

**APLICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE  
PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURALDEHÍDO (HMF)  
EN LECHE COMERCIALES**

**SANDRA PATRICIA ROJAS FERNÁNDEZ**



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2007**

**APLICACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE  
PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-(HIDROXIMETIL)-2-FURALDEHÍDO (HMF)  
EN LECHES COMERCIALES**

**SANDRA PATRICIA ROJAS FERNÁNDEZ**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
**QUÍMICA**

Directora

**MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2007**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

***MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D.***

Directora de trabajo de grado

---

***EDIER HUMBERTO PEREZ, Ph.D.***

Jurado

---

***JOSÉ FERNANDO GRASS RAMÍREZ, M.Sc***

Jurado

Popayán, 25 de Octubre de 2007

## DEDICATORIA

A **D**íos, por ser mi guía incondicional y la fuerza que necesité para culminar con éxito esta meta.

A mi madre **LYDA OMAIRA**, por su amor, paciencia, sabios consejos y el apoyo que me ha brindado para seguir adelante y no decaer en los momentos difíciles de cada etapa de mi vida.

A mis hermanos **Carlos** y **Diana** y sobrinas **Maryori** y **Ruth**, por su gran apoyo, su cariño y compañía en los momentos gratos y tristes.

A mis tíos **Ary José** y **Flor**, por enseñarme que los logros sólo se alcanzan con perseverancia, y que cada derrota es un impulso para continuar con más ganas.

A **Luis** por su cariño, comprensión y el gran apoyo que me ha brindado en todo momento, y porque ha hecho de mi mundo un lugar mejor.

A mis amigos **Mary**, **Mónica**, **Lorena**, **Maricela**, **Ana María**, **Jackeline**, **William** y **Andrés**, por su amistad, por todos los momentos compartidos, y por hacer que los obstáculos fueran más fáciles de superar.

*Sandra Patricia Rojas Fernández*

## AGRADECIMIENTOS

A la profesora **MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA**, por todo su apoyo y dedicación, ayudándome a culminar satisfactoriamente ésta meta.

A la profesora **ISABEL BRAVO**, por toda su colaboración y compromiso para el desarrollo de éste trabajo.

Al profesor **FERNANDO HERNANDEZ** y a la **Unidad de Análisis Industriales**, por toda su cooperación y disponibilidad para llevar a cabo éste proyecto.

A mis jurados, el profesor **EDIER HUMBERTO PEREZ** y al profesor **JOSÉ FERNANDO GRASS**, por su tiempo y dedicación en la evaluación de éste trabajo.

A cada uno de los profesores del Departamento de Química por sus valiosas enseñanzas, que ayudaron en mi formación como profesional.

A todas las personas que hacen parte de mi vida y que permitieron que finalizara con éxito una etapa más en mi vida. Gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	23
1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE	23
1.2. COMPOSICIÓN	24
1.2.1. Proteínas	24
1.2.2. Carbohidratos	28
1.2.3. Lípidos	31
1.2.4. Enzimas	32
1.2.5. Sales y minerales	32
1.2.6. Vitaminas	33
1.2.7. Elementos biológicos	33
1.3. TRATAMIENTO DE LA LECHE	34
1.3.1. Tratamiento térmico	35
1.3.1.1. <i>Pasteurización</i>	35
1.3.1.2. <i>Calentamiento ultra-alto ó ultrapasteurización</i>	35
1.3.1.3. <i>Esterilización</i>	35
1.4. TIPOS DE LECHE	37
1.5. CALIDAD DE LA LECHE	39
1.5.1. Caracterización microbiológica	39
1.5.1.1. <i>Prueba de la reductasa ó azul de metileno</i>	39
1.5.1.2. <i>Prueba de la fosfatasa</i>	40
1.5.2. Caracterización fisicoquímica	40
1.5.2.1. <i>Determinación de acidez</i>	40
1.5.2.2. <i>Determinación de densidad</i>	41
1.5.2.3. <i>Determinación de grasa</i>	41

1.5.2.4.	<i>Determinación de extracto seco total</i>	42
1.5.2.5.	<i>Determinación de extracto seco desengrasado</i>	42
1.5.2.6.	<i>Determinación de pH</i>	42
1.5.2.7.	<i>Determinación de cenizas</i>	42
1.5.2.8.	<i>Determinación de proteína</i>	43
1.6.	<b>REGLAMENTACIÓN DE LA LECHE</b>	43
1.7.	<b>CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DURANTE LA MANIPULACIÓN DE LA LECHE</b>	44
1.7.1.	<b>Efecto del calor</b>	45
1.7.2.	<b>Reacciones de Maillard</b>	48
1.8	<b>CATALIZADORES DE LA REACCIÓN DE MAILLARD</b>	51
1.9.	<b>PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)</b>	52
1.9.1.	<b>Métodos de Análisis del Hidroximetilfurfural (HMF)</b>	54
1.9.2.	<b>Espectrofotometría Ultravioleta-Visible</b>	56
2.	<b>OBJETIVOS</b>	58
2.1.	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	58
2.2.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	58
3.	<b>METODOLOGÍA</b>	59
3.1.	<b>EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE VIDRIO</b>	59
3.1.1.	<b>Equipos</b>	59
3.1.2.	<b>Reactivos</b>	60
3.1.3.	<b>Material de vidrio y plástico</b>	61
3.2.	<b>PREPARACIÓN DE SOLUCIONES</b>	61
3.3	<b>RECEPCIÓN DE MUESTRAS</b>	63
3.4.	<b>CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FÍSICOQUÍMICA DE LAS LECHE COMERCIALES</b>	65
3.4.1.	<b>Calidad higiénica mediante métodos indirectos</b>	65
3.4.1.1.	<i>Reductasa ó azul de metileno</i>	65

3.4.1.2.	<i>Fosfatasa</i>	66
3.4.2.	<b>Fisicoquímicos</b>	66
3.4.2.1.	<i>Acidez</i>	66
3.4.2.2.	<i>Densidad</i>	67
3.4.2.3.	<i>Grasa</i>	67
3.4.2.4.	<i>Extracto seco (ES)</i>	68
3.4.2.5.	<i>Extracto seco desengrasado (ESD)</i>	68
3.4.2.6.	<i>pH</i>	68
3.4.2.7.	<i>Cenizas</i>	69
3.4.2.8.	<i>Proteína</i>	69
3.5.	<b>SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS</b>	70
3.5.1.	Calibración de los espectrofotómetros UV-Vis	70
3.5.2.	Elección de la longitud de onda	70
3.5.3.	Método de cuantificación	71
3.6.	<b>ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE HMF</b>	71
3.6.1.	Linealidad	71
3.6.2.	Precisión	71
3.6.3.	Sensibilidad	72
3.6.4.	Exactitud	72
3.7.	<b>ESTABILIDAD DEL HMF</b>	72
3.8.	<b>EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE HMF EN LECHE</b>	73
4.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	74
4.1.	<b>ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FISICOQUÍMICO DE LAS LECHEs UHT COMERCIALES</b>	74
4.2.	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE</b>	77



4.2.1.	Prueba de la reductasa	77
4.2.2.	Prueba de la fosfatasa	77
4.3.	<b>CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA</b>	78
4.3.1.	Acidez	78
4.3.2.	Densidad	78
4.3.3.	Grasa	79
4.3.4.	ES	80
4.3.5.	ESD	80
4.3.6.	pH	81
4.3.7.	Cenizas	81
4.3.8.	Proteína	81
4.4.	<b>SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS</b>	84
4.4.1.	Calibración de los espectrofotómetros UV-Vis	84
4.4.2.	Elección de la longitud de onda	85
4.4.3.	Método de cuantificación	87
4.5.	<b>PARÁMETROS ANALÍTICOS</b>	89
4.5.1.	Linealidad	89
4.5.2.	Precisión	89
4.5.2.1.	Repetibilidad	89
4.5.2.2	Repetibilidad del método completo	90
4.5.3.	Sensibilidad	92
4.5.4.	Exactitud	94
4.6.	<b>ESTABILIDAD DEL HMF</b>	95
4.7.	<b>EXTRACCIÓN DEL HMF EN LAS MUESTRAS DE LECHE UHT</b>	98
4.8.	<b>ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO Y CUANTIFICACIÓN DEL HMF EN MUESTRAS DE LECHE UHT COMERCIALES</b>	100
	<b>CONCLUSIONES</b>	109

<b>RECOMENDACIONES</b>	112
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	113
<b>ANEXOS</b>	121

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>TABLA No. 1.</b> Características microbiológicas y fisicoquímicas de los tipos de leche, según la norma ICONTEC <sup>(7)</sup>	44
<b>TABLA No. 2</b> Factores importantes que afectan la estabilidad de los productos lácteos	45
<b>TABLA No. 3</b> Efectos del calentamiento sobre los componentes de la leche	47
<b>TABLA No. 4</b> Características fisicoquímicas y microbiológicas de las leches ultrapasteurizadas	75
<b>TABLA No. 5</b> Concentraciones y absorbancias de las soluciones patrón de HMF obtenidas en el equipo G con sus respectivas desviaciones estándar	87
<b>TABLA No. 6</b> Concentraciones y absorbancias de las soluciones patrón de HMF obtenidas en el equipo D con sus respectivas desviaciones estándar	87
<b>TABLA No. 7</b> Precisión espectrofotométrica del HMF. Equipo G	90
<b>TABLA No. 8</b> Precisión espectrofotométrica del HMF. Equipo D	90
<b>TABLA No. 9</b> Repetibilidad del método completo de HMF. Equipo G	91
<b>TABLA No. 10</b> Repetibilidad del método completo de HMF. Equipo D	91
<b>TABLA No. 11</b> Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) para el HMF. Equipos G y D	93
<b>TABLA No. 12</b> Recuperación (%) del método de análisis por espectrofotometría UV-Vis de HMF (mg/mL) de un patrón y una muestra de leche (PEFeV). Equipos G y D.	94
<b>TABLA No. 13</b> Prueba de estabilidad. Equipo G	95
<b>TABLA No. 14</b> Prueba de estabilidad. Equipo D	96

<b>TABLA No. 15</b>	Concentración de HMF en muestras de leche UHT. Equipos G y D.	101
<b>TABLA No. 16</b>	Valores de HMF libre reportados para leches UHT	105

## LISTA DE FIGURAS

	pág.	
<b>FIGURA No. 1</b>	Modelo esquemático de una micela de caseína. a) Subunidades de las $\alpha_{S1}$ , $\beta$ , $\delta$ y $\kappa$ caseínas; b) Micelas de subunidades que están unidas por puentes de fosfato cálcico <sup>(11)</sup>	27
<b>FIGURA No. 2</b>	Estructura química de la $\beta$ -lactosa	29
<b>FIGURA No. 3</b>	Obtención y tratamiento de la leche cruda <sup>(11)</sup>	37
<b>FIGURA No. 4</b>	Primera fase de la reacción de Maillard. Formación del producto de Amadori	49
<b>FIGURA No. 5</b>	Fase intermedia de la reacción de Maillard. Formación del HMF	50
<b>FIGURA No. 6</b>	Estructura química del Hidroximetilfurfural	53
<b>FIGURA No. 7</b>	Selección de la longitud de onda mediante barrido con soluciones patrón de HMF de concentración 0,039 y 0,116mg/mL; a) Equipo G, b) Equipo D	86
<b>FIGURA No. 8</b>	Curva de calibración para la determinación de HMF en leches UHT. Equipo G	88
<b>FIGURA No. 9</b>	Curva de calibración para la determinación de HMF en leches UHT. Equipo D	88
<b>FIGURA No. 10</b>	Prueba de estabilidad. Variación de la concentración de HMF respecto al tiempo. Equipo G	97
<b>FIGURA No. 11</b>	Prueba de estabilidad. Variación de la concentración de HMF respecto al tiempo. Equipo D	97

## LISTA DE ECUACIONES

		pág.
<b>Ecuación 1</b>	Determinación de acidez	67
<b>Ecuación 2</b>	Determinación de los grados lactodensímetros corregidos	67
<b>Ecuación 3</b>	Determinación de los grados lactodensímetros corregidos	67
<b>Ecuación 4</b>	Determinación de extracto seco	68
<b>Ecuación 5</b>	Determinación de extracto seco desengrasado	68
<b>Ecuación 6</b>	Determinación de cenizas	69
<b>Ecuación 7</b>	Determinación de nitrógeno	70
<b>Ecuación 8</b>	Determinación de proteína	70
<b>Ecuación 9</b>	Cálculo de la concentración de HMF	98

## LISTA DE REACCIONES

		pág.
<b>Reacción 1</b>	Hidrólisis enzimática de la lactosa	30
<b>Reacción 2</b>	Hidrólisis enzimática del ácido láctico	31
<b>Reacción 3</b>	Reducción del azul de metileno	40
<b>Reacción 4</b>	Hidrólisis del <i>p</i> -nitrofenilortofosfato disódico	40
<b>Reacción 5</b>	Acidez natural de la leche	41
<b>Reacción 6</b>	Acidez desarrollada de la leche	41
<b>Reacción 7</b>	Calcinación de la materia orgánica	43
<b>Reacción 8</b>	Oxidación del nitrógeno orgánico	43
<b>Reacción 9</b>	Descomposición del sulfato ácido de amonio	43
<b>Reacción 10</b>	Formación del borato de amonio	43
<b>Reacción 11</b>	Titulación del borato de amonio	43
<b>Reacción 12</b>	Reacción de Carrez	98

## LISTA DE ANEXOS

pág.

<b>ANEXO A</b>	<b>COMPONENTES MAYORITARIOS DE LAS LECHEES UHT, SEGÚN LA INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL ENVASE TETRAPAK</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>COMPONENTES MINORITARIOS DE LAS LECHEES UHT, SEGÚN LA INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL ENVASE TETRAPAK</b>	<b>123</b>



## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Absorbancia
Ā	Absorbancia promedio
AOAC	Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL
AM	Azul de metileno
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
°C	Grados centígrados
$\rho$	Densidad
DSR	Desviación estándar relativa
Equipo D	Espectrofotómetro UV-Vis Intralab DMS-100
Equipo G	Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Genesys 6
ES	Extracto seco total
ESD	Extracto seco desengrasado
FV	Fecha de vencimiento
g	Gramos
G	Grasa
h	Hora
HMF	Hidroximetilfurfural
L	Litro
LAM	Leucoazul de metileno
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
M	Molaridad
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros

ppm	Partes por millón
r	Coefficiente de linealidad
rpm	Revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
µm	Micrómetros
UHT	Ultrapasteurizada
UV-Vis	Ultravioleta-visible

## RESUMEN

El 5-(Hidroximetil)-2-furaldehído, hidroximetilfurfural ó HMF, es un aldehído y derivado furánico que se forma durante los procesos de deshidratación y degradación de los azúcares, tales como las hexosas; un factor como el tratamiento térmico promueve estos procesos<sup>(1)</sup>. Este compuesto actúa como un intermediario en la formación de pigmentos en las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard, y es por ello que se ha utilizado como un indicador del deterioro térmico en una amplia variedad de alimentos procesados térmicamente, entre los cuales se encuentra la leche.

En éste estudio se implementó la técnica de espectrofotometría ultravioleta-visible para determinar la concentración de HMF en diferentes tipos de leches comerciales; para tal efecto, se trabajó con un espectrofotómetro UV-Vis THERMO GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100, aplicando la metodología empleada para el análisis de HMF en muestras de leche entera UHT<sup>(2)</sup>, cereales<sup>(3)</sup> y leches fórmuladas para la población infantil<sup>(4),(5)</sup>, como también el método adoptado por la AOAC desde 1983, para la determinación de HMF en miel<sup>(6)</sup>.

Para la aplicación del método espectrofotométrico, se tomaron de forma aleatoria muestras de leche ultrapasteurizada entera, semidescremada, descremada, deslactosada y enriquecida con vitaminas, minerales y fibra, disponibles en el comercio local.

Los parámetros analíticos que sirvieron como criterio de confianza del método fueron: exactitud (90,52 y 92,24% en el equipo G; 90,10 y 91,81% en el equipo D), precisión (DSR 0,10-1,19% en el equipo G; 0,08-0,38% en el equipo D), linealidad (0,9962 en el equipo G; 0,9965 en el equipo D), límite de detección (0,011mg/mL

para ambos equipos) y de cuantificación (0,037mg/mL en el equipo G; 0,036mg/mL en el equipo D); adicionalmente, hubo selectividad y reproducibilidad de los picos.

Los niveles de HMF encontrados en las muestras de leche UHT estuvieron comprendidos entre 0,43 y 2,83mg/mL con el equipo G, mientras que con el equipo D fueron de 0,45 y 2,82mg/mL.

Además de cuantificar el HMF en las muestras de leche, se complementó su caracterización con otros análisis fisicoquímicos y microbiológicos con el fin de establecer su composición y calidad higiénica; los valores hallados para todos los tipos de leche analizadas fueron:

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
Prueba de la reductasa	7 horas
Prueba de la fosfatasa	Negativa
Acidez	0,141-0,158%
Densidad	1,030-1,036g/mL
Grasa	0,0-3,5%
Extracto seco total	8,64-12,11%
Extracto seco desengrasado	8,34-9,16%
pH	6,5-6,7
Cenizas	0,71-0,81%
Proteína	2,4-2,7%

Estos parámetros son exigidos por la reglamentación colombiana (norma ICONTEC)<sup>(7)</sup> y permiten su clasificación como leches de calidad aptas para consumo.

## INTRODUCCIÓN

La leche, según el Código Alimentario Español (CAE) es el producto integro, no alterado, ni adulterado y sin calostros, del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras domésticas sanas y bien alimentadas<sup>(8)</sup>. Su importancia radica en la variada y compleja composición, pues en ella se encuentran la mayoría de los elementos necesarios para el organismo; además, posee componentes únicos que la hacen imprescindible para una correcta nutrición. Cuando se habla de leche, se refiere principalmente a la leche de vaca debido a que es la más consumida y con mayor aporte de nutrientes para el ser humano<sup>(9)</sup>.

Los componentes principales de la leche son: agua, proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales, en una proporción que varía de acuerdo a distintos factores tales como raza de la vaca, alimentación, época de lactancia, época del año, entre otros; sin embargo, el constituyente más característico de la leche y que la hace diferente de cualquier otro alimento es la lactosa (4-0-β-D-galactopiranosil-D-glucopiranososa)<sup>(1)</sup>.

Dada su composición, la leche no solo es un excelente alimento para el hombre sino también un caldo de cultivo ideal para bacterias y otros microorganismos; por ello, es necesario asegurar que la leche destinada para el consumo de humanos sea un producto sano que conserve su calidad, aplicando sistemas de manejo y procesado que destruyan los microorganismos patógenos y reduzcan la presencia de otros.

El método más eficaz para destruir las bacterias de la leche, es utilizar un tratamiento térmico, que consiste en calentarla el tiempo suficiente a una temperatura elevada. De los métodos más utilizados se tienen: pasteurización, ultrapasteurización ó calentamiento ultra-alto (UHT) y la esterilización.<sup>(10)</sup>

A pesar de que los tratamientos térmicos son necesarios para garantizar una leche de óptima calidad, tienen la desventaja de ocasionar una serie de modificaciones en los componentes de la misma. La lactosa, que es el carbohidrato predominante en la leche bovina (4-6%), es vulnerable de sufrir alteraciones como consecuencia del tratamiento térmico, cuando interviene en la reacción de pardeamiento no enzimático ó de Maillard, que ocurre con los grupos  $\epsilon$ -amino libres de la lisina<sup>(11)</sup>; durante ésta reacción, se pueden formar algunos ácidos (fórmico, láctico, acético, pirúvico, y propiónico), y otros compuestos como el furaldehído y el Hidroximetilfurfural<sup>(1)</sup>.

Uno de los productos intermediarios de la reacción de Maillard y quizás, de los más estudiados, es el Hidroximetilfurfural (HMF); éste es un reconocido indicador de calentamiento que conduce a la formación de pigmentos oscuros denominados melanoidinas<sup>(12)</sup>.

El HMF ha sido determinado en una gran variedad de alimentos, tales como la leche y los productos lácteos<sup>(2),(13)</sup>, miel<sup>(14),(15)</sup>, jugos de frutas<sup>(16)</sup>, leches líquidas formuladas para la población infantil<sup>(4),(5),(17),(18)</sup>, compotas<sup>(19)</sup>, cerveza<sup>(20)</sup>, entre otros, y los métodos empleados para su determinación, han incluido desde técnicas colorimétricas y espectrofotométricas hasta cromatográficas.<sup>(21)</sup>

Para la determinación y cuantificación del HMF en diferentes tipos de leche ultrapasteurizada entera, descremada, semidescremada, deslactosada y enriquecida con vitaminas, minerales y fibra disponibles en el comercio local, en este trabajo se estandarizó el método espectrofotométrico UV-Vis del carrez.

## **1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES**

### **1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE**

La leche es un alimento completo y el más importante en la alimentación humana; cuando se habla de leche se entiende que se trata de la leche de vaca.

Atendiendo a su origen, la leche se define como el líquido segregado por la glándula mamaria, como consecuencia del ordeño ininterrumpido de animales sanos, que se realiza ocho días después del parto. En el período comprendido entre los 15 días anteriores y los 5 siguientes al parto, la leche tiene una composición distinta, que se conoce con el nombre de “calostro” y no sirve para la alimentación del hombre, sólo para el ternero recién nacido<sup>(22)</sup>. El calostro del ganado bovino no sólo ofrece la mayor riqueza proteica, sino que también difiere de la leche normal en la relación que guardan entre sí, las distintas proteínas; es más rica en albúminas y globulinas y contiene más amoníaco<sup>(9)</sup>.

Las características principales de la leche son: Líquido blanco, opaco, dos veces más viscoso que el agua, de sabor ligeramente azucarado y de olor acentuado. También se puede considerar como una emulsión de materia grasa en una solución acuosa que contiene numerosos elementos, unos en disolución y otros en estado coloidal; constituye un sistema químico y fisicoquímico muy complejo, cuyo perfecto conocimiento es indispensable para comprender los principios del tratamiento y la transformación del producto<sup>(23)</sup>.

## 1.2. COMPOSICIÓN

La leche está constituida principalmente por agua (63-87%), una compleja mezcla de grasas, proteínas, carbohidratos y minerales constituyen el extracto seco total (ES).

También contiene enzimas, anticuerpos, hormonas, gases disueltos, vitaminas, ciertas células (macrófagos); además, inevitablemente puede contener microorganismos, antibióticos y antiparasitarios<sup>(24)</sup>.

**1.2.1. Proteínas:** La leche contiene principalmente dos tipos de proteínas micelares:

- Caseínas, asociadas con el calcio, el fosfato y el citrato, que tienen una estructura aleatoria abierta, precipitan a un pH de 4,6 y se encuentran en una proporción de 75 a 85%.
- Proteínas del suero, que tienen una estructura globular, son solubles a un pH de 4,6 y se hallan porcentajes de 15-22%. En menor cantidad encontramos la fracción de proteosa peptona, que va desde un 2 a 4% <sup>(25)</sup>.

### **Caseínas**

Son un conjunto de polipéptidos sintetizados en la glándula mamaria de la vaca, que forman la fracción proteica más importante de la leche, ya que suman hasta el 85% de las proteínas totales; pertenecen al grupo de las gluco-fosfoproteínas, las cuales existen principalmente en la leche como micelas<sup>(26)</sup>.

Las micelas están constituidas por cuatro fracciones de caseínas, clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética:  $\alpha_s$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  que se encuentran en una proporción de 55, 25, 15 y 5%, respectivamente. Características de las caseínas



son su gran contenido de residuos de fosfoserilo y su moderadamente alto contenido de prolina<sup>(24)</sup>.

- **La  $\alpha_{s1}$  caseína** es el componente mayoritario de todas las caseínas; es sensible al calcio, tiene un elevado peso molecular, es relativamente rica en fósforo (aproximadamente 1%, lo que representa 8 átomos de fósforo por molécula) y no contiene glúcidos<sup>(23)</sup>.
- **La  $\beta$  caseína** es soluble en presencia de calcio (0,03M) a bajas temperaturas (4°C) y contiene menos fósforo que la caseína anterior, pero mucha más prolina.
- **La  $\kappa$  caseína** por su composición y propiedades, es uno de los constituyentes de la caseína bruta más interesantes; en presencia de calcio 0,3M a temperatura ambiente y a pH 7, se observa una ruptura del complejo de la caseína. En estas condiciones, las  $\alpha_s$  y  $\beta$  caseínas precipitan, una fracción de la  $\kappa$  caseína permanece en disolución y la otra precipita. Su contenido en fósforo es bajo y por el contrario, en serina, treonina y cisteína es elevado<sup>(26)</sup>.
- **Las  $\delta$  caseínas** son un producto de la degradación de las  $\beta$  caseínas por acción de la plasmina, una proteinasa de la leche. Las  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  y  $\delta_3$  caseínas se forman por escisión de algunos residuos de aminoácidos, que en la leche forman la proteosa peptona<sup>(11)</sup>.

### ***Formación de micelas***

Como resultado de su fosforilación y naturaleza anfifílica, las caseínas interaccionan unas con otras para formar grandes complejos esféricos, llamados micelas, con diámetros que oscilan desde unos 30-50 hasta 300nm.

Las micelas contienen el 92% de la proteína, constituida por  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseína, en una relación media de 3:1:3:1 y el 8% de los constituyentes

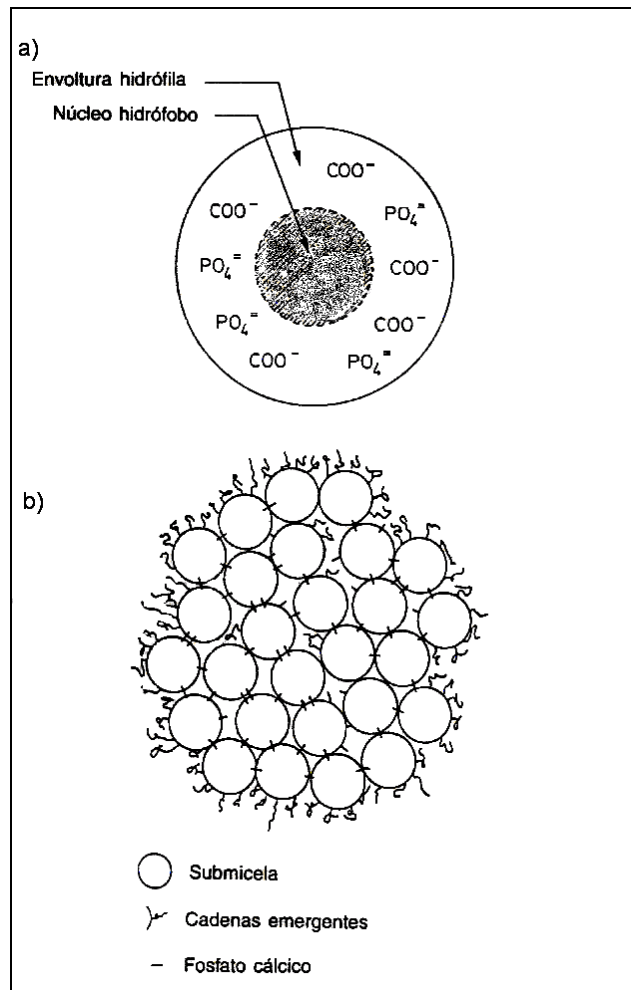
inorgánicos, compuestos principalmente por fosfato cálcico; a su vez las micelas están formadas por submicelas casi esféricas, que son el resultado de interacciones entre los dominios hidrofóbicos de las caseínas individuales<sup>(24)</sup>.

La estabilidad de las micelas se debe principalmente a los enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos (puentes de calcio ó de fosfato entre los residuos de fosfoserina y ácido glutámico) y a los enlaces hidrófobos de aminoácidos no polares de las caseínas<sup>(27)</sup>.

El conocimiento de la estructura íntima de las micelas de caseína constituye, probablemente, el fundamento de toda la tecnología lechera, que tiene por objeto, según el caso, estabilizar o desestabilizar la fase micelar de la leche<sup>(23)</sup>.

En la Figura No. 1 se muestra un modelo esquemático de una micela de caseína.

**FIGURA No. 1:** Modelo esquemático de una micela de caseína. a) Subunidades de las  $\alpha_{S1}$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  caseínas; b) Micelas de subunidades que están unidas por puentes de fosfato cálcico<sup>(11)</sup>.



### ***Proteínas del suero***

Las proteínas del suero constan de ocho diferentes fracciones, entre las cuales, las principales son la  $\beta$ -lactoglobulina, la  $\alpha$ -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina bovina y las proteosas peptonas; se caracterizan porque son compactas, globulares, con alto peso molecular, solubles a un pH de 4,6 y en estado nativo, no se asocian con las caseínas. En general, son sensibles al calor, contrario a lo

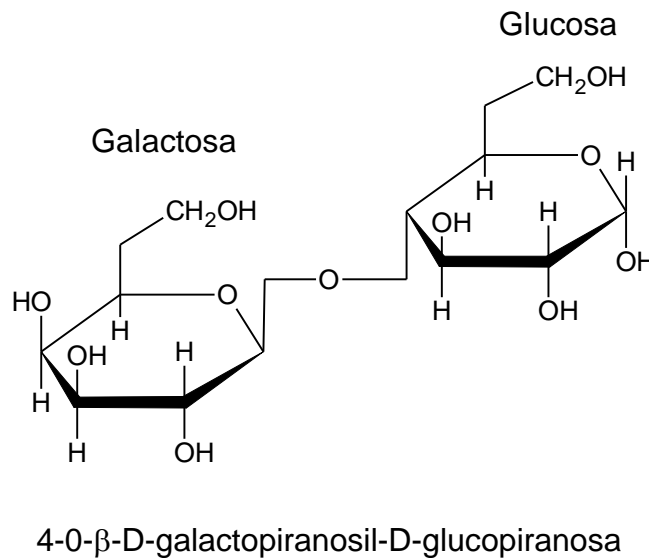
que sucede con las caseínas, lo cual es debido a que su mecanismo de estabilidad opera por hidratación y no por carga eléctrica.<sup>(28)</sup>

- **La  $\beta$ -lactoglobulina** es la proteína más abundante en el lactosuero de la leche de vaca, encontrándose contenidos de 2 a 3 g/L; posee numerosos grupos -SH, los cuales son responsables del desprendimiento del hidrógeno sulfurado que se produce cuando la leche se calienta por encima de 70°C<sup>(27)</sup>.
- **La  $\alpha$ -lactoalbúmina** se caracteriza por su actividad biológica, ya que es parte constitutiva del sistema enzimático requerido para la síntesis de la lactosa<sup>(1)</sup>; tiene alto contenido de triptófano y es insoluble a pH's comprendidos entre 4,0 y 5,5<sup>(27)</sup>.
- **Las inmunoglobulinas** representan del 10 al 12% de las proteínas solubles, tienen una actividad inmunológica importante al producir sustancias inhibitoras del desarrollo de gérmenes en la leche cruda. Existen dos subfracciones: la euglobulina, que es insoluble en agua y la pseudoglobulina que es soluble<sup>(26)</sup>.
- **Las proteosas peptonas** están compuestas por un grupo muy heterogéneo de fosfoglicoproteínas, de pesos moleculares elevados. Estas proteínas representan aproximadamente el 8% de las proteínas del suero lácteo<sup>(23)</sup>.
- **La albúmina bovina ó seroalbúmina** es una proteína de peso molecular elevado, muy soluble en agua; su molécula contiene un grupo tiol y 17 puentes bisulfuro intrapeptídicos. Representa aproximadamente entre el 5 a 6% de la fracción «albúminas»<sup>(23)</sup>.

**1.2.2. Carbohidratos:** En la leche de vaca, los glúcidos están representados principalmente por la lactosa ó también denominada azúcar de leche, 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa, que se sintetiza en la glándula mamaria. Este

disacárido, compuesto principalmente por glucosa y galactosa, contribuye al sabor característico de la leche<sup>(25)</sup>; presenta dos formas isoméricas,  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya presencia y cantidad dependen de los tratamientos térmicos; normalmente, éste disacárido existe en equilibrio en una mezcla de cristales de  $\alpha$ -lactosa hidratada y  $\beta$ -lactosa anhidra. Teóricamente ambos isómeros pueden existir tanto en la forma anhidra como en la hidratada; sin embargo, las más estables son la  $\alpha$ -hidratada y la  $\beta$ -anhidra<sup>(24)</sup>. En la Figura No. 2 se presenta la estructura química de la  $\beta$ -lactosa.

**FIGURA No. 2:** Estructura química de la  $\beta$ -lactosa



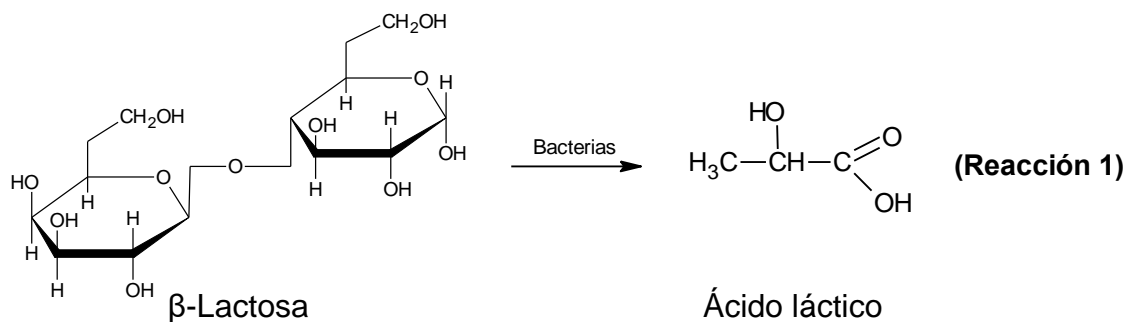
Una de las propiedades de la lactosa es su baja solubilidad en agua comparada con otros azúcares y está directamente relacionada con el fenómeno de "arenosidad" que se presenta en algunos productos de la industria lechera, debido a la cristalización de la lactosa cuando se excede su nivel de saturación<sup>(21)</sup>; tiene menor poder reductor que la glucosa y además influye en las propiedades coligativas de la leche como son la presión osmótica, punto de ebullición y punto de congelación<sup>(27)</sup>.

La lactosa tiene un enlace hemiacetal libre entre los carbonos 1 y 5 de la glucosa; las reacciones químicas en las que participa, involucran a éste enlace, además del enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico entre ambos anillos (glucosa y galactosa), el grupo hidroxilo y los enlaces carbono-carbono de los anillos; puede sufrir las reacciones típicas de los aldehídos, entre las que se encuentran la isomerización, degradación y oligomerización, entre otras<sup>(28)</sup>.

### **Reacciones de la lactosa**

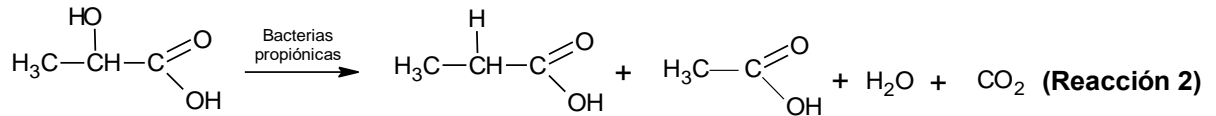
Entre las principales reacciones que sufre la lactosa se encuentran, la hidrólisis y la degradación térmica. Por su parte, la hidrólisis puede ser ácida, básica ó enzimática<sup>(23)</sup>.

- **Hidrólisis:** La reacción sólo tiene lugar a altas temperaturas y cuando se trata de un ácido fuerte (sulfúrico o clorhídrico) a concentraciones elevadas; también es posible una hidrólisis enzimática que puede ser provocada por la acción de algunas bacterias y levaduras, que producen principalmente ácido láctico, como se muestra en la **Reacción 1**.



Esta reacción se acompaña, en general, de la producción de sustancias secundarias como acetilmetilcarbinol y diacetilo en cantidades más o menos apreciables, según los gérmenes responsables de la degradación y las condiciones en las que actúan; algunas de estas sustancias desempeñan un papel importante en la formación del aroma de los productos lácteos<sup>(23)</sup>.

Como se observa en la **Reacción 2**, el ácido láctico puede ser transformado también en ácido propiónico y gas carbónico por las bacterias propiónicas.



Ácido láctico

Ácido propiónico

Ácido acético

La lactosa puede sufrir también la fermentación alcohólica cuando es atacada por levaduras que producen una lactosa que hidroliza este azúcar en glucosa y galactosa<sup>(23)</sup>.

- **Degradación térmica:** La lactosa es sensible al calor; entre 110 y 130°C la forma hidratada pierde su agua de cristalización, se torna amarilla y tiene lugar un oscurecimiento o pardeamiento pronunciado debido a la formación de melanoidinas. Sin embargo, en la leche se ha observado que el pardeamiento sobreviene a temperaturas muy inferiores, fenómeno que no se debe a una caramelización de la lactosa en sí, sino a una reacción de éste azúcar con las proteínas. Esta reacción de pardeamiento, muy compleja, se denomina reacción de Maillard<sup>(1)</sup>.

**1.2.3. Lípidos:** La composición lipídica de la leche bovina es la más compleja que se conoce. Los triacilgliceroles (triglicéridos) suponen la mayor proporción de los lípidos, constituyendo hasta el 97-98% de los lípidos totales<sup>(24)</sup> y contienen principalmente, ácidos grasos saturados (60-70%), entre los cuales encontramos el mirístico, palmítico y esteárico, pero también ácidos de cadena corta como el butírico y caproico. Así mismo, los triglicéridos contienen el 25 al 30% de ácidos monoinsaturados y del 2 al 5% de ácidos poliinsaturados<sup>(27)</sup>, cuyo contenido varía con la época del año y la alimentación de la vaca<sup>(11)</sup>; el resto consiste de fosfolípidos y esteroides, especialmente colesterol, que se presentan en las fracciones de la membrana celular que pasa a la leche. La fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina y esfingomielina dan cuenta de la mayor parte de la fracción fosfolipídica.

Para disminuir la energía libre de la superficie de los lípidos en un medio acuoso, las moléculas de los lípidos se asocian formando grandes glóbulos esféricos denominados glóbulos grasos<sup>(26)</sup>.

**1.2.4. Enzimas:** La leche contiene una gran cantidad de enzimas, ya sea unidas a las micelas de caseína, a la membrana del glóbulo graso o en forma libre en el suero<sup>(26)</sup>, y que tienen importancia analítica para determinar si se ha realizado o no un calentamiento<sup>(11)</sup>.

La plasmina es la principal serin-proteínasa de la leche que presenta una actividad similar a la tripsina de la leche. Es muy termoestable al pH normal de la leche (entre 6,5 y 6,7) y mantiene una actividad considerable después de la pasteurización<sup>(29)</sup>.

La lipasa, una lipoproteína, es la principal enzima lipolítica de la leche que se encuentra en cantidades elevadas en la leche recién ordeñada. Es termolábil y por eso, no es importante en la leche tratada térmicamente<sup>(29)</sup>.

Podemos encontrar también hidrolasas (amilasas, esterases y fosfatasas), oxidoreductasas (catalasa, lactoperoxidasa y xantín-oxidasa) e inhibidores de las proteinasas<sup>(11)</sup>.

**1.2.5. Sales y minerales:** Los minerales representan alrededor del 0,6-0,8% del peso de la leche y suelen estar presentes como cloruros, fosfatos y citratos de calcio, magnesio, sodio y potasio, que se encuentran tanto en estado coloidal como en solución<sup>(1)</sup>.



Entre los oligoelementos figuran el aluminio, bromo, zinc y manganeso. En mayor proporción encontramos hierro y cobre; estos metales están, en gran parte, formando complejos con las proteínas y su composición varía con la alimentación del animal<sup>(10)</sup>.

El Calcio es fundamental para producir la coagulación de la leche mediante el cuajo y por ello, cuando existe un desbalance de este elemento en la leche, ésta se acidifica o cuaja inmediatamente después del ordeño, lo cual se debe a factores fisiológicos individuales de la vaca, especialmente la raza y edad<sup>(30)</sup>.

El Ca y el fósforo (P) forman el fosfato de calcio  $[Ca_3(PO_4)_2]$  en la leche; esta sal disminuye su solubilidad a medida que aumenta la temperatura, hasta que a temperaturas altas comienza a precipitar. Por esta razón, leches sobrecalentadas ó sobre-pasteurizadas, producen coagulaciones defectuosas<sup>(31)</sup>.

**1.2.6. Vitaminas:** La leche contiene todas las vitaminas conocidas, la A, D, E, K y carotenos y las del complejo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>), aunque algunas de ellas están presentes solo a nivel de trazas. En mayor proporción, se encuentran principalmente las vitaminas A, B<sub>2</sub> y B<sub>12</sub><sup>(30)</sup>.

Algunas vitaminas de la leche presentan una propiedad altamente favorable para la industria, como es el poder antioxidante que exhiben las vitaminas A, C, E y los procarotenos; este poder antioxidante contribuye a proteger a la grasa de la leche de posibles oxidaciones<sup>(31)</sup>.

**1.2.7. Elementos biológicos:** La leche, incluso recogida asépticamente y procedente de un animal sano, contiene células que son de dos tipos:

- Células procedentes de la sangre y de la glándula mamaria del animal.

- Microorganismos que se encuentran normalmente en el canal del pezón y otros que pueden atravesar el epitelio mamario, cuando el animal se encuentra enfermo<sup>(23)</sup>.

### **Células**

Son numerosas y variadas. Al lado del epitelio se encuentran leucocitos procedentes de la sangre y de la linfa, que están representados por mononucleares, linfocitos y polinucleares. Los leucocitos son frágiles y si la leche se conserva durante 14 horas a una temperatura inferior a 10°C, se observa su desaparición parcial; la congelación y el calentamiento de la leche provocan su destrucción<sup>(23)</sup>.

### **Microorganismos**

Casi todas las formas bacterianas de importancia en lechería, tienen origen vegetal.

En la leche se pueden encontrar bacterias, levaduras, mohos, virus y bacteriófagos, aunque muchos otros microorganismos pueden hallarse como contaminantes, y pueden proliferar con gran facilidad en la leche, que constituye un excelente medio de cultivo<sup>(30)</sup>.

Algunos de estos microorganismos son: *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus* o *Micrococcus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus caucasicus*, entre otros<sup>(30)</sup>.

## **1.3. TRATAMIENTO DE LA LECHE**

Para asegurar que la leche vendida para el consumo humano es un producto sano que conserva bien su calidad, es necesario desarrollar un sistema de manejo y

procesado que destruya todos los microorganismos patógenos y reduzca la presencia de otros<sup>(27)</sup>. El desarrollo de microorganismos se previene, ó bien por un tratamiento térmico ó por adición de azúcar<sup>(10)</sup>.

**1.3.1. Tratamiento térmico:** Su objetivo es la prolongación de la vida útil de la leche y la eliminación de microorganismos patógenos. Los tratamientos térmicos se pueden realizar por los siguientes procedimientos:

**1.3.1.1. *Pasteurización:*** Consiste en calentar la leche por debajo del punto de ebullición pero a una temperatura lo suficientemente alta y durante un tiempo adecuado, para que pueda ser transportada, distribuida y consumida con seguridad<sup>(10)</sup>. La pasteurización se realiza a 63°C durante 30 minutos ó a 72-75°C durante 15 segundos, ó también instantáneamente a 95°C.

La pasteurización a 63°C se efectúa en tanques cerrados, provistos de agitadores; las pasteurizaciones rápidas a temperaturas elevadas se hacen en intercambiadores de calor, tubulares ó de placas<sup>(27)</sup>.

**1.3.1.2. *Calentamiento ultra-alto ó ultrapasteurización:*** Consiste en exponer a la leche durante un corto lapso de tiempo a una temperatura que oscila entre 135-140°C, seguida de un rápido enfriamiento; esto se hace de una forma continua y en un recinto cerrado que garantice que el producto no se contamine.

La ultrapasteurización se puede realizar por calentamiento indirecto a 136-138°C durante 5 a 6 segundos en intercambiadores de calor tubulares ó de placas y por calentamiento directo a 140-145°C durante 2 a 4 segundos, por inyección de vapor, seguido de envasado aséptico<sup>(29)</sup>.

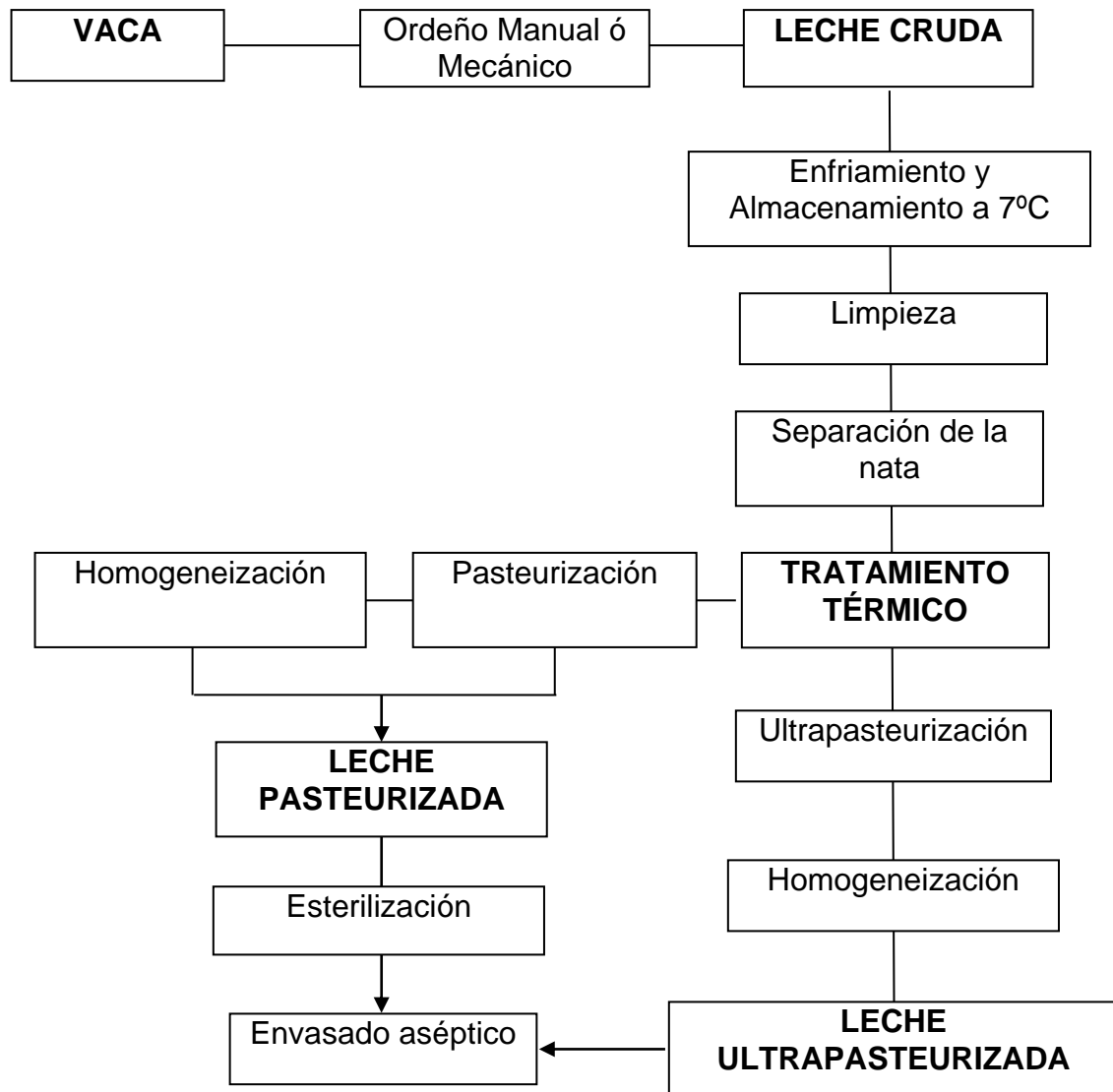
**1.3.1.3. *Esterilización:*** La leche (homogeneizada obligatoriamente antes y, por lo general, pasteurizada) es colocada en botellas u otros envases, y se les

realiza un tratamiento a 115°C durante 15 minutos; si los envases se agitan fuertemente, es suficiente un tratamiento de 4 minutos a 125°C, pero siempre es preferible trabajar según el principio "temperatura alta-tiempo corto". Para llevar a cabo este proceso, se emplean intercambiadores de calor o bien el contacto directo con el vapor; en el primer caso se realiza durante 10 a 15 segundos a 135°C y en el segundo de 1 a 3 segundos a 140-145°C; luego, se enfría rápidamente y se acondiciona en recipientes totalmente estériles, tales como envases tipo «Tetrapak». Este proceso tiene por objeto la conservación indefinida de la leche<sup>(23)</sup>.

Existen otras técnicas de conservación de las leches de consumo a parte de las mencionadas anteriormente, pero la mayoría de estos métodos son poco utilizados, ya que no son tolerados por la legislación o se encuentran en fase de experimentación. Algunos de estos son: desacidificación, adición de antisépticos, tratamiento por ultrasonido, por ultravioleta y con rayos ionizantes, por medio del cual se obtiene leche irradiada<sup>(23)</sup>.

En la Figura No. 3 se esquematizan los diferentes tratamientos a los que se somete la leche cruda antes de su comercialización

**FIGURA No. 3:** Obtención y tratamiento de la leche cruda<sup>(11)</sup>.



#### 1.4. TIPOS DE LECHE

La presentación de la leche es variable, pues se acepta alterar sus propiedades, para satisfacer las preferencias de los consumidores. Estos productos lácteos se obtienen eliminando algún ingrediente de la leche natural, o añadiendo a la misma, alguna sustancia.

Los requisitos que debe cumplir un producto para poder ubicarlo en las diferentes categorías, varían de acuerdo a la definición de cada país. La leche se consume en las principales formas que se detallan a continuación<sup>(9)</sup>:

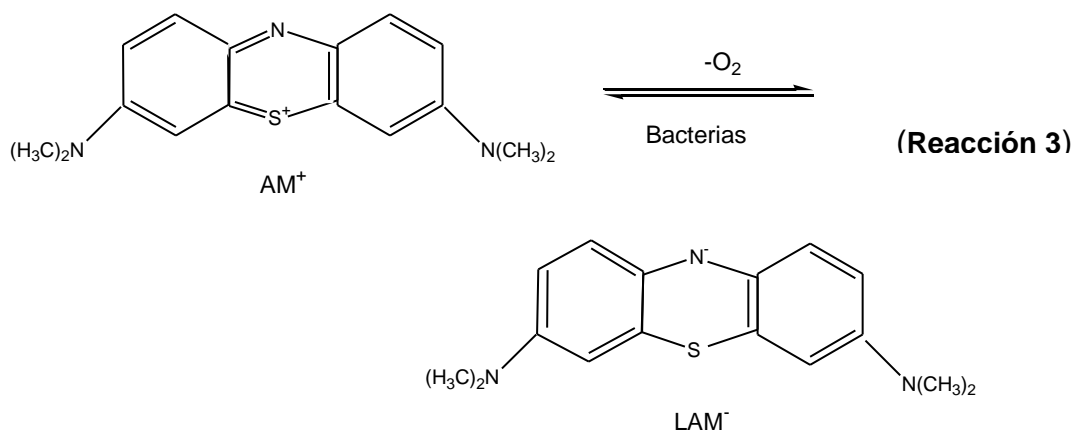
- a) **Leche cruda (certificada):** Es aquella que no se somete a ningún tratamiento, por lo tanto, debe responder a elevados índices de higiene<sup>(11)</sup>.
  
- b) **Leche entera:** Es la sometida a un tratamiento térmico en general y su contenido graso se ajusta a un estándar. Se ha establecido que la leche entera debe tener un contenido de grasa superior al 3,2%<sup>(11)</sup>.
  
- c) **Leche semidescremada:** Es la leche tratada térmicamente, con un contenido de grasa entre 1,5 y 1,8%<sup>(11)</sup>.
  
- d) **Leche descremada:** Es la leche tratada térmicamente, cuyo contenido de grasa es inferior al 0,3%<sup>(11)</sup>.
  
- e) **Leche enriquecida:** Este tipo de leche, es elaborado adicionando nuevas materias primas, como por ejemplo, vitaminas, minerales, ácidos grasos poliinsaturados (ácido eicosapentanoico y docosahexanoico) denominados comúnmente como omega-3, soja, fibra, entre otros, ó utilizando procesos no empleados habitualmente, los cuales pueden provocar un cambio deseado en la composición ó estructura, en el valor nutritivo y en el metabolismo, con el fin de satisfacer las preferencias y necesidades de los consumidores<sup>(10)</sup>.
  
- f) **Leche deslactosada:** Es aquella que se somete a un proceso en el cual se transforma la lactosa en glucosa y galactosa, para hacerla de mayor digestibilidad. Puede ser semidescremada o descremada<sup>(23)</sup>.

## 1.5. CALIDAD DE LA LECHE

En toda planta lechera, es necesario realizar un muestreo inicial de leche para asegurar que únicamente, la de mejor calidad, ingresará al proceso. Entre los análisis realizados a la leche para evaluar su calidad están los fisicoquímicos, que permiten ver su composición; los organolépticos, empleados para detectar sabores extraños y los bacteriológicos, que son los que detectan las bacterias patógenas y la presencia de antibióticos<sup>(30)</sup>.

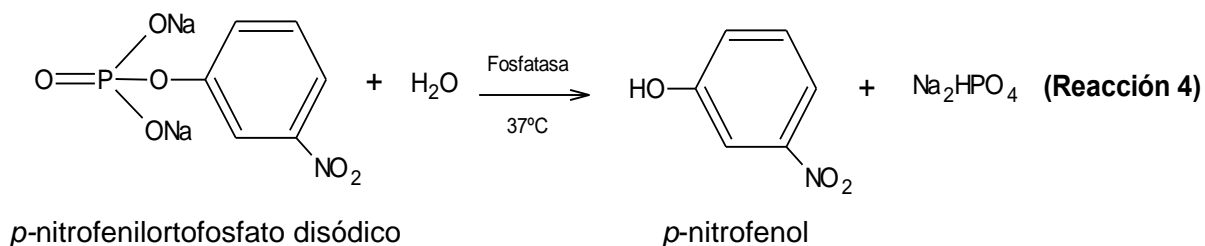
**1.5.1. Caracterización microbiológica:** Dada su composición, la leche no es solo un excelente alimento para el hombre, sino también un adecuado medio donde casi todos los microorganismos pueden proliferar con gran facilidad<sup>(1)</sup>. Dentro de las pruebas desarrolladas para verificar la calidad microbiana de la leche se encuentran las determinaciones enzimáticas, ya que la mayoría de los gérmenes de la leche elaboran reductasas que modifican el potencial de óxido-reducción de la misma<sup>(23)</sup>. Algunas determinaciones para evaluar la calidad higiénica de la leche son:

**1.5.1.1. Prueba de la reductasa ó azul de metileno:** Se realiza a la leche no tratada y a la leche pasteurizada, evaluando la cantidad de bacterias en la leche y por tanto la calidad de su conservación. Se basa en la capacidad reductora de las bacterias en presencia de sustancias como el azul de metileno, al incubarse a 37°C durante aproximadamente 7 horas. En la reacción No. 3, se representa la reducción del azul de metileno para formar leucoazul de metileno<sup>(23)</sup>.



La prueba permite concluir acerca del estado de conservación y pureza de la muestra<sup>(23)</sup>.

**1.5.1.2. Prueba de la fosfatasa:** Para la leche pasteurizada, ésta prueba permite verificar rápidamente si la leche ha sido efectivamente privada de todos los gérmenes patógenos que pudiera contener antes de ser pasteurizada. Esta prueba consiste en añadir un sustrato que lleva un éster fosfórico, seguido de su incubación a 37°C, donde puede ocurrir ó no, una reacción colorimétrica, como la que se indica en la reacción No. 4<sup>(23)</sup>.



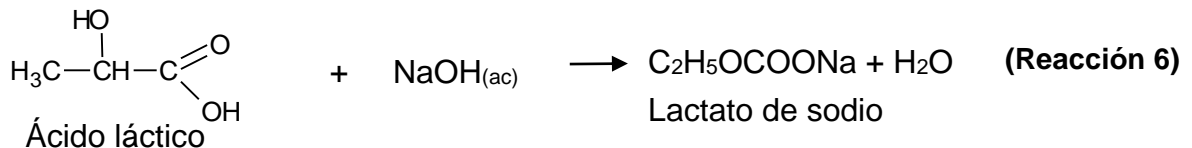
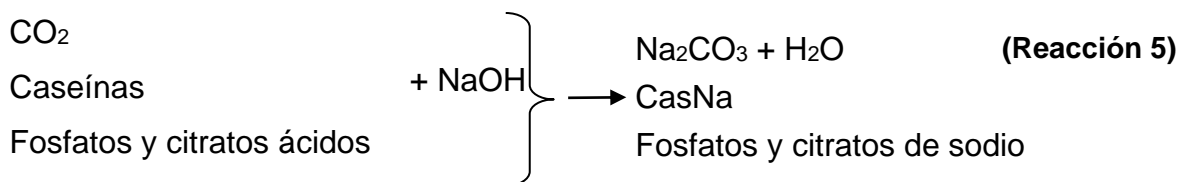
**1.5.2. Caracterización fisicoquímica:** La composición nutritiva de la leche, se puede determinar realizando los siguientes procedimientos:

**1.5.2.1. Determinación de acidez:** Se realiza por medio de una titulación directa con una solución estándar de hidróxido de sodio y en presencia del indicador fenolftaleína<sup>(11)</sup>.



La prueba de acidez es usada para determinar la reacción de la caseína en conjunto con la reacción del ácido láctico existente<sup>(30)</sup>. En principio, la leche fresca en estado normal no contiene ácido láctico y su acidez se debe principalmente a los fosfatos ácidos, la caseína, el dióxido de carbono disuelto y los citratos ácidos. Esta acidez, se denomina acidez natural o aparente de la leche, que no se debe a la presencia del ácido láctico, la cual es denominada acidez desarrollada<sup>(11)</sup>.

Las reacciones debidas a la acidez natural de la leche (**reacción 5**) y a la acidez desarrollada (**reacción 6**), se describen a continuación.



**1.5.2.2. Determinación de densidad:** Se utiliza convenientemente un lactodensímetro, el cual es un higrómetro especial, calibrado en el intervalo de 1,025 a 1,035. Para efectuar la lectura, la muestra de leche debe estar fresca y debe mezclarse perfectamente, pero con suavidad, evitando incorporar aire<sup>(11)</sup>. Esta determinación es de gran importancia, ya que si no está absolutamente de acuerdo con los valores establecidos por la reglamentación, se podría pensar en una posible falsificación ó adulteración. La densidad, más exactamente el peso específico de la leche higienizada a 15°C, está entre 1,030 y 1,036g/mL<sup>(10)</sup>.

**1.5.2.3. Determinación de grasa:** El método más usado comúnmente es el Método de Gerber, el cual consiste en disolver los componentes de la leche, excepto la materia grasa, mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado.

Posteriormente, una centrifugación en unos tubos apropiados llamados butirómetros, permite separar fácilmente la materia grasa por la adición de alcohol amílico<sup>(23)</sup>.

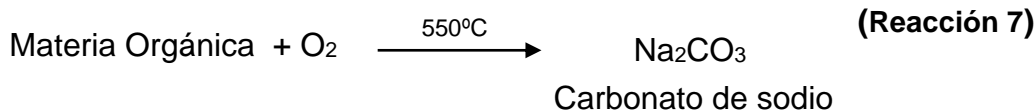
El contenido de materia grasa que persiste después de que la leche haya sido sometida o no a un proceso de desnatado, permite clasificarla como leche entera, semidescremada y descremada<sup>(11)</sup>.

**1.5.2.4. Determinación de extracto seco total:** Se puede realizar empleando un método gravimétrico que involucre calentamiento o utilizando la fórmula de Richmond, basada en el valor de la densidad y el contenido de grasa. También se le denomina determinación de sólidos totales<sup>(7)</sup>.

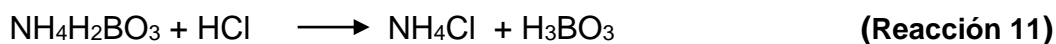
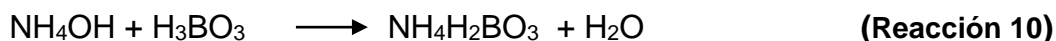
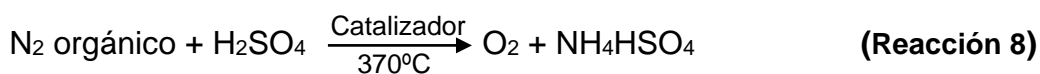
**1.5.2.5. Determinación de extracto seco desengrasado:** El ESD, expresa el contenido de la leche en materia seca, libre de grasa. Los sólidos no grasos se pueden determinar empleando la fórmula de Richmond, pero sin tener en cuenta el valor del contenido graso<sup>(7)</sup>.

**1.5.2.6. Determinación del pH:** Se realiza empleando un método potenciométrico, al sumergir un electrodo en un volumen determinado de leche<sup>(31)</sup>. A pesar de que éste parámetro no se encuentra como requisito en la norma, su determinación puede ser mucho más importante que la determinación de la acidez titulable, puesto que la acción de enzimas, la precipitación de la caseína, el gusto ácido y el cambio de color de indicadores, están relacionados directamente con los valores de pH<sup>(31)</sup>.

**1.5.2.7. Determinación de cenizas:** El material mineral se determina gravimétricamente, después de calcinar la leche a 550°C durante un tiempo aproximado de 2 horas<sup>(9)</sup>. En la reacción 7, se muestra la oxidación de la materia orgánica, sometida a calcinación.



**1.5.2.8. Determinación de proteína:** Para ello se emplea el Método Kjeldahl, el cual consiste en oxidar la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de un catalizador. Mediante un proceso de destilación, se libera el amoníaco que es recolectado en una solución de ácido bórico y se titula con una solución estándar de ácido clorhídrico<sup>(9)</sup>. Las reacciones que ocurren se muestran a continuación:



La cantidad de proteína se obtiene multiplicando el porcentaje de nitrógeno calculado, por el factor 6,38, que es el utilizado para la proteína de la leche<sup>(31)</sup>.

## 1.6. REGLAMENTACIÓN DE LA LECHE

Las normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos, ICONTEC, del Ministerio de Salud en Colombia<sup>(7)</sup>, establecen que la leche que se produzca, transporte, envase, comercialice o consuma en el territorio nacional, deberá cumplir con las características microbiológicas y fisicoquímicas que se señalan a continuación en la Tabla No. 1.

**TABLA No. 1:** Características microbiológicas y fisicoquímicas de los tipos de leche, según la norma ICONTEC<sup>(7)</sup>.

Tipo de leche	Prueba reductasa* (Horas)	Prueba fosfatasa	Acidez* (% ácido láctico)	Densidad a 15°C (g/mL)	Grasa* (%)	ES* (%)	ESD* (%)
Higienizada entera	7	Negativa	0,14-0,19	1,030-1,033	3,0	11,3	8,3
Higienizada semidescremada	7	Negativa	0,14-0,19	1,031-1,033	1,5-2,0	9,8	8,3
Higienizada descremada	7	Negativa	0,14-0,19	1,034-1,036	0,1-0,5	8,7	8,6

\* Valores reportados como mínimos

Estos son los requisitos mínimos que deben cumplir los diferentes tipos de leche; cualquier variación que se presente en dichos resultados, podrían evidenciar una alteración, adulteración o fraude del producto.

### 1.7. CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICOS DURANTE LA MANIPULACIÓN DE LA LECHE

Durante la manipulación de la leche y sus derivados, se emplean distintas condiciones de procesamiento que implican transferencia de calor, congelamiento, esfuerzos mecánicos, entre otros, los cuales pueden alterar las características físicas y químicas de estos productos, afectando su calidad global<sup>(32)</sup>.

Con base en lo anterior, se observa que la leche y sus derivados son sensibles al calor, al frío, a esfuerzos mecánicos, a la luz y al oxígeno, por lo que durante su manufactura se debe cuidar la influencia de cualquiera de estos factores, para evitar reacciones de deterioro que vayan en detrimento de la calidad<sup>(32)</sup>. Los factores externos que afectan la estabilidad de los productos lácteos, se muestran en la Tabla No. 2.

**TABLA No. 2:** Factores importantes que afectan la estabilidad de los productos lácteos<sup>(1)</sup>.

<b>Factor</b>	<b>Efecto</b>
Calor	Desnaturalización de proteínas, destrucción de vitaminas, reacciones químicas de degradación, reacciones de oscurecimiento, cambios en el sabor y el olor.
Congelamiento	Rompimiento de la estabilidad de las emulsiones, sinéresis, inestabilidad de las proteínas.
Esfuerzo mecánico	Cambios fisicoquímicos en macromoléculas, separación del suero, daño en las características de la emulsión, pérdida de las propiedades de textura y “cuerpo”.
Luz	Fotooxidación de vitaminas, proteínas y lípidos.
Oxígeno	Oxidación de lípidos, vitaminas y compuestos responsables del aroma y el sabor.

De todos estos factores, son los tratamientos térmicos los que mayor efecto tienen y adicionalmente inducen los cambios más importantes en los componentes de la leche<sup>(1)</sup>.

**1.7.1. Efecto del calor:** Cada uno de los constituyentes de la leche muestra un grado diferente de sensibilidad a los tratamientos térmicos. Es por ello que las enzimas en forma libre y las proteínas del suero, son mucho más lábiles al calor que las caseínas y estas a su vez que los lípidos y los carbohidratos.

Cuando se realizan los tratamientos térmicos, lo que se busca es destruir los microorganismos patógenos que pueden crecer y reproducirse en el seno de la leche; lo ideal sería poder calentar la leche, a temperaturas que aseguren un producto libre de contaminantes microbiológicos, de manera que pueda conservarse por mucho tiempo; sin embargo, al someter la leche a calentamientos excesivos, se inducen cambios químicos en la leche, que reducen su calidad tanto nutritiva como organoléptica<sup>(33)</sup>.

Actualmente, en la industria láctea se emplean procesos que aplican el principio «temperatura alta-tiempo corto». Entre ellos, los métodos de pasteurización son más rápidos (71,8°C durante 15 segundos) y sustituyen a los antiguamente realizados a 63°C durante 30 minutos. Estos tratamientos son suficientes para lograr que la leche se pueda conservar a temperaturas de refrigeración, solamente por algunos días<sup>(31)</sup>.

Otros métodos, como la ultrapasteurización, permiten obtener productos más duraderos, que permanecen inalterables por tiempos prolongados (hasta de 4 meses). Los procesos de esterilización se efectúan a temperaturas de 121°C, lo que da como resultado productos conservables por un tiempo mayor<sup>(29)</sup>.

Cada uno de los tratamientos térmicos citados anteriormente, modifica las propiedades de la leche, ya que se inducen diferentes cambios químicos, principalmente en las proteínas y carbohidratos.

La estabilidad térmica de la leche depende de muchos factores, como son la presencia de microorganismos proteolíticos, la concentración total de sólidos, la homogeneización, la acidez, el pH, los precalentamientos, la concentración de iones ó sales y la cantidad de albúminas y globulinas<sup>(33)</sup>.

La Tabla No. 3 presenta algunas de las modificaciones que sufren los diferentes constituyentes de la leche como resultado de los tratamientos térmicos<sup>(31)</sup>.

**TABLA No. 3:** Efectos del calentamiento sobre los componentes de la leche<sup>(31)</sup>.

<b>Sustancias modificadas</b>	<b>Modificaciones</b>	<b>Principales consecuencias</b>
Lactosa	Descomposición con formación de ácidos orgánicos.	Influencia sobre el crecimiento de bacterias lácticas. Descenso del pH. Sustancias extraíbles con éter. Caramelización.
Lactosa y Proteínas	Reacción entre los grupos aldehídicos y aminados; productos de condensación coloreados (reacción de Maillard).	Disminución del valor nutritivo de las proteínas (principalmente pérdida de la lisina). Formación de compuestos reductores, descenso del potencial redox, dificultad para la oxidación de las grasas. Oscurecimiento.
Proteínas solubles (principalmente $\beta$ -lactoglobulina)	Aparición de grupos -SH activos y de compuestos sulfurados libres. Desnaturalización. Inactivación de aglutininas.	“Sabor a cocido”. Sistema reductor. Floculación. Dificultades para la formación de la crema.
Proteínas solubles y caseína	Formación de amoníaco. Concentración e insolubilidad en la interzona líquido/aire. Formación de complejos $\kappa$ caseína + $\beta$ -lactoglobulina.	Influencia sobre el sabor. Formación de la llamada “capa de la leche”, una de las causas de estabilización por precalentamiento.
Caseína	Degradación de la molécula (defosforilación y ruptura de enlaces peptídicos) acompañada de modificación del estado micelar de la leche.	Floculación de las suspensiones de caseína a alta temperatura. Floculación y gelificación de la leche.
Minerales	Desplazamiento del equilibrio Ca/P soluble a Ca/P insoluble. Modificación de la capa superficial de las micelas.	Precalentamiento estabilizador. Insolubilización de las sales de calcio y descenso del pH. Retraso en la coagulación por el cuajo. Influencia sobre la estabilización de las micelas.
Grasa	Formación de lactosa (a partir de los ácidos monomeros de cadena corta).	Sabor desagradable (en las leches concentradas y en polvo).
Vitaminas	Destrucción, principalmente de vitaminas B1 y C	Disminución del valor nutritivo.
Enzimas	Inactivación a temperaturas bajas (60-100°C).	Detención de las actividades enzimáticas, especialmente la lipásica y la proteásica.
Gases	Pérdida de CO <sub>2</sub>	Elevación ligera del pH

Como puede observarse en la Tabla No. 3, una de las sustancias modificadas por efectos del tratamiento térmico es la lactosa, la cual interviene principalmente en las reacciones de pardeamiento no enzimático ó de Maillard.

**1.7.2. Reacciones de Maillard:** Las reacciones de Maillard fueron originalmente observadas por el químico francés Louis Camille Maillard en 1912<sup>(12)</sup>, quién las describió como el pardeamiento que ocurría en las disoluciones acuosas de azúcar cuando eran calentadas en presencia de aminoácidos. Con base a ello, posteriormente se ha denominado reacción de Maillard, a los fenómenos observados como consecuencia de las interacciones entre glúcidos reductores y proteínas; sin embargo, no fue sino hasta 1953 cuando Hodge<sup>(34)</sup> planteó el mecanismo de las complejas interacciones que inducen a esta clase de pardeamiento no enzimático.

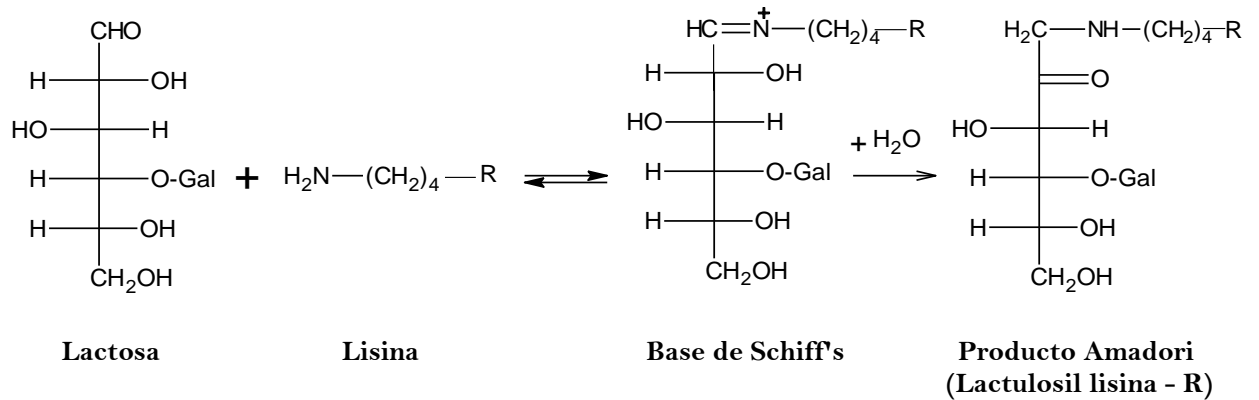
Los mecanismos químicos de la reacción de Maillard han sido ampliamente descritos por varios autores, según los cuales, el desarrollo de esta reacción presenta 7 tipos de reacciones diferentes que pueden ser clasificadas, con base a tres fases de desarrollo: primera, intermedia y final<sup>(13)</sup>. Para éste caso, se describe el transcurso de la reacción de Maillard en la leche, donde las relativamente altas concentraciones de lactosa y lisina, la hacen especialmente sensible a ésta reacción de pardeamiento no enzimático, cuando se induce un tratamiento térmico<sup>(35)</sup>.

- En la primera fase, la molécula de lactosa forma una base de Schiff's con el grupo amino de la lisina, la cual es transformada en Lactulosil lisina-R, vía reareglo de Amadori<sup>(13)</sup>. Este producto de Amadori es poco estable mientras las condiciones no sean tan drásticas ó el tiempo de reacción sea corto<sup>(13)</sup>.

En la Figura No. 4 se muestra la formación del complejo de adición, denominado producto de Amadori.



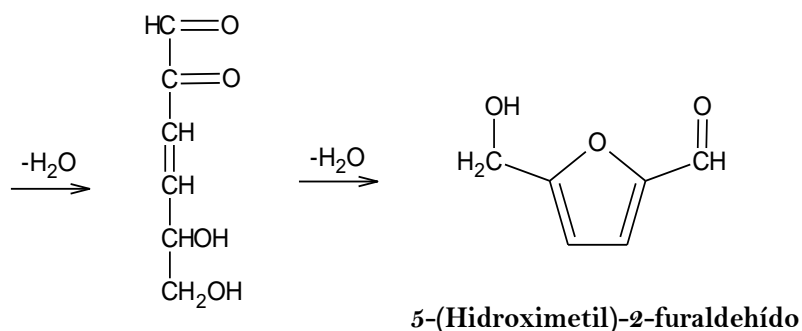
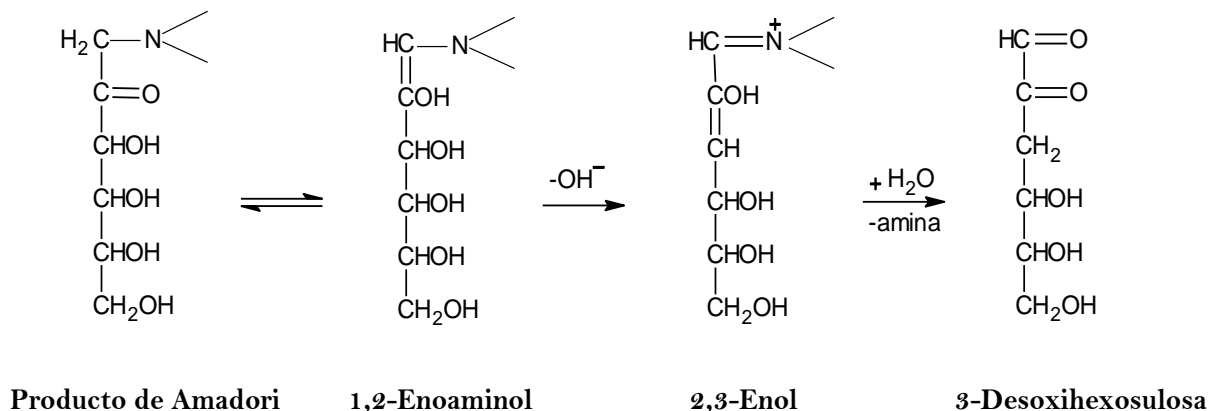
**FIGURA No. 4:** Primera fase de la reacción de Maillard. Formación del producto de Amadori.



- En la fase intermedia, el producto de Amadori Lactulosil lisina-R, mediante reacciones de deshidratación e isomerización, se transforma en una glucosamina N-sustituida (3-Desoxihexosulosa). La 3-Desoxihexosulosa se descompone por escisión o por deshidratación, a partir de tres rutas principales: **1)** En condiciones ácidas donde hay deshidratación y ciclación de las hexosas y las pentosas que inducen a la producción del mencionado HMF, **2)** En condiciones alcalinas y **3)** Mediante la degradación térmica del derivado de Amadori en forma directa. Bajo condiciones ácidas, el grupo amino de la lactulosil lisina-R es protonado, y la 1,2 enolización a través de la 3-Desoxihexosulosa conduce al HMF. Además, la degradación ácida catalizada de la lactosa a HMF, también procede vía 3-Desoxihexosulosa<sup>(36)</sup>.

En la Figura No. 5 se muestra la fase intermedia de la reacción de Maillard, donde se forma el HMF.

**FIGURA No. 5:** Fase intermedia de la reacción de Maillard. Formación del HMF.



- En la fase final, tiene lugar la formación de polímeros coloreados denominados melanoidinas, que resultan de la combinación de diversos compuestos con grupos carbonilos y aminoácidos que aparecen en esta etapa de la reacción. Por condensaciones y polimerizaciones progresivas, la cadena de reacciones conduce a la precipitación gradual de las melanoidinas<sup>(13)</sup>.

Por lo tanto, existen dos vías principales de formación del HMF cuando los azúcares como la lactosa, son calentados en solución: **1)** Vía los productos de Amadori de la reacción de Maillard a través de la enolización (en presencia del grupo amino) y **2)** Vía isomerización y degradación de la lactosa, conocida como la transformación de Lobry de Bruyn-Alberda Van Ekenstein<sup>(37)</sup>, donde se forma otro indicador del deterioro térmico de la leche, la lactulosa.

## 1.8. CATALIZADORES DE LA REACCIÓN DE MAILLARD

La reacción de pardeamiento no enzimático ó de Maillard no se desarrolla siempre de la misma forma, y tanto su velocidad como los productos finales que de ella se obtienen dependen de numerosos factores; los más importantes son: **a)** la temperatura, **b)** la actividad del agua, **c)** el pH y **d)** la composición del alimento, dentro de éste último factor se destacan el contenido y la naturaleza de los azúcares, de los aminoácidos y proteínas y el contenido de metales<sup>(12)</sup>.

**a) Temperatura y duración del tratamiento:** Bajo las mismas condiciones, la temperatura de tratamiento es el factor que más influye sobre la velocidad de la reacción de Maillard. En general, un aumento de la temperatura de tratamiento provoca un aumento en la velocidad de la reacción, incluso en ausencia de catalizadores amino. La duración del tratamiento influye en el número y diversidad de los productos finales de la reacción<sup>(12)</sup>.

**b) Actividad del agua:** A valores altos de actividad acuosa ( $a_w$ ) la velocidad de la reacción de Maillard es baja debido a que los reaccionantes se encuentran diluídos en el agua del medio; a valores de  $a_w$  bajos, como en los alimentos sólidos la reacción se ralentiza debido a la reducida movilidad de los reaccionantes. Por lo tanto, la velocidad de reacción es máxima cuando la actividad del agua se encuentra en el rango intermedio de 0,6-0,7<sup>(12)</sup>.

**c) pH:** El efecto del pH sobre el pardeamiento de Maillard es muy significativo, verificándose muy poco ó prácticamente ningún pardeamiento en soluciones de pH 6 ó inferior. El mayor descenso del nitrógeno amínico ocurre en soluciones de pH 7,8-9,2<sup>(24)</sup>.

**d) Composición del alimento: 1) Naturaleza del azúcar:** El efecto de la estructura del azúcar sobre el grado de pardeamiento no enzimático fue ya

observado por Maillard. Así, demostró que el grado de pardeamiento alcanzado por los azúcares comunes decrece en el orden D-xilosa > L-arabinosa > hexosas (D-galactosa, D-manosa, D-glucosa, D-fructosa) > disacáridos (maltosa, lactosa, sacarosa). La D-fructosa es mucho menos reactiva que las aldosas, a causa del diferente mecanismo que sufren las cetosas<sup>(24)</sup>. **2) Contenido de metales:** Específicamente el cobre, hierro y algunas sales favorecen la velocidad de la reacción de Maillard, siendo el Fe (III) más efectivo que el Fe (II), por su parte el ión sodio no ejerce ningún efecto. La catálisis del pardeamiento no enzimático por iones metálicos sugiere que las últimas fases de la reacción de Maillard, tal vez aquellas que contribuyen a la formación de pigmentos, son reacciones de oxidación-reducción<sup>(24)</sup>.

#### **1.9. PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE MAILLARD. HIDROXIMETILFURFURAL (HMF).**

Dentro de los diversos productos formados durante la reacción de Maillard, se encuentra el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF), derivados furánicos que se encuentran entre los más estudiados en los alimentos que son sometidos a tratamientos térmicos. El furfural se origina principalmente durante la deshidratación de las pentosas, mientras que el HMF es un producto de la degradación de las hexosas<sup>(33)</sup>.

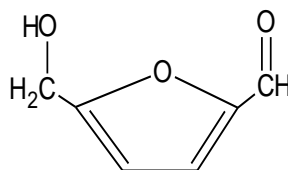
La formación de derivados furánicos como el HMF, tiene lugar en la fase intermedia de la reacción de Maillard, lo que implica la eliminación del grupo amino del derivado 1-amino-2-desoxi-2-cetosa a través de reacciones de deshidratación, ciclación, fragmentación o condensación<sup>(38)</sup>, como se mostró anteriormente en la Figura No. 5.

Un aspecto importante que se deriva de las vías de formación del HMF, es que se ha designado como «HMF libre», al formado directamente durante el tratamiento

térmico de los alimentos, en su procesado y posterior almacenamiento y como «HMF total», el que se forma por calentamiento con el ácido.

El HMF formado es un compuesto orgánico moderadamente reactivo, cristalino, inicialmente incoloro y con un olor agradable, pero por una subsiguiente oxidación produce pigmentos amarillos. Algunas de sus propiedades físicas son: Punto de ebullición de 115°C, punto de fusión de 35°C, densidad a 25°C de 1,2062 g/cm<sup>3</sup>, índice de refracción de 1,5927 y una masa molecular de 126,11 g/mol. Es soluble en agua, metanol, etanol, dietil éter, benceno, acetona, acetato de etilo y dimetilformamida<sup>(38)</sup>. En la Figura No. 6 se muestra la estructura química del HMF.

**FIGURA No. 6:** Estructura química del Hidroximetilfurfural.



Hidroximetilfurfural

El HMF que ha sido identificado en una amplia variedad de alimentos sometidos a procesos de calentamiento o almacenamiento inapropiado y prolongado, es considerado un reconocido indicador del tratamiento térmico y del curso de la reacción de Maillard, siendo un intermediario ó producto final.

Cuando un aminoácido o parte de una cadena proteica sufre este tipo de reacción, se produce evidentemente una pérdida de esas moléculas desde el punto de vista nutricional; ello, es especialmente importante en el caso de los aminoácidos esenciales, en los cuales la lisina, con su grupo ε-amino libre, es el más susceptible de reaccionar<sup>(13)</sup>.

Por su parte, los productos lácteos son muy susceptibles al pardeamiento no enzimático durante todos los tratamientos térmicos a los que se someten. Esto se debe básicamente a su alto contenido de lactosa y de lisina. A pesar de que la lactosa es un reductor débil, puede interaccionar con la lisina presente en las proteínas de la leche durante el almacenamiento por 30 días a 35°C<sup>(39)</sup>.

**1.9.1. Métodos de Análisis del Hidroximetilfurfural (HMF):** El HMF ha sido analizado mediante varios procedimientos analíticos entre los que se encuentran principalmente, los colorimétricos, espectrofotométricos y cromatográficos; sin embargo, muchos de estos métodos necesitan de una etapa de preparación, dependiendo del tipo de muestra y especificidad del método.

Inicialmente, la limpieza de las muestras puede llevarse a cabo con una simple dilución, este es el caso de muestras como licores, café, jugos de frutas y mieles, que han sido analizadas solamente con una etapa previa de filtración<sup>(38)</sup>; por otra parte, las muestras que contienen proteínas o partículas sólidas tales como leche, pastas de tomate y concentrados de frutas, requieren de una clarificación seguida de una centrifugación o filtración<sup>(38)</sup>; el método más comúnmente usado ha sido el implementado desde 1979 por White<sup>(40)</sup>, que consiste en adicionar Carrez I (ferrocianuro de potasio) y Carrez II (sulfato de zinc) como agentes clarificantes.

Cuando las soluciones de Carrez son adicionadas a la muestra, se forma un precipitado que retiene las proteínas y el material insoluble; luego se lee la absorbancia del sobrenadante a 284 nm. Este método espectrofotométrico directo fue adoptado por la AOAC, desde 1983 para la determinación de HMF en miel<sup>(6)</sup>. Sin embargo, estas soluciones también han sido utilizadas en muestras de jugos y leche<sup>(38)</sup>.

A continuación, se describen otros de los métodos empleados para determinar el HMF.

- **Métodos Colorimétricos:** Desde 1959, Kenney y Bassette<sup>(41)</sup> implementaron un método colorimétrico para determinar el HMF. En este método, el HMF reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y *p*-toluidina, para formar un compuesto de color rojizo cuya densidad óptica se puede medir a 550nm. Sin embargo, este método tiene ciertas desventajas:
  - No es muy específico.
  - Presenta interferencias para los alimentos fuertemente coloreados (además de que los productos coloreados formados en las reacciones son inestables y también dependen de factores como la temperatura entre otros parámetros).
  - Existe variabilidad del color con la edad de los reactivos.
  - Uso de compuestos tóxicos como son las aminas aromáticas.
  
- **Métodos Espectrofotométricos:** Danehy y otros<sup>(42)</sup>, han aplicado métodos espectrofotométricos indirectos donde el HMF reacciona con tiosemicarbazida para formar la correspondiente tiosemicarbazona, la cual tiene intensas bandas de absorción a 322nm. La reacción ocurre a 100°C bajo reflujo por 15 minutos.

El método presenta la ventaja de ser simple y sensible pero tiene la desventaja de mostrar interferencia, con respecto a las bandas de absorción que presentan otros componentes del alimento, como por ejemplo el ácido ascórbico, cuyo efecto puede suprimirse por acidificación a pH 1,0. Con éste método, se han encontrado niveles de HMF alrededor de 0,5-2,5 mg/L, con porcentajes de recuperación del 88%<sup>(42)</sup>. Estos métodos espectrofotométricos modificados, han sido empleados para el análisis de HMF en mieles, jugos de frutas, licores, caramelos, leche y productos lácteos<sup>(38)</sup>.

- **Métodos Cromatográficos:** Un método específico y sensible también está disponible, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) en fase reversa. Dicha técnica ha sido aplicada para la determinación de HMF en alimentos

como la miel<sup>(14),(15)</sup>, los jugos de frutas<sup>(16)</sup>, la leche<sup>(2),(13)</sup>, fórmulas infantiles<sup>(4),(5),(17),(18),(19)</sup>, pastas de tomate<sup>(43)</sup> y cerveza<sup>(20)</sup>, entre otros; esta técnica a pesar de ofrecer una gran especificidad y sensibilidad, representa mayores costos<sup>(3)</sup>.

Otra técnica promisoría empleada para la determinación de HMF en jugos de frutas y miel, es la cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC), que ofrece una muy alta resolución y utiliza el 2-furoilmetil-cetona como estándar interno<sup>(44)</sup>.

La cromatografía de gases (CG), ha sido poco empleada para el análisis de HMF y otros derivados furánicos en alimentos. Sin embargo, estos compuestos han sido determinados de muestras de vinos y leche UHT y semidescremada, usando n-octanol como estándar interno<sup>(39)</sup>.

**1.9.2. Espectrofotometría Ultravioleta-Visible:** La espectrofotometría ultravioleta-visible estudia la interacción de la sustancia con la radiación electromagnética en un determinado intervalo de longitudes de onda. En los últimos años, gracias al desarrollo de nuevos equipos registradores, se ha extendido la aplicación de la espectrofotometría para el análisis cuantitativo y en la cinética química. Esta técnica permite controlar el grado de pureza de la sustancia a investigar, además de que se puede usar para la identificación y determinación de la estructura de distintos compuestos, mediante la interpretación de su espectro<sup>(45)</sup>.

El equipo empleado para medir la absorbancia de la luz se denomina espectrofotómetro. La luz de una fuente continua pasa a través de un monocromador, el cual selecciona una banda estrecha de longitudes de onda del haz incidente; esta luz monocromática atraviesa la muestra y se mide así la potencia de la luz que sale<sup>(46)</sup>.



El espectrofotómetro consta de un detector, cuya propiedad general es su capacidad para producir una señal eléctrica cuando son bombardeados por fotones. La respuesta de la mayoría de estos detectores dependen de la longitud de onda de los fotones incidentes<sup>(46)</sup>. Los detectores más ampliamente utilizados son fototubos, tubos fotomultiplicadores, fotodiodos de silicio y celdas fotovoltaicas<sup>(47)</sup>.

La curva que refleja la intensidad de la absorción en función de la longitud de onda, se llama espectro de absorción. En él se destacan las bandas aisladas o los picos de absorción, que se caracterizan por una determinada intensidad de absorción, longitud de onda y por la propia forma de la banda de absorción<sup>(45)</sup>.

Las aplicaciones cualitativas de la espectrofotometría ultravioleta-visible son limitadas, ya que el espectro de la mayoría de los compuestos en solución consta de uno o de unos pocos picos amplios sin estructura fina, que podrían ser requeridos para su identificación precisa. Sin embargo, este método es uno de los más utilizados para el análisis cuantitativo. Entre las características importantes de la espectrofotometría cuantitativa ultravioleta-visible están su amplia aplicabilidad en sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos, buena sensibilidad, límites de detección de  $10^{-4}$  a  $10^{-7}$  M, selectividad de moderada a elevada, exactitud y precisión razonables (errores relativos en el intervalo de 1 a 3%), rapidez y conveniencia. Además, los métodos espectrofotométricos se pueden automatizar fácilmente<sup>(48)</sup>.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar la técnica de espectrofotometría ultravioleta visible para la determinación y cuantificación de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído en leches comerciales.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar una técnica espectrofotométrica para la determinación y cuantificación de hidroximetilfurfural en leche entera, fortificada, descremada, semidescremada y deslactosada.
- Establecer diferentes parámetros que sirvan como criterio de confianza del método espectrofotométrico para la cuantificación de hidroximetilfurfural.
- Realizar el tratamiento estadístico adecuado para garantizar la confiabilidad de los resultados y su aplicación a estudios posteriores.
- Determinar la composición nutricional aproximada de las leches comerciales, mediante pruebas químicas de caracterización.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE VIDRIO

La metodología de este trabajo se desarrolló empleando reactivos y solventes grado analítico para llevar a cabo los procesos de caracterización fisicoquímica, extracción y determinación de HMF por espectrofotometría UV-Vis en leches comerciales. En la siguiente sección se listan los equipos, reactivos y material de vidrio empleados para las diferentes determinaciones.

##### 3.1.1. Equipos

- Balanza analítica, METTLER AE 200 (200g±0,0001g)
- Baño maría, ISOTEMP 205, FISCHER SCIENTIFIC (25-100°C)
- Centrífugadora, Dr. N. GERBER, K-56<sup>a</sup> (1.380rpm)
- Centrífugadora, HERMLE Z 200A (6.000rpm)
- Equipo de digestión, BUCHI K-424
- Equipo de destilación, BUCHI K-314
- Espectrofotómetro Ultravioleta-visible, THERMO GENESYS 6
- Espectrofotómetro Ultravioleta-visible, INTRALAB DMS-100
- Horno, WTB BINDER (0-230°C)
- Horno de calcinación, TERRIGENO D-8 (25-1.200°C)
- Nevera, HACEB
- Planchas, CORNING PC-420 (Temperatura: 25-550°C; agitación: 60-1.100rpm)
- pH-metro, METTLER TOLEDO 8603 con electrodo, MT INLAB 413
- Vortex, THERMOLYNE M37615

### 3.1.2. Reactivos

- Acetato de sodio, 99%, MERCK
- Ácido acético glacial, 99,8%, MERCK
- Acido bórico, comercial
- Ácido clorhídrico, 37%, MERCK
- Ácido sulfúrico, 96%, MERCK
- Ácido sulfúrico para Gerber, 91%, MERCK
- Alcohol amílico, 99,5%, MALLINCKRODT
- Alcohol etílico absoluto, 99,8%, CARLO ERBA
- Azul de metileno, MERCK
- Bicarbonato de sodio, 99%, FISCHER SCIENTIFIC
- Carbonato de sodio, 99,9%, MERCK
- Catalizador para proteína:  $K_2SO_4$ , 99%;  $CuSO_4$ , 98%;  $TiO_2$ , 99%  
(10g:0,3g:0,3g)
- Dicromato de potasio, 98%, CARLO ERBA
- Fenolftaleína, CARLO ERBA
- Ferrocianuro de potasio trihidratado, 99%, CARLO ERBA
- Hidróxido de potasio, 98%, CARLO ERBA
- Hidróxido de sodio, 98%, CARLO ERBA
- 5-Hidroximetil-2-furaldehído, 99%, ALDRICH
- Leche cruda
- *p*-nitrofenilortofosfato disódico, 98%, MERCK
- Rojo de metilo, CARLO ERBA
- Sulfato de zinc heptahidratado, 99 %, MALLINCKRODT

### 3.1.3. Material de vidrio y plástico

- Algodón
- Balones aforados de 25 y 10mL
- Beaker de 600 y 100mL
- Butirómetros, Dr. N. GERBER, Escala 0-8%
- Crisol de porcelana
- Desecador
- Erlenmeyer de 100mL y 250mL
- Lactodensímetro, ASSISTENT (15-40 grados lactodensímetros; 0-30°C)
- Microbureta de 10mL
- Pipeta aforada de 11mL Gerber
- Pipetas aforadas de 10, 5, 2 y 1mL
- Pipeta graduada de 10mL
- Probeta de 250mL
- Termómetro (0-400°C)
- Tubos para centrifugar de 15mL, CORNING
- Tubos Kjeldahl de 250mL
- Viales de vidrio ámbar de 30mL
- Viales de vidrio de 250mL

### 3.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación, se describe la preparación de las soluciones utilizadas en las determinaciones.

- **Solución de azul de metileno:** En un vaso de precipitados, se disolvió aproximadamente 0,012g de azul de metileno con 7mL de etanol al 99,8% hasta saturación y luego se diluyeron 5mL de ésta solución saturada en 195mL de agua destilada.

- **Solución tampón de carbonato-bicarbonato:** En un vaso de precipitados, se disolvieron 0,35g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro y 0,151g de  $\text{NaHCO}_3$  con agua destilada y se aforó hasta 100mL.
- **Solución de *p*-nitrofenilortofosfato disódico al 0,15%(p/v):** En un vaso de precipitados, se disolvió 0,153g de *p*-nitrofenilortofosfato disódico al 98% en 10mL de la solución tampón de carbonato-bicarbonato y se aforó con ésta solución hasta 100mL.
- **Solución indicadora de tashiro:** En un vaso de precipitados, se disolvieron 0,2g de rojo de metilo y 0,1g de azul de metileno con etanol al 99,8%, hasta completar un volumen de 100mL.
- **Solución de fenoltaleína al 1%(p/v):** En un vaso de precipitados, se disolvió 1g de fenoltaleína con etanol al 99,8%, hasta completar un volumen de 100mL.
- **Solución de ácido bórico al 4%(p/v):** 40g de ácido bórico comercial, se disolvieron con 250mL de agua destilada en un vaso de precipitados; para ello, fue necesario calentar la solución en una plancha de calentamiento a una temperatura alrededor de 35°C, se dejó enfriar y se aforó hasta 1L.
- **Solución de hidróxido de sodio al 30%(p/v):** En un vaso de precipitados, se disolvieron 300g de NaOH al 98% con agua destilada y se aforó hasta 1L.
- **Ácido clorhídrico 0,1N:** En un vaso de precipitados, se disolvió un volumen de 2mL de HCL al 37% con agua destilada y se aforó hasta 250mL.
- **Hidróxido de sodio 0,1N:** En un vaso de precipitados, se disolvió una cantidad de 1,02g de NaOH al 98% con agua destilada y se aforó hasta 250mL.
- **Hidróxido de potasio 0,06M:** En un vaso de precipitados, se disolvió una cantidad de 0,342g de KOH al 98% con agua destilada y se aforó hasta 100mL.

- **Solución madre de dicromato de potasio de 50ppm:** En una caja de petri, se adicionó aproximadamente 1g de  $K_2Cr_2O_7$  al 98% y se secó en el horno durante 2 horas a  $110^{\circ}C$ ; transcurrido el tiempo, se sacó del horno y se dejó enfriar en un desecador. Se pesó 0,0051g de este reactivo y se disolvió en un vaso de precipitados con la solución, de KOH 0,06M y se aforó hasta 100mL. A partir de esta solución, se prepararon soluciones patrón de  $K_2Cr_2O_7$  de 4, 8, 16, 24 y 32ppm.
- **Soluciones patrón de dicromato de potasio de 4, 8, 16, 24 y 32ppm:** En un vaso de precipitados, se disolvieron volúmenes de 2, 4, 8, 12 y 16mL de la solución de  $K_2Cr_2O_7$  de 50ppm con la solución de KOH 0,06M y se aforó con ésta solución hasta 25mL.
- **Solución de ferrocianuro de potasio trihidratado al 15%(p/v):** 15,2g de  $[K_4Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ , se disolvieron en un vaso de precipitados con agua destilada y se aforó hasta 100mL.
- **Solución de sulfato de zinc heptahidratado al 14,4%(p/v):** 14,5g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , se disolvieron en un vaso de precipitados con agua destilada y se aforó hasta 100mL.
- **Solución madre de HMF de 50mg/mL:** 2,52g de HMF al 99%, se disolvieron en un vaso de precipitados con agua destilada y se aforó a 50mL; a partir de esta solución, se prepararon 10 mL de soluciones patrón de HMF de 0,039, 0,051, 0,065, 0,077, 0,116, 0,154, 0,194, 0,232mg/mL. Estas soluciones de trabajo se protegieron de la luz, envolviéndose con papel aluminio.

### 3.3. RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de leche objeto de este estudio, se adquirieron directamente de los diferentes supermercados de la ciudad de Popayán en junio del 2006. La

selección se realizó aleatoriamente, teniendo en cuenta el cubrir la amplia variedad de leches disponibles en el mercado. Se seleccionaron 21 tipos de leche ultrapasteurizada (UHT) en envase Tetrapak (caja), con una fecha de vencimiento entre 5 y 6 meses, especificadas a continuación:

- 1 Leche UHT entera
- 2 Leches UHT enteras, enriquecidas con vitaminas y minerales.
- 2 Leches UHT semidescremadas.
- 5 Leches UHT semidescremadas, enriquecidas con vitaminas y minerales.
- 1 Leche UHT semidescremada, enriquecida con fibra.
- 3 Leches UHT semidescremadas, deslactosadas.
- 1 Leche UHT descremada.
- 1 Leche UHT descremada, enriquecida con vitaminas y minerales.
- 2 Leches UHT descremadas, enriquecidas con fibra.
- 1 Leche UHT descremada, deslactosada, enriquecida con vitaminas y minerales.
- 2 Leches UHT descremadas, deslactosadas.

Una vez adquiridas, se transportaron en el menor tiempo posible al Laboratorio de Alimentos de la Unidad de Análisis Industriales de la Universidad del Cauca, donde fueron envasadas en frascos de vidrio, rotuladas y refrigeradas en la nevera, para las posteriores pruebas de caracterización y análisis.

De igual forma se envasó, rotuló y congeló en un frasco ámbar, aproximadamente 30mL de cada leche, destinada para realizar la determinación y cuantificación del HMF.



### 3.4. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FISICOQUÍMICA DE LAS LECHES COMERCIALES

A las muestras debidamente envasadas y rotuladas, se les determinaron parámetros microbiológicos como: la prueba de la reductasa ó azul de metileno y la fosfatasa y fisicoquímicos como: acidez, densidad, grasa, extracto seco total, extracto seco desengrasado, pH, cenizas y proteína. Para ello, se siguió la metodología descrita en los Métodos Oficiales de Análisis de la AOAC Internacional, implementados y estandarizados en la Unidad de Análisis Industriales-Sección alimentos del Departamento de Química de la Universidad del Cauca. Cada ensayo se realizó por triplicado.

**3.4.1. Calidad higiénica mediante métodos indirectos:** Estos ensayos permiten evaluar la cantidad de bacterias presentes en la leche, derivadas del grado de tratamiento térmico al que fue sometida, con el objeto de establecer si cumplen con los parámetros de calidad higiénica establecidos por la reglamentación<sup>(30)</sup>. Algunas de estas pruebas son:

**3.4.1.1. Reductasa ó azul de metileno:** En un tubo de ensayo se adicionaron 10mL de leche y 1mL de la solución de azul de metileno; se agitó suavemente hasta conseguir homogeneidad completa y se tapó con un algodón. Posteriormente, se colocó el tubo en baño maría a 37°C y se observó cada 30 minutos. Como criterio de comparación, se utilizó un tubo control que contenía 40mL de la muestra y 1mL de agua destilada, el cual se sumergió en agua hirviente durante 5 minutos. El tubo de control y los tubos que contenían la muestra, se dejaron sumergidos durante 7 horas.

Para realizar la interpretación de la prueba, esta se basó en el tiempo de viraje ó reducción del azul de metileno<sup>(31)</sup>:

- Leche muy mala: Si no se conserva el color por más de 20 minutos.
- Leche mala: Si se conserva el color de 20 minutos a 2 horas.
- Leche calidad mediana: Si conserva el color de 2 a 5 ½ horas.
- Leche primera calidad: Si conserva el color más de 5 ½ horas.

**3.4.1.2. Fosfatasa:** A cada uno de dos tubos de ensayo, se les adicionó 5mL de la solución de *p*-nitrofenilortofosfato disódico al 0,15%, se taparon con algodón y se colocaron en un baño maría a 37°C durante 5 minutos. Después de este tiempo, se agregó al primer tubo 1mL de muestra y al segundo 1mL de leche cruda para utilizarla como testigo. Para incubar, los tubos se sumergieron nuevamente en el baño maría a 37°C durante 2 horas; finalizado el tiempo, se observó si el color blanco inicial permaneció inalterado o si hubo desarrollo de un color amarillo intenso en uno ó ambos tubos, lo cual indicaría la presencia de la enzima activa.

**3.4.2. Fisicoquímicos:** Las determinaciones que se realizan comúnmente en el análisis químico de leche, permiten determinar su composición nutricional y comprobar si sus valores responden a las características de composición genuina, para poner al descubierto posibles alteraciones, adulteraciones ó fraudes<sup>(23)</sup>. Entre estas determinaciones se encuentran:

**3.4.2.1. Acidez:** A 10mL de muestra de leche se le adicionaron 2mL de solución alcohólica de fenolftaleína al 1% y se tituló con una solución estandarizada de hidróxido de sodio 0,1N hasta obtener una coloración ligeramente rosada, que permaneció durante aproximadamente un minuto. Los resultados se expresaron como porcentaje (p/v) de ácido láctico según la ecuación 1.

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \frac{V \times N \times F}{V_m} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde,

V = Volumen en Litros de NaOH gastado en la titulación

N = Normalidad del NaOH

F = Factor de conversión a ácido láctico (1 equivalente-g NaOH  $\equiv$  1 equivalente-g ácido láctico) x 90,08g ácido láctico

V<sub>m</sub> = Volumen en mililitros de muestra titulado

**3.4.2.2. Densidad:** En una probeta se vertieron suavemente 200mL de leche, evitando la formación de espuma; se dejaron 2 minutos en reposo hasta que se estabilizó la temperatura a 15°C. Luego, se sumergió el lactodensímetro girándolo de tal forma que ocupara la parte central del líquido y se determinó la densidad.

➤ Si la lectura de la temperatura de la leche, es inferior a la temperatura de referencia (15°C), la corrección se realiza restando 0,2 a los grados lactodensímetros leídos por cada grado centígrado por debajo de la temperatura de referencia, según la ecuación 2, y por el contrario si la temperatura de la leche es superior, la corrección se realiza sumando 0,2, como se indica en la ecuación 3

Grados lactodensímetros corregidos = °C leídos - 0,2 (15°C - °C leídos) **(Ecuación 2)**

Grados lactodensímetros corregidos = °C leídos + 0,2 (°C leídos - 15°C) **(Ecuación 3)**

**3.4.2.3. Grasa:** En un butirómetro se adicionaron 10mL de ácido sulfúrico para Gerber, 11mL de la muestra de leche y 1mL de alcohol amílico, se taparon con el tapón hermético y se agitaron inicialmente de forma suave y luego más fuerte con el fin de mezclar muy bien los reactivos con la muestra. Posteriormente, los butirómetros con el tapón hacia abajo fueron colocados en un baño de agua a 65°C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, se retiraron del baño y fueron

centrifugados por 10 minutos, para después llevarlos de nuevo al baño de agua por 5 minutos para lograr la separación de la grasa. Ya fríos, se realizó la lectura directa del espesor de la capa de grasa, haciéndola coincidir con el cero de la escala del butirómetro mediante el ajuste del tapón de cierre.

**3.4.2.4. Extracto seco (ES):** El extracto seco, constituye el residuo remanente que queda después de la evaporación de las materias volátiles de la leche a la temperatura de ebullición del agua. Se calculó con la ecuación 4.

$$\%ES = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 + \%G \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Donde,

ES = Extracto seco

$\rho$  = Densidad

%G = Porcentaje de materia grasa

**3.4.2.5. Extracto seco desengrasado (ESD):** Se calculó aplicando la ecuación 5.

$$\%ESD = 250(\rho - 1) + 0,2(\%G) + 0,14 \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Donde,

ESD = Extracto seco desengrasado

$\rho$  = Densidad

%G = Porcentaje de materia grasa

**3.4.2.6. pH:** En un vaso de precipitados, se midieron alrededor de 50mL de leche; se introdujo el electrodo de un pH-metro previamente calibrado y se determinó la lectura de pH en forma directa.

**3.4.2.7. Cenizas:** En un crisol con tapa previamente tarado, se pesó 1mL de leche y se llevó hasta sequedad en la estufa a 100°C. Luego, los crisoles se dejaron enfriar en un desecador y después se colocaron en una mufla donde se calcinaron a 550°C durante 2 horas. Posteriormente, se disminuyó la temperatura de la mufla hasta 60°C y cuando se alcanzó esa temperatura los crisoles se sacaron. Una vez enfriados en el desecador, se pesaron. Para determinar el contenido de cenizas se utilizó la ecuación 6.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{W_c}{W_m} \times 100 \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde,

$W_c$  = Peso de las cenizas en gramos

$W_m$  = Peso de la leche en gramos

**3.4.2.8. Proteína:** A un tubo de digestión Kjeldahl, se agregó 1mL de leche, 1g de catalizador para proteína ( $K_2SO_4/CuSO_4/TiO_2$ ) y 9mL de ácido sulfúrico concentrado; seguidamente se calentó la muestra en el equipo de digestión BUCHI durante 3 horas, hasta que quedó completamente clara. Terminada la digestión, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se les adicionaron unas gotas de fenolftaleína hasta obtener una coloración naranja y se instalaron en el destilador BUCHI, en donde se les agregó directamente 50mL de hidróxido de sodio al 30% (hasta que apareció una coloración azul tenue que se obtiene al finalizar la reacción), liberando así el amoníaco, el cual se destiló por arrastre de vapor y fue recogido en 100mL de ácido bórico al 4% que contenía 3 gotas del indicador de tashiro. Se destiló hasta obtener una coloración verde y un volumen final de 250mL. La solución se tituló con ácido clorhídrico 0,095N estandarizado, hasta la aparición de una coloración violeta. Paralelamente se montó un blanco (catalizador y ácido sulfúrico concentrado) en las mismas proporciones y bajo las mismas condiciones de la muestra. El contenido de nitrógeno y proteína, se determinó de acuerdo a las ecuaciones 7 y 8.

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V \times N \times F}{Wg} \times 100 \quad \text{(Ecuación 7)}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ nitrógeno} \times 6,38 \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Donde,

V = Volumen en Litros de HCl gastado en la titulación

N = Normalidad del ácido

F = Factor de conversión a gramos de nitrógeno (1 equivalente-g HCL  $\equiv$  1 equivalente-g N<sub>2</sub>) x 14g N<sub>2</sub>

Wg = Peso en gramos de muestra

### **3.5. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-Vis**

**3.5.1. Calibración de los espectrofotómetros UV-Vis:** Para la calibración de los espectrofotómetros UV-Vis THERMO GENESYS 6 (equipo G) e INTRALAB DMS-100 (equipo D), se midió la absorbancia de las soluciones patrón de 4, 8, 16, 24 y 32 ppm de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a una longitud de onda de 373nm, empleando como blanco KOH 0,06M; con estos datos, se construyó una curva de calibración. Adicionalmente para el equipo D, se realizó un barrido desde una longitud de onda de 275 a 750nm con la celda de óxido de holmio.

La calibración de los espectrofotómetros se realizó mensualmente, y cada vez que se realizaron lecturas de muestras ó de patrones, se introdujeron por lo menos, dos estándares de concentración conocida, para chequear el equipo.

**3.5.2. Elección de la longitud de onda:** Antes de realizar la lectura de absorbancia de las muestras de leche, se seleccionó la longitud de onda

adecuada para el análisis. Para ello, se prepararon soluciones patrón de HMF de concentraciones 0,039, 0,116, 0,154 y 0,194 mg/mL y se les hizo el correspondiente barrido desde una longitud de onda de 190 a 900nm.

**3.5.3. Método de cuantificación:** La cuantificación de HMF se realizó por el método de curva de calibración, con patrones de concentración de 0,039, 0,077, 0,116, 0,154, 0,194 y 0,232 mg/mL para ambos espectrofotómetros. Con el espectro de cada solución, se graficó la absorbancia versus la concentración de las soluciones patrón. Finalmente, se registró el espectro de las muestras en las mismas condiciones experimentales. La concentración del analito se determinó a partir del valor medido de la absorbancia de la muestra y de la curva de calibración, empleando el método de los mínimos cuadrados<sup>(46)</sup>.

### **3.6. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE HMF**

Esta etapa se desarrolló con el fin de obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterio de confianza del método analítico; estos fueron: linealidad, precisión (repetitividad y reproducibilidad), sensibilidad (límite de detección y de cuantificación) y exactitud (porcentaje de recuperación). Esta estandarización fue realizada para los equipos G y D.

**3.6.1. Linealidad:** Cada solución patrón de HMF, se midió 5 veces y a partir de los datos obtenidos de la absorbancia y sus respectivas concentraciones, se trazó la curva de calibración correspondiente.

**3.6.2. Precisión:** Con el fin de observar el grado de concordancia entre los datos individuales y la repetitividad de la técnica, cada patrón de la curva y una muestra

de leche (PEFeV) se midieron 5 veces, determinándose la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (DSR).

Para determinar la repetibilidad del método completo, tres soluciones patrón de HMF de concentración 0,039, 0,051, 0,065mg/mL y la muestra de leche UHT (PEFeV), fueron analizadas durante 10 días consecutivos.

**3.6.3. Sensibilidad:** Para calcular el LD y el LC<sup>(49)</sup>, se prepararon tres soluciones patrón de HMF de concentración 0,039, 0,051 y 0,065mg/mL, las cuales fueron diferentes a las utilizadas para la curva de calibración ya establecida y a cada una se le leyó la absorbancia, midiéndola 10 veces y de ésta manera se calculó la mínima concentración de HMF detectable y cuantificable por el método espectrofotométrico.

**3.6.4. Exactitud:** La exactitud del método se calculó evaluando la recuperación porcentual de HMF, al adicionar cantidades conocidas de un patrón de HMF de concentración 1,0mg/mL a un patrón de 0,039mg/mL y a una muestra de leche UHT (PEFeV).

### **3.7. ESTABILIDAD DEL HMF**

Para definir la estabilidad del HMF con el método empleado, se prepararon tres soluciones patrón de concentración 0,039, 0,051 y 0,065mg/mL y una muestra de leche UHT (PEFeV). Se guardaron en la nevera durante 10 días y cada día se realizó la lectura de la absorbancia a 285nm, para ambos casos.



### **3.8. EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO DE HMF EN LECHE**

Para la extracción de HMF, 2mL de leche fueron aforados a 25mL con agua destilada. En un tubo para centrifugar CORNING con capacidad de 15mL, se adicionaron 5mL de la solución anterior y 0,5mL de la solución de Carrez I (ferrocianuro de potasio trihidratado al 15%) y 0,5mL de la solución de Carrez II (sulfato de zinc heptahidratado al 14,4%). La mezcla se agitó en un vortex durante 5 minutos y fue centrifugada a 4.000rpm durante 20 minutos.

Transcurrido este tiempo, se tomó 1mL del sobrenadante y se aforó a 10mL con agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra en los equipos G y D a una longitud de onda de 285nm.

El proceso de extracción mencionado anteriormente, también se llevó a cabo para los patrones de HMF de concentraciones 0,039, 0,051, 0,065, 0,077, 0,116, 0,154, 0,194 y 0,232mg/mL, antes de realizar la lectura de absorbancia.

Cada determinación se llevó a cabo por triplicado y utilizando un blanco de reactivos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y FISICOQUÍMICO DE LAS LECHES UHT COMERCIALES

Los resultados obtenidos en la caracterización microbiológica y fisicoquímica de las leches UHT comerciales, se presentan en la Tabla No. 4, de acuerdo al procedimiento expuesto en la metodología (**Sección 3.4**).

Al calcular la desviación estándar y estándar relativa para los resultados obtenidos en cada análisis, según se muestra en la Tabla No. 4, se encontraron valores muy bajos, lo cual permite establecer que los procedimientos fueron reproducibles.

**TABLA No. 4:** Características físicoquímicas y microbiológicas de las leches ultrapasteurizadas.

MUESTRA	$\rho$ (g/mL) $\pm$ s DSR	ACIDEZ (%) $\pm$ s DSR	pH $\pm$ s DSR	G (%) $\pm$ s DSR	ES (%) $\pm$ s DSR	ESD (%) $\pm$ s DSR	PROTEÍNA (%) $\pm$ s DSR	CENIZAS (%) $\pm$ s DSR	Prueba reductasa (Horas)	Prueba fosfatasa
<b>Leches Enteras</b>										
ALE <sup>1</sup>	1,030 $\pm$ 0,000 0,0	0,147 $\pm$ 0,001 0,68	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	3,5 $\pm$ 0,1 2,8	11,84 $\pm$ 0,05 0,4	8,34 $\pm$ 0,01 0,1	2,4 $\pm$ 0,1 4,1	0,73 $\pm$ 0,01 1,4	7	Negativa
CEV <sup>2</sup>	1,033 $\pm$ 0,000 0,0	0,141 $\pm$ 0,001 0,71	6,7 $\pm$ 0,0 0,0	3,1 $\pm$ 0,1 3,2	12,11 $\pm$ 0,05 0,4	9,01 $\pm$ 0,01 0,1	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,75 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa
PEFeV <sup>3</sup>	1,033 $\pm$ 0,000 0,0	0,150 $\pm$ 0,002 1,30	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	3,0 $\pm$ 0,0 0,0	11,74 $\pm$ 0,46 3,9	8,74 $\pm$ 0,02 0,2	2,6 $\pm$ 0,0 0,0	0,71 $\pm$ 0,06 8,4	7	Negativa
<b>Leches Semidescremadas</b>										
SFS <sup>4</sup>	1,032 $\pm$ 0,000 0,0	0,146 $\pm$ 0,000 0,00	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,6 $\pm$ 0,1 6,2	10,06 $\pm$ 0,11 1,1	8,46 $\pm$ 0,12 1,4	2,4 $\pm$ 0,0 0,0	0,72 $\pm$ 0,00 0,0	7	Negativa
SFSD <sup>5</sup>	1,032 $\pm$ 0,000 0,0	0,149 $\pm$ 0,002 1,30	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	2,0 $\pm$ 0,1 4,7	10,56 $\pm$ 0,05 0,5	8,56 $\pm$ 0,01 0,1	2,7 $\pm$ 0,1 3,7	0,74 $\pm$ 0,01 1,4	7	Negativa
PS <sup>6</sup>	1,032 $\pm$ 0,000 0,0	0,145 $\pm$ 0,001 0,69	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,6 $\pm$ 0,0 0,0	10,06 $\pm$ 0,00 0,0	8,46 $\pm$ 0,00 0,0	2,5 $\pm$ 0,1 4,0	0,76 $\pm$ 0,04 3,6	7	Negativa
PSOV <sup>7</sup>	1,032 $\pm$ 0,000 0,0	0,147 $\pm$ 0,001 0,68	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,0 0,0	10,30 $\pm$ 0,00 0,0	8,50 $\pm$ 0,00 0,0	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,75 $\pm$ 0,02 2,6	7	Negativa
PSD <sup>8</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,148 $\pm$ 0,001 0,68	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,6 $\pm$ 0,1 6,2	10,56 $\pm$ 0,05 0,5	8,96 $\pm$ 0,01 0,1	2,5 $\pm$ 0,03 1,2	0,73 $\pm$ 0,02 2,7	7	Negativa
APSV <sup>9</sup>	1,034 $\pm$ 0,001 0,1	0,149 $\pm$ 0,001 0,67	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,1 5,5	10,80 $\pm$ 0,11 1,0	9,00 $\pm$ 0,11 1,2	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,76 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa
APSMV <sup>10</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,154 $\pm$ 0,001 0,64	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,0 0,0	10,80 $\pm$ 0,00 0,0	9,00 $\pm$ 0,00 0,0	2,7 $\pm$ 0,0 0,0	0,78 $\pm$ 0,01 1,2	7	Negativa
APSCaV <sup>11</sup>	1,033 $\pm$ 0,000 0,0	0,154 $\pm$ 0,003 1,90	6,6 $\pm$ 0,1 1,5	1,9 $\pm$ 0,1 5,2	10,67 $\pm$ 0,05 0,4	8,77 $\pm$ 0,01 0,1	2,6 $\pm$ 0,0 0,0	0,81 $\pm$ 0,2 2,4	7	Negativa
APSD <sup>12</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,157 $\pm$ 0,001 0,63	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,1 5,5	10,80 $\pm$ 0,05 0,4	9,00 $\pm$ 0,01 0,1	2,6 $\pm$ 0,0 0,0	0,74 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa
CSV <sup>13</sup>	1,033 $\pm$ 0,000 0,0	0,141 $\pm$ 0,001 0,71	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,6 $\pm$ 0,1 6,2	10,31 $\pm$ 0,05 0,4	8,71 $\pm$ 0,01 0,1	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,75 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa
CSDV <sup>14</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,141 $\pm$ 0,000 0,00	6,6 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,1 5,6	10,80 $\pm$ 0,11 1,0	9,00 $\pm$ 0,02 0,2	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,72 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa
ALSDF <sup>15</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,158 $\pm$ 0,000 0,00	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	1,8 $\pm$ 0,1 5,5	10,80 $\pm$ 0,05 0,4	9,00 $\pm$ 0,01 0,1	2,6 $\pm$ 0,1 4,0	0,72 $\pm$ 0,02 2,7	7	Negativa

MUESTRA	$\rho$ (g/mL) $\pm$ s DSR	ACIDEZ (%) $\pm$ s DSR	pH $\pm$ s DSR	G (%) $\pm$ s DSR	ES (%) $\pm$ s DSR	ESD (%) $\pm$ s DSR	PROTEÍNA (%) $\pm$ s DSR	CENIZAS (%) $\pm$ s DSR	Prueba reductasa (Horas)	Prueba fosfatasa
<b>Leches Descremadas</b>										
CDV <sup>16</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,142 $\pm$ 0,002 1,40	6,7 $\pm$ 0,1 1,4	0,0 $\pm$ 0,0 0,0	8,64 $\pm$ 0,00 0,0	8,64 $\pm$ 0,00 0,0	2,6 $\pm$ 0,1 4,2	0,71 $\pm$ 0,01 1,4	7	Negativa
ALDF <sup>17</sup>	1,034 $\pm$ 0,000 0,0	0,156 $\pm$ 0,002 1,20	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	0,2 $\pm$ 0,0 0,0	8,88 $\pm$ 0,00 0,0	8,68 $\pm$ 0,00 0,0	2,6 $\pm$ 0,1 3,8	0,78 $\pm$ 0,02 2,5	7	Negativa
APD <sup>18</sup>	1,035 $\pm$ 0,000 0,0	0,153 $\pm$ 0,002 1,30	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	0,1 $\pm$ 0,0 0,0	9,01 $\pm$ 0,00 0,0	8,91 $\pm$ 0,00 0,0	2,7 $\pm$ 0,1 3,7	0,77 $\pm$ 0,01 1,2	7	Negativa
PDD <sup>19</sup>	1,034 $\pm$ 0,001 0,10	0,150 $\pm$ 0,001 0,66	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	0,1 $\pm$ 0,0 0,0	8,76 $\pm$ 0,11 1,3	8,66 $\pm$ 0,11 1,3	2,5 $\pm$ 0,1 4,0	0,76 $\pm$ 0,02 2,6	7	Negativa
APDD <sup>20</sup>	1,035 $\pm$ 0,000 0,0	0,157 $\pm$ 0,001 0,63	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	0,0 $\pm$ 0,0 0,0	8,89 $\pm$ 0,00 0,0	8,89 $\pm$ 0,00 0,0	2,7 $\pm$ 0,0 0,0	0,74 $\pm$ 0,00 0,0	7	Negativa
APDF <sup>21</sup>	1,036 $\pm$ 0,000 0,0	0,142 $\pm$ 0,001 0,70	6,5 $\pm$ 0,0 0,0	0,1 $\pm$ 0,0 0,0	9,26 $\pm$ 0,00 0,0	9,16 $\pm$ 0,00 0,0	2,6 $\pm$ 0,0 0,0	0,75 $\pm$ 0,01 1,3	7	Negativa

1. FV: 12/11/06; 2. FV: 29/10/06; 3. FV: 16/11/06; 4. FV: 24/11/06; 5. FV: 08/10/06; 6. FV: 20/11/06; 7. FV: 05/10/06; 8. FV: 12/11/06; 9. FV: 06/11/06;  
10. FV: 10/11/06; 11. FV: 30/11/06; 12. FV: 19/12/06; 13. FV: 24/10/06; 14. FV: 12/11/06; 15. FV: 08/12/06; 16. FV: 22/10/06; 17. FV: 29/10/06;  
18. FV: 20/11/06; 19. FV: 02/11/06; 20. FV: 02/01/07; 21. FV: 07/12/06.

## **4.2. CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE LA LECHE**

**4.2.1. Prueba de la Reductasa:** Esta prueba permite verificar la calidad microbiana de la leche y se emplea para leches no tratadas y leches pasteurizadas. Para nuestras muestras, que son leches ultrapasteurizadas, se asume que están exentas de microorganismos contaminantes debido al tratamiento térmico a que han sido sometidos y esto pudo comprobarse con los resultados obtenidos para dicha prueba; dado que no hay microorganismos, la actividad reductora de estos es nula y por lo tanto, no hubo cambio visual en el color del indicador azul de metileno, que persistió por más de 7 horas.

El tiempo de no viraje del indicador para los diferentes tipos de leche analizadas, las clasifica como leches de primera calidad.

**4.2.2. Prueba de la Fosfatasa:** Esta prueba se realizó basándonos en el hecho de que las fosfatasas son enzimas que están invariablemente presentes en la leche cruda y son inactivadas durante la pasteurización. Todas las leches analizadas resultaron negativas ante esta prueba; en ausencia de la fosfatasa, no ocurre la reacción colorimétrica específica evidenciada por la formación de productos de hidrólisis como el *p*-nitrofenol, que provee un color amarillo a la solución. Al blanco de la leche cruda le ocurrió todo lo contrario, ya que se observó una coloración amarilla intensa.

Con base en todo lo anterior, se confirma que las leches evaluadas fueron calentadas mediante procesos de ultrapasteurización, en condiciones que garantizaron la destrucción de todos los gérmenes patógenos que pudieran estar presentes en la leche cruda.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

**4.3.1. Acidez:** En las leches UHT analizadas, se encontraron valores de acidez entre 0,141 y 0,158%, expresados en porcentaje de ácido láctico. Estos valores concuerdan con los reportados por la norma<sup>(7)</sup>, y constituyen la acidez natural o aparente de la leche, lo cual es debido a que el tratamiento térmico al que se someten, evita la acción de microorganismos como los *Streptococcus lácticos*, que al actuar sobre la lactosa, forman el ácido láctico durante procesos fermentativos y proporcionan una acidez desarrollada debida al ácido láctico.

**4.3.2. Densidad:** Como se muestra en la Tabla No. 4, las leches ultrapasteurizadas enteras que se analizaron, presentaron densidades entre 1,030 y 1,033g/mL, y las leches descremadas entre 1,034 y 1,036g/mL, valores que están acordes a lo establecido por la norma<sup>(7)</sup>. En el caso de las leches semidescremadas, se presentó cierta variación de la densidad con respecto a los valores reportados por la norma, como es el caso de las leches APSV, APSMV, PSD, ALSDF, APSD y CSDV, donde se encontró una densidad de 1,034g/mL; estas leches fueron enriquecidas con vitaminas, minerales, fibra y algunas de ellas son deslactosadas.

La variación en la densidad entre estos diferentes tipos de leche, se relaciona principalmente con la cantidad de materia grasa, además de otros componentes que contenga.

La grasa es el único constituyente de la leche con menor densidad que el agua, y es el factor o característica que más influye al disminuir la gravedad específica de la leche<sup>(11)</sup>. De acuerdo a ello, se observó un aumento en la densidad de las leches semidescremadas enriquecidas y deslactosadas PSD, APSV, APSMV, APSD, CSDV y ALSDF, y aún más significativo en las descremadas APD, APDD y

APDF, cuya proporción de materia grasa se ha eliminado parcial ó casi completamente.

**4.3.3. Grasa:** Los resultados de grasa obtenidos para las leches UHT analizadas, muestran que las leches enteras tienen un porcentaje de grasa entre 3,0 y 3,5%. Comparándolos con los otros tipos de leche, se encuentra, como se esperaba, un mayor contenido de grasa, debido a que durante su tratamiento no han sido sometidas a un proceso de desnatado, conservando así, su nivel mayoritario de grasa; como lo expresa la norma, la leche entera debe tener un porcentaje mínimo de grasa del 3,0%<sup>(7)</sup>, lo cual coincide con los resultados obtenidos.

Las leches semidescremadas mostraron porcentajes de grasa de 1,6 a 2,0%, lo cual concuerda con los valores referenciados en la norma<sup>(7)</sup>. La principal característica de la leche semidescremada es el hecho de tener un equilibrio en cuanto al nivel de grasa, lo cual es debido a que la agitación a la que ha estado sometida durante el proceso de higienización, solo separa una cantidad determinada de grasa.

A diferencia de las anteriores, como se esperaba, la leche descremada presentó la mínima cantidad de materia grasa (0,0 a 0,2%), ya que por el proceso de separación por centrifugación que se le aplica, se logra extraer la mayor cantidad de la misma; no obstante, estos porcentajes se encuentran dentro de lo reglamentado.

Dentro de los tratamientos importantes a los que se someten los diferentes tipos de leche durante su procesado, y en los cuales participa la materia grasa, está el proceso de homogeneización, cuyo objetivo es estabilizar la emulsión láctea mediante la disminución del tamaño de los glóbulos de grasa, los cuales son pulverizados mecánicamente a alta presión<sup>(11)</sup>; la reducción del tamaño y la concomitante alteración de la interfase lípido/agua, imparte a la leche

homogeneizada diversas características, algunas deseables y otras indeseables; así, por ejemplo, la leche homogeneizada es más susceptible a la lipólisis. Por tanto, la leche debe calentarse antes de éste proceso, con el fin de inactivar las lipasas asociadas a la caseína<sup>(24)</sup>.

Al existir una interrelación entre las concentraciones de algunos constituyentes de la leche y el contenido de grasa, se puede evaluar la influencia significativa o no de ésta, con parámetros indicativos de calidad como son el extracto seco (ES) y el extracto seco desengrasado (ESD).

**4.3.4. ES:** Considerando que el extracto seco comprende a la materia grasa, los carbohidratos, proteínas, sales minerales y vitaminas de la leche, se encontró, al aplicar la fórmula de Richmond<sup>(7)</sup>, valores comprendidos entre 11,74 y 12,11% para las leches enteras, entre 10,06 y 10,80% para las semidescremadas y entre 8,64 y 9,26% para las leches descremadas y por lo tanto, se puede decir que las leches evaluadas contienen los valores mínimos exigidos por la norma; el mayor porcentaje lo presentan las leches enteras, debido a su mayor contenido de grasa, y especialmente dentro de estas, la que estaba enriquecida con vitaminas A, D<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y niacina (CEV).

**4.3.5. ESD:** En las leches analizadas, los valores estuvieron comprendidos entre 8,34 y 9,01% para las leches enteras y entre 8,46 y 9,00% para las semidescremadas. Según la norma, tanto la leche entera como la semidescremada, deben tener un porcentaje mínimo de 8,3%<sup>(7)</sup>; este valor fue un poco mayor para las leches enriquecidas con vitaminas, minerales y fibra.

Por su parte, las leches descremadas presentaron un nivel un poco mayor, entre 8,64 y 9,16%, similar al referenciado<sup>(7)</sup>.



**4.3.6. pH:** Se encontraron valores de pH para las leches analizadas en un rango de 6,5-6,7, que se considera como normal, ya que en la bibliografía se ha reportado que la leche tiene un pH de 6,67, ligeramente en el lado ácido, y que puede variar entre 6,4 y 6,7<sup>(30)</sup>. A su vez, estos valores corroboran la ligera acidez natural de la leche.

**4.3.7. Cenizas:** Los resultados obtenidos para el contenido mineral de las leches fueron de 0,71 y 0,75% para las enteras, entre 0,72 y 0,81% para las semidescremadas y 0,71 y 0,78% para las descremadas; teniendo en cuenta que los minerales representan alrededor del 0,6-0,8% del peso de la leche<sup>(31)</sup>, se encontró un contenido mineral dentro de éste rango, siendo un poco más significativos los valores de las leches semidescremadas enriquecidas con hierro, fósforo, sodio, calcio y zinc (APSMV y APSCaV).

Sin duda, de los elementos minerales contenidos en la leche, el calcio es el más importante, no sólo porque es fundamental para producir la coagulación de la leche mediante la formación del cuajo (se forma un precipitado de fosfato cálcico cuando se aumenta la temperatura), sino también que desde el punto de vista nutricional, ya que cubre muchas de las necesidades del organismo humano, siendo esencial para la base ósea<sup>(30)</sup>.

**4.3.8. Proteína:** El porcentaje de proteína calculado para las leches analizadas, presentó una mayor variabilidad con respecto a los resultados obtenidos para los otros parámetros, encontrándose valores entre 2,4 y 2,7%. Según lo referenciado en la literatura, la leche de vaca contiene de 3,0 a 3,5% de proteínas distribuidas en los 3 grupos<sup>(27)</sup> mencionados anteriormente en la **Sección 1.2.1**. Al comparar estos valores con los encontrados experimentalmente, se puede observar la variación entre los mismos. Esta variación en el contenido de proteína, se debe a la desnaturalización que sufren dichos compuestos por el tratamiento térmico al que se somete la leche durante su procesamiento.

Hay que tener en cuenta que las proteínas de la leche son sensibles a la acción del calor, siendo las proteínas solubles muy termosensibles y las caseínas, menos alterables por el calor; las proteínas solubles son, en mayor o menor grado, desnaturalizadas mediante calentamiento a temperaturas superiores a 56°C durante 30 minutos. Esta desnaturalización se traduce por una desestabilización y activación de los grupos sulfhidrilo (-SH).

En efecto, el calentamiento provoca la agitación de las moléculas de las proteínas del suero que tienen carácter globular; esta agitación, que aumenta con la temperatura, rompe los enlaces secundarios que unen las cadenas polipeptídicas que intervienen en la constitución de la molécula. El resultado, es una modificación más o menos profunda de su configuración nativa<sup>(23)</sup>. En nuestro caso, las leches analizadas fueron sometidas a procesos de ultrapasteurización a una temperatura de 132°C durante 2 a 3 segundos, lo cual pudo provocar la desnaturalización y por consiguiente la pérdida de las proteínas.

Dentro de los efectos desfavorables de la desnaturalización en la estructura primaria de las proteínas, se encuentra la disminución de los aminoácidos esenciales ó la formación de derivados antinutritivos; los tratamientos térmicos pueden acarrear la destrucción parcial (modificación irreversible) de cisteína y cistina<sup>(24)</sup>. De acuerdo a ello, se establece que los bajos resultados en el porcentaje de proteína encontrados en la leche, están sujetos a las variaciones presentadas en los aminoácidos, inducidas por el calentamiento.

Por otra parte, la precipitación de las caseínas por el calor, solo se obtiene a temperaturas muy elevadas, ya que al no tener una estructura secundaria y terciaria bien definidas, difícilmente se desnaturalizan; para poder constatar alguna modificación, es necesario realizar el calentamiento a temperaturas muy elevadas, superiores a 130°C durante 30 minutos<sup>(1)</sup>.

En el caso de las leches analizadas, no ocurrirían modificaciones significativas de las caseínas, debido a que el calentamiento se realiza a 132°C durante un corto período de tiempo (2-3 segundos).

Al relacionar los valores obtenidos en cada determinación con los tres grupos de leches (enteras, semidescremadas y descremadas), se observó que presentan diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos como densidad, grasa, ES y ESD; por su parte, los valores de acidez, pH, proteína y cenizas, mostraron una variabilidad mínima en cada grupo de leche. Todo lo contrario se observó para el caso de los parámetros microbiológicos como la reductasa y fosfatasa, donde todos los resultados fueron iguales para los tres grupos de leche.

Al comparar los valores de grasa, minerales y proteínas determinados en el laboratorio de la Unidad de Análisis Industriales-Sección Alimentos, con los reportados en la información nutricional en las cajas del producto, se encontró bastante variación entre los mismos.

Para el contenido graso, se observó que solamente las leches ALE, PDD y APDD presentaron los mismos valores; las leches enteras CEV y PEFev y las semidescremadas PSOv, PS, SFS, PSD y APSD, se encontró una variabilidad mínima; las leches CSV, APSV, APSMV, APSCaV, SFSD, ALSDF CSDV, CDV, ALDF, APD y APDF presentaron la mayor variación de resultados.

En relación al contenido mineral, ningún valor se asemejó al reportado; en las leches SFS y SFSD se encontró una menor variación en los resultados y las leches PS, PSD y PDD presentaron una mayor variación de los mismos.

En el caso del porcentaje de proteína, únicamente las leches APSMV, APD y APDD reportaron los mismos valores encontrados experimentalmente. El resto de leches mostraron una gran variación, con lo cual se confirma lo mencionado

anteriormente, respecto a la pérdida de éste tipo de nutriente por desnaturalización, mediante los procesos de tratamiento térmico a los que se sometió la leche.

No obstante, los parámetros microbiológicos evaluados para las leches UHT, indicaron su buen estado de conservación y calidad higiénica. A su vez, los parámetros fisicoquímicos permitieron comprobar que los valores correspondían a las características de composición genuina, y no presentaron ningún tipo de alteración, adulteración ó fraude, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas por la norma.

#### **4.4. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-Vis**

Previo a iniciar el proceso de estandarización de la metodología empleada para la determinación de HMF en las leches UHT comerciales analizadas anteriormente, se realizó la calibración de los equipos G y D, con el fin de obtener datos confiables y reproducibles para esa determinación; adicionalmente, se estableció la longitud de onda de trabajo, como parámetro fundamental para detectar y cuantificar el HMF mediante esta técnica analítica.

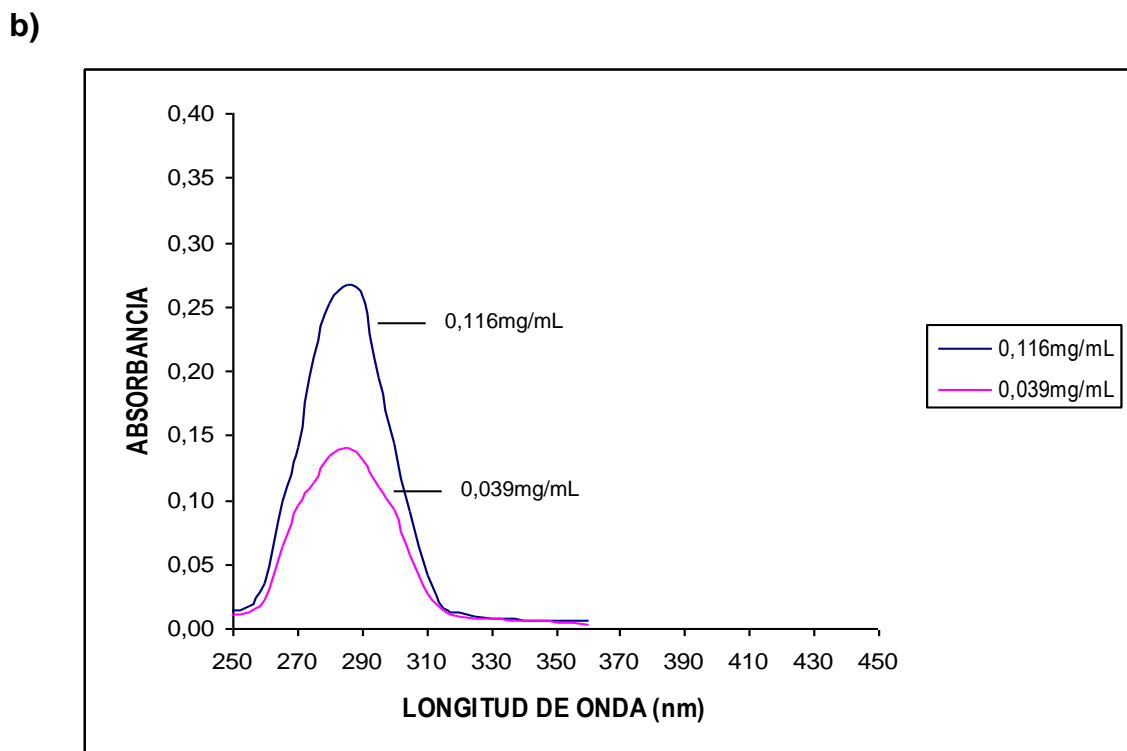
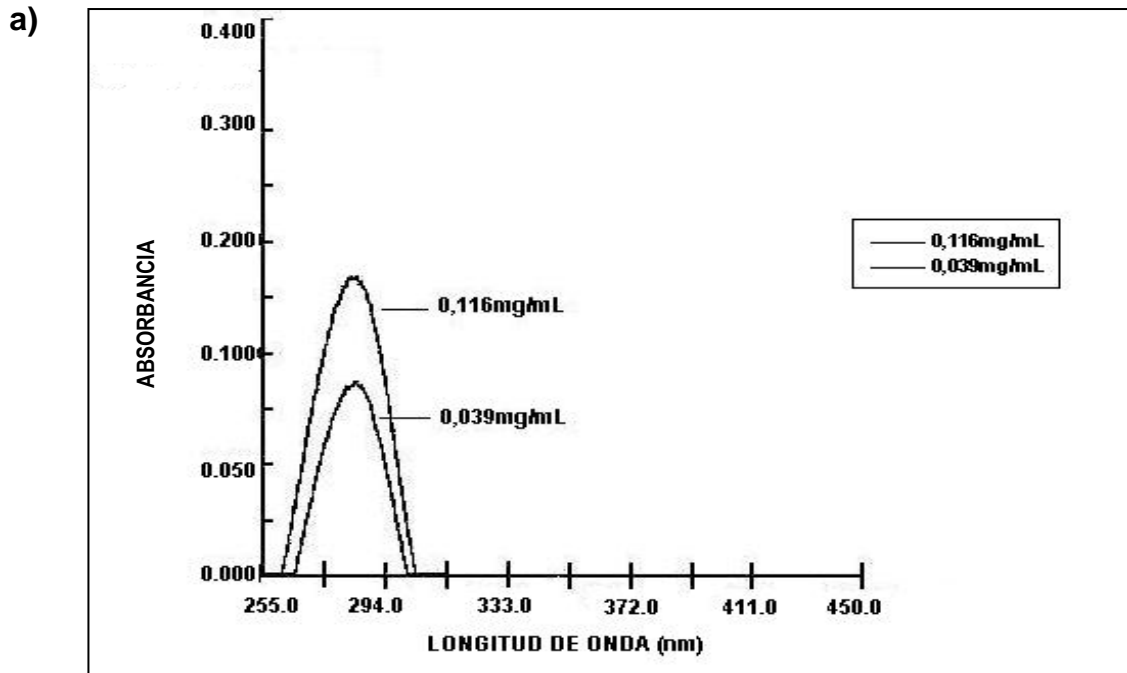
**4.4.1. Calibración de los espectrofotómetros UV-Vis:** Se comprobó la calibración de los equipos G y D, midiendo la absorbancia de las soluciones patrón de dicromato de potasio a una longitud de onda de 373nm, antes de realizar las mediciones de absorbancia de las muestras de leche. Se utilizó el dicromato de potasio, ya que éste se caracteriza porque tiene una magnitud de absorción exactamente conocida, lo cual permite establecer el grado de error de la señal obtenida para el equipo.

Para el equipo G, se obtuvo una excelente linealidad, con valores de  $r$  en promedio de 0,99994 en cada una de las calibraciones mensualmente realizadas con los patrones de dicromato de potasio; para el equipo D se obtuvo un valor de  $r$  en promedio de 0,99998, lo que también comprobó su excelente linealidad. Adicionalmente, en este equipo se llevó a cabo un barrido con la celda de óxido de holmio, desde una longitud de onda de 275 a 750nm y se obtuvo el espectro correspondiente, el cual mostró picos agudos característicos del cristal a las longitudes de onda específicas de 636,8, 536,3, 452,7, 417,8, y 359,6nm.

Estos procedimientos permitieron confirmar el buen funcionamiento de los dos espectrofotómetros UV-Vis.

**4.4.2. Elección de la longitud de onda:** Una vez realizado el barrido con cuatro soluciones patrón de HMF de concentraciones 0,039, 0,116, 0,154 y 0,194 mg/mL, se obtuvo un máximo pico de absorción a 285nm para ambos equipos; sin embargo, se observó que los picos correspondientes a las concentraciones de 0,154 y 0,194 mg/mL presentaron un corrimiento de banda hacia longitudes de onda más bajas. El corrimiento de las bandas de absorción observado para las concentraciones de 0,154 y 0,194mg/mL, se explica teniendo en cuenta las propiedades espectrales del HMF, en concordancia con sus electrones de valencia; según su estructura química, éste tiene dobles enlaces y por lo tanto presenta transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$ ; como también tiene oxígeno con electrones desapareados, presenta transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  no permitidas. Para éste tipo de molécula puede ocurrir un desplazamiento de la banda de absorción, hacia longitudes de onda más bajas, por influencia de un solvente tan polar como lo es el agua; este desplazamiento se denomina hipsocrómico y se dirige hacia la parte de ondas cortas. Por lo tanto, en la Figura No. 7, sólo se muestran los picos obtenidos con las concentraciones de 0,039 y 0,116 mg/mL de HMF.

**FIGURA No. 7:** Selección de la longitud de onda mediante barrido con soluciones patrón de HMF de concentración 0,039 y 0,116mg/mL; **a)** Equipo G, **b)** Equipo D



Los espectros de la Figura No. 7, verifican la proporcionalidad existente entre la concentración del HMF y la absorbancia postulada según la ley de Beer, e indican una sensibilidad máxima, ya que las mediciones de absorbancia espectrofotométrica, se hacen a una longitud de onda correspondiente a los picos de absorción, porque la sensibilidad (cambio en la absorbancia por unidad de concentración), es mayor en este punto. Los picos presentaron buena resolución.

**4.4.3. Método de cuantificación:** Como método de cuantificación se empleó la curva de calibración, midiendo 5 veces la absorbancia de cada solución patrón de HMF (0,039, 0,077, 0,116, 0,154, 0,194 y 0,232 mg/mL). Las concentraciones de las soluciones patrón de HMF y sus respectivas absorbancias, se especifican en las Tablas No. 5 y 6 y se representan en las Figuras No. 8 y 9.

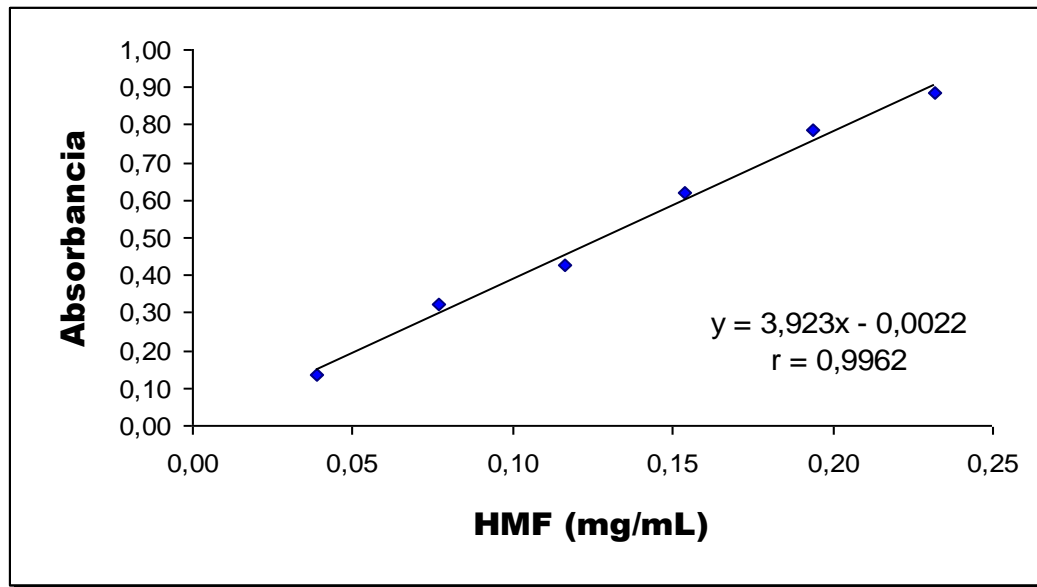
**TABLA No. 5:** Concentraciones y absorbancias de las soluciones patrón de HMF obtenidas en el equipo G con sus respectivas desviaciones estándar.

Concentración (mg/mL)	A1	A2	A3	A4	A5	$\bar{A}$	s	DSR (%)
0,039	0,137	0,135	0,131	0,139	0,136	0,136	0,0029	2,13
0,077	0,327	0,320	0,311	0,327	0,330	0,323	0,0076	2,40
0,116	0,425	0,428	0,426	0,431	0,420	0,426	0,0040	0,94
0,154	0,613	0,623	0,625	0,629	0,617	0,621	0,0064	1,03
0,194	0,793	0,785	0,787	0,783	0,771	0,784	0,0080	1,02
0,232	0,882	0,880	0,885	0,884	0,883	0,883	0,0019	0,22

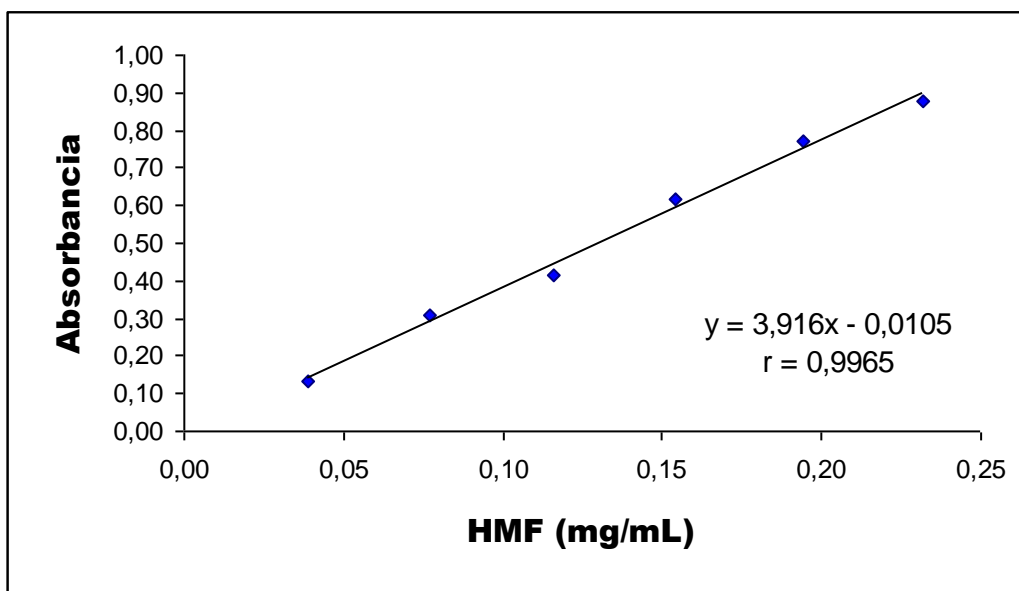
**TABLA No. 6:** Concentraciones y absorbancias de las soluciones patrón de HMF obtenidas en el equipo D con sus respectivas desviaciones estándar.

Concentración (mg/mL)	A1	A2	A3	A4	A5	$\bar{A}$	s	DSR (%)
0,039	0,132	0,135	0,129	0,128	0,130	0,131	0,0027	2,06
0,077	0,310	0,313	0,315	0,307	0,312	0,311	0,0030	0,96
0,116	0,418	0,412	0,416	0,409	0,415	0,414	0,0035	0,85
0,154	0,618	0,617	0,615	0,607	0,618	0,615	0,0046	0,75
0,194	0,770	0,773	0,768	0,767	0,772	0,770	0,0025	0,32
0,232	0,870	0,876	0,879	0,878	0,879	0,876	0,0037	0,42

**FIGURA No. 8:** Curva de calibración para la determinación de HMF en leches UHT. Equipo G.



**FIGURA No. 9:** Curva de calibración para la determinación de HMF en leches UHT. Equipo D.





## 4.5. PARÁMETROS ANALÍTICOS

Con la estandarización del método espectrofotométrico para la determinación del HMF, se establecieron los límites de la técnica y la metodología empleada, además de que se aseguró la precisión y exactitud de los datos obtenidos.

**4.5.1. Linealidad:** Se realizaron dos curvas de calibración (una para cada equipo), en las que se graficó la absorbancia promedio ( $\bar{A}$ ) de las Tablas No. 5 y 6 en función de la concentración de cada una de las soluciones patrón de HMF (desde 0,039-0,232mg/mL), donde el área bajo la curva fue proporcional a la concentración (Figuras No. 8 y 9). Las curvas elaboradas, corresponden a los niveles de HMF encontrados en las leches comerciales analizadas.

De acuerdo a las curvas mostradas anteriormente y a los coeficientes de correlación obtenidos (valores próximos a 1), se demuestra la respuesta lineal de los equipos G y D dentro del rango de concentraciones de HMF trabajadas.

### 4.5.2. Precisión

**4.5.2.1. Repetibilidad:** La repetibilidad o precisión espectrofotométrica, se determinó mediante lecturas repetidas (n=5) de la absorbancia de la misma muestra de leche (PEFeV) y de los mismos patrones de concentración 0,039, 0,051 y 0,065mg/mL en diferentes días. En las Tablas No. 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos.

Como se observa, la desviación estándar relativa fue inferior al 4,2% para la muestra de leche PEFev, cuya concentración en HMF era de 2,83mg/mL con el equipo G y de 2,82mg/mL con el equipo D.

Para los patrones de HMF de 0,039 0,051 y 0,065mg/mL, las desviaciones estándar relativas fueron inferiores al 5,2% para ambos equipos.

**TABLA No. 7:** Precisión espectrofotométrica del HMF. Equipo G.

Absorbancia	HMF (mg/mL)			Leche
	0,039	0,051	0,065	PEFeV
1	0,132	0,176	0,227	0,860
2	0,128	0,170	0,220	0,845
3	0,125	0,165	0,213	0,823
4	0,120	0,161	0,208	0,806
5	0,116	0,157	0,199	0,772
Å	0,124	0,166	0,213	0,821
s	0,006	0,007	0,011	0,034
DSR (%)	4,84	4,22	5,16	4,14

**TABLA No. 8:** Precisión espectrofotométrica del HMF. Equipo D.

Absorbancia	HMF (mg/mL)			Leche
	0,039	0,051	0,065	PEFeV
1	0,129	0,167	0,217	0,853
2	0,126	0,164	0,210	0,837
3	0,121	0,158	0,205	0,818
4	0,118	0,151	0,197	0,800
5	0,112	0,146	0,191	0,763
Å	0,121	0,157	0,204	0,814
s	0,006	0,008	0,010	0,034
DSR (%)	4,95	5,10	4,90	4,17

**4.5.2.2. Repetibilidad del método completo:** La repetibilidad del método completo del HMF (incluyendo la preparación de la muestra y el análisis por espectrofotometría UV-Vis) fue determinado midiendo 10 alícuotas de una muestra de leche (PEFeV) y de tres soluciones patrón de HMF (0,039, 0,051 y 0,065mg/mL) en diferentes días, obteniéndose los datos que se muestran en las Tablas No. 9 y 10.

**TABLA No. 9:** Repetibilidad del método completo de HMF. Equipo G.

Absorbancia	Concentración (mg/mL)			Leche
	0,039	0,051	0,065	PEFeV
1	0,134	0,177	0,227	0,869
2	0,135	0,175	0,227	0,867
3	0,132	0,176	0,226	0,866
4	0,134	0,176	0,225	0,866
5	0,134	0,177	0,224	0,867
6	0,134	0,176	0,227	0,867
7	0,137	0,177	0,225	0,867
8	0,136	0,176	0,227	0,866
9	0,137	0,176	0,225	0,866
10	0,136	0,176	0,226	0,867
Ā	0,135	0,176	0,226	0,867
s	0,0016	0,0006	0,0011	0,0009
DSR (%)	1,19	0,34	0,49	0,10

**TABLA No. 10:** Repetibilidad del método completo de HMF. Equipo D.

Absorbancia	Concentración (mg/mL)			Leche
	0,039	0,051	0,065	PEFeV
1	0,129	0,165	0,216	0,857
2	0,129	0,167	0,216	0,857
3	0,129	0,166	0,215	0,856
4	0,130	0,166	0,216	0,856
5	0,130	0,166	0,217	0,856
6	0,130	0,166	0,216	0,856
7	0,130	0,166	0,216	0,856
8	0,130	0,166	0,216	0,856
9	0,129	0,166	0,216	0,855
10	0,130	0,166	0,216	0,855
Ā	0,130	0,166	0,216	0,856
s	0,0005	0,0005	0,0005	0,0007
DSR (%)	0,38	0,30	0,23	0,08

Como se observa, la desviación estándar relativa fue inferior al 1,2% tanto para los patrones, como para la muestra PEFev. Se considera que la DSR calculada no sobrepasa el valor estipulado del 5,0%<sup>(50)</sup>, esto teniendo presente que al calcular dicho parámetro tiene gran importancia la magnitud porcentual o la masa relativa

del analito y la complejidad de la matriz, con lo cual se ha establecido por ejemplo, que para fluidos biológicos, la DSR apropiada debe ser de 5,0% a 10,0%<sup>(50)</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demuestra que el método espectrofotométrico presenta buena repetibilidad dentro del rango de concentraciones evaluadas.

**4.5.3. Sensibilidad:** Con el fin conocer la sensibilidad del método analítico para la determinación de HMF en las muestras de leche UHT comerciales, se determinó el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC), siguiendo el mismo procedimiento reportado en el **Sección 3.6.3.** de la metodología. De las diez réplicas hechas al blanco y a las concentraciones de 0,039, 0,051 y 0,065mg/mL de HMF, se obtuvieron respectivamente, valores de absorbancia promedio de 0,013, 0,137, 0,175 y 0,227 en el equipo G, y de 0,012, 0,130, 0,166 y 0,216, respectivamente, en el equipo D.

Las desviaciones estándar relativas de los 10 valores de absorbancia para los tres patrones fueron de 0,88, 0,17 y 0,92%, respectivamente, para el equipo G y de 1,32, 0,96 y 0,65% para el equipo D.

Al cociente calculado, del promedio de cada patrón entre el promedio del blanco, se le analizó la relación señal/ruido correspondiente al LD y al LC; los valores obtenidos del análisis para cada patrón fueron promediados para obtener LD y LC, con sus respectivas desviación estándar y desviación estándar relativa, siendo esta última de 2,86% para el LD en el equipo G y de 3,84% en el equipo D y para el LC de 3,26 y 3,77% para el equipo G y el equipo D, respectivamente.

A continuación, en la Tabla No. 11 se muestran los límites de detección y de cuantificación calculados para el método.

**TABLA No. 11:** Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) para el HMF. Equipos G y D.

<b>Espectrofotómetro</b>	<b>LD (mg/mL)</b>	<b>s</b>	<b>DSR (%)</b>	<b>LC (mg/mL)</b>	<b>s</b>	<b>DSR (%)</b>
Equipo G	0,011	0,0002	1,81	0,037	0,0005	1,35
Equipo D	0,011	0,0002	1,81	0,036	0,0005	1,39

El LD obtenido, fue de 0,011mg/mL para ambos equipos, calculados como la cantidad necesaria para obtener una relación señal/ruido en un factor de 3. Estos resultados indican la menor concentración de HMF que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra de leche UHT, en las condiciones establecidas.

Los valores de LC calculados, teniendo en cuenta una relación señal/ruido de 10, presentaron una mínima diferencia entre ellos, siendo de 0,037mg/mL para el equipo G y de 0,036mg/mL para el equipo D.

Comparando los resultados obtenidos para el LD y el LC con cada uno de los equipos, se observó que ambos equipos presentaron concentraciones detectables bajas, lo cual permite establecer que tienen una buena sensibilidad al detectar y cuantificar menores concentraciones del HMF en las condiciones estipuladas.

Con base en todos los resultados anteriores, se observa que tanto en la repetibilidad como en la repetibilidad del método completo se obtuvieron DSR menores al 5,2%, lo que nos permite realizar mediciones precisas; adicionalmente, con los cálculos anteriores, también fue posible comprobar que el método espectrofotométrico UV-Vis del Carrez, ofrece bajos límites de detección, cuantificación y por ende alta sensibilidad.

**4.5.4. Exactitud.** La exactitud del método de cuantificación, se comprobó adicionando cantidades conocidas de un patrón de HMF de 1,0mg/mL a un patrón de 0,039mg/mL y a una muestra de leche UHT (PEFeV). Se midió la absorbancia de cada solución cinco veces, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla No. 12.

**TABLA No. 12:** Recuperación (%) del método de análisis por espectrofotometría UV-Vis de HMF (mg/mL) de un patrón y una muestra de leche (PEFeV). Equipos G y D.

Muestra	Equipo	s	DSR (%)	Cantidad inicial (mg)	Cantidad añadida (mg)	Cantidad recuperada (mg)	Recuperación (%)
Patrón 0,039mg/mL	G	0,0005	0,065	0,195	0,193	0,214	92,24
	D	0,0008	0,100	0,195	0,193	0,213	91,81
Leche PEFev	G	0,0005	0,070	0,195	0,193	0,210	90,52
	D	0,0008	0,100	0,195	0,193	0,209	90,10

La exactitud del método hace referencia a la concordancia entre el valor medido y el valor aceptado como referencia (curva de calibración); para que el valor medido se aproxime al de referencia, la recuperación del analito debe acercarse al 100%. De acuerdo a ello, se encontró que los porcentajes de recuperación para el HMF fueron altos, mayores del 90% y cercanos a dicho valor, siendo la DSR inferior al 0,11% tal y como se muestra en la Tabla No. 12; además, estos porcentajes están por encima de las consideraciones habituales y aceptadas para el análisis de fluidos biológicos como la leche, valores que se encuentran entre el 60 y 80%<sup>(47)</sup>.

Esto permite deducir que el método aplicado permite recuperar un porcentaje considerable del derivado furánico.

Los altos porcentajes de recuperación y la baja desviación estándar calculada para las cinco mediciones de absorbancia de una solución patrón de HMF y la muestra de leche UHT (PEFeV), demuestran la exactitud del método analítico.

#### 4.6. ESTABILIDAD DEL HMF

Adicionalmente, se realizaron pruebas de estabilidad para las soluciones patrón de 0,039, 0,051 y 0,065mg/mL de HMF y una muestra de leche (PEFeV), con el objetivo de determinar el tiempo y condiciones bajo las cuales una muestra preparada puede ser reproduciblemente medida. Para ello, las soluciones fueron preparadas, medidas y almacenadas para ser nuevamente medidas durante 10 días consecutivos. En las Tablas No. 13 y 14 se muestran los resultados.

**TABLA No. 13:** Prueba de estabilidad. Equipo G.

Absorbancia	HMF (mg/mL)						Muestra PEFev	Error (%)
	0,039	Error (%)	0,051	Error (%)	0,065	Error (%)		
1	0,132	3,03	0,176	3,41	0,227	3,08	0,860	1,74
2	0,128	5,30	0,170	6,25	0,220	6,36	0,845	4,30
3	0,125	9,09	0,165	8,52	0,213	8,37	0,823	6,28
4	0,120	12,12	0,161	10,80	0,218	12,33	0,806	10,23
5	0,116	14,39	0,157	13,64	0,199	14,98	0,772	14,42
6	0,113	17,42	0,152	17,05	0,193	17,62	0,736	18,26
7	0,109	23,48	0,146	19,89	0,187	22,91	0,703	21,51
8	0,101	26,52	0,141	28,47	0,175	25,11	0,675	25,47
9	0,097	30,30	0,137	25,00	0,170	27,80	0,641	28,14
10	0,092	-----	0,132	-----	0,164	-----	0,618	-----
$\bar{A}$	0,113	-----	0,154	-----	0,196	-----	0,748	-----
s	0,013	-----	0,014	-----	0,022	-----	0,087	-----
DSR (%)	11,50	-----	9,09	-----	11,22	-----	11,56	-----

**TABLA No. 14:** Prueba de estabilidad. Equipo D.

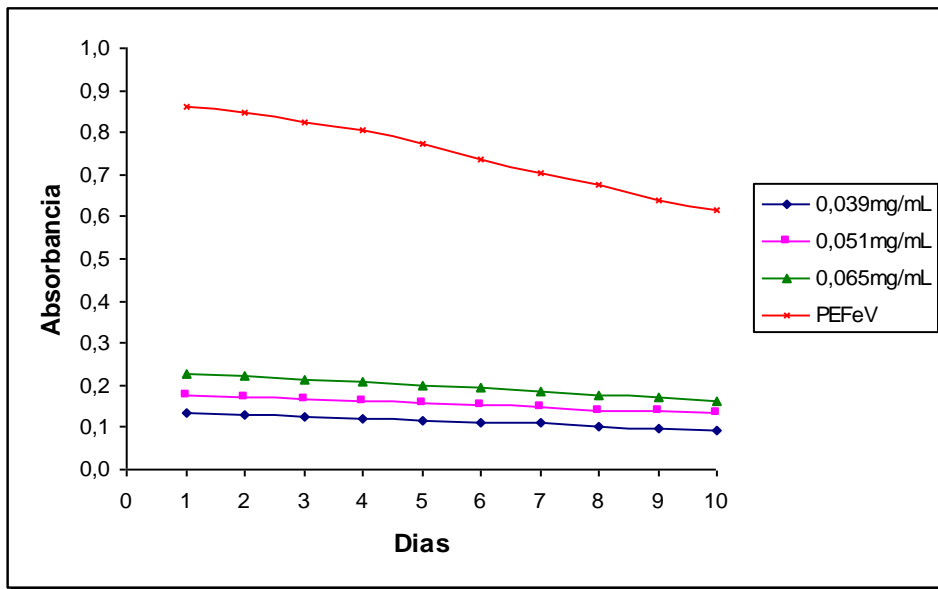
Absorbancia	HMF (mg/mL)						Muestra PEFev	Error (%)
	0,039	Error (%)	0,051	Error (%)	0,065	Error (%)		
1	0,129	2,33	0,167	1,80	0,217	3,23	0,853	1,88
2	0,126	6,20	0,164	5,39	0,210	5,53	0,837	4,10
3	0,121	8,53	0,158	9,58	0,205	9,22	0,818	6,21
4	0,118	13,18	0,151	12,57	0,197	12,00	0,800	10,56
5	0,112	16,28	0,146	16,17	0,191	15,21	0,763	14,78
6	0,108	18,60	0,140	19,16	0,184	17,98	0,727	19,70
7	0,105	21,71	0,135	23,35	0,178	20,28	0,685	22,16
8	0,101	24,03	0,128	27,54	0,173	23,04	0,664	25,21
9	0,098	27,13	0,121	30,54	0,167	25,81	0,638	28,83
10	0,094	-----	0,116	-----	0,161	-----	0,607	-----
Ā	0,111	-----	0,142	-----	0,188	-----	0,739	-----
s	0,012	-----	0,017	-----	0,018	-----	0,087	-----
DSR (%)	10,81	-----	12,42	-----	10,03	-----	11,88	-----

Los valores de absorbancia, tanto de las soluciones patrón de HMF, como de la muestra de leche PEFev, presentaron una variabilidad significativa durante los 10 días en que se analizaron, mostrando valores de DSR altos, mayores al 9,0% para ambos equipos. Lo anterior indica que el HMF no es un analito estable y se degrada rápidamente bajo las condiciones de tratamiento térmico y almacenamiento trabajadas, lo cual hace necesario realizar su análisis durante un periodo máximo de 3 días.

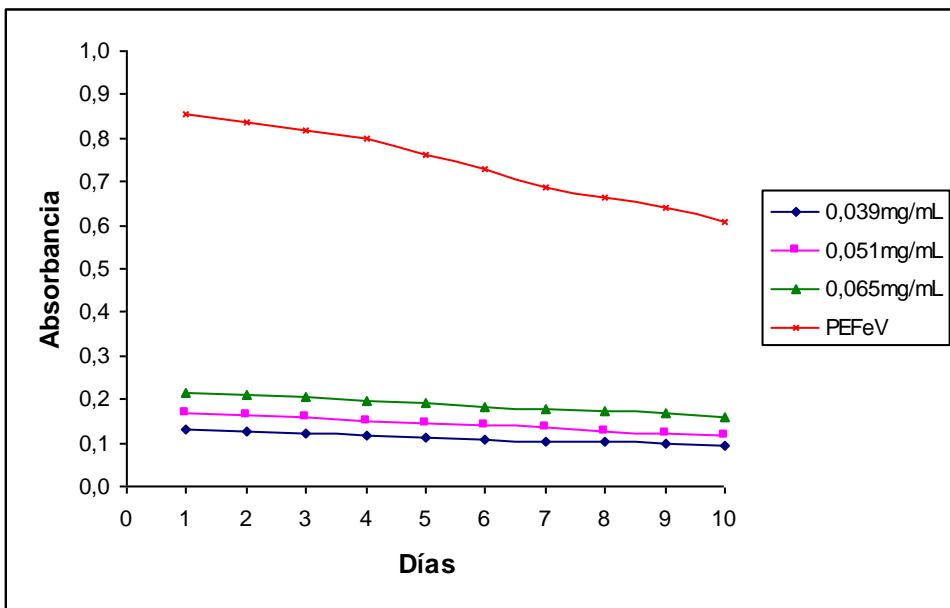
Otro parámetro importante que permitió establecer la inestabilidad del HMF fue el porcentaje de error, calculado a partir de la lectura de absorbancia del primer día con respecto al segundo, tercer, cuarto, quinto día, y así sucesivamente hasta completar los diez días. Estos valores aumentaron progresivamente, siendo mayores al 10% a partir del cuarto día, lo que corrobora dicha afirmación. La tendencia que mostraron estas soluciones a ser inestables, también se observó en las siguientes gráficas de variación de la absorbancia respecto al tiempo (Figuras No. 10 y 11).



**FIGURA No. 10:** Prueba de estabilidad. Variación de la absorbancia de HMF respecto al tiempo. Equipo G.



**FIGURA No. 11:** Prueba de estabilidad. Variación de la absorbancia de HMF respecto al tiempo. Equipo D.

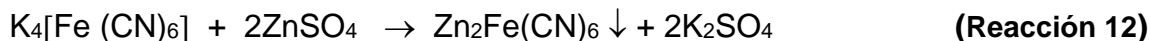


Las curvas descendentes que se observan en las Figuras No. 10 y 11, muestran la disminución de la absorbancia del HMF con respecto al tiempo (días), tanto para las soluciones patrón como para la muestra de leche (PEFeV), lo cual permite concluir que la obtención de datos confiables para la estimación de HMF en leches líquidas, como se mencionó anteriormente, solamente puede hacerse durante los tres primeros días de preparada la muestra.

#### 4.7. EXTRACCIÓN DEL HMF EN LAS MUESTRAS DE LECHE UHT

La extracción de HMF en las muestras de leche, se realizó según lo explicado en la **Sección 3.8.** de la metodología.

Para ello, la muestra de leche fue tratada con solución de Carrez I al 15% [ $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ ] y solución de Carrez II al 14,4% [ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ], en cantidad suficiente para desproteinizar la leche; la función de estas soluciones es la de precipitar las proteínas y partículas sólidas que pueden interferir en el análisis, mediante la formación de un precipitado de ferrocianuro de zinc [ $Zn_2Fe(CN)_6$ ] que las retiene, según la reacción:



La solución de Carrez también tiene la capacidad de absorber algunos colores y romper las emulsiones<sup>(38)</sup>.

Para facilitar el proceso de desproteinización de la muestra fue necesario agitar; inicialmente, la agitación se realizó mecánicamente en una plancha CORNING PC-420 (escala de agitación: 60-1.100rpm) en la posición número 7, que corresponde a una velocidad de 550rpm, durante 5 minutos; sin embargo, se

observó que la solución permaneció inalterable, de aspecto lechoso, con partículas en suspensión y sin ninguna evidencia de precipitado al cabo de 24 horas después de dejar en reposo, razón por la cual fue necesario aplicar un proceso de separación adicional como la centrifugación, que por lo general, según lo reportado<sup>(4)</sup>, se realiza a 10.000rpm durante 5 minutos. Debido a la carencia de una centrifugadora que alcanzara esta velocidad, se tomó un valor intermedio de 4.000rpm y se aumentó el tiempo hasta 20 minutos, para llevar a cabo dicho proceso. Pasado éste tiempo, se observó la presencia de dos fases, un precipitado blanco y un sobrenadante de HMF que permaneció incoloro durante unos pocos segundos e inmediatamente se volvió amarillo.

En otros estudios donde la leche es tratada con ácido tricloroacético al 40% como agente desproteinizante en lugar de Carrez, cuando lo que se pretende es determinar el HMF total, se requiere de una etapa previa de hidrólisis que generalmente se realiza con ácido oxálico. Sin embargo, se ha observado que no existe gran diferencia entre los niveles de HMF directamente formados durante el actual tratamiento térmico de la leche (HMF libre) y el que se forma después del tratamiento térmico adicional con el ácido oxálico (HMF total)<sup>(13)</sup>. Morales y otros autores<sup>(2)</sup>, han mostrado claramente que en la leche, la mayor parte del “HMF total” es inducido por la lactosa debido al calentamiento con ácido oxálico, y no del producto de Amadori enlazado a la proteína.

Como el objetivo de éste estudio era determinar el HMF formado en los diferentes tipos de leche durante los procesos de tratamiento térmico UHT y durante su almacenamiento, es decir, el “HMF libre”, no se llevó a cabo la hidrólisis con el ácido oxálico, ya que según lo referenciado anteriormente, permitiría establecer el HMF total contenido en la leche después de someterla a un calentamiento adicional.

#### 4.8. ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO Y CUANTIFICACIÓN DEL HMF EN MUESTRAS DE LECHE UHT COMERCIALES

Una vez estandarizada la metodología y extraído el HMF de las muestras de leche UHT, se realizó una dilución de 1mL del sobrenadante en 10mL de agua destilada, y se determinó la absorbancia de las muestras a la longitud de onda de 285nm previamente establecida. Con base en los datos de absorbancia, se reemplazaron estos valores en la ecuación  $y = 3,923x - 0,0022$  de la curva de calibración de la Figura No. 8 para el equipo G y  $y = 3,916x - 0,0105$  de la curva de calibración de la Figura No. 9 para el equipo D, para encontrar el contenido de HMF. A esta concentración obtenida, se le aplicó un factor de dilución (**Ecuación 9**), para obtener la concentración real en cada una de las muestras de leche analizadas.

$$[\text{HMF}] \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times \left( \frac{25,0\text{mL}}{2,0\text{mL}} \right) \quad (\text{Ecuación 9})$$

En la Tabla No. 15 se muestran las concentraciones de HMF calculadas para cada muestra, teniendo en cuenta la absorbancia promedio.

**TABLA No. 15:** Concentración de HMF en muestras de leche UHT. Equipos G y D.

Muestra	Equipo G		Equipo D	
	Ā	HMF (mg/mL)	Ā	HMF (mg/mL)
<b>Leches Enteras</b>				
ALE	0,426	1,36	0,416	1,36
CEV	0,426	1,36	0,416	1,36
PEFeV	0,886	2,83	0,876	2,82
<b>Leches Semidescremadas</b>				
SFS	0,428	1,37	0,415	1,35
SFSD	0,136	0,44	0,132	0,46
PS	0,323	1,03	0,314	1,03
PSOV	0,325	1,04	0,312	1,02
PSD	0,137	0,44	0,133	0,45
APSV	0,629	2,01	0,617	2,00
APSMV	0,783	2,50	0,772	2,49
APSCaV	0,658	2,10	0,646	2,09
APSD	0,136	0,44	0,132	0,46
CSV	0,424	1,35	0,416	1,36
CSDV	0,135	0,43	0,132	0,46
ALSDF	0,135	0,43	0,131	0,45
<b>Leches Descremadas</b>				
CDV	0,424	1,35	0,415	1,35
ALDF	0,426	1,36	0,418	1,36
APD	0,629	2,01	0,616	2,00
PDD	0,137	0,44	0,131	0,45
APDD	0,136	0,44	0,132	0,46
APDF	0,324	1,04	0,316	1,04

Comparando los datos de absorbancia obtenidos para cada una de las muestras de leche analizadas en ambos equipos, se encontró una variabilidad mínima; sin embargo, los valores fueron un poco mayores para el equipo G.

De nuevo, se demuestra que el método empleado es preciso, de acuerdo con los bajos valores obtenidos para las desviaciones estándar y estándar relativas, siendo esta última menor al 4,27%.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla No. 4, se puede considerar que el contenido de HMF en las leches UHT no está influenciado por la composición en cuanto a materia grasa, es decir, que se obtuvieron valores

similares de HMF, por ejemplo, para la misma leche, en sus tres presentaciones (entera, semidescremada y descremada); sin embargo, al comparar todas las leches en general, clasificadas dentro de los tres grupos, sí se observa una variabilidad significativa en los contenidos de HMF y más aún al ser comparadas con las leches deslactosadas, influenciadas directamente por el contenido de lactosa.

Algunos autores <sup>(28)(51)</sup> han evaluado el contenido de HMF en leches enteras, semidescremadas y descremadas, y pudieron concluir que la presencia de grasa no tiene un efecto significativo sobre las reacciones de degradación de la lactosa y por ende en la formación de HMF, al menos no en el rango de 0 a 4,5% de grasa, como es el caso de las leches UHT comerciales analizadas por nosotros, cuyos porcentajes de grasa están dentro de éste rango.

Para este caso, los aspectos relevantes son el tratamiento térmico al que se sometió la leche, es decir la ultrapasteurización a 132°C durante 2 a 3 segundos, su posterior período y condiciones de almacenamiento, y la composición en cuanto a proteínas y carbohidratos, debido a que el HMF es producto de la deshidratación y degradación térmica de la lactosa (azúcar de la leche) que reacciona con los residuos de la lisina, un aminoácido de las proteínas de la leche.

De ahí, que sean estos los principales factores que influyen en la producción de dicho compuesto.

El contenido de HMF encontrado en las muestras de leche analizadas, según se observa en la Tabla No.15, se encuentra en un rango de 0,43 a 2,83mg/mL para el equipo G y de 0,45 a 2,82mg/mL para el equipo D.

En las leches enteras, semidescremadas y descremadas con un contenido normal de lactosa, se favorece la reacción de degradación para producir el HMF, por lo

tanto, los niveles de HMF encontrados son más altos, en comparación con las leches con bajos contenidos de lactosa. En el caso de las leches deslactosadas (SFSD, PSD, APSD, CSDV, ALSDF, PDD y APDD), las cuales son sometidas a procesos especiales, donde alrededor del 80% de la lactosa se transforma en sus unidades monoméricas de glucosa y galactosa por adición de la enzima lactasa, se encontraron los más bajos niveles de HMF (0,43 a 0,44mg/mL para el equipo G y de 0,45 a 0,46mg/mL para el equipo D). Lo anterior es posible, debido a que su contenido de lactosa en mínima cantidad, limita la reacción de degradación para producir el HMF.

También se observó que las leches UHT enriquecidas con minerales y vitaminas PEF<sub>e</sub>V y APSMV, presentaron el mayor contenido de HMF, siendo de 2,83 y 2,50mg/mL para el equipo G y de 2,82 y 2,49mg/mL para el equipo D, respectivamente; en esta concentración, se considera que hay cierta influencia por la adición de minerales como el hierro en la producción de HMF, debido a que este tipo de fortificación se realiza, por lo general, con sales férricas que requieren que se aumente alrededor de 10°C más la temperatura durante el proceso de pasteurización ó ultrapasteurización. Adicionalmente, este mayor calentamiento favorece la inactivación de la enzima lipasa que se encuentra protegida de la desnaturalización térmica en presencia de dichas sales<sup>(1)</sup>.

Según lo anterior, la temperatura de ultrapasteurización para estas leches, alcanzaría como mínimo los 142°C aproximadamente, y es precisamente este aumento de temperatura, el que tendrá como consecuencia una mayor producción de HMF, en comparación con las que no han sido adicionadas con este mineral. Teniendo en cuenta este aspecto, se encontraron valores de HMF similares, de 1,35 y 1,36mg/mL con ambos equipos, para las leches ALE, CEV, CSV, CDV y ALDF, que tenían un 1,0% de hierro adicionado.

La leche APSCaV enriquecida con calcio, también presentó un alto contenido de HMF (2,10mg/mL con el equipo G y 2,09mg/mL con el equipo D); esta fortificación se realiza con sales de fosfato de calcio di y tribásico, al igual que con carbonatos. Sin embargo, el uso de estos cationes divalentes en alimentos como la leche, puede crear ciertos problemas de estabilidad, debido a que muchas proteínas suelen ser inestables en presencia de estos iones<sup>(1)</sup>. Este precedente indicaría que el alto contenido de calcio en esta leche, favorecería la inestabilidad de las proteínas, principalmente las caseínas, y por lo tanto, los residuos de aminoácidos libres como la lisina, podrían fácilmente reaccionar con la lactosa para formar el HMF en mayor proporción.

De ésta forma se comprobó el efecto catalizador que tiene no sólo el aumento de la temperatura debido la fortificación, sino al hierro , calcio y otras sales adicionadas a las leches UHT mencionadas, aumentando la velocidad de la reacción de Maillard y con ello la formación de productos como el HMF en grandes cantidades.

Con relación a las leches enriquecidas con vitaminas, independientemente de la fortificación con Calcio y Hierro, que sean enteras ó deslactosadas, se establece que la adición de vitaminas no muestra influencia en el contenido de HMF calculado, debido a que en la mayoría de los casos, las vitaminas adicionadas son liposolubles (A, D, D<sub>3</sub> y E) las cuales constan de una estructura química básica formada por la condensación de moléculas de isopreno, es decir, tienen características terpénicas y vitaminas hidrosolubles (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y niacina), constituidas por anillos heterocíclicos piridoxínicos y piridínicos, cuya estructura no está involucrada con las reacciones de degradación de la lactosa. En estos tipos de leche se obtuvieron valores intermedios de HMF de 1,04 y 2,01mg/mL con el equipo G y de 1,02 y 2,00mg/mL con el equipo D, para las muestras de leche PSOV y APSV.



Es importante tener en cuenta que durante la fortificación de los alimentos, se requiere conocer muy bien los efectos físicos y químicos que el nutrimento puede tener sobre ellos; por eso, antes de efectuar cualquier adición, se deben determinar perfectamente las necesidades del consumidor y el tipo de alimento sobre el cual se va a adicionar. Es importante que el nutrimento añadido, cumpla con las características adecuadas de estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo; de esta manera, se evita que ocurran reacciones secundarias (pardeamiento no enzimático) en un alimento tan susceptible como lo es la leche, con la posterior formación de productos indeseables (HMF), los cuales reducen drásticamente el valor nutritivo de dicho alimento.

Al comparar los valores de HMF libre encontrados en las leches UHT nacionales analizadas, con respecto a los reportados por otros autores en España<sup>(52)</sup> y Holanda<sup>(28)</sup>, se observó que las leches nacionales presentaron una concentración de HMF mucho mayor, así como se muestra en la Tabla No. 16; la variación dentro de los respectivos rangos, puede deberse a las diferentes condiciones de los procedimientos a los cuales están sujetas las leches en las diferentes industrias.

**TABLA No. 16:** Valores de HMF libre reportados para leches UHT.

<b>País</b>	<b>HMF (mg/mL)</b>	<b>Equipo</b>
Colombia*	0,43 – 2,83	Espectrofotómetro UV-Vis Genesys
	0,45 – 2,82	Espectrofotómetro UV-Vis Intralab DMS-100
España**	0,0011 – 0,0082	Cromatógrafo líquido de alta resolución Shimadzu
Holanda**	0,0005 – 0,0013	Cromatógrafo líquido de alta resolución Hewlett Packard

\* Método espectrofotométrico UV-Vis<sup>(53)</sup>; \*\* Método por CLAR<sup>(28),(52)</sup>.

Los resultados mostrados en la Tabla No. 16 permiten establecer que los tratamientos térmicos a los que se somete la leche en Colombia son más severos, comparados con los procesos de países como España y Holanda; dichos países,

han desarrollado una alta tecnología para todo el proceso de optimización de la leche, incluyendo cuidado del ganado, ordeño, manipulación, transporte, entre otros, y son precisamente estos procedimientos los que en Colombia, podrían estar careciendo de un control de calidad, permitiendo así que ocurran más fácilmente reacciones de degradación, donde se forman productos como el HMF en cantidades significativas.

Es posible que la severidad de los tratamientos térmicos a los que se somete la leche en Colombia, se deban a la menor calidad higiénica de la leche cruda adquirida como materia prima para el procesamiento; por tanto, una elevada carga microbiana, implicaría que las leches sean sometidas a un tratamiento térmico cercano ó igual a las condiciones de esterilización, lo que se corrobora por el menor porcentaje proteico (Tabla No. 4) encontrado en todas las leches analizadas, con respecto al que en teoría se esperaría. De igual manera, podría atribuirse a este proceso, la pérdida de vitaminas y de otros componentes, y por consiguiente, la creciente necesidad de la industria láctea por elaborar leches fortificadas en la actualidad.

Además, el almacenamiento prolongado de la leche y a temperaturas inadecuadas, puede influir en la gran cantidad de HMF encontrado, ya que las reacciones de Maillard no sólo ocurren bajo tratamiento térmico como se ha mencionado antes, sino que prosiguen lentamente durante el almacenamiento del producto. Lo anterior se debe a que la leche presenta un alto contenido de lactosa y de lisina; a pesar de que la lactosa es un agente reductor débil, puede interactuar con la lisina de las proteínas de la leche durante el almacenamiento por varios días a temperaturas de 35°C<sup>(1)</sup> ó más altas, como las alcanzadas en Colombia y por lo tanto, incrementa la concentración de HMF.

Con base en todo lo anterior, podemos indicar que en el contenido del HMF, influye la temperatura, la intensidad del tratamiento térmico, así como el contenido de agua, algunos aditivos y el tiempo de almacenamiento. De ahí, que éste índice

sea válido para controlar el daño provocado por el tratamiento térmico en productos como la leche y ser empleado como un indicador específico intrínseco del transcurso de la reacción de Maillard.

Adicionalmente, la presencia de HMF en leches tratadas térmicamente también puede relacionarse con otros indicadores como la turbidez, los contenidos de lactulosa, lisinoalanina, furosina y  $\beta$ -lactoglobulina<sup>(54)</sup> y sirve para determinar el tipo de proceso de higienización al cual ha sido sometida la leche, como pasteurización, UHT-directo, UHT-indirecto y esterilización clásica, entre otros.

Como se mencionó anteriormente, otro de los factores que influye en el desarrollo del HMF en la leche, es el contenido de lactulosa. Paralelamente a este estudio, se analizaron las mismas muestras de leche UHT comerciales en cuanto a su contenido de lactulosa, encontrándose valores bastante altos<sup>(55)</sup>, lo cual corrobora el efecto significativo de éste compuesto, que aumenta también la cantidad de HMF presente.

Finalmente, se considera que productos de la reacción de Maillard como el HMF, pueden afectar gravemente la calidad nutricional de nuestras leches, ocasionando la destrucción de aminoácidos esenciales, la producción de compuestos antinutritivos y tóxicos y cambios organolépticos y funcionales; a nivel nutricional, la destrucción de la lisina es la consecuencia más significativa y de mayor importancia, puesto que la sola condensación lactosa-aminoácido, reduce el valor nutritivo de la proteína<sup>(48)</sup>; esta alteración en la calidad proteica de la leche, tiene mucha importancia en la alimentación de los consumidores y en especial, si este producto se emplea en fórmulas infantiles para la alimentación de lactantes, pues a menudo constituye su única fuente proteica en una época en que el requerimiento de aminoácidos esenciales como la lisina, es muy alto.

Por su parte, existe evidencia acerca de la inhibición de la actividad enzimática digestiva producida por compuestos derivados de la reacción de Maillard<sup>(56)</sup> y que incluyen alteraciones en el metabolismo, en la biodisponibilidad de los minerales<sup>(57)</sup> y en la alergenicidad a las proteínas de los alimentos, especialmente en los niños<sup>(3)</sup>.

Con base en todo lo anterior, existe un creciente interés por disponer de indicadores químicos que evalúen el deterioro de la leche como es el caso del HMF, el cual puede ser determinado mediante una técnica sencilla, rápida, sensible y de bajo costo como es la espectrofotometría UV-Vis, fácilmente adaptable a nivel industrial, que permita controlar las modificaciones que se producen durante la recepción, elaboración y almacenamiento de la misma; este parámetro sería de gran utilidad en la optimización de los procesos y de las condiciones de almacenamiento para el mejor control de calidad de la leche tratada.

## CONCLUSIONES

- Los parámetros microbiológicos evaluados para las leches UHT enteras, descremadas y semidescremadas, indicaron su buen estado de conservación y calidad higiénica, lo que las clasifica como leches de calidad, aptas para el consumo humano.
- Los parámetros fisicoquímicos analizados para las leches UHT enteras, descremadas y semidescremadas, permitieron comprobar que los valores correspondían a las características de composición genuina, y que no presentaron ningún tipo de alteración, adulteración ó fraude, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas por la reglamentación.
- Se encontró una mayor variabilidad del porcentaje de proteína calculado con respecto al valor reglamentado en la norma ICONTEC y en la etiqueta del producto, lo cual permitió comprobar la reducción de la calidad proteica de la leche, siendo esto un indicativo del severo tratamiento térmico al que se estaría sometiendo la leche UHT, lo cual provoca la desnaturalización de las proteínas.
- La aplicación del método espectrofotométrico UV-Vis demostró ser una herramienta viable y útil para la cuantificación del HMF en leches UHT, debido a que después de optimizar las diferentes variables espectrofotométricas, se calcularon parámetros analíticos que confirmaron la confiabilidad de los resultados. Además, la gran ventaja de éste método en cuanto a costos y sencillez, lo hace de fácil acceso a nivel industrial.

- Los equipos UV-Vis GENESYS 6 e INTRALAB DMS-100, presentaron una buena sensibilidad, al poder detectar bajas concentraciones del analito; el valor para el LD fue de 0,011mg/mL.
- El contenido de HMF en las leches UHT analizadas estuvo comprendido entre 0,43-2,83mg/mL con el equipo G y de 0,45-2,82mg/mL con el equipo D, valores que al ser comparados con los de otros países como España y Holanda son bastante altos, lo que indicaría que el tratamiento térmico aplicado es posiblemente más severo y el almacenamiento del producto no solamente es prolongado sino a temperaturas inadecuadas.
- Las leches deslactosadas presentaron la menor cantidad de HMF (0,43 a 0,44mg/mL para el equipo G y de 0,45 a 0,46mg/mL para el equipo D), debido a que su contenido de lactosa en mínima cantidad, limita el desarrollo de la reacción de Maillard.
- Las cantidades considerables de HMF para las muestras PEF<sub>e</sub>V, APSMV y APSCaV, se atribuye respectivamente al aumento de temperatura en el proceso de higienización, al enriquecimiento con hierro y a la posible desestabilización de proteínas como la caseína, debido a la adición de gran cantidad de calcio.
- Se comprobó el efecto catalizador que tiene el aumento de la temperatura y la adición de hierro, calcio y otras sales a las leches PEF<sub>e</sub>V, APSMV, APSCaV, al aumentar la velocidad de la reacción de Maillard y con ello la formación de HMF en grandes cantidades.
- Se comprobó mediante el análisis de la proteína de la leche y el contenido de HMF, que las leches UHT han perdido gran parte de su valor nutricional. Este factor es de crucial importancia, teniendo en cuenta que la leche debe

ser el alimento más completo en la nutrición del ser humano, pues en ella se encuentran la mayoría de los elementos necesarios para el organismo.

- La determinación de un indicador químico del deterioro de la leche como lo es el HMF mediante este estudio, contribuye a controlar las modificaciones que se producen durante la manipulación del producto, siendo este parámetro de gran utilidad en la optimización de procesos y a las condiciones de almacenamiento para el control de calidad de la leche.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda prestar atención en el desarrollo de estos estudios al evaluar no solo este tipo de indicador, sino de otros indicadores de deterioro térmico como son la lactulosa, furosina, lisinoalanina, histidinoalanina y otros furfurales, para asegurar que los procesos empleados en la higienización y almacenamiento de la leche, no disminuyan la calidad nutritiva de sus constituyentes, ya que es un alimento básico en la dieta cotidiana.
- Continuar con la implementación de otros métodos como los cromatográficos que al igual que el método espectrofotométrico empleado en este trabajo, faciliten la determinación de HMF en términos de rutina y sencillez de procesos.



## BIBLIOGRAFÍA

1. **BADUI, S.** Química de los alimentos. 1 ed. México: Editorial Alhambra. 1989. p. 41-64, 376, 380-386, 392-396.
2. **MORALES, F.; ROMERO, C.; JIMÉNEZ, S.** Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1991. Vol. 45. p. 1570-1573.
3. **GUERRA, E.; GARCÍA, B.; MONTILLA, J.** Determination of hydroxymethylfurfural in baby cereals by high performance liquid chromatography. En: Journal of Liquid Chromatography. 1992. Vol. 15. p. 2551-2559.
4. **GUERRA, E.; LEON, C.; GARCÍA, B.; CORZO, N.; ROMERA, J.** Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. En: Journal of the Science of Food and Agriculture. 2002. Vol. 82. p. 587-592.
5. **FERRER, E.; ALEGRÍA, A.; FARRÉ, R.; ABELLÁN, P.; ROMERO, F.** High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant formulas changes during heat treatment and storage. En: Journal of Chromatography A. 2002. Vol. 947. p. 85-95.
6. **HORWITS, W.** Official methods of analysis of AOAC international. 17 ed. USA: AOAC International. 2000. Vol. II. p. 28-29.

7. **MINISTERIO DE SALUD. REPÚBLICA DE COLOMBIA.** Normas y procedimientos reglamentarios de la industria de alimentos. ICONTEC. Decreto 2437 de 1983. Decreto 476 de 1998.
8. **MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. ESPAÑA.** Capítulo XV (leche y derivados lácteos) del Código Alimentario Español (CAE). Decreto 2484 de 1967. Decreto 503 de 1986.
9. **HART, L.** Análisis moderno de los alimentos. 1 ed. España: Acribia. 1991. p. 133-137.
10. **PORTER, J.** Leche y productos lácteos. 1 ed. España: Acribia. 1981. p. 27-31, 36-37, 126.
11. **GROSCH, W.; BELITZ, H.** Química de los alimentos. 2 ed. España: Acribia. 1997. p. 538-540, 543-544, 547-549, 553, 556-560, 590-591, 594.
12. **GARZA, S.** El pardeamiento en zumos y purés de fruta. En: Alimentaria. 1998. Vol. 6. p. 87-90.
13. **BOEKEL, M.** Effect of heating on Maillard reactions in milk. En: Food Chemistry. 1998. Vol. 62. p. 403-414.
14. **SANZ, M.; CASTILLO, D.; CORZO, N.; OLANO, A.** 2-Furoylmethyl amino acids and hydroxymethylfurfural as indicators of honey quality. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003. Vol. 51. p. 4278-4283.
15. **VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; HERNÁNDEZ, M.; CANDELA, M.** Simultaneous liquid chromatographic analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and methyl anthranilate in honey. En: Food Chemistry. 1992. Vol. 44. p. 67-72.

16. **BLANCO**, D.; **GUTIÉRREZ**, M.; **SOPEÑA**, L.; **MANGAS**, J. High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates. En: *Chromatographia*. 1991. Vol. 32. p. 45-48.
17. **CHÁVEZ**, J.; **CASTELLOTE**, A.; **LÓPEZ**, M. Analysis of potential and free compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography evolution during storage. En: *Journal of Chromatography A*. 2005. Vol. 1076. p. 133-140.
18. **CHAVÉZ**, J.; **CASTELLOTE**, A.; **LÓPEZ**, M. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. En: *Food Research International*. 2006. Vol. 39. p. 536-543.
19. **RADA**, M.; **SANZ**, M.; **OLANO**, A.; **VILLAMIEL**, M. Formation of hydroxymethylfurfural and furosine during the storage of jams and fruit-based infant foods. En: *Food Chemistry*. 2004. Vol. 85. p. 605-609.
20. **BRAVO**, A.; **SÁNCHEZ**, B.; **SCHERER**, E.; **HERRERA**, J.; **RANGEL**, R.  $\alpha$ -Dicarbonylic compounds as indicators and precursors of flavor deterioration during beer aging. En: *Master Brewers Association of the Americas*. 2002. Vol. 39. p. 13-23.
21. **BONVEHI**, J.; **SERRA**, F. Determination of the hydroxymethylfurfural content of honey by HPLC and UV spectrometry. En: *Sciences des Aliments*. 2000. Vol. 11. p. 547-557.
22. **GAVIRIA**, L.; **BERNAL**, I. Análisis y control de calidad. 1 ed. Bogotá. Unisur. 1993. Vol. II. p. 215-217, 234-237.

23. **VEISSEYRE**, R. Lactología técnica. 2 ed. España: Acribia. 1980. p. 2, 11, 13, 17, 30-40, 47, 51, 97, 102-105, 116, 156, 161, 206-209, 233-235, 257, 297.
24. **FENNEMA**, O. Química de los alimentos. 2 ed. España: Acribia. 1993. p. 108-116, 894, 897-898, 901, 910-914.
25. **KIRK**, R.; **SAWYER**, R. Composición y análisis de alimentos de Pearson. 2 ed. México: Continental. 1996. p. 583-586, 589, 590-591, 594, 606-607.
26. **KAIRUZ**, L. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Bogotá: Guadalupe. 2002. p. 4-8, 10-12.
27. **CHEFTEL**, J. Leche y productos lácteos. 4 ed. España: Acribia. 2000. Vol I. p. 43, 45-49, 53-54.
28. **BERG**, H. Reactions of lactose during heat treatment of milk: A quantitative study. Wageningen. 1993. Ph.D. Thesis. Agricultural University. p. 105-106, 112.
29. **VARNAM**, A.; **SUTHERLAND**, J. Leche y productos lácteos. 1 ed. España: Acribia. 1995. p. 11, 14-15, 23, 26-27, 36-37, 48-51, 57, 63.
30. **RIVERA**, J. Tecnología de leche y derivados. 1 ed. Colombia: Universitaria. 1995. p. 25, 32, 65-68, 79, 87, 97-99, 104.
31. **LOZANO**, R. Composición y propiedades de la leche. 1 ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 1988. 3.24-3.25, 4.1-4.4, 5.1-5.3.
32. **JEURNINK**, T.; **WALSTRA**, P.; **KRUIF**, C. Mechanisms of fouling in dairy processing. En: Netherlands Milk & Dairy Journal. 1996. Vol. 50. p. 407-426.

33. **MORTIER, L.; BRAEKMAN, A.; CARTUYVELS, D.; VAN, R.; BLOCK, J.** Intrinsic indicators for monitoring heat damage of consumption milk. En: Biotechnology Agronomic Society Environmental. 2000. Vol. 4. p. 221-225.
34. **HODGE, J.; RIST, C.** The Amadori rearrangement under new conditions and its significance for non-enzymatic reactions. En: Journal of American Chemical Society. 1953. Vol. 75. p. 316-322.
35. **FEATHER, M.** The conversion of D-xylose and D-glucuronic acid to 2-furaldehyde. En: Tetrahedron. 1970. Vol. 46. p. 4143-4145.
36. **O'BRIEN, J.; MORRISEY, P.** The Maillard reaction in milk products. En: Bulletin International Dairy Federation. 1989. Vol. 283. p. 53-61.
37. **AMES, J.** The Maillard reaction. En: Biochemistry of Food Proteins. 1992. Vol 20. p. 99-153.
38. **OLANO, A.; MARTÍNEZ, I.** Nonenzymatic browning. Handbook of food analysis. USA: Nollet. 1996. p. 1683-1701.
39. **VALERO, E.; VILLAMIEL, M.; MIRALLES, B.; SANZ, J.; MARTÍNEZ, I.** Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. En: Food Chemistry. 2001. Vol 72. p. 51-58.
40. **WHITE, J.; WHITE, Jr.** Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. En: Journal of Association Official Analytical Chemistry. 1979. Vol. 62. p. 509-514.

41. **KEENY**, M.; **BASSETTE**, R. Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reactions in milk products. En: Journal of Dairy Science. 1959. Vol. 6. p. 945-960.
42. **DANEHY**, J. Maillard. Reactions: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. En: Advances in Food Research. 1986. Vol. 30. p. 77-138.
43. **HIDALGO**, A.; **POMPEI**, C.; **ZAMBUTO**, R. Heat damage evaluation during tomato products processed. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1998. Vol. 46. p. 4387-4390.
44. **CORRADINI**, D.; **CORRADINI**, C. Separation and determination of 5-hidrohymethyl-2-furaldehyde and 2- furaldehyde in fruit juices by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct sample injection. En: Journal of Chromatography. 1992. Vol. 624. p. 503-509.
45. **SERGUEIV**, G.; **KAZÁNSKAIA**, N.; **UZHINOV**, B.; **GURMAN**, V.; **ZENIN**, S. Métodos experimentales de la cinética química. 1 ed. Rusia: Mir Moscú. 1975. p. 7-8, 14-16.
46. **HARRIS**, D. Análisis químico cuantitativo. 3 ed. México: Iberoamericana. 1992. p. 474-475, 505-507, 557, 666-693.
47. **SKOOG**, D.; **WEST**, D.; **HOLLER**, J. Química analítica. 6ta ed. México: Mc Graw Hill. 2000. p. 396, 429.
48. **SKOOG**, D.; **HOLLER**, J. Principios de análisis instrumental. 5 ed. España: Mc Graw Hill. 2001. p. 785-820.
49. **IUPAC**, Analytical Chemistry Division (1978). Spectrochim Acta 33B: 241-245.

50. **QUATTROCCHI**, O.; **ABELAIRA**, S.; **LABA**, R. Introducción a la HPLC. 1 ed. Argentina: Artes Gráficas Farro.1992. p. 321.
51. **KONING**, P.; **BADINGS**, H.; **VAN DER POL**, J.; **KAPER**, J. Effect of the heat treatment and fat content on the properties of UHT milk. En: 23rd Internacional Dairy Congress. 1990. Vol. 2. p. 10-15.
52. **FERRER**, E.; **ALEGRÍA**, A.; **COURTOIS**, G.; **FARRÉ**, R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high temperature cows' milk. En: Journal of Chromatography A. 2000. Vol. 881. p. 599-606.
53. **ROJAS**, S. Aplicación de la espectrofotometría ultravioleta-visible para la determinación de 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF) en leches comerciales. Popayán, 2007, 123p. Trabajo de grado (Química). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación.
54. **JÍMENEZ**, S. Indicadores del deterioro de la leche. España: 2002. Disponible en Internet: <http://www.racve.es/actividades/veterinaria-salud-publica/2002-02-13SalvioJimenez.htm>
55. **SALAZAR**, M. Determinación de la lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) como indicador de calidad en leches comerciales, por espectrofotometría uv-visible. Popayán, 2007, 85p. Trabajo de grado (Química). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y de la Educación.
56. **ADRIAN**, J. Maillard reaction from the nutritional standpoint. II. Food behavior. En: Industrial Aliment Agricultural. 1972. Vol. 89. p. 1713-1720.

57. **JOHNSON, P.; LYKKEN, G.; MAHALKO, J.; MILNE, D.; INMAN, L.** The effect of browned and unbrowned corn products on absorption of zinc, iron and copper in humans in the Maillard reaction in food and nutrition. En: Journal of American Chemical Society. 1983. p. 316-322.



**ANEXOS**

**ANEXO A**  
**COMPONENTES MAYORITARIOS DE LAS LECHES UHT, SEGÚN LA INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL ENVASE TETRAPAK**

LECHE	INFORMACIÓN NUTRICIONAL (Tamaño porción 200 mL)							
	CALORÍAS (cal)	CARBOHIDRATOS (g)		PROTEÍNAS (g)	GRASA			FIBRA DIETARIA (g)
		Totales	Azúcar (lactosa)		Total (g)	Saturada (g)	Colesterol (mg)	
<b>Leches Enteras</b>								
ALE	128,0	10,0	10,0	6,0	7,0	5,0	30,0	0,0
CEV	119,9	10,0		6,0	6,0	4,0	28,0	
PEFeV	118,2	9,6		6,0	6,2			
<b>Leches Semidescremadas</b>								
SFS	94,0	9,4		6,2	3,4			
SFSD	92,0	9,4		5,9	3,4			
PS	90,20	9,8		6,0	3,0			
PSOV	94,0	9,6		6,4	3,4	1,8	320	
PSD	91,0	9,8	0,48	6,2	3,0			
APSV	80,0	9,6	9,6	5,6	3,0	1,6	12,0	
APSMV	90,0	11,0		5,4	3,0	2,0	12,0	
APSCaV	80,0	9,6	9,6	5,6	3,0	1,6	12,0	
APSD	80,0	9,6	1,4	5,6	3,0	1,6	12,0	
CSV	100,0	10,0		6,0	4,0	2,0	16,0	0,0
CSDV	95,9	10,0	0	6,0	4,0	2,0	15,0	
ALSDF	92,0	10,0		6,0	3,0	2,0	15,0	<1
<b>Leches Descremadas</b>								
CDV	71,9	10,0		6,0	1,0	0,0	4,0	
ALDF	67,0	10,0		6,0	0,0	0,0	0,0	<1
APD	56,0	9,36	9,36	5,36	0,0	0,0	0,0	
PDD	65,8	9,8	0,48	6,2	0,20			
APDD	56,0	9,36	1,4	5,36	0,0	0,0	0,0	
APDF	72,0	12,8	10,4	6,2	0,8	0,08	0,0	2,48

**ANEXO B**  
**COMPONENTES MINORITARIOS DE LAS LECHES UHT, SEGÚN LA INFORMACIÓN NUTRICIONAL DEL ENVASE TETRAPAK**

LECHE	INFORMACIÓN NUTRICIONAL (Tamaño porción 200 mL)																
	MINERALES						VITAMINAS										
	Na (mg)	Ca (%)	Fe (%)	P (%)	Zn (%)	Totales (g)	A (%)	D (%)	C (%)	E (%)	B <sub>1</sub> (%)	B <sub>2</sub> (%)	B <sub>6</sub> (%)	B <sub>12</sub> (%)	ÁCIDO FOLICO (%)	NIACINA (%)	BIOTINA (%)
<b>Leches Enteras</b>																	
ALE	96	48,0	1,0				4,0	40,0	0,0								
CEV	100	25,0	1,0				20,0	25,0			22,0	16,0					
PEFeV***		0,12	0,48				0,078	0,001			0,06	0,08	0,13		20,0	1,0	9,0
<b>Leches Semidescremadas</b>																	
SFS		0,11		88,0		1,40						0,16		0,4			
SFSD*		0,12				1,40											
PS		0,12				1,22	0,075	0,001									
PSOV**		0,12							20,0	3,0			0,6				
PSD*		0,12				1,20											
APSV	76	28,0		16,0			12,0	12,0									
APSMV	95	35,0	20,0	25,0	35		17,5	50,0	12,5	15,0	15,0	25,0	15,0	50,0	27,5	12,5	50,0
APSCaV	76	62,4		35,0			12,0	12,0									
APSD*	76	28,0		16,0													
CSV	100	25,0	1,0				10,0	20,0									
CSDV*	100	22,0	1,0				25,0	25,0			26,0	16,0					
ALSDF*	97	48,0	1,0				2,0	20,0	0,0								
<b>Leches Descremadas</b>																	
CDV	80	25,0	1,0				20,0	24,0			22,0	16,0					6,2
ALDF	96	48,0	1,0				0,0	0,0	0,0								
APD	104	24,0		20,0			12,0	12,0									
PDD*		0,12				1,20											
APDD*	76	24,0		20,0			12,0	12,0									
APDF		48,0		16,8			24,0	42,4									

\* Enzima lactasa

\*\* Estabilizante tripolifosfato de sodio

\*\*\*Hierro minoquelado

