura y Leche cruda.

En correspondencia con la figura 4.4, absorción por FTIR, se observan los resultados del análisis por MilkoScan de los 3 tipos de leche; en la tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos para los porcentajes de grasa, proteínas, lactosa, sólidos totales no grasos (STNG), sólidos totales (ST) y agua; donde la leche clásica muestra mayor porcentaje de sólidos totales y la leche cruda mayor porcentaje de agua. De todos los análisis realizados, se pudo observar que las muestras de leche cruda y de leche clásica eran las que mostraron una mayor diferencia en la cantidad de sólidos, en comparación con los resultados obtenidos para la leche semidescremada, la cual tiene una cantidad menor de grasa pero presenta un porcentaje de proteínas y lactosa parecido al de la leche clásica, esto es debido a que ambas leches son provenientes de la misma planta de producción, la única diferencia es que la leche semidescremada tiene un proceso de desnatado para reducir la grasa.

TABLA 4.1.- Resultados del análisis de los 3 tipos de leche por MilkoScan.

Tipo de Leche	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG	% ST	% Agua
Cruda	2.055 ±0.261	2.8133 ±0.144	3.69±0.074	7.37 ±0.164	9.425 ±0.345	90.575 ±0.345
Entera	2.364 ±0.447	3.236 ±0.018	4.416±0.335	8.524 ±0.335	10.88 ±0.425	89.112 ±0.425

Semidescremada	1.933 ±0.071	3.298 ±0.067	4.622±0.074	8.786 ±0.127	10.72 ±0.139	89.28 ±0.139
-----------------------	---------------------	---------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Se decidió utilizar la leche semidescremada para continuar con el estudio de adulteraciones con suero ya que presentan menor variabilidad. Los parámetros medidos para este tipo de leche presenta una desviación estándar (σ) menor comparada con la que presentan la correspondiente a la leche cruda y la leche clásica; además de cumplir con los estándares de calidad que marca la norma NOM-155-SCFI-2003 (ver tabla 4.2), y el laboratorio de la Procuraduría Federal del Consumidor, mediante un estudio hecho en el año 2004 [47], donde reporta el cumplimiento de la leche semidescremada Marca Alpura con las especificaciones de las normas: NOM-155-SCFI-2003 y NOM-002-SCFI-1993.

Tabla 4.2.- Especificaciones de leche semidescremada (NOM-155-SCFI-2003)

Especificaciones (%)	Leche Semidescremada
Grasa butírica	2.8 máx.
Sólidos no grasos	8.3 min.
Lactosa	4.3 min. 5.0 máx.
Proteínas propias de la leche	3.0 min.

4.2 PRUEBAS FISICOQUIMICAS Y POR MILKOSCAN

Se analizó la leche comercial apura por las técnicas descritas por la norma NOM-155-SCFI-2003 (método Gerber y micro Kjeldahl), AOAC 974.06 (Método Fehling) y NMX-F-708-COFOCALEC-2004 (Infrarrojo con el equipo de MilkoScan) para las tres principales regiones de la leche: lactosa, proteínas y grasa. Esto se hizo con la finalidad de demostrar la correspondencia entre las diferentes técnicas marcadas por las normas que actualmente se encuentran vigentes para leches y los equipos de lectura rápida como es el MilkoScan.

Los resultados más representativos (mayor y menor) de la determinación de grasa butírica, proteínas y lactosa de la leche semidescremada Alpura, obtenida por el método Gerber, Micro Kjeldahl y Fehling respectivamente, se muestran en la tabla 4.3. De la tabla se puede observar

que la menor variación es para el parámetro de las grasas cercano al 1 % de variación; mientras que para el parámetro de lactosa y de proteínas, la variación es en promedio del 5%.

TABLA 4.3.- Resultados del análisis de leche Semidescremada, para lactosa, proteínas y grasa.

Lactosa (g/L) (Fehling)	Proteínas (g/L) (Kjeldahl)	Grasa (g/L) (Gerber)
46.935	30.297	21.7
48.703	32.065	22

En las figuras 4.5, 4.6 y 4.7 se muestran los resultados obtenidos por los métodos fisicoquímicos y los resultados por MilkoScan para la leche semidescremada.

Las graficas muestran un comportamiento similar en los resultados de la determinación de la cantidad de los componentes (lactosa, proteínas y grasa) entre los métodos fisicoquímicos y el análisis por MilkoScan. En la gráfica 4.5 se observa que la lactosa medida por el método de Fehling la leche semidescremada presentó una mayor variación en los resultados obtenidos por diferentes mediciones, lo cual se puede explicar porque es un método basado en la titulación para la lectura de lactosa donde el error humano juega un papel importante. En tanto que para las proteínas, figura 4.6, los valores obtenidos por el método Kjeldahl son los que presentan las mayores variaciones entre las muestras analizadas comparado con el MilkoScan. Al igual que en el método de Fehling, la técnica de Kjeldahl se basa en una titulación por lo cual está sujeta al error humano tiene mucho que ver y el porcentaje de proteína puede leerse más alto o más bajo, además de otros factores como son la destilación donde la posible pérdida de nitrógeno también influye mucho y disminuiría el porcentaje de proteínas. Este método es bastante laborioso y tardado, en tanto que MilkoScan es rápido y con ninguna pérdida de proteínas en el proceso. El método Gerber se utilizó para determinar el contenido de grasa, este mostro un comportamiento casi lineal figura 4.7, lo cual se explica debido a que es una técnica bastante sencilla donde lo único que se tiene que leer es el porcentaje de grasa en la escala del butirometro al final de la separación.

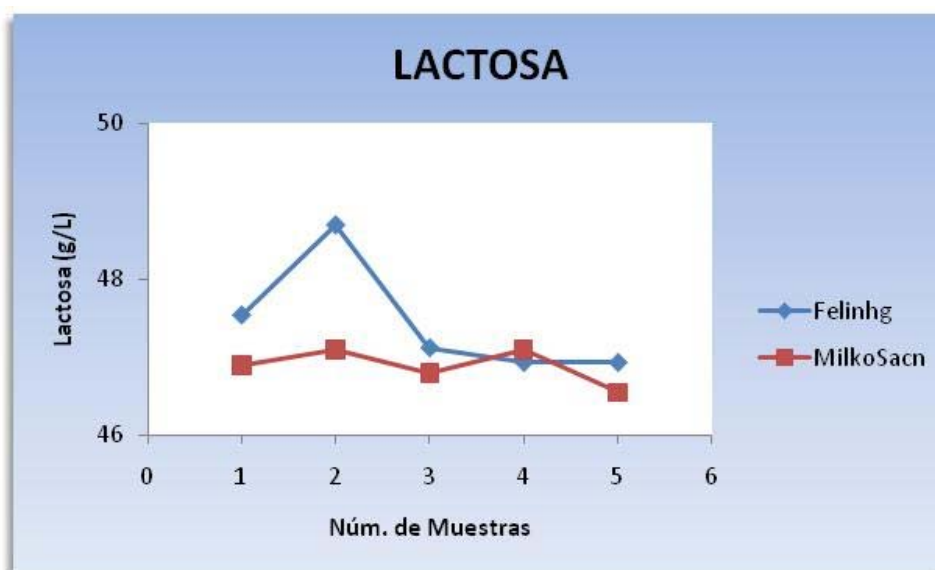


FIGURA 4.5.- Comparación de resultados para la determinación de Lactosa por Fehling y MilkoScan.

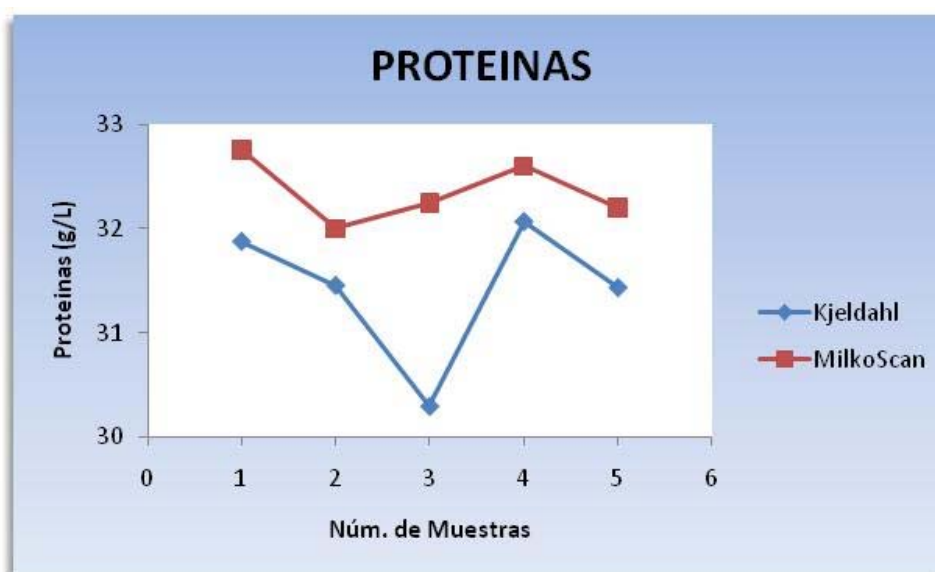


FIGURA 4.6.- Comparación de resultados para la determinación de Proteínas por Kjeldahl y MilkoScan.

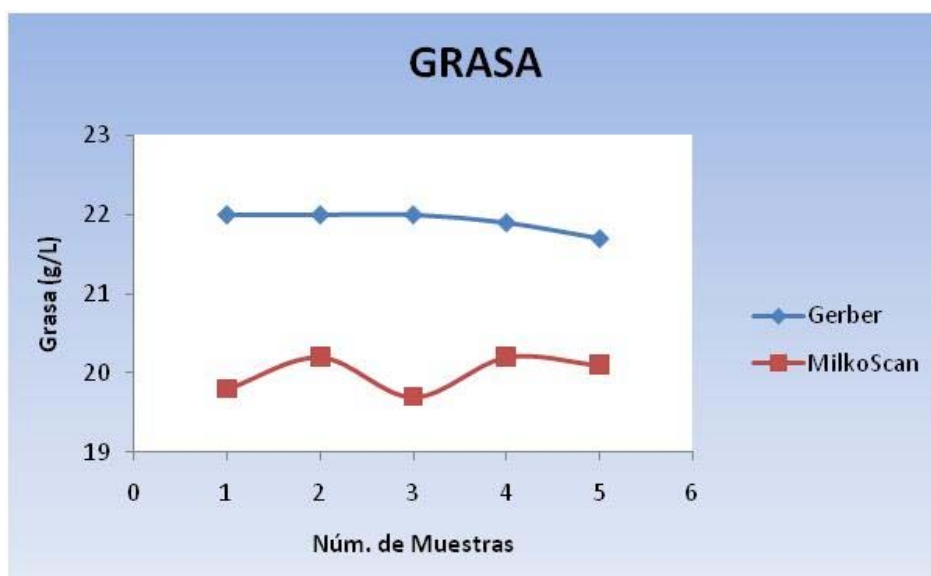


FIGURA 4.7.- Comparación de resultados para la determinación de Grasa por Gerber y MilkoScan.

En la tabla 4.4 se muestran los valores promedio de los resultados obtenidos de la determinación de proteínas y grasa por ambas técnicas (por MilkoScan y Fisicoquímicas) con lo que reporta la tabla nutricional de la Leche Alpura (en el embalaje). Comparando para lactosa y proteínas el promedio de los resultados de las pruebas fisicoquímicas (NOM-155-SCFI-2003), fueron más cercanos a los reportes en el embalaje de la leche (> 98%), en tanto que el resultado promedio obtenidos por MilkoScan, para el caso de las grasas reportó un valor muy cercano al indicado en el embalaje por el productor y descrito a continuación.

TABLA 4.4.- Comparación de resultados (por MilkoScan y Métodos Fisicoquímicos) del análisis de leche Semidescremada.

	Embalaje	MilkoScan	Fisicoquímicas
Lactosa (g/L)	48	46.89 $\pm$ 0.230	(Fehling) 47.44 $\pm$ 0.743
Proteínas(g/L)	31	32.36 $\pm$ 0.385	(Kjeldahl) 31.42 $\pm$ 0.686
Grasa(g/L)	20	20 $\pm$ 0.234	(Gerber) 21.92 $\pm$ 0.130

La desviación estándar para la determinación de lactosa y proteínas en MilkoScan y las pruebas fisicoquímicas no fue significativa; en comparación con la desviación estándar de los resultados

obtenidos para grasa la cual es menor para la prueba fisicoquímica; lo que implica que esta técnica da resultados bastante confiables.

Es necesario mencionar que a pesar de que el MilkoScan se basa solo en un pico de intensidad, en la región correspondiente a la lactosa, proteínas y grasas; los resultados obtenidos se pueden correlacionar con los resultados fisicoquímicos, en otras palabras se ha podido determinar que las pruebas fisicoquímicas que marca la norma NOM-155-SCFI-2003 tienen su correspondencia con el equipo de medición que marca la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004 o MilkoScan; por lo que los equipos de medición rápidos son confiables en las en los rangos analizados.

De acuerdo con este análisis, en el estudio siguiente se compararon: la técnica marcada por la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004 o resultados con MilkoScan y los espectros obtenidos mediante el equipo de espectroscopia FTIR, que es la técnica alternativa que se propone en este trabajo.

4.3 FTIR Y MILKOSCAN

4.3.1 ADULTERACIONES CON SUERO EN POLVO

Inicialmente se analizaron 3 tipos de sueros en polvo por MilkoScan, cuya composición se muestra en la tabla 4.5, el suero 2 presenta una cantidad mayor de lactosa con respecto a los otros sueros, y el suero 1 se destaca por tener mayor contenido de proteínas.

TABLA 4.5.- Composición de sueros en polvo por MilkoScan.

% Lactosa	% Proteínas	% Grasa	% STNG	%ST
SUERO 1, PROWINNER (CHOCOLATE)				
1.17	7.70	0.75	7.84	8.59
SUERO 2, VEYCO S. A. DE C. V.				
7.01	1.70	0.20	9.41	9.61
SUERO 3, LACTOPRODUCTOS LA PROVIDENCIA				
2.43	6.38	0.71	9.92	10.63

Estos 3 sueros fueron analizados con el equipo de MilkoScan y con el equipo de FTIR, la figura 4.8 muestra los espectros de infrarrojo característicos de estos sueros. El suero 1, además de las proteínas propias de la leche, se encuentra enriquecido con Lisina. Este suero se comercializa

como un suero con un contenido neto de más del 75% de proteínas, por lo tanto muestra la mayor absorción en la región de 1500-1700 cm^{-1} , que es la región de las amidas (proteínas), esto se relaciona directamente con los resultados de la tabla 4.5. En tanto que el suero 2, un suero que se comercializa en México con un contenido mayor de lactosa y bajo contenido de proteína; que es el componente más valioso de la leche y el suero se puede decir que se obtiene como subproducto de la deshidratación del suero, tiene una mayor absorción en la región de 900-1200 cm^{-1} correspondiente a la lactosa. El suero 3, obtenido del deshidratado del suero (del queso Oaxaca) del proceso de Lactoproductos la Providencia, es un suero que ha sido obtenido con los estándares de calidad establecidos, además de que no ha sido adicionado con ningún producto para su enriquecimiento. El espectro del suero 3 muestra una respuesta en los picos asociados a la presencia de los enlaces relacionados con la lactosa (O-H, C-OH), proteínas (C=O, C-N; N-H) y grasa (C=O).

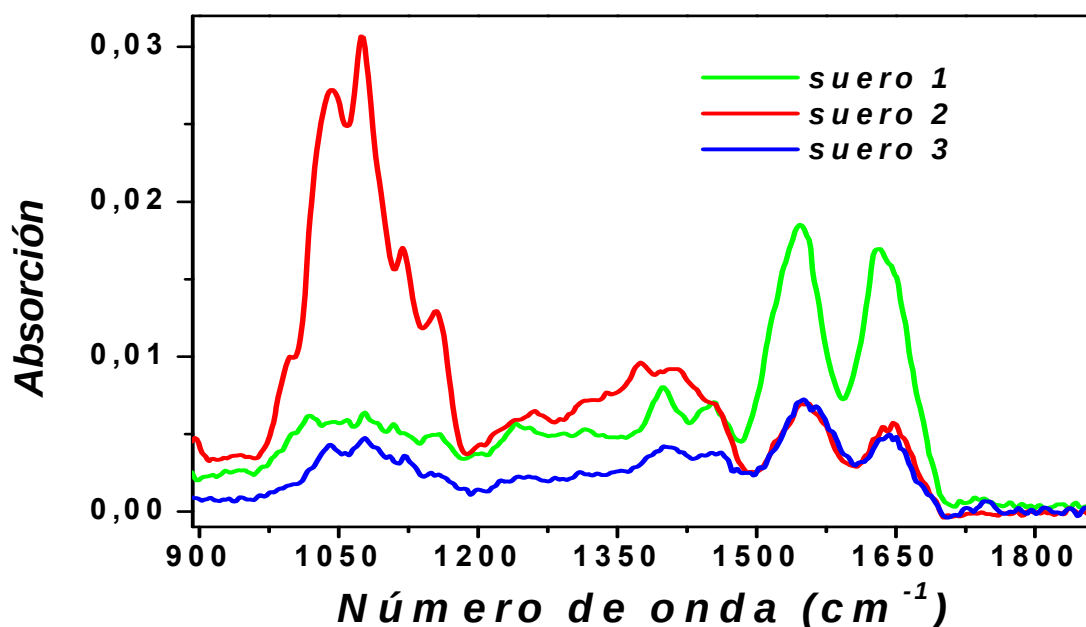


FIGURA 4.8.- Espectros de FTIR de 3 tipos de suero de leche.

Los resultados obtenidos por medio del análisis por FTIR de las adulteraciones de la leche con los 3 diferentes sueros en polvo se muestran en las figuras 4.9, 4.10 y 4.11. En la figura 4.9 se muestra leche adulterada con suero 1, aquí se puede ver que el mayor aumento en intensidad fue en la región de las proteínas, lo cual concuerda con el espectro de la figura 4.8. En la figura 4.10 se observa una mayor absorción en la región de los carbohidratos de la leche (lactosa) el cual es el principal componente del suero 2 como se pudo observar también en la figura 4.8. Por último la figura 4.11 que muestra leche con el suero 3, aquí se puede observar que conforme aumentó la

concentración de suero agregado a la leche aumentó de intensidad en las tres regiones características de la leche: lactosa, proteínas y grasa como se esperaba ya que este suero tiene un contenido alto de los componentes relacionados pero ninguno en proporción mayoritaria como el caso del suero 1 y 2.

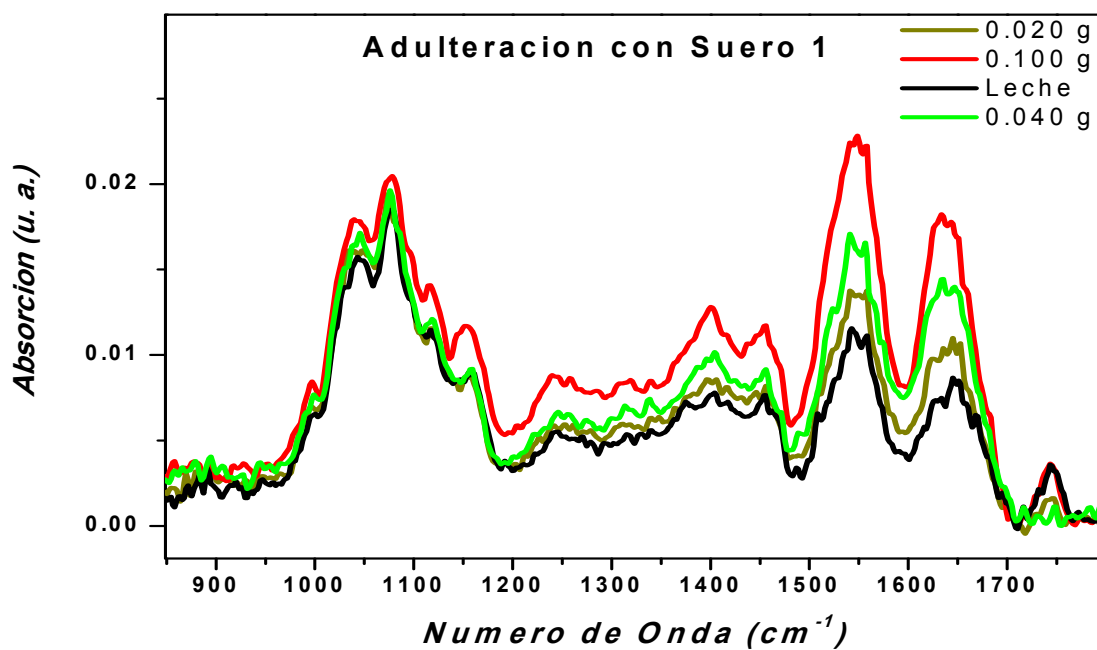


FIGURA 4.9.- Espectro FTIR de Leche adulterada con suero 1.

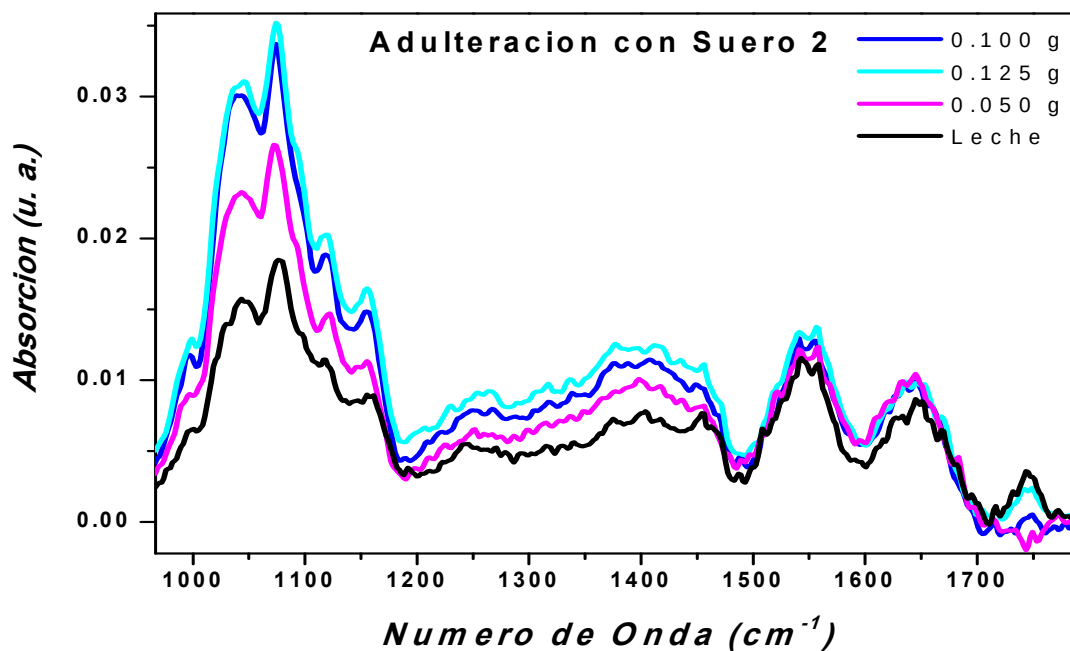


FIGURA 4.10.- Espectro FTIR de Leche adulterada con suero 2.

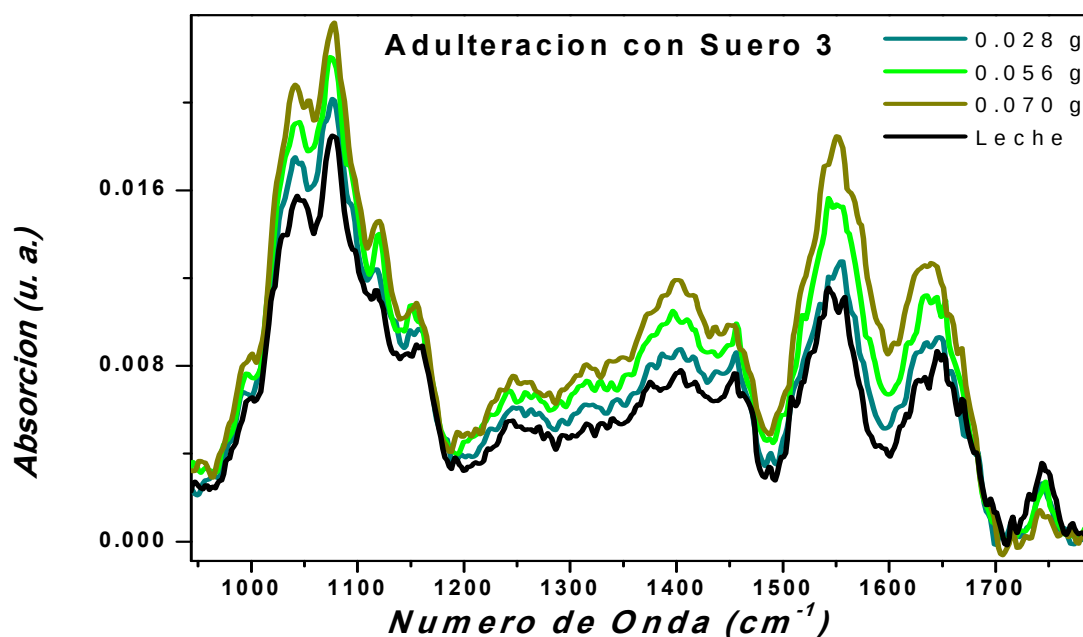


FIGURA 4.11.- Espectro FTIR de Leche adulterada con suero 3.

Se seleccionó el suero 3 para adulterar las muestras de leche, debido a que en éste se observaron variaciones en las tres regiones características de la leche.

Posteriormente se analizó el comportamiento de las muestras de leche cuando se adulteró con diferentes concentraciones de suero. Para observar el comportamiento de las variaciones en la leche, se inició agregando concentraciones altas de suero (1, 2, 3, 4 y 5 g/ 50 mL de leche).

La tabla 4.6 muestra los resultados obtenidos por MilkoScan del análisis de la leche con las diferentes concentraciones utilizando 1, 2, 3, 4 y 5 g de suero / 50 mL de leche. Se observa el aumento en concentración de la grasa, la proteína, la lactosa y los STNG; de manera lineal con respecto al porcentaje de suero agregado, tal como se esperaba, el equipo de lectura rápido fue sensible a los cambios en los 4 parámetros analizados al agregar altas concentraciones de suero..

TABLA 4.6.- Análisis de leche adicionada con concentraciones altas de suero.

g de suero/ 50 mL de leche	% Lactosa	% Proteínas	% Grasa	% STNG	%ST	% Agua
1	5.08	4.58	2.2	10.59	12.79	87.21
2	5.41	5.54	2.34	11.94	14.28	85.72
3	5.92	6.78	2.54	13.74	16.28	83.72
4	6.34	7.86	2.7	15.29	17.99	82.01
5	6.68	8.73	2.83	16.54	19.37	80.63
Leche	4.37	3.03	1.98	8.26	10.24	89.76

En la figura 4.12, se muestran los espectros de absorción en infrarrojo de la leche con suero en polvo (suero 3) a concentraciones altas.

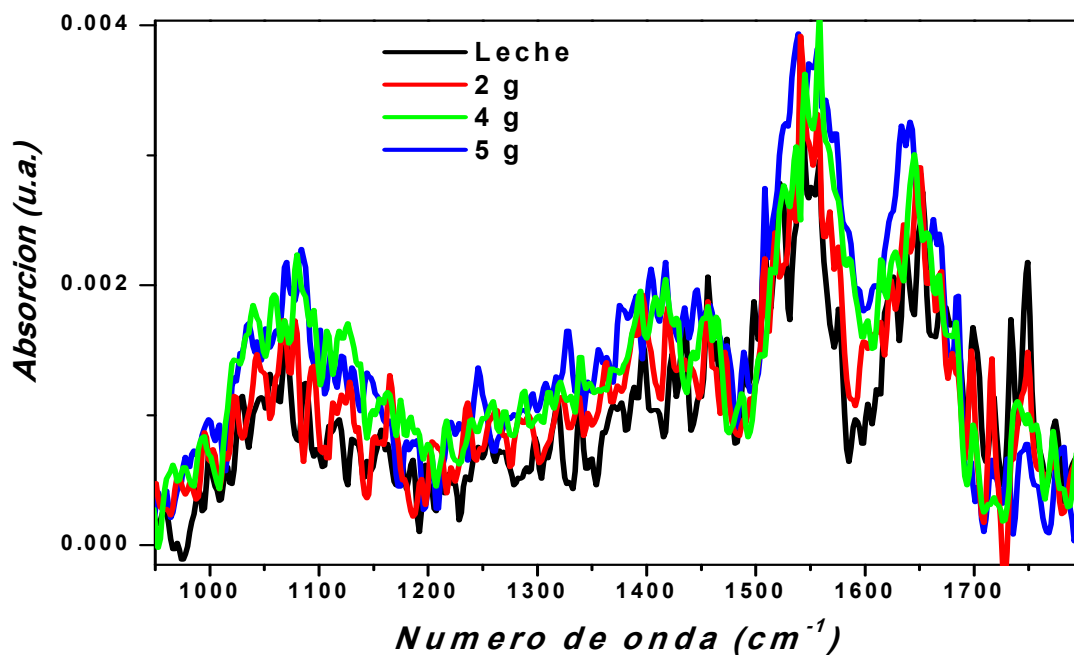


FIGURA 4.12. Espectros de infrarrojo de leche adulterada con el suero.

Se observan cambios en intensidad de los picos conforme la leche es adulterada con mayor cantidad del suero 3, lo cual se explica por una mayor cantidad de enlaces vibrando a la misma frecuencia y segundo, los cambios en la forma de los picos debido a la saturación de las muestras conforme se agrega mayor cantidad de suero a la leche; lo cual hace que los espectros obtenidos sean parecidos a los espectros de muestras en polvo, mucho ruido. En los espectros se observan

variaciones muy importantes en tres regiones: la región entre 1000 y 1200 cm^{-1} , la cual es atribuida a la lactosa; la región entre 1500 y 1700 cm^{-1} , la cual es atribuida a las proteínas y el pico alrededor de los 1740 cm^{-1} el cual es atribuido a las grasas. En cada uno de ellas, se puede observar que conforme se incrementó la cantidad de suero adicionado la concentración de lactosa, proteínas y grasas también incremento en la muestra de leche. Las señales características van incrementado su intensidad de manera paulatina variando también en su forma.

Una vez analizado el comportamiento de la leche con altas concentraciones de suero, se realizaron otras pruebas con concentraciones bajas del mismo: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 g, se presentan resultados únicamente de las dos corridas más representativas.

La tabla 4.7 muestra los análisis con el sistema MilkoScan a las muestras de leche adicionada con 0.1 a 0.5 g de suero; en esta se puede observar el incremento progresivo de los cuatro principales componentes de la leche, en función de la cantidad de suero adicionado para la adulteración de las muestras de leche.

TABLA 4.7.- Análisis por MilkoScan de adulteración a concentraciones bajas de suero.

g de suero/ 50 mL de leche	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG	% ST	% Agua
0.1	1.97	3.27	4.41	8.55	10.52	89.48
0.2	2	3.42	4.49	8.78	10.78	89.22
0.3	2.02	3.55	4.54	8.97	10.99	89.01
0.4	2.04	3.66	4.58	9.12	11.16	88.84
0.5	2.06	3.8	4.63	9.33	11.39	88.61
Leche	1.95	3.13	4.35	8.35	10.3	89.7

Al hacer los análisis de las muestras por FTIR (ver la figura 4.13), en la zona correspondiente a la región de las proteínas, se observan ligeros cambios en absorbancia y en la forma de los espectros como: un corrimiento a bajas energías en el pico de 1377 cm^{-1} que está relacionado con los monosacáridos (CH_3), la mayoría de los corrimientos son debidos a un reacomodo en las moléculas; los picos en las regiones de 1545 y 1556 cm^{-1} , picos asociados a la Amida II (N-H, C-N), se combinan para generar un solo pico conforme aumenta la adulteración. En la región de 1640 cm^{-1} , asociada a enlaces peptídicos en la región Amida I (C=O), el espectro de la leche sin adulterar muestra tres picos, que se combinan en dos y se corren uno a altas energías y el otro a

bajas al aumentar la concentración de suero. Además existe un incremento en la intensidad de los picos a 1545, 1556 y 1640 cm^{-1} , conforme se incrementó la presencia de suero, en las muestras de leche; al aumentar la concentración de suero el número de moléculas, presentes también aumenta y al haber un número mayor de moléculas existe una mayor absorción de energía que se ve reflejado en el incremento de intensidad en los espectros.

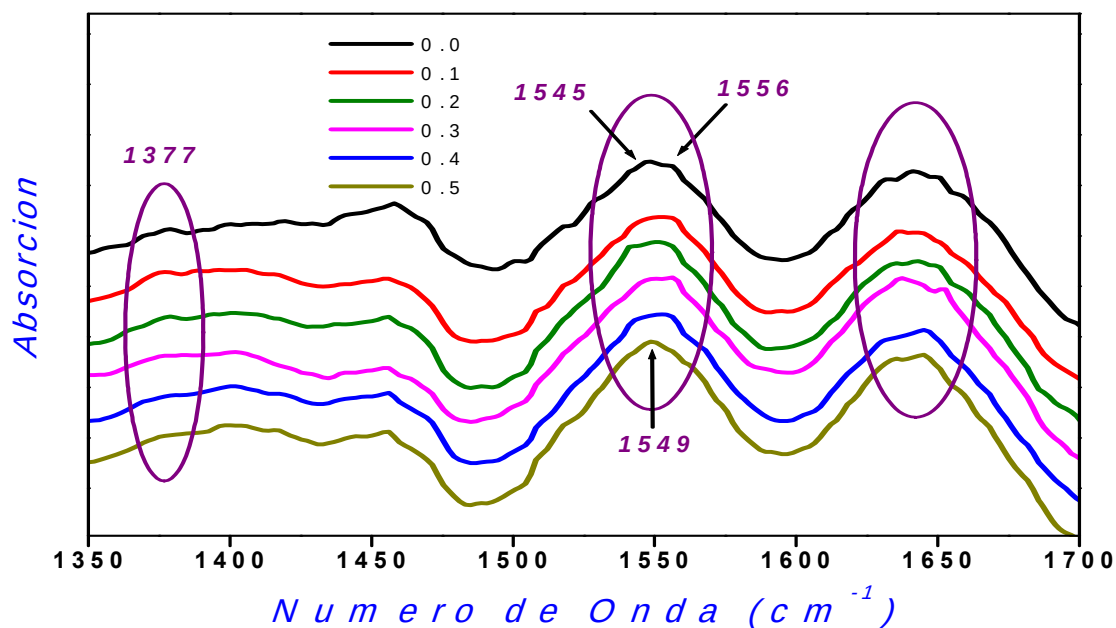


FIGURA 4.13. Espectros de infrarrojo, región de las proteínas.

A pesar de que los espectros de infrarrojo sí muestran cambios en la forma e intensidades de los picos, lo observado en la figura 4.13 no está en total correspondencia con los resultados obtenidos mediante el análisis de MilkoScan de las muestras de leche adulterada (ver tabla 4.7); donde las proteínas son las que muestran el mayor cambio (aumento 21.4%) en comparación con la lactosa (6.4%) o las grasas (5.6%), comportamiento que bajo las condiciones de muestreo (análisis por duplicado por MilkoScan y 60 muestreos por FTIR) no se pudo confirmar con el espectro de infrarrojo, ya que los espectros deberían de mostrar un cambio más notorio en la cantidad de energía absorbida; esto por el aumento de moléculas presentes debidas al suero agregado.

Para resolver este problema fue necesario hacer un cambio en las condiciones de muestreo para el análisis por FTIR, para lo cual el número de muestreos se incrementaron tanto para la muestra como para la línea base, 150 y 60 respectivamente, los resultados se presentan las tablas 4.8, 4.9 y gráficas 4.14, 4.15 y 4.16.

TABLA 4.8. Resultados de análisis por MilkoScan.

g de suero/ 50 mL de leche	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG	% ST	% Agua
0.1	1.98 ±0.014	3.195 ±0.007	4.435 ±0.007	8.495 ±0.007	10.475 ±0.021	89.52 5±0.021
0.2	2.045 ±0.021	3.31 ±0.014	4.495 ±0.007	8.675 ±0.021	10.72 ±0.042	89.28 ±0.042
0.3	2.025 ±0.021	3.435 ±0.007	4.535 ±0.007	8.85 ±0.014	10.875 ±0.007	89.125 ±0.007
0.4	2.03 0	3.56 ±0.014	4.58 0	9.03 ±0.014	11.06 ±0.014	88.94 ±0.014
0.5	2.025 ±0.021	3.67 ±0.028	4.625 ±0.007	9.185 ±0.035	11.21 ±0.056	88.79 ±0.056
Leche	1.965 ±0.021	3.08 ±0.071	4.36 ±0.014	8.305 ±0.064	10.27 ±0.042	89.73 ±0.042

Se analizaron nuevamente muestras con las mismas cantidades de suero en la leche (ver tabla 4.8), los resultados de las muestras analizadas por el MilkoScan (tabla 4.8) dejan ver un aumento tanto en las proteínas, lactosa y SNF; conforme aumenta la cantidad de suero agregado. Para el caso de la grasa, en comparación con los resultados anteriores, muestra que su incremento no es progresivo, esta aleatoriedad se atribuye a que la grasa es menos densa que el agua de la leche por lo que tiende a elevarse hacia la superficie. Este comportamiento se presenta cuando la solución pierde homogeneidad, durante el lapso de tiempo que lleva analizar el conjunto de muestras en el equipo de MilkoScan.

El incremento, en porcentaje, de cada uno de los parámetros de medición, se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 4.9. Porcentaje de incremento de cada uno de los componentes.

Aumento (%)			
Grasas	Proteína	Lactosa	SNF
3.053	19.156	6.078	10.596

Para las muestras adulteradas, se analizó el espectro de FTIR desde los 900 hasta 3500 cm^{-1} . En este espectro se analizaron las regiones de mayor interés como son la región de la lactosa, las proteínas y la grasa. Para el caso de la grasa se tomó en cuenta el pico a 1740 cm^{-1} asociado al enlace C=O y la región de los enlaces C-H, 2800-3400 cm^{-1} asociados al enlace H-C=O.

Para su análisis individual, se muestran las regiones por separado y se muestran cada una de las señales importantes, los picos de la región de la lactosa de 1000-1200 cm^{-1} (figura 4.14), la región

de las proteínas de $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ (figura 4.15) y la región de la grasa (figura 4.16). Cabe señalar que en la región de $2800\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, asociadas a los H-C=O , se observan cambios que en los análisis anteriores fueron difíciles de observar, esto se logra al aumentar el número de muestreos por unidad de tiempo para FTIR.

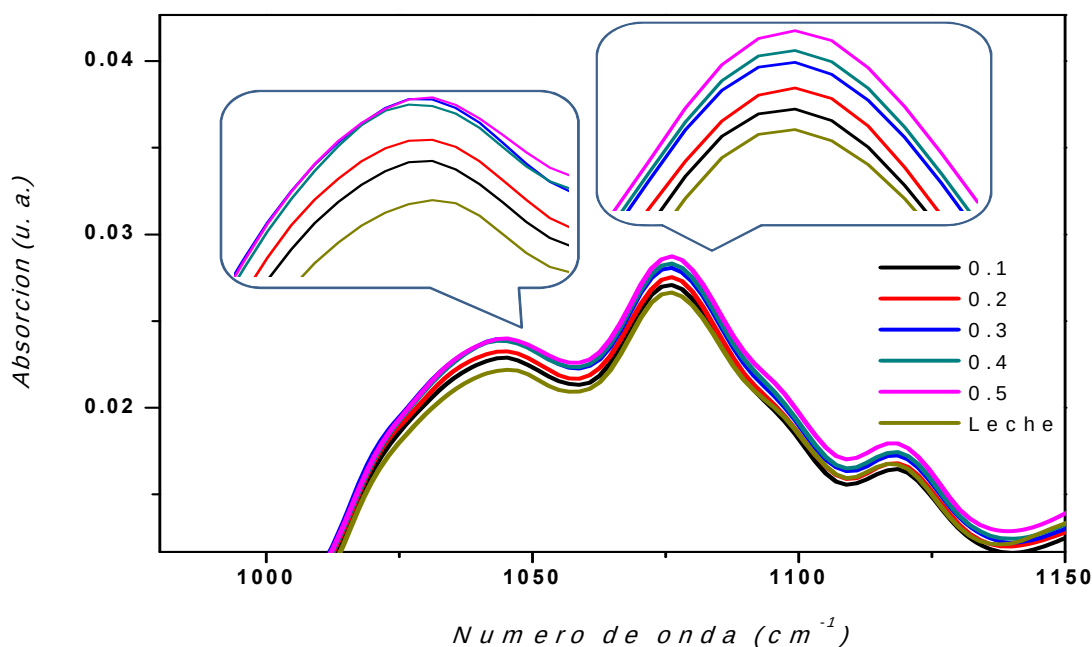


FIGURA 4.14. Espectros de FTIR en la región de los $900\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$, que incluye la región de la lactosa.

La figura 4.14 señala un cambio en la absorbancia cercano al 10% (de 0.022 para la leche hasta 0.024 para el espectro de leche con 0.5 g de suero adicionado) en el pico centrado en los 1042 cm^{-1} , el cual es propio de la banda de absorción de la lactosa (alcohol primario C-O); la intensidad aumentó conforme se incrementó la concentración del suero en la leche. Otro pico que muestra cambios de absorción cercanos al 10% dentro de esta región, es el de 1076 cm^{-1} asociado con enlaces O-H (de 0.026 hasta 0.029).

En la región de las proteínas (figura 4.15) se observan las bandas de absorción para la región de la Amida II y Amida I, que al igual que para la lactosa, muestran un aumento en la intensidad de absorción (de 0.014 a 0.02) conforme aumenta la adición de suero; para esta región los cambios fueron mayores al 40%. Cabe señalar que para el caso del espectro con 0.1 g de suero en leche, su absorción fue cercana al espectro de 0.2 g de suero (0.0160 y de 0.0163).

Los resultados de los espectros de FTIR de las figuras 4.14 y 4.15, muestran correspondencia con los mostrados en la tabla 4.8, ambos presentan un incremento en el porcentaje de lactosa y proteínas.

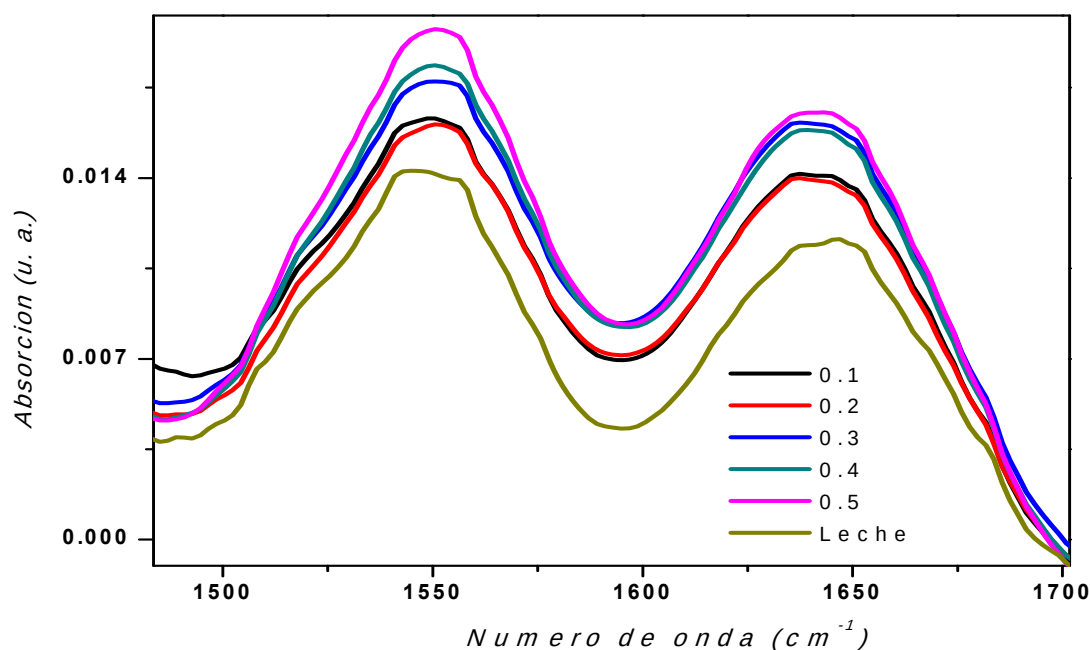


FIGURA 4.15. Espectros de FTIR en la región de la Amida I y Amida II (para el caso de las proteínas de la leche).

Por otro lado, la tabla muestra una aleatoriedad en las mediciones de la concentración de grasa, lo cual también se detectó con el equipo de infrarrojo, estos cambios como ya se mencionó, son debidos a la densidad de la grasa y la posible pérdida de homogeneidad mientras se realiza el análisis de la muestra debido al aumento en la cantidad de suero agregado a la leche.

En la figura 4.16, en el pico centrado en $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ (relacionado con la respuesta de los enlaces carboxilo $\text{C}=\text{O}$), las intensidades de los espectros no aumentaron de manera consistente, ya que tanto para las muestras de leche con 0.1 y 0.3 g de suero, se tuvo el mismo valor de absorción (0.002). Por otro lado el espectro de leche, para las 2 regiones mostradas en la figura 4.16, presentó la mayor intensidad (0.007). En esta figura también se muestran los picos relacionados con la grasa en la región de los CH_2 's, los picos a 2854 cm^{-1} y 2924 cm^{-1} ; en estos picos también existe una diferencia entre el aumento de suero para la adulteración y el valor de absorción en las muestras.

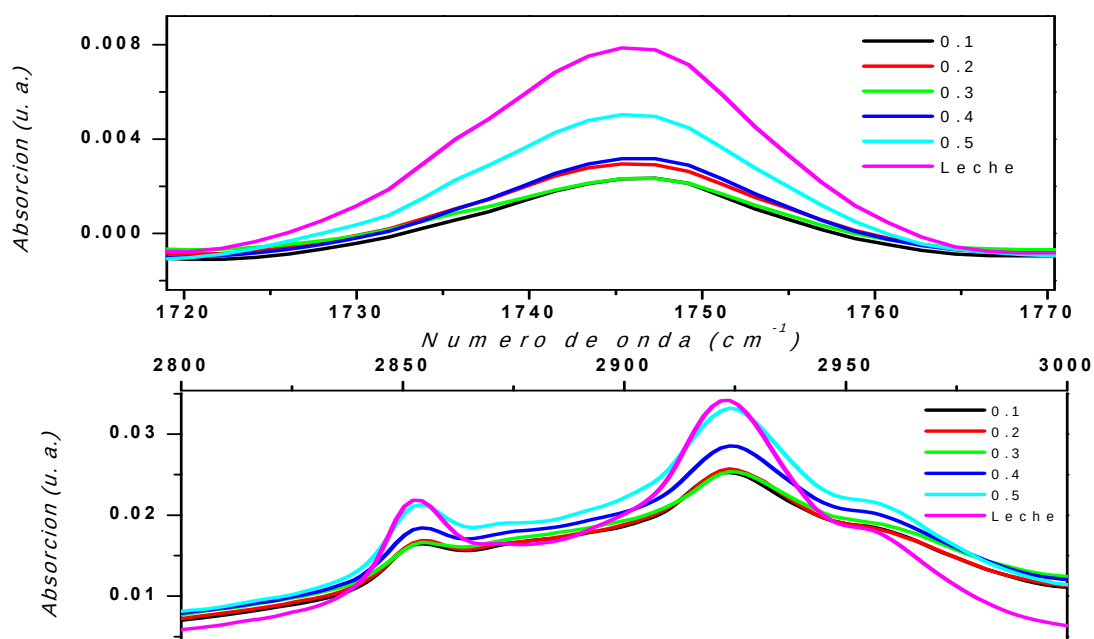


FIGURA 4.16.- Espectro de FTIR de los cambios en las regiones asociadas a la grasa.

De los análisis efectuados con suero en polvo se determinó que está sucediendo un incremento en los valores iniciales de los diversos componentes de la leche, es decir se puede decir que existe un enriquecimiento del producto y los cambios fueron perceptibles por FTIR.

4.3.2 ADULTERACIONES CON SUERO LÍQUIDO

El análisis de muestras adicionando suero líquido, se presenta a continuación; se utilizaron sueros líquidos obtenidos de dos procesos de fabricación diferentes, para queso tipo panela y para queso tipo Oaxaca o quesillo, tomadas directamente de la empresa lactoproductos la Providencia.

En la figura 4.17, se comparan los espectros de ambos sueros y el de la leche utilizada, se puede observar que la mayor intensidad de picos la presenta el espectro de la leche (desde 800 a 1800 cm^{-1}). Un dato interesante es la forma de los picos en la región de las proteínas, entre 1400 y 1500 cm^{-1} , asociado a nitro compuestos aromáticos propios de las proteínas. En la leche el pico predominante es a 1456 cm^{-1} , mientras que para los sueros en esta región predomina el pico a 1375 cm^{-1} . Esto está totalmente de acuerdo con la literatura, la cual dice que el suero presenta una mayor contribución a las proteínas debido a la presencia del glicomacropéptido presente únicamente en los sueros.

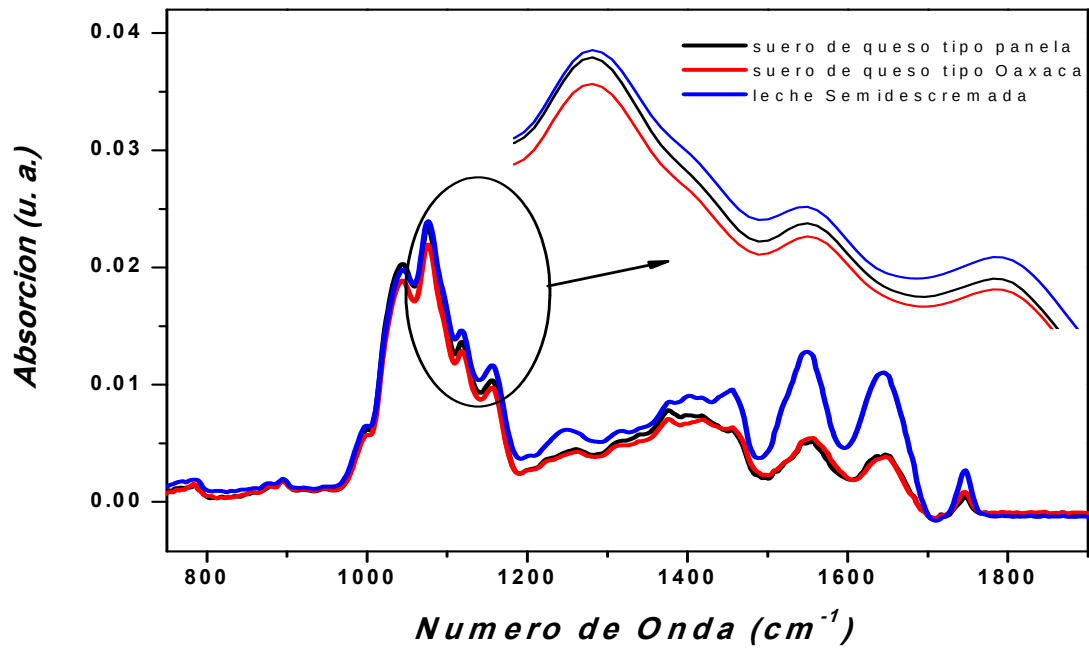


FIGURA 4.17. Comparación entre los espectros de FTIR de los 2 sueros líquidos empleados para adulteración de leche y el espectro de la leche.

Aunado a lo anterior, en la región de las grasas se observa la presencia de un nuevo pico cercano a los 1700 cm^{-1} para el espectro del suero panela. Para observar mejor la región de las grasas se presenta la figura 4.18, en esta figura se observa un pico característico de los enlaces $\text{C}=\text{C}$ en la región de 1716 cm^{-1} , el cual sobresale para el suero de queso tipo panela, lo que indica que es factible identificar por FTIR, no solo la adulteración por suero, sino también identificar si el tipo de suero utilizado para este fin fue correspondiente a la elaboración de queso panela.

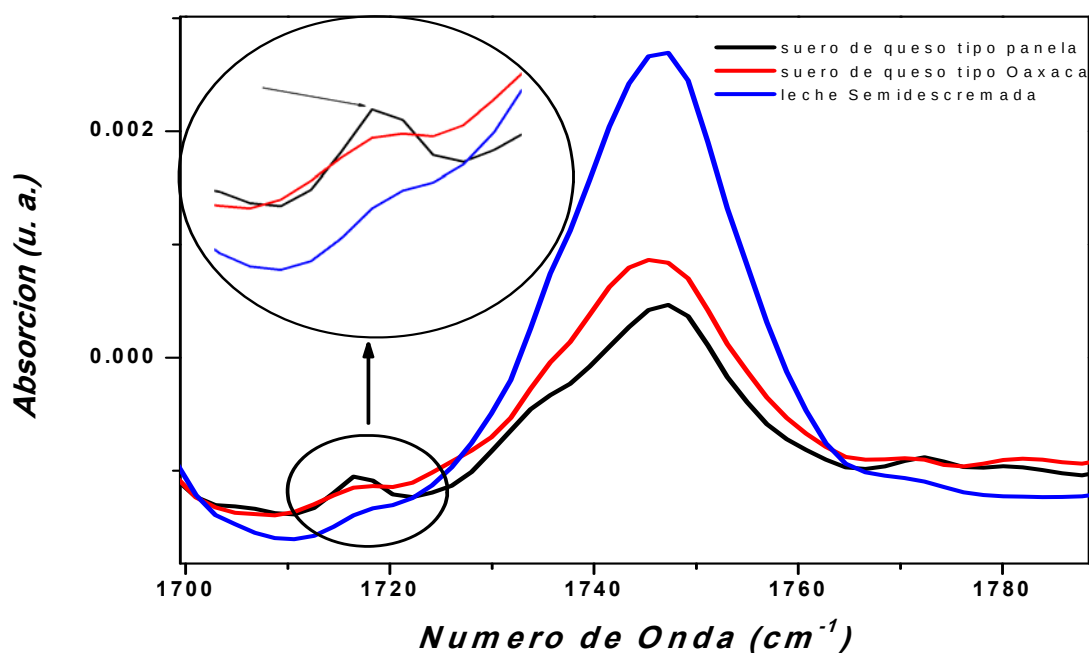


FIGURA 4.18. Región de la grasa para los espectros de FTIR de sueros líquidos y leche.

Haciendo un análisis más a fondo en la región de las proteínas, se presentan las gráficas comparativas de los diferentes espectros de leches utilizadas en este trabajo (figura 4.19), así como de los sueros (figura 4.20), contra un espectro característico del glicomacropéptido.

En el proceso de la elaboración de algunos quesos, la leche se cuaja usando renina (cuajo), las caseínas pierden en forma natural e inevitable un fragmento (llamado glicomacropéptido) que constituye el 4% de su masa. Este fragmento se transfiere en forma soluble al lactosuero, el cual ha sido objeto de estudio para determinar si la leche ha sido adulterada con suero [29].

En la figura 4.19, se observa que en las diferentes muestras de leche el pico predominante es el centrado a 1450 cm^{-1} , mientras que el pico característico de la proteína presente solo en el suero, está a 1400 cm^{-1} .

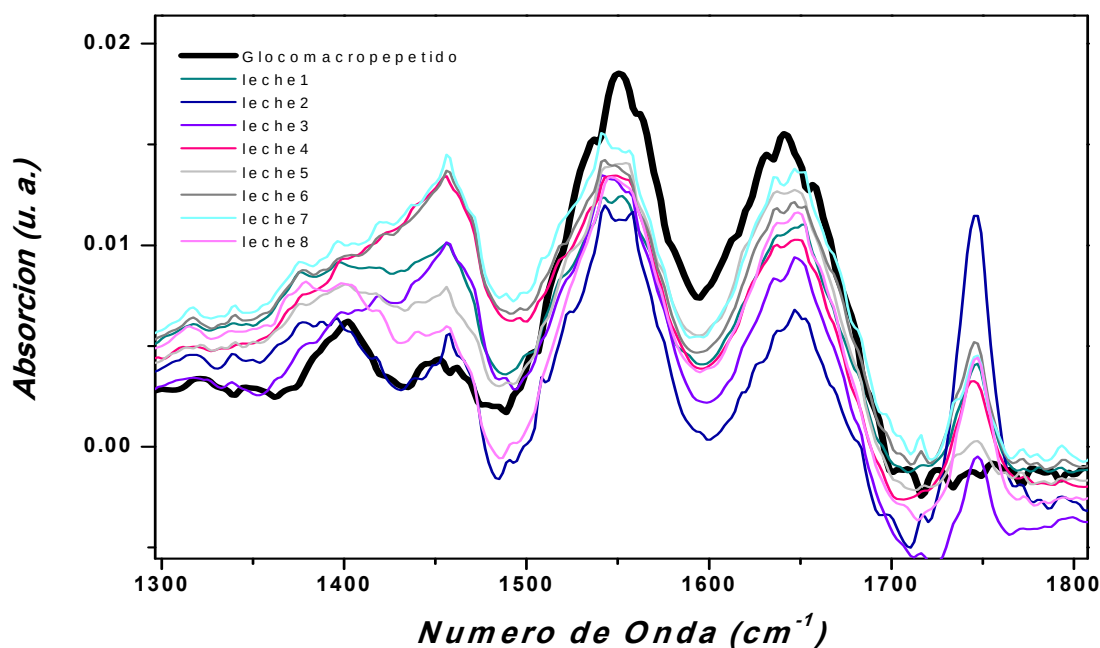


FIGURA 4.19. Comparación entre el espectro del glicomacropéptido y los diferentes lotes de leches (semi) utilizadas.

Comparando el espectro del glicomacropéptido, con el de los diferentes sueros utilizados, figura 4.20, se observa que los espectros de los sueros sí presentan este pico característico a 1400 cm^{-1} . Sin embargo, la intensidad del pico no es la misma en los espectros, lo cual indica que el porcentaje de generación de esta proteína, no es constante; por lo cual no es un buen indicativo para con este dato determinar el porcentaje de adulteración. Aunque si es un punto de partida para confirmar la adulteración de leche por suero de queserías.

Debido a lo anterior se considera necesario ahondar más en el análisis del espectro de las diferentes regiones espectrales de la leche, así los análisis de sueros líquidos se realizarán de acuerdo al tipo de suero utilizado.

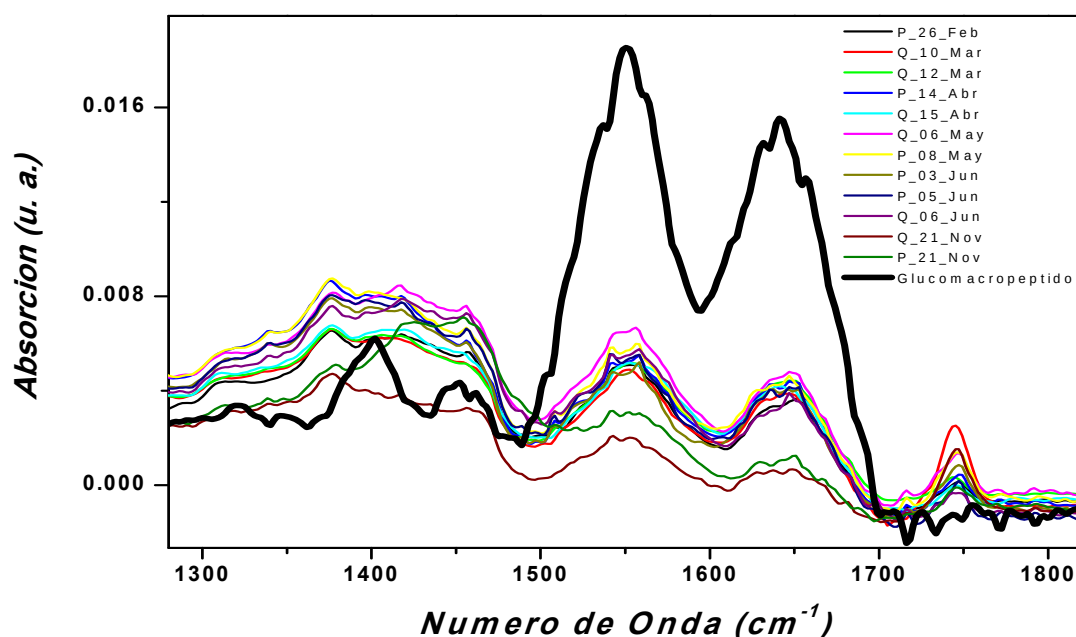


FIGURA 4.20. Comparación entre el espectro de FTIR del glicomacropéptido y los diferentes sueros utilizados (P, Q, son sueros de quesos tipo Panela y Quesillo respectivamente).

4.3.2.1 Suero de queso tipo Panela

Una vez que se determinó el comportamiento de las muestras de leche adulteradas con suero en polvo, el siguiente paso fue observar ahora el comportamiento cuando a la leche se le adiciona suero de queserías, que fue proporcionado directamente de la empresa quesera.

En los espectros de la figura 4.21, se muestran las regiones de lactosa, proteínas y grasa de algunos sueros de queso tipo panela estudiados en este trabajo. Lo que es importante hacer notar de la figura, es la gran similitud entre los espectros obtenidos de los sueros analizados a diferentes días de muestreo. En la región de los enlaces relacionados con la respuesta de los carbohidratos, ácidos orgánicos y grupos fosfatos, de la lactosa y proteínas respectivamente; se observan únicamente variaciones en los valores de intensidad de los espectros de los diferentes sueros analizados. En las proteínas se puede observar muy claramente la presencia del glicomacropéptido, por la mayor intensidad en el pico a 1400 cm^{-1} . La región que corresponde a los enlaces $\text{C}=\text{O}$ de la grasa muestra claramente el pico a 1742 cm^{-1} , así también un pico centrado en los 1715 cm^{-1} el cual hasta este momento no se había detectado en los espectros ni en leches ni en los sueros en polvo.

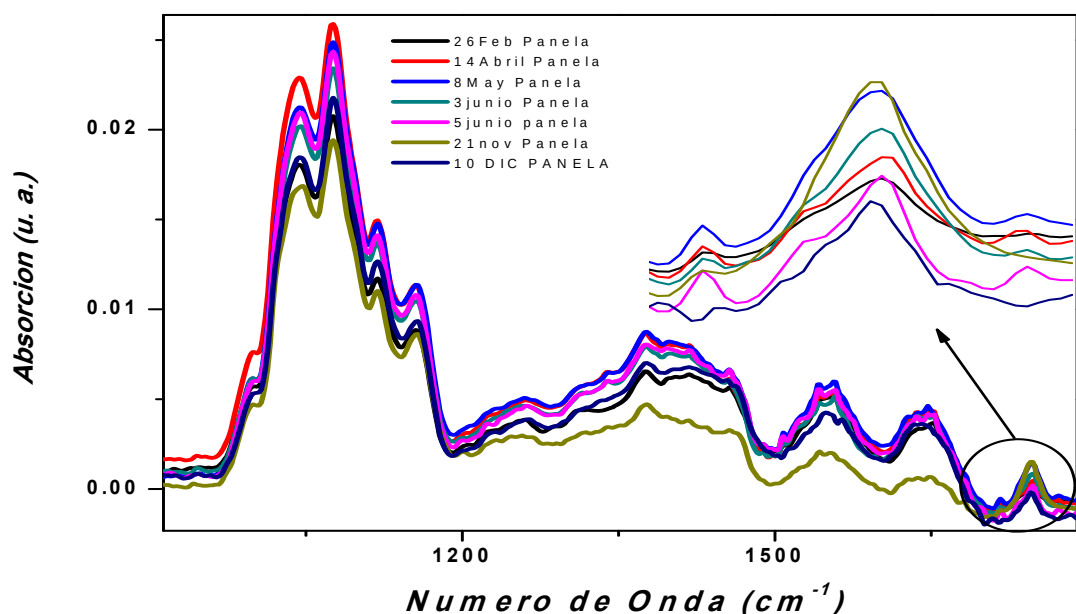


FIGURA 4.21. Espectros de FTIR de Suero de queso tipo Panela, región de lactosa, proteínas y grasa.

La tabla 4.10 muestra el promedio de los parámetros cuantificados por MilkoScan del análisis del suero líquido obtenido del proceso de fabricación de queso panela, así como también la desviación estándar de los resultados. Se puede ver en esta tabla que los porcentajes de proteína y grasa fueron menores comparados con la leche mientras que el de lactosa es más elevada; y al ser la cantidad de sólidos totales menor (7.2108%) el porcentaje de agua en este suero fue más grande (92.7892%), lo cual se esperaba debido a que la mayor parte del suero es agua y la mayor parte de los sólidos presentes están compuestos por los carbohidratos presentes en la leche, de la cual fue utilizada para elaborar el queso tipo panela, y se desconoce su composición, pero debido al análisis de los espectros es notorio que tiene mucho mayor cantidad de lactosa que la leche semidescremada.

TABLA 4.10.- Resultados de análisis por MilkoScan de suero de queso tipo panela.

	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG
PROMEDIO	0.198 ±0.06	1.309 ±0.1035	4.97 ±0.520	7.012 ±0.596

Una vez que se ha determinado el espectro característico y los valores promedio del suero de queso tipo panela a utilizar; se procedió a la adulteración de las muestras de leche.

La tabla 4.11 muestra los resultados de los parámetros medidos por MilkoScan obtenidos al agregar cantidades de entre 1 mL a 20 mL de suero/50 mL de leche. En la tabla se puede observar que los valores de proteínas, grasa y sólidos, decrecen de manera sistemática (17.94%, 26.46% y 9.41% respectivamente) conforme se incrementó la presencia del suero. El suero líquido al tener porcentajes mayores de agua y menores de ST que la leche, hace que la solución leche/suero aumente la cantidad de agua y disminuya sus valores de ST. Por lo anterior la tabla muestra que los valores de agua y de lactosa en las muestra de leche se incrementan, 2.89% y 1.13% respectivamente, por la presencia del suero. Esto es un resultado que se esperaba, ya que en los análisis anteriores se observó que lactosa y agua son los componentes que representan la mayor composición de los sueros.

TABLA 4.11.- Resultados por MilkoScan del análisis de leche adulterada con suero líquido de queso tipo panela.

mL de suero/ 50 mL de Leche	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG	% ST	% AGUA
1	1.895 ±0.104	3.198 ±0.117	4.627 ±0.084	8.687 ±0.131	10.582 ±0.181	89.418 ±0.181
5	1.768 ±0.100	3.137 ±0.085	4.665 ±0.055	8.597 ±0.099	10.365 ±0.149	89.635 ±0.149
10	1.634 ±0.093	2.939 ±0.078	4.708 ±0.050	8.488 ±0.099	10.122 ±0.155	89.878 ±0.155
20	1.422 ±0.090	2.707 ±0.075	4.756 ±0.097	8.289 ±0.138	9.711 ±0.196	90.289 ±0.196
Suero	0.198 ±0.071	1.309 ±0.068	4.97 ±0.074	7.012 ±0.128	7.211 ±0.140	92.789 ±0.140
Leche	1.934 ±0.060	3.298 ±0.104	4.622 ±0.520	8.786 ±0.596	10.72 ±0.596	89.28 ±0.596

Ahora bien analizando estas muestras por FTIR, se obtuvieron los siguientes resultados. En la figura 4.22 se muestra la respuesta al infrarrojo, en la región de la lactosa, de las muestras adulteradas con suero; las cuales son comparadas con el espectro obtenido de la muestra de leche sin adulterar y el espectro del suero utilizado. Se observa un pico centrado en 1050 cm^{-1} correspondiente al alcohol primario C-O, en esta región, el espectro del suero de queso tipo panela presento mayor intensidad respecto a los demás espectros (el de la leche y muestras adulteradas con diferentes cantidades de este suero), mientras que el espectro de la leche presentó la menor absorción. En esta región, el pico a 1050 cm^{-1} incrementó su intensidad conforme las muestras de leche tuvieron mayor porcentaje de suero, el porcentaje de aumento de absorción de la muestra de leche (sin adulteración) hasta la muestra con 20 mL de suero agregado, fue de 2.12%. Lo que concuerda con el porcentaje que muestran los resultados de los

análisis efectuado por MilkoScan (2.89%). Con esto se concluye que el pico localizado en 1050 cm^{-1} presenta el mejor punto de referencia para la elaboración de las curvas de calibración en cuanto al compuesto de lactosa presente en leche.

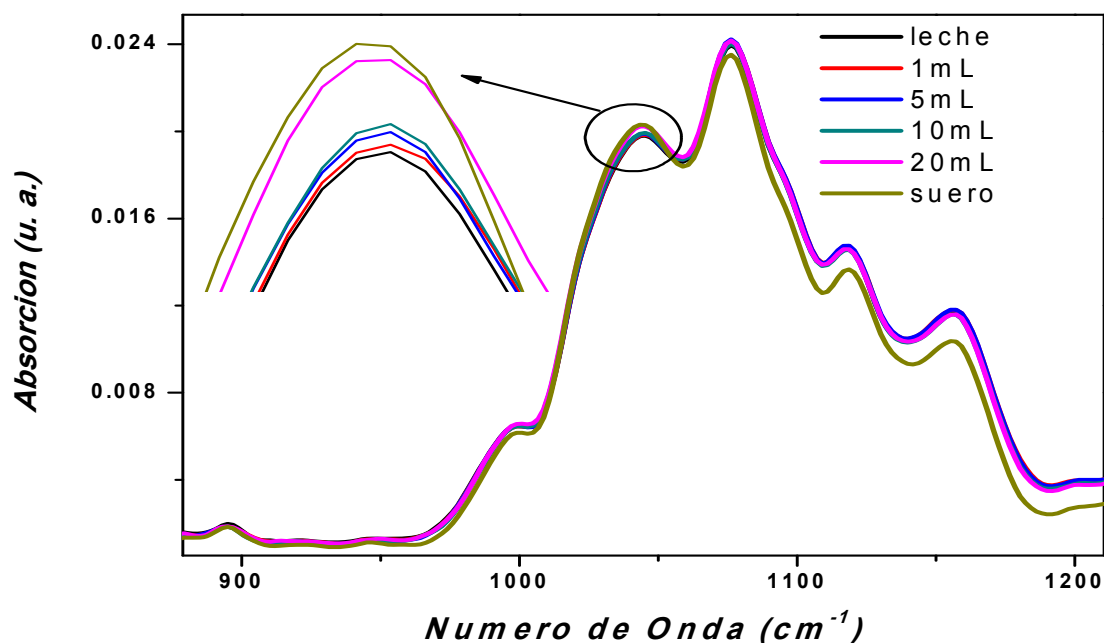


FIGURA 4.22. Espectros de FTIR de la región de lactosa de muestras de leche adulterada con suero de queso tipo panela.

Los espectros en la región de las proteínas, muestran que la leche presentó la mayor intensidad y esta disminuyó conforme se adiciona suero, hasta ser el espectro del suero el que presenta la menor intensidad. Esto se logra visualizar mejor en la región de la amina I y II, (figura 4.23) específicamente en el pico de 1550 cm^{-1} (enlaces N-H, C-N). En la figura se observa un descenso en la intensidad del 15.38%; a partir del espectro de leche hasta el espectro de leche adulterada con 20 mL de suero; este es un pico bastante confiable para generar la curva de calibración en la región de las proteínas, ya que los valores disminuyen en las muestras de leche conforme se aumenta el suero agregado y esto está en total correspondencia con los resultados obtenidos por MilkoScan.

Esto mismo sucede para el caso de la grasa, ver figura 4.24; donde la absorción incrementó conforme a la leche se le agrego una menor cantidad de suero presente; en esta región, el pico ubicado en 1747 cm^{-1} tiene un porcentaje de disminución del espectro de leche al espectro con la mayor cantidad de suero (de 0.0034 a 0.0014 u.a.) del 58.8%.

Para ambos componentes (proteínas y grasa) se esperaba que conforme ocurriera el incremento de suero en las muestras de leche, estas descendieran en el número de enlaces característicos de estos 2 compuestos; ya que el aumento de agua gracias al suero y al poco aporte tanto de proteínas como de grasa del mismo, disminuyó la absorción en esas regiones.

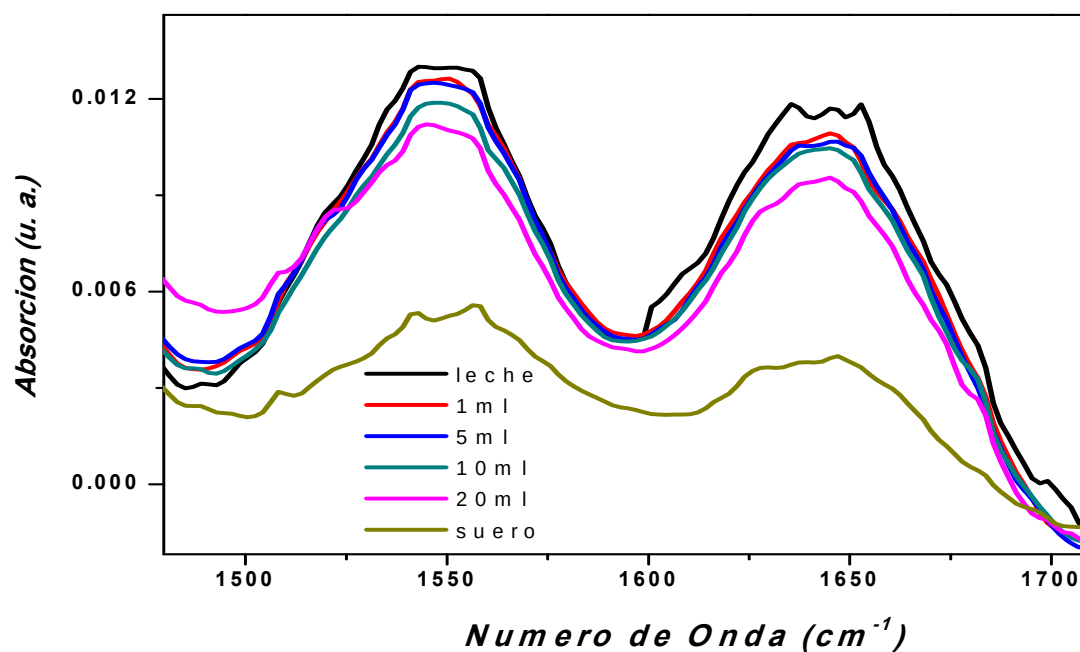


FIGURA 4.23. Espectros región de proteínas de muestras de leche adulterada con suero tipo panela.

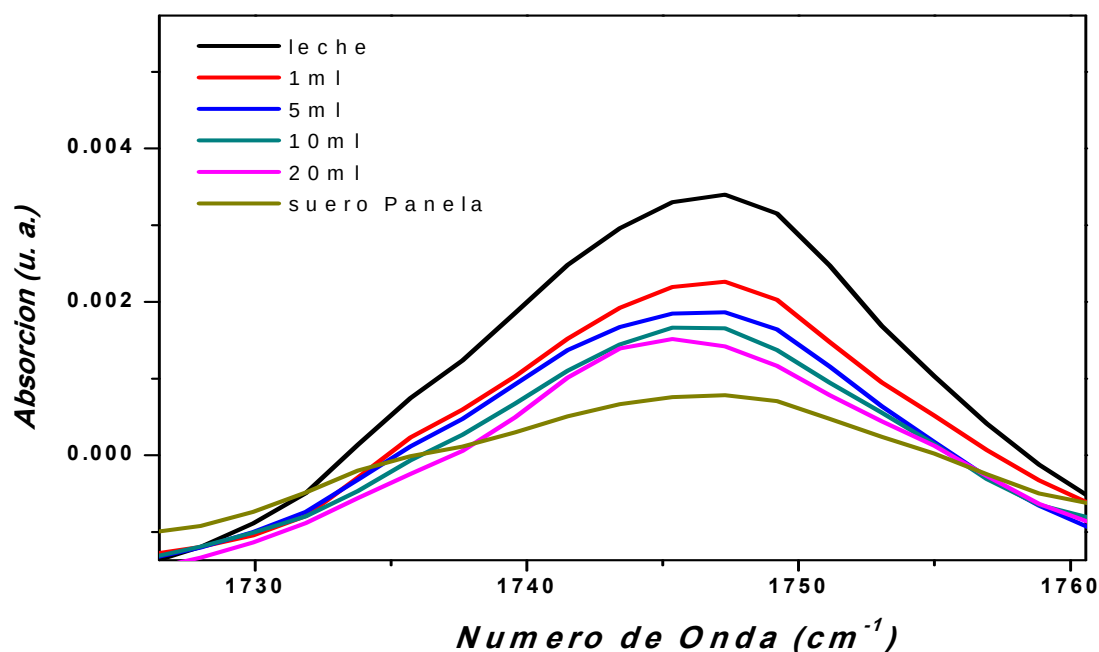


FIGURA 4.24. Espectros de FTIR de la región de grasa de muestras de leche adulterada con suero tipo panela.

Al comparar los resultados espectrales de absorción en el infrarrojo con los porcentajes medidos en el equipo de MilkoScan, se observa que concuerdan de manera casi perfecta, en la disminución de la intensidad en las regiones de la grasa y proteínas conforme se agregó más suero a la leche. Para la región de la lactosa, la absorción incremento al aumentar la cantidad de suero de las muestras.

En las gráficas 4.25, 4.26 y 4.27 se comparan directamente el porcentaje dado por el equipo de MilkoScan con la absorción del pico característico para las regiones de lactosa, proteínas y grasa. Para la lactosa se tomó el pico de 1045 cm^{-1} (figura 4.25), en las proteínas se escogió el pico de 1550 cm^{-1} que se encuentra dentro del área de la Amida II (figura 4.26) y el pico 1747.27 cm^{-1} para la grasa (figura 4.27). Estos valores fueron tomados de acuerdo a la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004, en otras palabras, son los números de onda donde se encuentran los filtros en el equipo de MilkoScan.

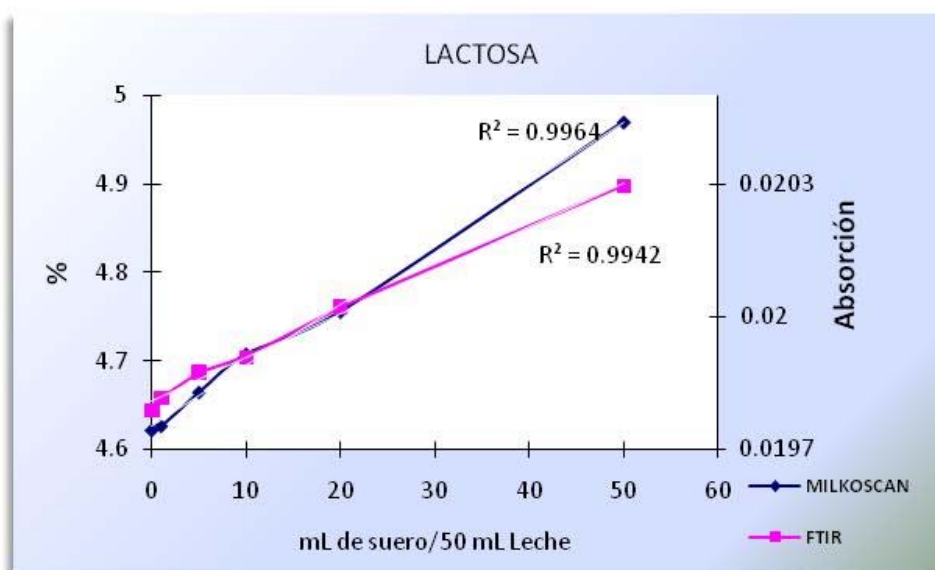


FIGURA 4.25. Comparación de análisis por -■-FTIR y -◆-MilkoScan de lactosa de las adulteraciones con suero de queso tipo panela.

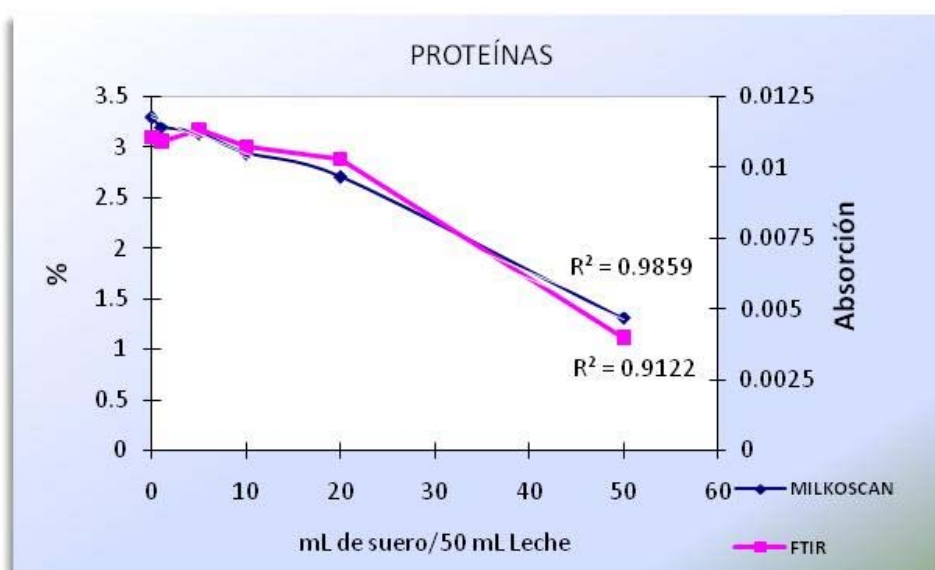


FIGURA 4.26. Comparación de análisis por -■-FTIR y -◆-MilkoScan de proteínas de las adulteraciones con suero de queso tipo panela.

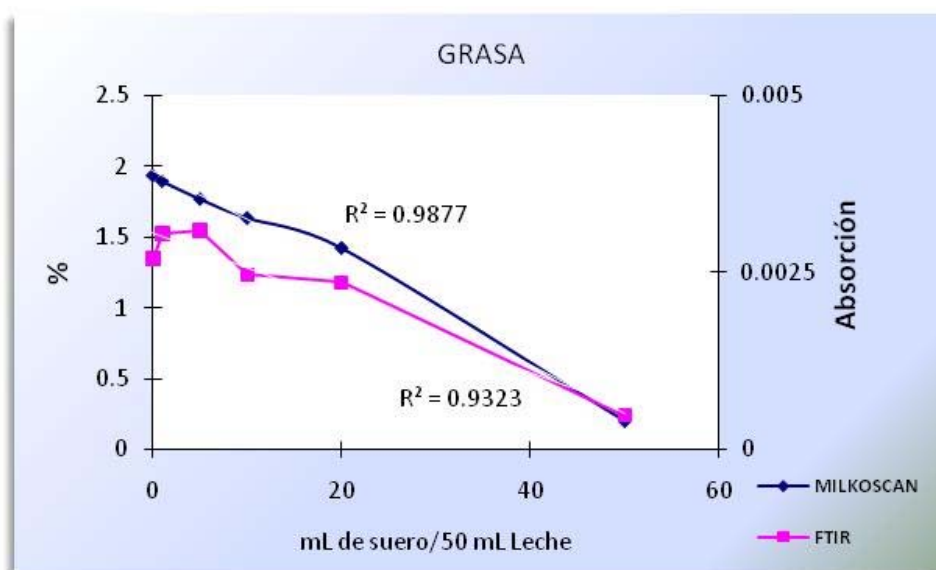


FIGURA 4.27. Comparación de análisis por -■-FTIR y -◆-MilkoScan de grasa de las adulteraciones con suero de queso tipo panela.

Como muestran las gráficas comparativas, la absorción para FTIR y el porcentaje de cada parámetro medido con MilkoScan siguen la misma tendencia, el crecimiento para la lactosa y el decremento para proteínas y grasa. Con esto se comprueba que los espectros del equipo de FTIR aparte de mostrar los enlaces característicos de los componentes de la muestra analizada, también muestran relación entre su absorción y el porcentaje presente en las muestras de leche adulterada; además permite identificar entre muestras de suero de queso tipo panela y muestras de leche.

4.3.2.2 Suero de queso tipo Oaxaca

Ahora bien para el caso de adulteración de leche con suero de queso tipo quesillo, se muestran a continuación los espectros por FTIR de la región de lactosa, la región de las proteínas y la región de la grasa, de la muestra de suero líquido del queso tipo Oaxaca utilizadas en este trabajo (figura 4.28).

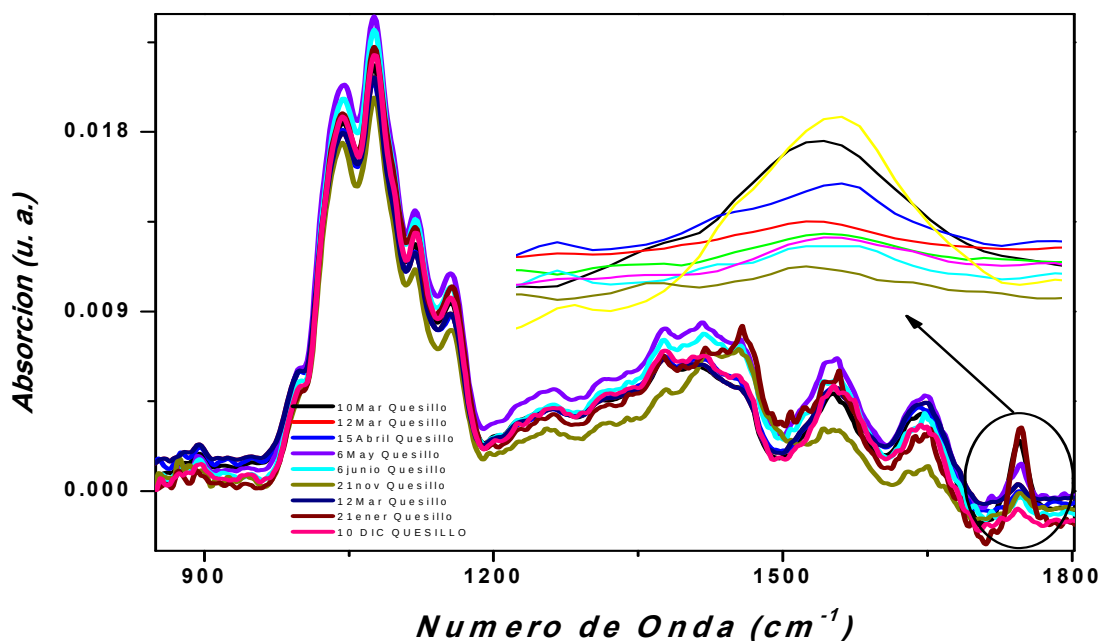


FIGURA 4.28.- Espectros de Suero de queso tipo Quesillo, región de lactosa, proteínas y grasa.

Como se puede observar en los espectros de FTIR anteriores (figura 4.28), para la región de la lactosa, los sueros presentan un espectro muy similar; para la región de las proteínas, contrario a los espectros de suero de queso panela, no se identificó de manera clara el pico asociado al glicomacropéptido; por lo que esta proteína probablemente no se genera en una cantidad significativa para su identificación en el espectro, si es comparada con las demás proteínas presentes en el suero (α -lactoalbúminas, β -lactoglobulinas). Finalmente para la grasa, como se mencionó anteriormente, no se presentó el pico por debajo de los 1740 cm^{-1} , que si aparece para el suero de queso tipo panela, lo cual es asociado al proceso de fabricación de ambos quesos.

En la tabla 4.12, se presentan los resultados promedio de los porcentajes de lactosa, proteínas, grasa y STNG de los sueros medidos por el equipo de MilkoScan. Aquí es importante mencionar que este suero tiene un porcentaje de ST de 6.943% y de agua del 93.058%. Comparado estos resultados con los del suero tipo panela, se aprecia que el suero de quesillo tiene una menor cantidad de ST y una mayor cantidad de agua. En lo que respecta a las proteínas, el suero de queso tipo Oaxaca tiene un 1.3% más que el suero de queso tipo panela; para la grasa el suero de queso tipo Oaxaca tiene un 4.23% mas, comparado con el contenido de grasa de suero de queso panela.

TABLA 4.12.- Resultados de MilkoScan para el suero líquido de queso tipo Quesillo.

	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG
PROMEDIO	0.207 ±0.118	1.325 ±0.0162	4.666 ±0.139	6.735 ±0.132

En la siguiente tabla (tabla 4.13) se presentan los resultados por MilkoScan de las muestras de leche con diferentes cantidades de suero adicionado; donde se aprecia que el porcentaje de grasa al agregar más suero disminuye al igual que para el caso de las proteínas (disminución de 25.7 y 15.7% respectivamente), si comparamos el valor de la muestra de leche comercial con el valor de la muestra a la cual se le agrego 20 mL de suero. Para el caso de la lactosa, al agregar suero aumenta un 1.4%, sin embargo los resultados no van en aumento constante; es decir esta variación no fue similar como en el caso del suero de queso tipo panela, donde siempre hubo un incremento consistente.

TABLA 4.13.- Comparación de resultados de muestras de leche con suero líquido de queso tipo quesillo analizadas por MilkoScan.

mL de suero/ 50 mL de Leche	% Grasa	% Proteínas	% Lactosa	% STNG	% ST	% AGUA
1	1.889 ±0.080	3.272 ±0.040	4.682 ±0.041	8.818 ±0.069	10.707 ±0.137	89.293 ±0.137
5	1.763 ±0.069	3.17 ±0.046	4.688 ±0.033	8.671 ±0.059	10.434 ±0.114	89.566 ±0.114
10	1.63 ±0.062	2.993 ±0.053	4.685 ±0.024	8.509 ±0.047	10.139 ±0.095	89.861 ±0.095
20	1.437 ±0.050	2.78 ±0.051	4.685 ±0.017	8.269 ±0.038	9.706 ±0.061	90.294 ±0.061
Leche	1.934 ±0.071	3.299 ±0.068	4.622 ±0.074	8.786 ±0.128	10.72 ±0.140	89.28 ±0.140
Suero	0.207 ±0.118	1.326 ±0.016	4.666 ±0.140	6.735 ±0.132	6.942 ±0.132	93.0583 ±0.132

De los resultados de absorción en el infrarrojo (figura 4.29), se ve que los espectros en la región de la lactosa, tienen una tendencia a disminuir su absorción conforme las muestras tienen mayor cantidad de suero adicionado (5.8% de disminución en la intensidad del espectro de leche al de la muestra con 20 mL). Este resultado está en contraposición a lo obtenido por MilkoScan, lo que se atribuye a que el equipo de FTIR reporta una menor cantidad de energía absorbida, por lo tanto una menor cantidad de moléculas vibrando en esa región.

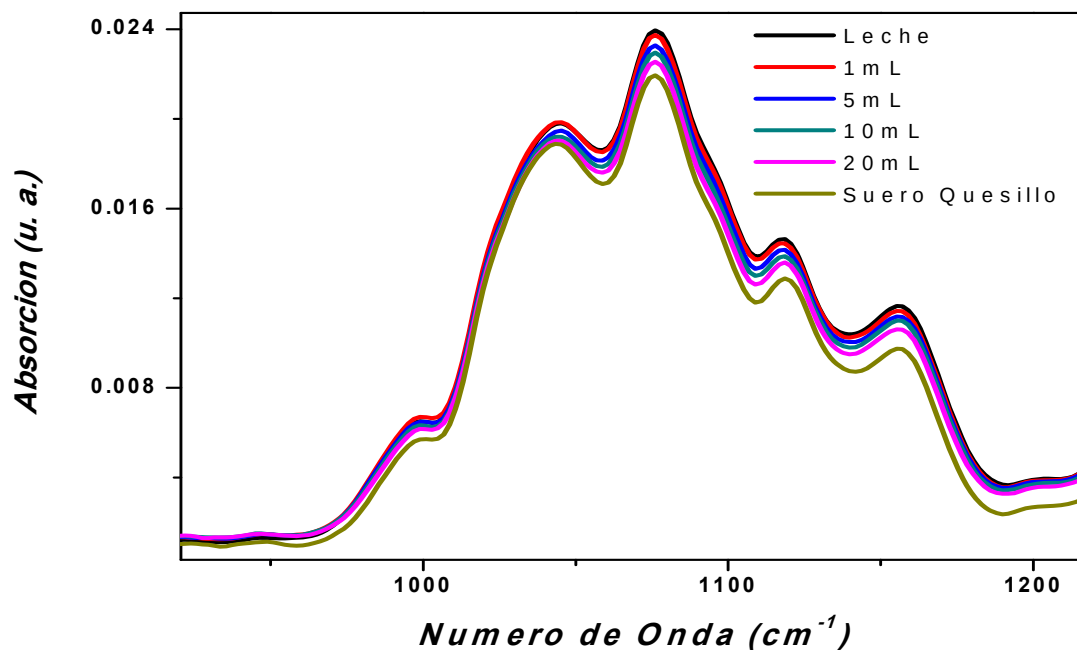


FIGURA 4.29. Región de lactosa para los diferentes espectros de FTIR de la muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca (o quesillo).

La figura 4.30 muestra la región de las proteínas, se ve que la intensidad de las muestras de leche también disminuyó su absorción conforme se fue adicionando suero (20.3% de disminución, para la región de amina II), lo que concuerda con los resultados de MilkoScan. La región donde se observa mejor la diferencia entre los espectros es la región de la grasa, específicamente en el pico de 1747 cm^{-1} donde la disminución fue del 44.4% en la intensidad de los espectros, ver figura 4.31.

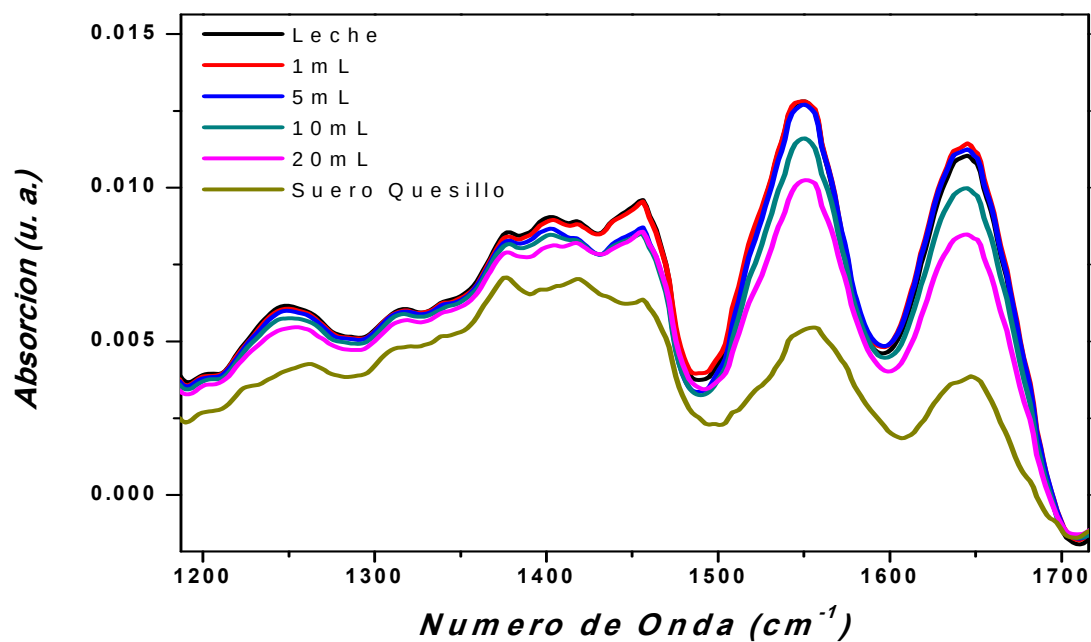


FIGURA 4.30. Región de proteínas para los diferentes espectros de FTIR de la muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca (o quesillo).

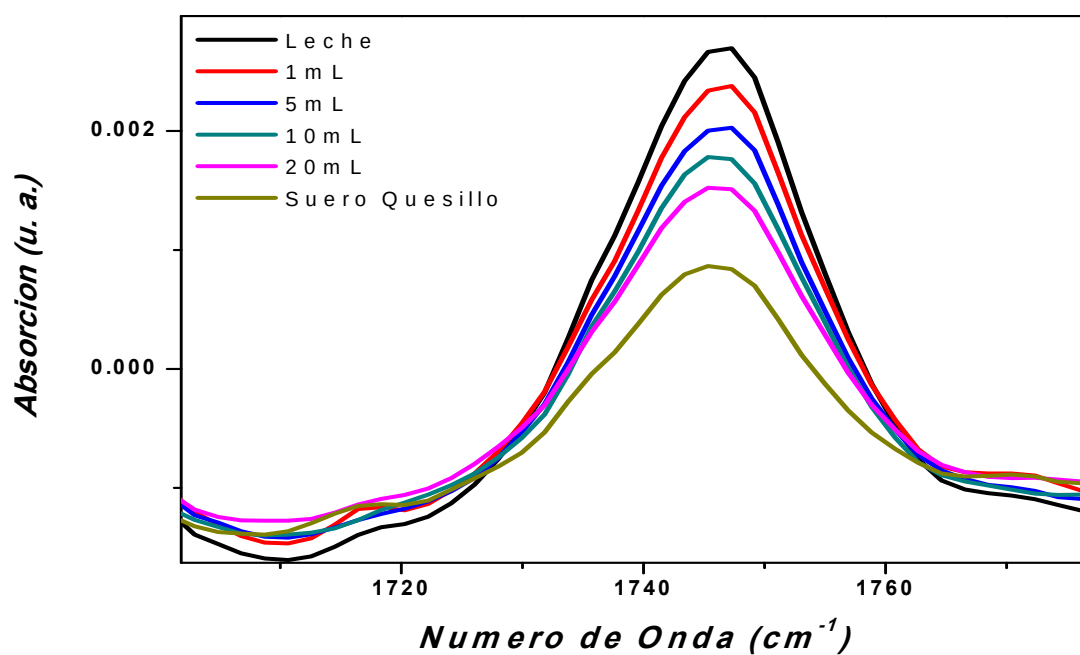


FIGURA 4.31. Región de la grasa para los diferentes espectros de FTIR de la muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca (o quesillo).

Tal como ocurre con la adición del suero de queso tipo panela, el aporte de sólidos (en este caso de proteínas y grasa) no fue sustancial, en contraposición con la cantidad de agua que hace que las muestras de leche sean diluidas.

En la gráfica 4.32 se compara el resultado de absorción por espectroscopia de infrarrojo contra los valores obtenidos por MilkoScan en el pico propio de la lactosa; para las diferentes muestras de leche adulterada con suero líquido, leche y el suero mismo. Para el caso de infrarrojo se ve como disminuyó la intensidad, mientras que al ser comparada con la composición obtenida por MilkoScan, la lactosa inicialmente aumentó conforme se incrementó la presencia de suero y después se mantuvo con muy pocos cambios.

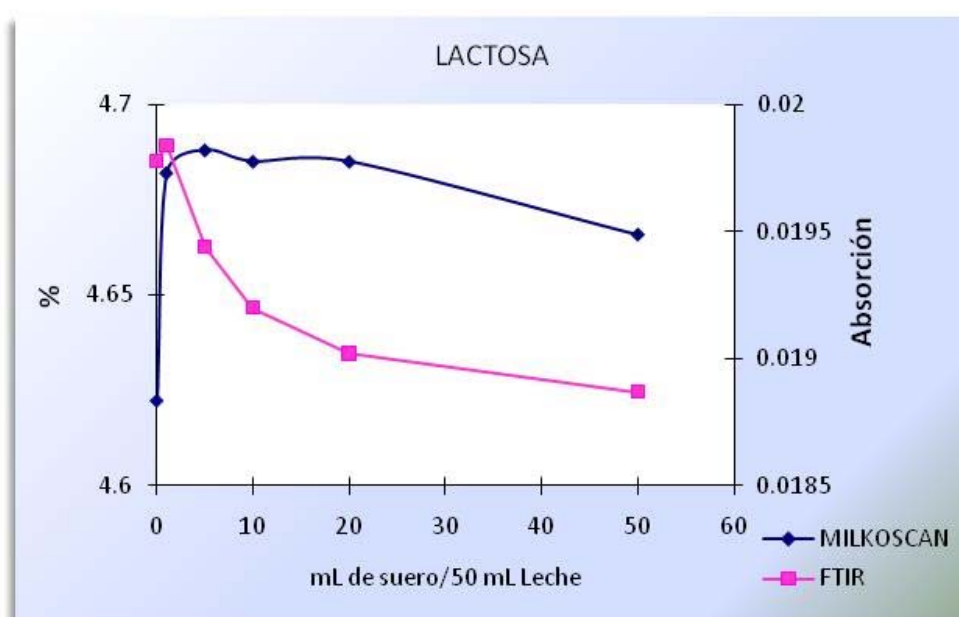


FIGURA 4.32. Comparación del análisis de lactosa para -■-FTIR y -◆-MilkoScan, de las muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca.

En las figuras 4.33 y 4.34 se ve que tanto para MilkoScan como para FTIR hubo una tendencia al descenso de proteínas y grasa respectivamente, por lo que al igual que con la adulteración con suero de queso tipo panela, se determinó tanto cualitativa como cuantitativamente el porcentaje de suero adicionado al correlacionar ambos resultados.

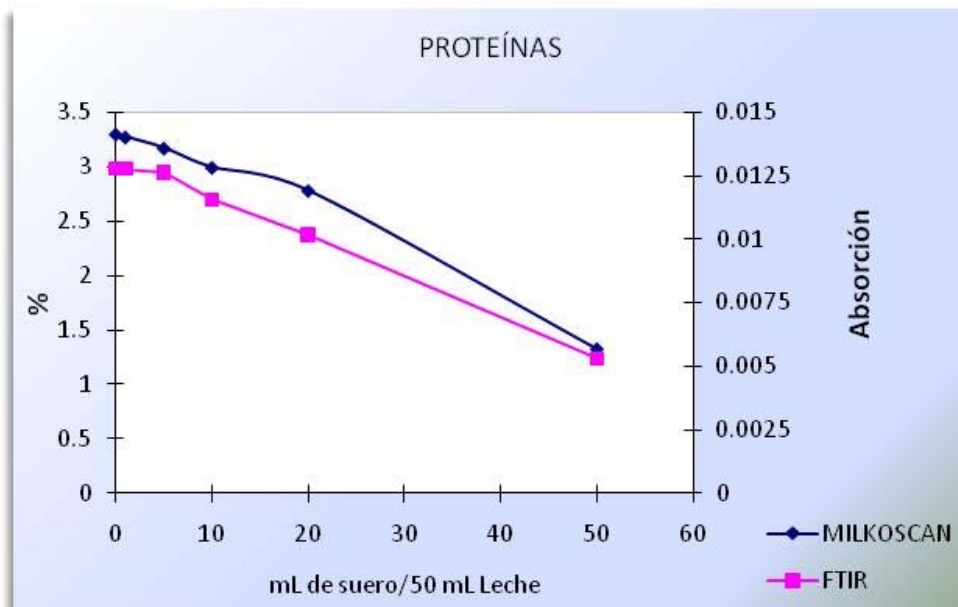


FIGURA 4.33. Comparación del análisis de proteínas para -■-FTIR y -◆-MilkoScan, de las muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca.

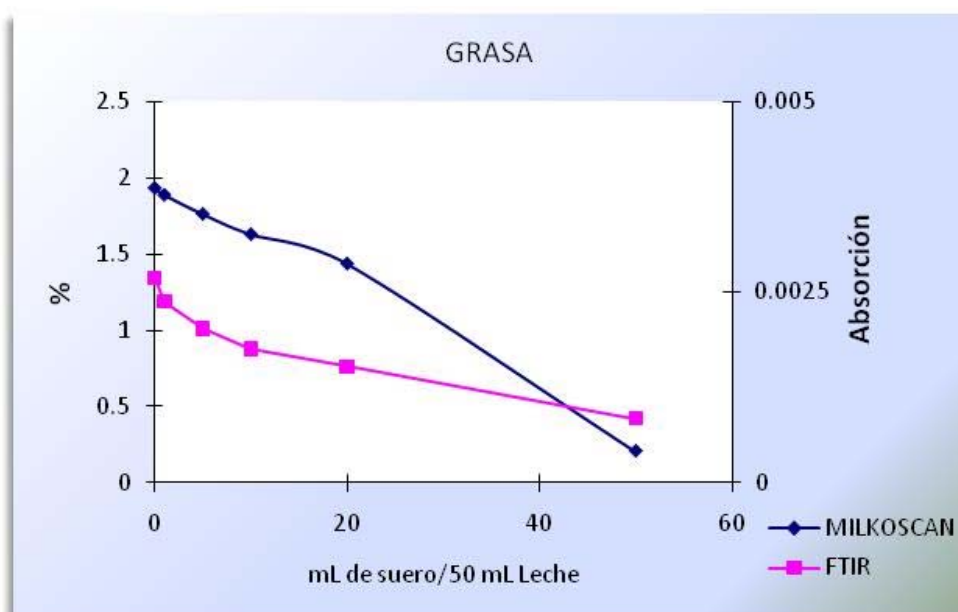


FIGURA 4.34. Comparación del análisis de grasa para -■-FTIR y -◆-MilkoScan, de las muestras de leche adulterada con suero de queso tipo Oaxaca.

Como muestran las gráficas comparativas, la absorción para FTIR y el porcentaje del parámetro obtenido por MilkoScan sigue la misma tendencia, excepto para la lactosa en el caso de suero de queso Oaxaca. Con esto se comprueba que los espectros del equipo de FTIR aparte de mostrar

enlaces característicos de los componentes de la leche; también muestran de manera cuantitativa la composición de las muestras analizadas, así como también se tiene un indicativo para identificar entre el suero de queso tipo quesillo, el suero de queso tipo panela y la leche, esto identificando las absorciones características de las señales características en cada uno en las regiones de sus componentes (grasa y proteínas).

Los resultados anteriores, han mostrado la capacidad de la espectroscopia de infrarrojo para determinar la presencia de suero en muestras de leche (por medio del pico a 1400 cm^{-1} el cual muestra una mayor absorción para el caso del suero) y la posibilidad de diferenciar entre un tipo de suero y otro (por el pico presente en la mayoría de los sueros de queso tipo panela).

Así como también, se ha demostrado que los resultados obtenidos por medio de la espectroscopia de infrarrojo o FTIR, están totalmente correlacionados con los resultados obtenidos por metodologías que marca la normativa actual en el país.

4.4 CURVA DE CALIBRACION

De acuerdo con los análisis realizados se determinó que la región que permitiría generar una curva de calibración más exacta es la región de las proteínas. La gráfica generada se presenta en la figura 4.35, la cual es el promedio de todas las muestras analizadas durante el presente trabajo, tanto de suero de queso tipo panela como de suero de queso tipo quesillo. Como en los casos de las figuras 4.26 y 4.33, la correlación entre los dos métodos de infrarrojo empleados es casi perfecta.

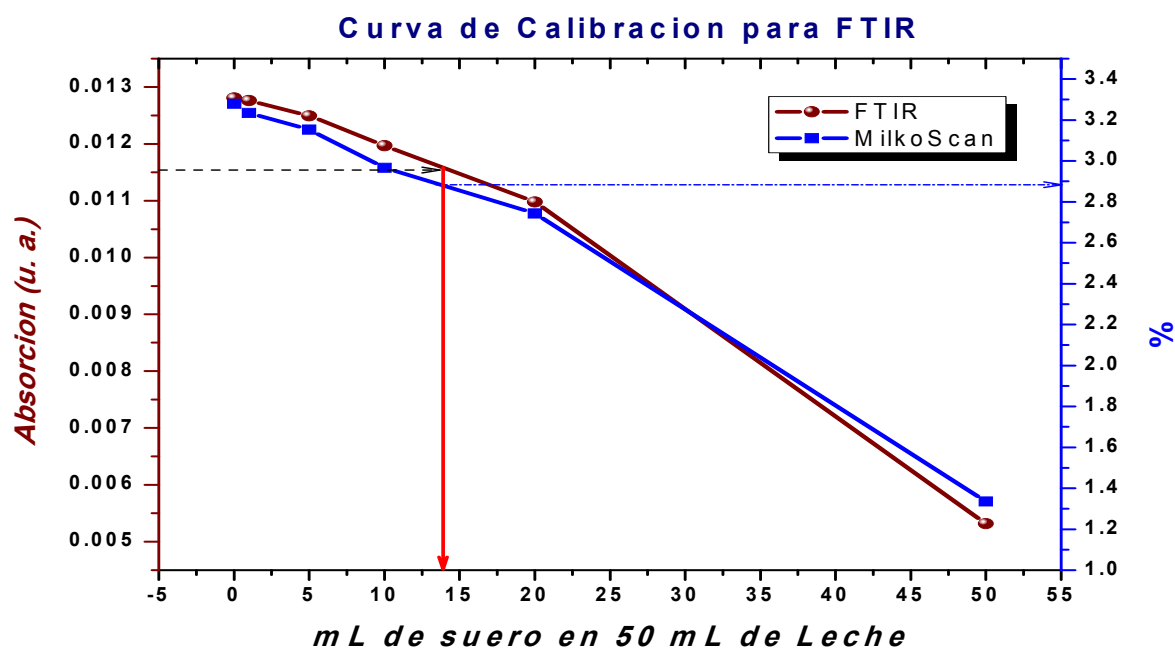


FIGURA 4.35. Curva de calibración general para las proteínas.

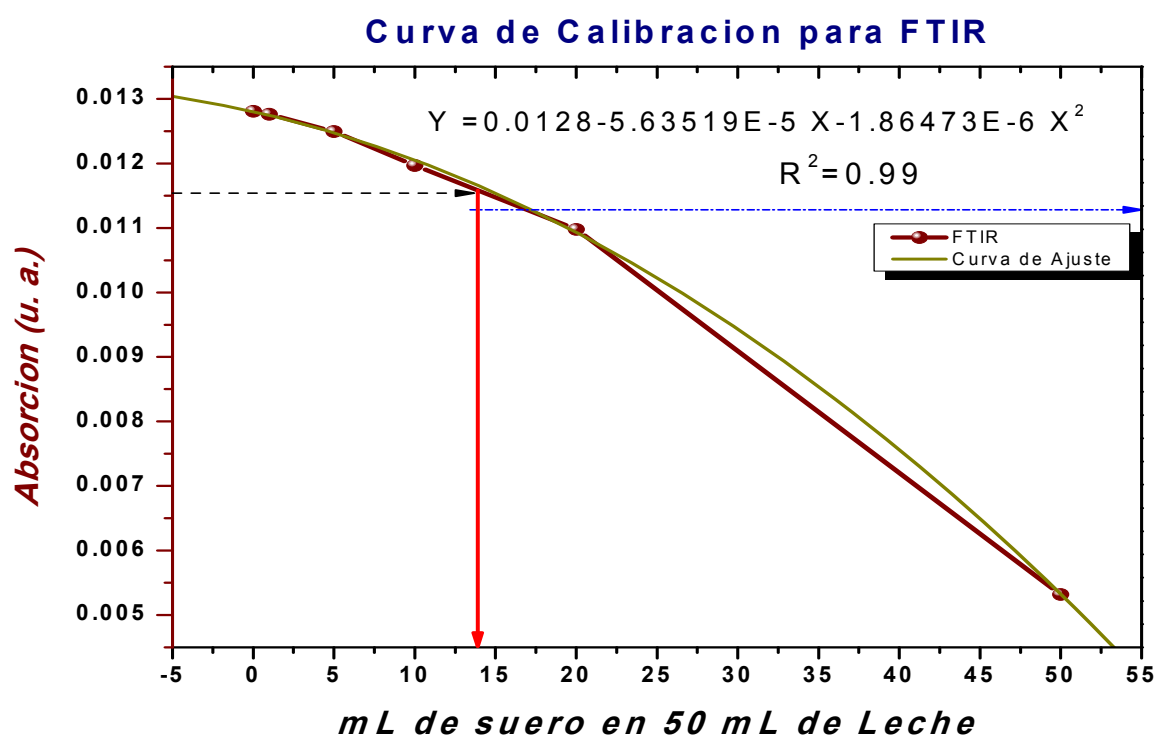


FIGURA 4.36. Curva de ajuste a la curva de FTIR.

Se realizaron pruebas con concentraciones aleatorias de suero adicionado a las muestras de leche, los espectros obtenidos se muestran en la figura 4.37 y sus valores respectivos de absorbancia en la tabla 4.14.

TABLA 4.14. Valores de absorbancia de las muestras con adulteraciones aleatorias de suero en leche.

Muestra	Absorción (u.a.)	Muestra	Absorción (u.a.)	Muestra	Absorción (u.a.)
Leche	0.01369	Suero panela	0.00424	Suero quesillo	0.00546
6 ml panela	0.01248	1.5 ml quesillo	0.01277	18 ml quesillo	0.01138
18 ml panela	0.01145	3 ml quesillo	0.01224	26 ml quesillo	0.01065
26 ml panela	0.00983	12 ml quesillo	0.01232		

Al buscar en el eje de las X, de la curva de calibración, la concentración de cada una de las muestras aleatorias; se puede observar que la curva de calibración generada, permitió poder determinar el volumen de suero adicionado a las muestras de leche, así como el valor en porcentaje de proteínas presente en las muestras.

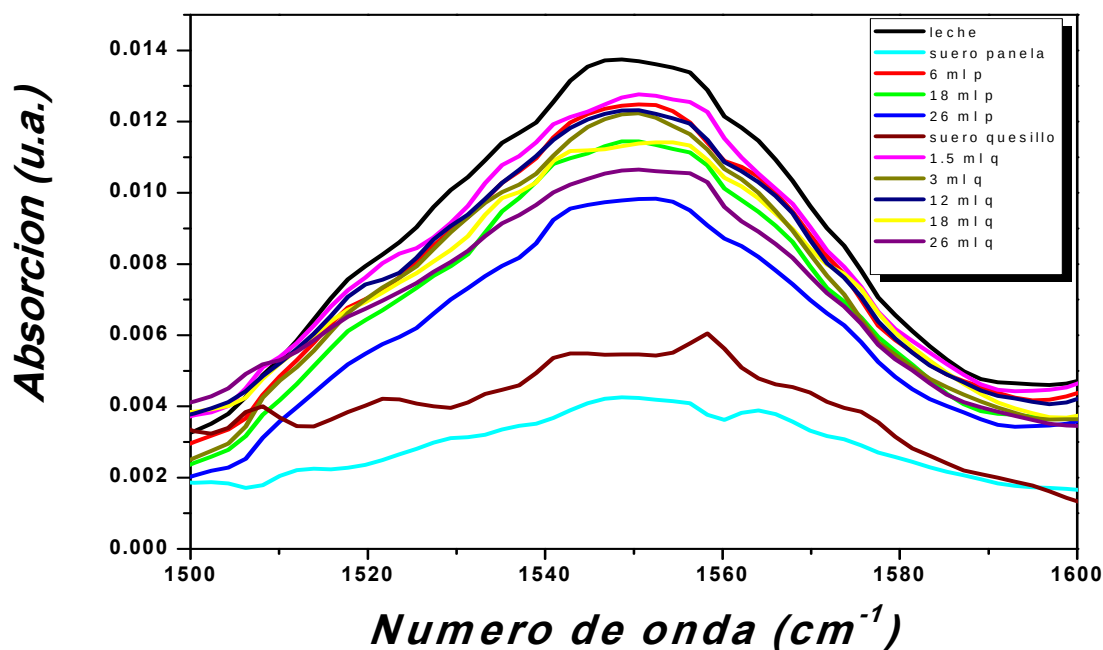


FIGURA 4.37. Espectros FTIR, región de proteínas, de diferentes muestras de leche, leche adulterada y sueros.

CAPÍTULO 5

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis tradicionales para descubrir adulteración y/o en el control de calidad en alimentos, se han basado en análisis químicos para determinar los componentes de alguna muestra y posteriormente estos resultados sean comparados con muestras patrón o de la cual se conoce su procedencia o composición. Este tipo de enfoque tiene varias desventajas, una de ellas se debe a que el rango establecido para diferentes componentes de la muestra varía por el área geográfica de procedencia y por las condiciones de su producción. En otras palabras, a menudo no se puede hacer una declaración definitiva acerca de la autenticidad de alguna muestra, aún después de haber sido examinados a detalle algunos compuestos de dicha muestra.

El análisis de muestras que contienen compuestos químicos, constituye uno de los retos más importantes de la química analítica. La dificultad aumenta cuando se pretende determinar simultáneamente estos compuestos a bajas concentraciones o en presencia de otras sustancias que tienen estructuras y propiedades similares, las cuales pueden interferir en su determinación; tal es el caso de la adición de suero en la leche. En la utilización de un sistema de detección para las especies a analizar se pueden encontrar problemas debido a los diferentes componentes del sistema de medición, efectos de ruido, etc.

Técnicas instrumentales alternativas como las técnicas espectroscópicas, en este caso el infrarrojo medio, para la determinación de muestras con estructuras y propiedades similares, cuyos resultados son procesados por análisis estadísticos y con herramientas quimiométricas, como análisis de componentes principales (PCA) o mínimos cuadrados parciales (PLS); proporcionan ventajas para discriminar y evaluar más detalladamente la autenticidad de algunos productos, para este caso la presencia de suero en leche.

5.1 DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Como parte del análisis estadístico, es necesario hacer una comparación de la desviación estándar para las absorciones y porcentaje obtenidos por FTIR y por MilkoScan. Los datos de absorción fueron obtenidos de los picos para lactosa proteínas y grasa (1045, 1550 y 1747.27 cm^{-1} respectivamente), que corresponden a los números de onda de los filtros del equipo de MilkoScan.

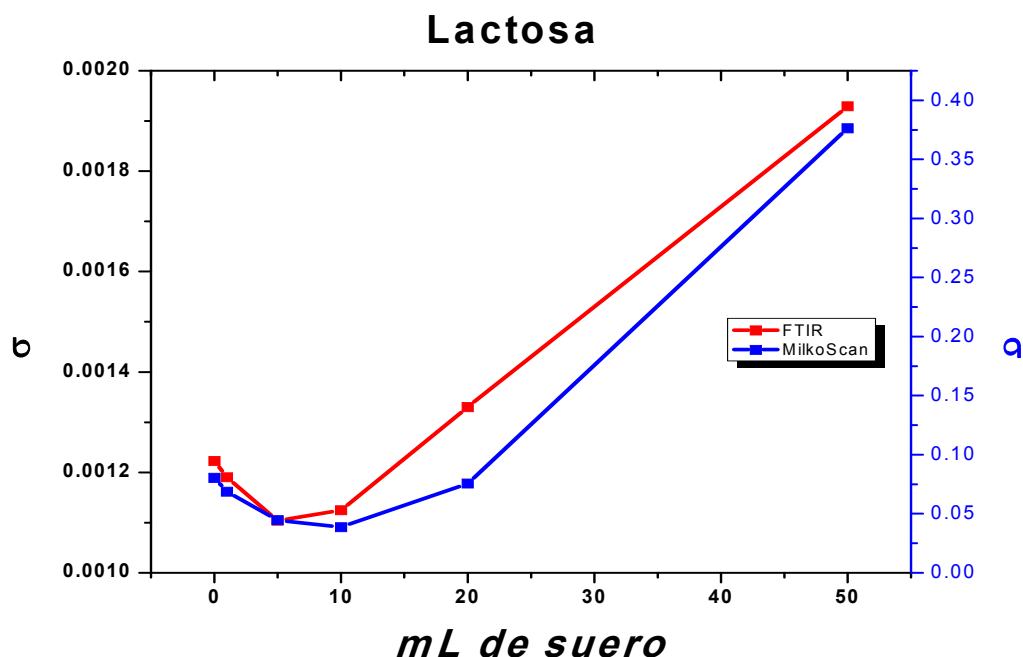


FIGURA 5.1. Comparación de las desviaciones estándar para la lactosa, de los resultados obtenidos por FTIR y por MilkoScan.

En la figura 5.1, se observa la desviación estándar para la absorción obtenido por FTIR en la región de 1045 cm^{-1} y para el porcentaje obtenido por MilkoScan ambos para la lactosa, el análisis se muestra en relación con los mL de suero en leche. En la gráfica el eje X señala los mL de leche, donde 0 mL de suero significa leche sin adulterar y 50 mL de suero se refiere a la muestra de suero líquido.

Lo importante de esta gráfica es que para los resultados obtenidos por FTIR la desviación estándar fue menor que para el porcentaje calculado a partir de los resultados del equipo de MilkoScan, en dos órdenes de magnitud. Esto nos indica que con el equipo de FTIR se obtuvo menor variabilidad en las repeticiones que usando el equipo de lectura rápida.

Ambas desviaciones en esta región presentan una tendencia similar, donde se muestra que la desviación más alta se presenta en los sueros, lo que se esperaba debido a que en este análisis se incluyeron los 2 tipos de sueros, y la más baja para las leches adulteradas con 5 y 10 mL, para FTIR y MilkoScan respectivamente.

En la figura 5.2 se graficó la desviación estándar para la determinación de las proteínas, inicialmente se puede observar que para este componente, la desviación que muestran los resultados obtenidos por FTIR fue menor comparada con la de MilkoScan, de hecho es cercana a los dos órdenes de magnitud.

La desviación más pequeña fue para el suero por ambas técnicas, contrario al resultado obtenido para lactosa. Esto se puede explicar debido a que las diferentes muestras de suero presentaron una tendencia similar en el caso de las proteínas, tanto en porcentaje como en absorción. Es necesario hacer notar que no existe una tendencia en los resultados de la desviación estándar, para ninguna de las dos técnicas experimentales empleadas.

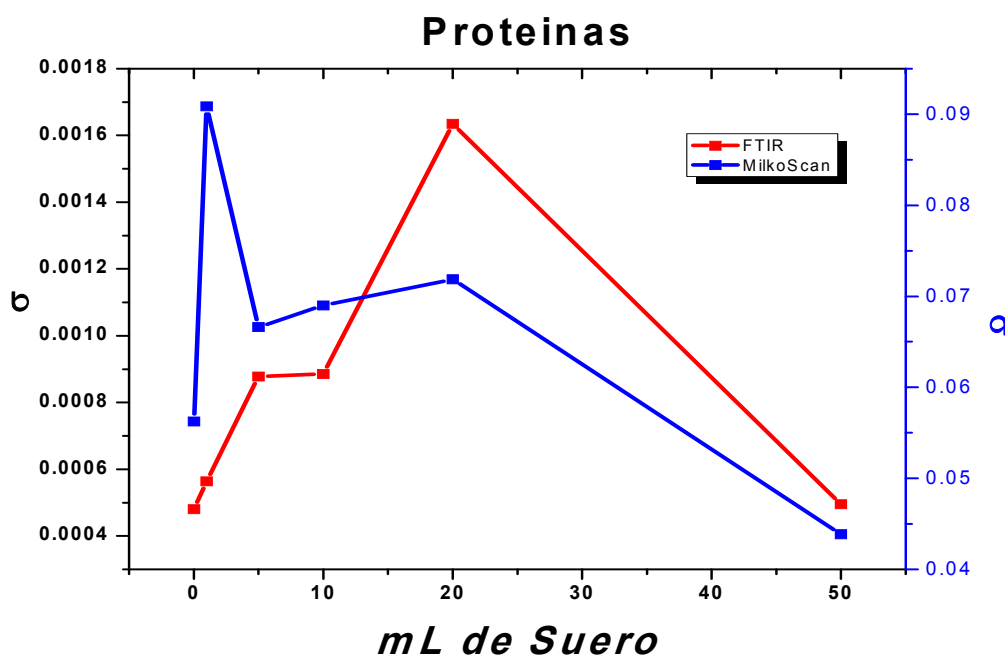


FIGURA 5.2. Comparación de las desviaciones estándar para la cuantificación de proteína, por FTIR y por MilkoScan.

En la figura 5.3, se presentan los resultados obtenidos para la grasa, la variación en los resultados de la desviación estándar es mayor para el caso de los resultados obtenidos por infrarrojo, aunque como en el caso de las proteínas no se muestra una tendencia clara. Los resultados para la desviación estándar para los datos de absorción son menores en dos órdenes de magnitud. La menor desviación se observó para el suero en MilkoScan y para la muestra con 1 mL en FTIR.

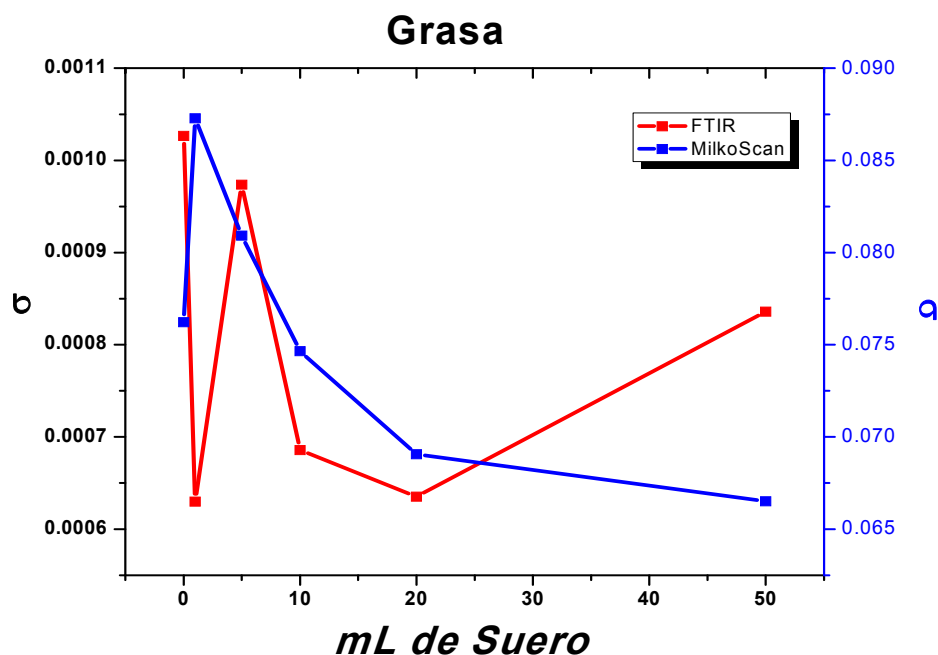


FIGURA 5.3. Comparación de las desviaciones estándar medidos para la grasa, de los resultados por FTIR y por MilkoScan.

5.2 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

A continuación se muestran los resultados utilizando la técnica de PCA para los resultados por infrarrojo. En la figura 5.4 se muestran los datos de absorción de los espectros de FTIR para la región de las grasas, específicamente en la región de 1700 a 1730 cm^{-1} , por ser esta región donde los espectros de suero tipo panela presentaron un pico a 1715 cm^{-1} que la mayoría de las muestras de suero de queso tipo Oaxaca (o quesillo) no tenían. Utilizando esta herramienta quimiométrica se graficaron el segundo y tercer componente principal, CP2 y CP1 respectivamente. En la gráfica se ve que los sueros de queso tipo panela (P) se encontraron preferentemente dentro del segundo y tercer cuadrante, en tanto que los sueros de queso tipo Oaxaca (Q) se ubican preferentemente en el primer y cuarto cuadrante. Para ambos, solo una de las muestras se encuentra en la región contraria (Q4 y P6).

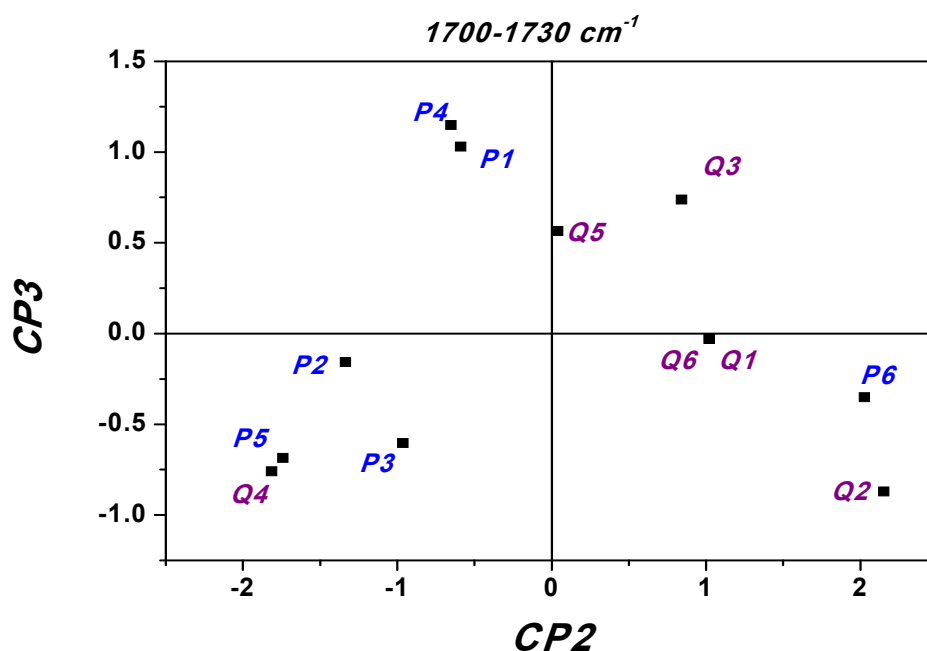


FIGURA 5.4. Análisis de PCA para las muestras de sueros utilizadas en este trabajo.

Con estos resultados se confirma lo observado por FTIR que se explica en el capítulo 4, donde se mencionó que se puede diferenciar el tipo de suero.

En el capítulo 4 se mencionó también, que algunos trabajos reportaron la presencia del glicomacropéptido únicamente en muestras de suero; pero que desafortunadamente los espectros de infrarrojo mostraban, específicamente en muestras de sueros, que la generación de esta proteína no era lo suficientemente apreciable para hacer una determinación precisa.

Por esta razón, se procesaron los datos de absorción de proteínas por PCA, en la región de $1300-1500\text{ cm}^{-1}$, ver figura 5.5. Los resultados obtenidos por esta técnica quimiométrica son concluyentes, se observa que las muestras de leche se ubican en el segundo y tercer cuadrante mientras que los sueros tienen una tendencia a agruparse en el primer y segundo cuadrante. Es así que al localizar un punto dentro de esta región podemos saber la diferencia entre muestras de suero y muestras de leche.

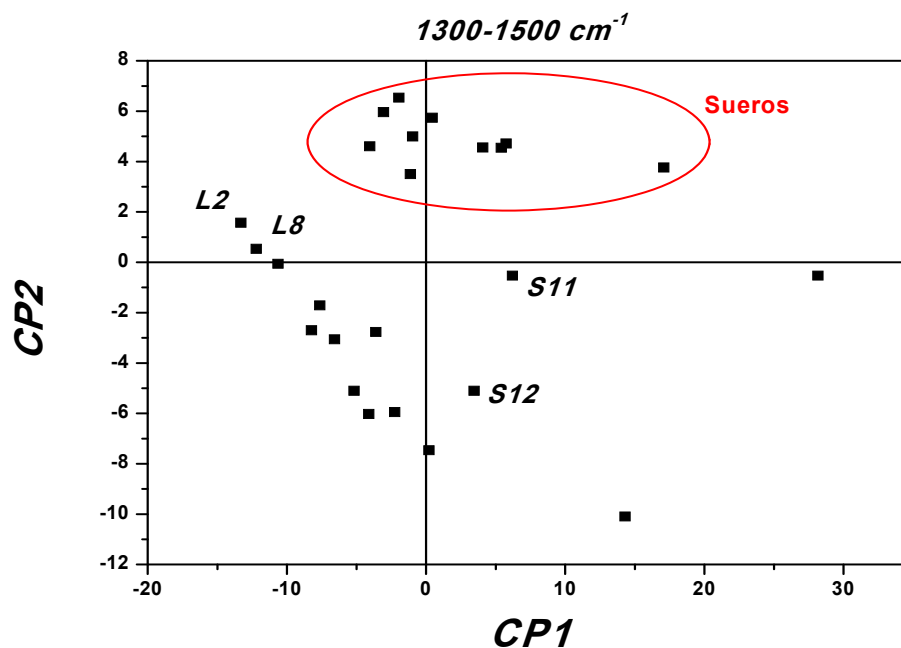


FIGURA 5.5. Análisis de PCA para la discriminación entre muestras de leche y suero.

En la figura 5.6 se muestran los resultados por PCA entre las muestras de leche con diferentes adulteraciones de suero y la leche sin adulterar, la gráfica es producto de la relación entre los componentes CP1 y CP2. Es claro ver que las muestra de leche se ubican dentro de los cuadrantes 3 y 4 (lado negativo de las X) y las muestras de leche con suero en los cuadrantes 1 y 2 (lado positivo de las X), por lo tanto en esta gráfica se concluye que aparte de utilizar los espectros de FTIR para distinguir entre leche y leche adulterada con suero, PCA permite diferenciar las muestras con una mayor precisión.

Cuando se aplicó el método de PCA para diferenciar entre las diferentes cantidades de suero adicionado para adulterar la leche, se obtuvo la figura 5.7, en esta figura no se presenta una tendencia para las diferentes muestras adulteradas; es por eso que para el caso del porcentaje de adulteración, la curva de calibración obtenida entre FTIR y MilkoScan es la mejor opción es la curva de calibración del capítulo 4 (figura 4.35).

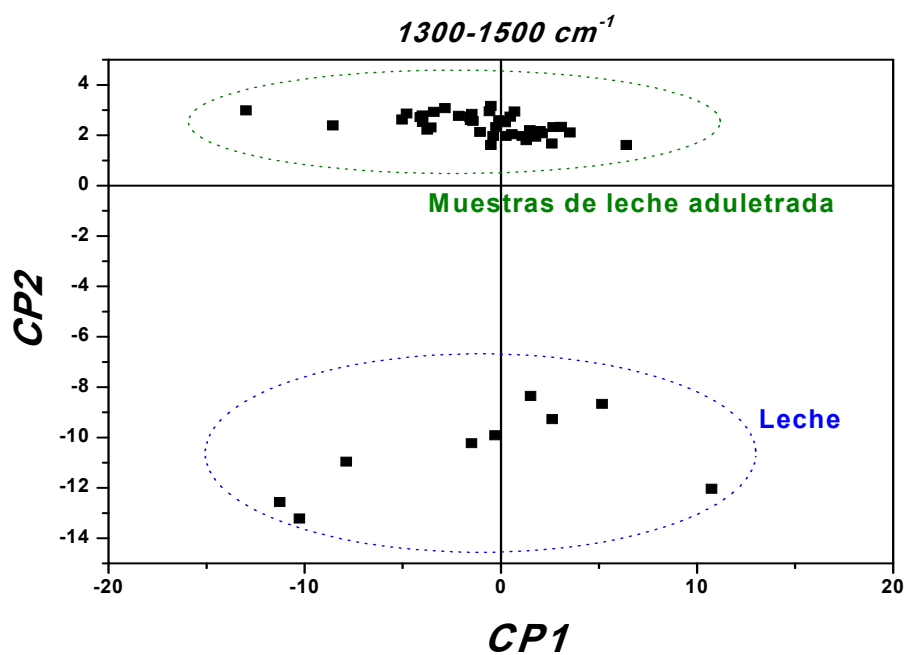


FIGURA 5.6. Análisis de PCA para la discriminación entre leche y leche adulterada con suero.

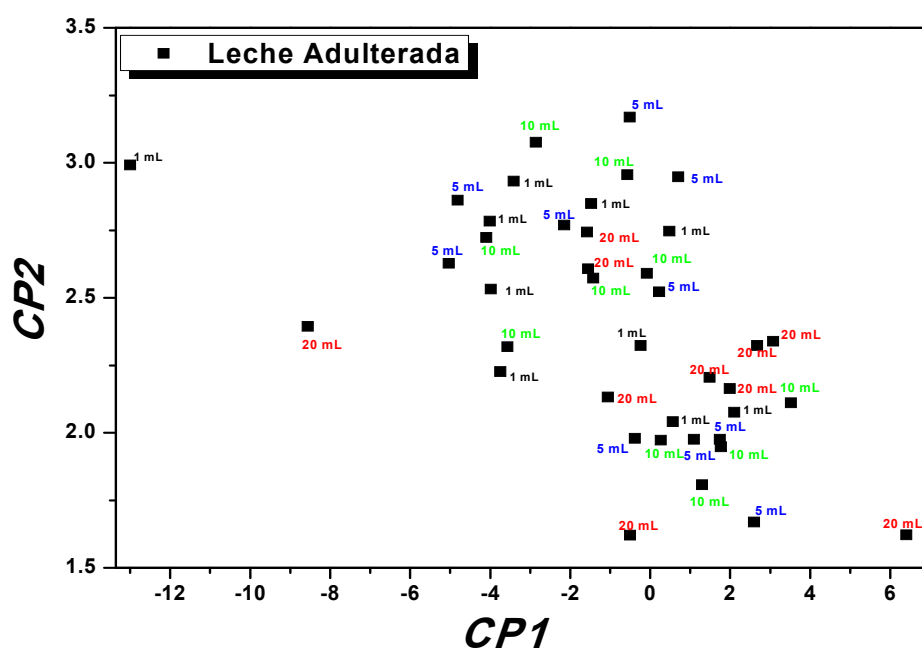


FIGURA 5.7. Análisis de PCA para muestras de leche adulterada con suero.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES GENERALES

Las siguientes conclusiones generales que a continuación se enuncian fueron obtenidas por los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis.

Comparación entre técnicas experimentales bajo norma:

Al realizar la comparación entre las técnicas químicas especificadas bajo la norma NOM-155-SCFI-2003 y los resultados del equipo MilkoScan, que trabaja por infrarrojo bajo la modalidad de filtros, la cual es el sustento de la norma NMX-F-708-COFOCALEC-2004, permiten observar que son correspondientes; de hecho la desviación estándar para lactosa y proteínas en MilkoScan se encuentran dentro del mismo rango. La desviación estándar obtenida para grasa es menor para la prueba fisicoquímica; lo que implica que la técnica Gerber nos da resultados bastante confiables, comparables con los obtenidos por medio de la espectroscopia de infrarrojo.

Comparación entre técnicas experimentales por infrarrojo:

Al comparar las espectroscopias de infrarrojo, MilkoScan e FTIR, se concluye que ambas técnicas muestran una gran correspondencia entre sus resultados, aunque las desviaciones estándar obtenidas para FTIR son de hasta dos órdenes de magnitud menores que los obtenidos por MilkoScan. El pico asociado a las proteínas es el único que mostro una excelente correspondencia por las dos técnicas.

Determinación de adulteración

Inicialmente por infrarrojo fue posible determinar el tipo de suero empleado para la adulteración de las muestras, por medio del pico presente en los espectros de suero de queso de tipo panela a 1716 cm^{-1} .

Es posible determinar el porcentaje de adulteración de muestras de leche con suero de queserías, mediante la generación de las curvas de calibración obtenidas para las tres regiones características de la leche: lactosa, proteínas y grasa.

Análisis por PCA

Utilizando la técnica PCA se confirmó lo ya observado por FTIR para identificar el tipo el suero, ya que cada uno de los sueros muestra una tendencia muy específica en la gráfica de componentes principales.

Se identificó por PCA las muestras de leche con diferentes adulteraciones de suero y la leche comercial; estos resultados junto con los espectros obtenidos por FTIR, nos permiten diferenciar muestras de leche adulterada con sueros de queserías, con una mayor precisión.

BIBLIOGRAFIA

1. Spreer E.; Milk and Dairy Product Technology; CRC Press; 1998; Alemania; cap 2, pp. 11-2.
2. Varnam A. H., Sutherland J. P.; Milk and Milk Products Thechnology Chemistry and Microbiology; Springer; 2001, N.Y.; cap 1, pp. 1-27.
3. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, pesca y alimentación Guadalajara, Jal., a 10 de julio de 2008, NUM. 132/08, México producirá 10,500 millones de litros de leche en 2008: ACJ
5. Ley General de Salud. Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario, de actividades, establecimientos, productos y servicios; Porrúa; 15ª ed; 1998; México; pp. 173 – 238.
6. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Leche. 1993.
7. Faría J., Boscán, L.; Detección de adulteración de leche con suero mediante la relación proteína sérica/caseinato. Rev. Cientif. FCV-LUZ.II (1); pp. 43-48; (1992).
8. Boscán L. Manual de Laboratorio de Industrias Lácteas; Caracas: Universidad Simón Bolívar; 1986.
9. Webb B. and Johnson U. A. H.; Fundamentals of Dairy Chemistry; The AVI Publishing Company Inc.; 1974; Westport, Connecticut.
10. O'Sullivan A., O'Connor B., Kelly A. and McGrath M. J.; The use of chemical and infrared methods for analysis of milk and dairy products; Journal of Dairy Technology; Vol. 52, No 4; (1999).
11. Szakas T; Food analysis: an instrument manufacturer's perspective; Food Technology International Europe 1995; pp. 165-161.

12. Rodríguez J., Hermida Ma., Cepeda A.; Determination of fat, protein, and Total solids in Cheese by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy; Journal of AOAC International, **78**, No 3, (1995).
13. Iñon F., Garrigues S. y Guardia M.; Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and Chemometrics techniques; Analytical Chimica Acta; **513**, (2004).
14. Lefier D., Grappin R. y Pochet S.; Determination of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by Analysis with a Conventional Filter-Based Milk Analyzer; Journal of AOAC International; **79**, No 3, (1996).
15. Etzion Y., Linker R., Cogan U. y Shmulevich I.; Determination of protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy; Journal of dairy Science; **87**, No 9, (2004).
16. Morales S., María Sol. Factores que afectan la composición de la leche; TECNO VET; Año 5 N°1, 1999
17. Gibson JP; The potential for genetics change in milk fat composition; J. Dairy Sci.; **74**; pp. 3258-3260; (1991).
18. Precht D.; Detection of adulterated milk fat by fatty acid and triglyceride analysis; Fat Sci. Technol; **93**; pp. 538-544; (1991).
19. Piva G, Fusconi G, Prandini A, Capri E, Pietri A.; Effects of some environment factors on fatty acid composition of milk fat; Atti della Società Italiana di Buiatria; **225**; pp. 198-204; (1993).
20. Auldist M, Walsh BJ, Thomson NA.; Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zeland; Journal of Dairy Research; **65**; pp. 401-411; (1998).
21. Gencurova V, Hanus O.; The effect of season on the composition of individual samples of cow milk, with a focus on nitrogen fractions; Dairy Science Abstracts; **60**(7); pp.16-24; (1998).

22. Charles Alais Ch., Lacasa G. A.; Ciencia de la Leche; Reverte; 1985; México DF; cap. 2-4; pp. 21-100, 112.
23. Owen R. Fennema; Química de los Alimentos; Acribia; 2000; N.Y.; cap. 14, pp. 1001-1020.
24. Alfa-Laval; Dairy Processing Handbook; Tetra Pak Processing System A. B.; 1995.
- 25-. Secretaría de Economía, Norma oficial Mexicana, NOM-155-SCFI-2003; Leche, Formula Láctea y producto lácteo combinado Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
26. Callanan, T.; Recovery of Milk Constituents in Cheesemaking (Relation to Process Control); International Dairy Federation; 1991; Bruselas, Bélgica; Cap. 4.
27. Lawrence R. C., Gilles J. y Creamer I. K.; The Relationship Between Cheese Texture and Flavour; J. Dairy Sci. and Technol; **18**(3); pp. 175-190; (1983).
28. SAGARPA, Elaboración de queso Tipo Panela y Oaxaca.
29. Inda C. A. E.; La Leche y el Queso; Organización de los Estados Americanos OEA; 2000.
30. Secretaría de Economía, Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA1-1993, Bienes y servicios. Quesos de suero. Especificaciones sanitarias.
31. Farías R. J. F., García U. A. C., De Hernández A.; Efecto de la Tecnología Quesera sobre la Composición del Suero Lácteo; Multiciencias; 2002; Venezuela; vol. 2; pp.126-130.
32. Pederson Jr. y Harold T.; Treatment of whey; US patent 4,202,909. (1980).
33. Cayot, P. y Lorient D.; Food Proteins and their Applications; Damodaran, S.y A.; 1997; New York; Cap. 8.

34. Olav T, Oftedal T and Iversion S J; Handbook of Milk Composition; Academic Press; 1995; San Diego.
35. Matissek R., Schnepel F-M., Steiner G.; Análisis de los Alimentos: Fundamentos, Métodos y Aplicaciones; Acribia; 1998; Zaragoza España; pp 43.
36. Salfield J. R.; Practicas de Ciencia de los Alimentos; Acribia; 1977; Zaragoza España; cap 1; pp 11, 12.
37. International Dairy Federation Standards; 1997; Brussels: IDF.
38. Skoog, Holler, Niemman; Principios de Análisis Instrumental, 5ta ed; Mc Graw Hill, 2001, España; cap. 16 y 17.
39. Manual del usuario del equipo FTIR Vertex 70 de Berko, pp 2.
40. J. Coates; Interpretation of Infrared spectra, A practical Approach; Encyclopedia of analytical Chemistry; (2000), pp. 1815-1817.
41. Dyer J. R.; Aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos; Prentice/hall internacional, 1973.
42. Zhou, Q., Sun, S. Q., Yu, L., Xu, C. H., Noda, I., y Zhang, X. R.; sequential changes of main components in different kids of milk powders using two-dimentional infrared correlation analysis; Journal of Molecular Structure; **799**, pp 77-84.
43. Secretaria de Economía; Norma Mexicana, NMX-F-708-COFOCALEC-2004 Sistema producto leche-Alimentos-Lácteos-Determinación de Grasa, Proteína, Lactosa, Sólidos no Grasos y Sólidos Totales, en leche cruda, por Espectroscopia de Infrarrojo-Métodos de Prueba.
44. Bradley R. L., Chapter Jr.; Official methods of analysis AOAC International; 2006; Method 972.16; vol. 2; cap 33.

45. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica;QUIMIOMETRÍA, Una disciplina útil para el análisis químico; Grupo de Quimiometría y Cualimetría de Tarragona. Pl. Imperial Tàrraco, 1 43005-Tarragona España.
46. Luis Arturo García L. A., Aguilar A., Luévano A. y Cabral A.; La Globalización Productiva y Comercial de la Leche y sus derivados; Plaza y Valdez; 2005; México DF; pp. 11-26.
47. PROFECO; El laboratorio PROFECO reporta No todo lo que parece leche lo es, Leche formulas lácteas y productos lácteos combinados; 2004.