



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Veterinària

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Aplicación de indicadores nativos de fluorescencia para la evaluación rápida de daño térmico en el procesado de leche

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos

Ulises Alvarado Mamani

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2016



Los Drs. MANUEL CASTILLO ZAMBUDIO y JORDI SALDO PERIAGO, profesores del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona

HACEN CONSTAR: que el Ingeniero Agroindustrial **Ulises Alvarado Mamani** ha realizado, bajo su dirección, en el área de Ciencia de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado **“Aplicación de indicadores nativos de fluorescencia para la cuantificación rápida de daño térmico en el procesado de leche”** que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Y para que así conste firmamos el presente documento en:

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), el 14 de diciembre de 2016.

Dr. Manuel Castillo Zambudio

Dr. Jordi Saldo Periago

Esta tesis doctoral fue financiada por el Programa Nacional de Becas y crédito Educativo (PRONABEC) y por el proyecto de fluorescencia (AGL201 – 33957 Project, cofinanciado con fondos FEDER), a quienes el autor agradece eternamente por la confianza depositada.



A mis padres: Bernabé Alvarado y María S. Mamani

A mi querido hijo, Eduardo

Y a mis hermanas(o) Maribel, Ruth y Alex

“La ciencia de hoy en día es la tecnología de mañana”

Edward Teller

AGRADECIMIENTOS

A mi país y a la Universidad Autónoma de Barcelona por haberme dado la oportunidad de seguir fortaleciéndome como profesional y desarrollarme como investigador.

A Manuel, por haberme aceptado como su doctorando y darme oportunidad de incursionar al mundo de la investigación científica. Sus sabios consejos y su personalidad cordial, refleja admiración.

A Jordi mi más amplio reconocimiento por su valiosa dirección, consejo y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Junto con Manuel fueron los máximos artífices colaboradores del desarrollo de esta memoria de tesis.

De igual modo quiero hacer extensivo mi agradecimiento al equipo del proyecto de fluorescencia, a Noemí, Jinfang, Carlos, por los consejos y por los seminarios impartidos durante estos años. A Noemí un especial reconocimiento por su constante apoyo moral en todo momento.

A Marta por haber sido la iniciadora de esta linda aventura, estoy infinitamente agradecido por haber depositado la confianza en mi persona y contactarme con Manuel.

A Ramón y Joan Miquel quienes siempre se caracterizan por ser joviales, además sus consejos y apoyo moral fueron trascendentales para la culminación de la tesis y por lo tanto una inolvidable experiencia en Barcelona.

A Bibiana por haberme dado alcances sobre el manejo de algunos equipos para el desarrollo de la tesis.

A Cindy por haber sido una compañera con quien compartí momentos gratos y apoyo mutuo durante nuestros estudios de doctorado, donde nuestro principal objetivo común fue obtener el tan ansiado grado de Doctor.

A todos mis compañeros del programa de doctorado: Abel, Sonia, Cristina, Sasha, en especial a Oscar con quien compartimos momentos muy gratos, a la vez fuimos compañeros de oficina. Doy gracias a la vida por haberme dado oportunidad de conocer gente estupenda y haber vivido esta etapa de mi vida en España.

Publicaciones y presentaciones derivadas de esta tesis

Presentación de posters:

Alvarado, U., Juan, B., Zamora, A., Saldo, J., Castillo, M. Cuantificación rápida de riboflavina en leche mediante fluorescencia “*front-face*”. VIII CYTA/CESIA (Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos -CYTA- y Congreso Español de Ingeniería de Alimentos (CESIA), Badajoz, España, 7-10 de abril de 2015.

Alvarado, U., Juan, B., Zamora, A., Liu, J., Saldo, J., Castillo, M. Quick prediction of the concentration of ascorbic acid in heat-treated milk using front-face autofluorescence. 29th EFFoST (European Federation of Food Science & Technology). Athens, Greece, 10 – 12 november 2015.

U. Alvarado, A. Zamora, J. Saldo and M. Castillo. Kinetics of ascorbic acid thermal degradation in skim milk. The Food Factor I Barcelona Conference, Spain. 2 – 4 november 2016.

U. Alvarado, N. Ayala, A. Zamora, J. Saldo and M. Castillo. Prediction of riboflavin concentration in heat-treated skim milk using front-face fluorescence. The Food Factor I Barcelona Conference, Spain. 2 – 4 november 2016.

N. Ayala, U. Alvarado, A. Zamora, J. Saldo and M. Castillo. Classification of heat-treatment intensity in skim milk using discriminant analysis. The Food Factor I Barcelona Conference, Spain. 2 – 4 november 2016.

RESUMEN

El objetivo de esta tesis es la aplicación de indicadores nativos de fluorescencia para la cuantificación rápida de los cambios generados por el calor en varios marcadores de daño térmico, tales como: hidroximetilfurfural (HMF), grupos sulfhidrilo (-SH), ácido ascórbico (AA) y riboflavina (Rbf) en leche desnatada mediante espectroscopía de fluorescencia “*front-face*”.

Se llevaron a cabo cuatro experimentos: en los dos primeros se estudió la cinética de desaparición y/o aparición de los marcadores indicados y, a partir de la información generada, se construyeron modelos cinéticos, así como de predicción mediante marcadores de fluorescencia. En el tercer experimento, con la utilización de dos fluorímetros diferentes (sobremesa y fibra óptica), se validaron y recalibraron los modelos de predicción obtenidos anteriormente, empleando muestras generadas en planta piloto en condiciones industriales.

En el caso de los modelos cinéticos, éstos fueron validados y recalibrados combinando datos de los tres experimentos a fin de ampliar el número de muestras y obtener modelos mejorados. La aparición y/o degradación de los marcadores químicos estudiados se ajustó a cinéticas de primer orden. Se estimaron algunos parámetros cinéticos tales como la energía de activación, la constante preexponencial de Arrhenius y el coeficiente térmico.

Durante el proceso de validación de los modelos matemáticos de predicción de los marcadores, los indicadores estadísticos tales como CV (coeficiente de variación) y SEP (error estándar de predicción) resultaron elevados; más aún con los datos de fibra óptica, debido a diferencias de configuración óptica entre los espectrómetros de sobremesa y de fibra óptica. Por ello se realizó por una parte un recalibrado de los modelos de sobremesa con los datos de los tres experimentos, si bien en el caso del equipo de fibra óptica se procedió a la calibración empleando exclusivamente datos de planta piloto generados con el tercer experimento y consiguiente validación mediante el método de validación cruzada “*leave one out*”. La fluorescencia del triptófano, los compuestos intermedios de Maillard y la riboflavina excitada a 370 fueron los predictores más importantes en la calibración de los modelos.

El mejor modelo seleccionado tanto para el equipo de sobremesa como para el de fibra óptica fue el correspondiente a la predicción del ácido ascórbico con $CV < 12\%$ mientras que los modelos con mayor variabilidad de error fueron los del hidroximetilfurfural con $CV < 45\%$.

En un cuarto experimento se desarrolló un método de cuantificación rápida de riboflavina mediante la medida de fluorescencia "*front-face*". Los valores obtenidos con el modelo desarrollado para cuantificar la riboflavina en leches comerciales no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los métodos convencionales (HPLC).

La fluorescencia "*front-face*" es un método rápido, sencillo y sin manipulación de muestra que permite calibrar modelos de predicción de los marcadores de daño térmico en leche. La aplicación en línea de los modelos desarrollados presenta un gran potencial para la mejora del control de los tratamientos térmicos en leche, si bien los resultados obtenidos hasta el momento indican que la implementación de los mismos requeriría una etapa previa de calibración en planta.

ABSTRACT

The objective of this thesis is the application of native indicators of fluorescence for the rapid quantification of heat-induced changes in several thermal damage markers, such as hydroxymethylfurfural (HMF), sulfhydryl groups(-SH), ascorbic acid (AA) and riboflavin (Rbf) in skim milk by front-face fluorescence spectroscopy.

Four experiments were carried out: in the first two, the kinetics of disappearance and / or appearance of the indicated markers were studied and kinetic models were constructed from the information generated as well as prediction models by fluorescence markers. In the third experiment, with the use of two different fluorimeters (benchtop and optic fiber), the prediction models previously obtained were validated and recalibrated using samples generated in a pilot plant under industrial conditions.

In the case of kinetic models, these were validated and recalibrated by combining data from the three experiments in order to increase the number of samples and obtain improved models. The appearance and / or degradation of the chemical markers studied was adjusted to first order kinetic equations. Some kinetic parameters such as activation energy, Arrhenius pre-exponential constant and thermal coefficient were estimated.

During the validation process of the markers prediction models, statistical indicators such as CV (coefficient of variation) and SEP (standard error of prediction) were high; even higher with optic fiber data, due to differences in optical configuration between benchtop and optic fiber spectrometers. For this reason, a recalibration of the benchtop models with the data of the three experiments was carried out, although in the case of optic fiber equipment, calibration was carried out exclusively using the pilot plant data generated in the third experiment and validation using the *leave one out* cross validation method. The fluorescence of tryptophan, intermediates compounds of Maillard reaction and riboflavin excited at 370 nm were the most important predictors in the calibration of the models. The best model selected for both the benchtop and optic fiber equipment was the prediction of ascorbic acid with CV <12%, while the models with the highest error variability were for hydroxymethylfurfural with CV <45%.

In a fourth experiment, a rapid quantification method of riboflavin was developed by the measurement of front-face fluorescence. The values obtained with the model developed to quantify riboflavin in commercial milks were not significantly different from those obtained with conventional methods (HPLC).

Front-face fluorescence is a fast, simple method. Without the need of sample manipulation, allows calibration of thermal damage predictive models. The inline application of the developed models presents potential for the improvement of the control of thermal treatments in milk, although the results obtained so far indicate that the implementation of the models would require a previous stage of calibration in plant.

RESUM

L'objectiu d'aquesta tesi és l'aplicació d'indicadors nadius de fluorescència per a la quantificació ràpida dels canvis generats per la calor en diversos marcadors de dany tèrmic, com ara: hidroximetilfurfural (HMF), grups sulfhidril (-SH), àcid ascòrbic (AA) i riboflavina (RBF) en llet desnatada mitjançant espectroscòpia de fluorescència "*front-face*".

Es van dur a terme quatre experiments; en els dos primers es va estudiar la cinètica de desaparició i / o aparició dels marcadors indicats i, es van construir models cinètics a partir de la informació generada, així com de predicció mitjançant marcadors de fluorescència. En el tercer experiment, amb la utilització de dos fluorímetres diferents (sobretaula i fibra òptica), es van validar i recalibrar els models de predicció obtinguts anteriorment, emprant mostres generades en planta pilot en condicions industrials.

En el cas dels models cinètics, aquests van ser validats i recalibrats combinant dades dels tres experiments per tal d'ampliar el nombre de mostres i obtenir models millorats. L'aparició i / o degradació dels marcadors químics estudiats es va ajustar a cinètiques de primer ordre. Es van estimar alguns paràmetres cinètics com ara l'energia d'activació, constant preexponencial d'Arrhenius i coeficient tèrmic.

Durant el procés de validació dels models matemàtics de predicció dels marcadors, indicadors estadístics com ara CV (coeficient de variació) i SEP (error estàndard de predicció) van resultar elevats; més encara amb les dades de fibra òptica, a causa de diferències de configuració òptica entre els espectròmetres de sobretaula i fibra òptica. Per això es va realitzar per una banda un recalibrat dels models de sobretaula amb les dades dels tres experiments, si bé en el cas de l'equip de fibra òptica es va procedir al calibratge emprant exclusivament dades de planta pilot generats amb el tercer experiment i consegüent validació mitjançant el mètode de validació creuada "*leave one out*". La fluorescència del triptòfan, compostos intermedis de Maillard i riboflavina excitada a 370 nm van ser els predictors més importants en el calibratge dels models. El millor model seleccionat tant per a l'equip de sobretaula com per al de fibra òptica va ser el corresponent a la predicció de

l'àcid ascòrbic amb CV <12% mentre que els models amb major variabilitat d'error van ser els del hidroximetilfurfural amb CV <45%.

En un quart experiment es va desenvolupar un mètode de quantificació ràpida de riboflavina mitjançant la mesura de fluorescència "*front-face*". Els valors obtinguts amb el model desenvolupat per quantificar la riboflavina en llets comercials no van ser significativament diferents dels obtinguts amb els mètodes convencionals (HPLC).

La fluorescència "*front-face*" és un mètode ràpid, senzill i sense manipulació de mostra que permet calibrar models de predicció dels marcadors de dany tèrmic en llet. L'aplicació en línia dels models desenvolupats presenta potencial per a la millora del control dels tractaments tèrmics en llet, si bé els resultats obtinguts fins al moment indiquen que la implementació dels mateixos requeriria una etapa prèvia de calibratge en planta.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
1 Interés del estudio	3
2 Revisión bibliográfica	7
2.1 Situación actual y perspectivas del sector lácteo	7
2.2 El tratamiento térmico en la industria láctea.....	8
2.2.1 Termización	9
2.2.2 Pasteurización baja	9
2.2.3 Pasteurización alta	11
2.2.4 Esterilización UHT	12
2.3 Principales marcadores químicos de daño térmico y su cuantificación en la industria láctea	14
2.3.1 Ácido ascórbico	14
2.3.2 Riboflavina	16
2.3.3 Grupos sulfhidrilo (-SH)	18
2.3.4 Hidroximetilfurfural.....	21
2.4 Métodos rápidos alternativos de análisis para control de los tratamientos térmicos en la industria láctea	23
2.4.1 Espectroscopía de fluorescencia	27
2.4.2 Principales compuestos autofluorescentes en la leche	37
3 Objetivos y plan de trabajo	49
3.1 OBJETIVOS	49
3.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	49
3.1.2 Objetivos específicos:.....	49
3.1.3 Objetivo complementario:	49

3.2	PLAN DE TRABAJO	50
4	Materiales y métodos.....	59
4.1	Recepción de leche.....	59
4.2	Tratamientos térmicos aplicados a la leche	59
4.3	Determinación de fluorescencia	60
4.4	Cuantificaciones químicas de marcadores de daño térmico	62
4.4.1	Cuantificación del hidroximetilfurfural	62
4.4.2	Cuantificación de los grupos sulfhidrilo totales	63
4.4.3	Cuantificación del ácido ascórbico.....	65
4.4.4	Cuantificación de la riboflavina	65
4.5	Modelización de datos cinéticos.....	66
4.6	Obtención de modelos de predicción	69
4.7	Validación de los modelos matemáticos de predicción	69
4.8	Calibrado y validado de modelos para el equipo portátil.....	70
5	Resultados y discusión	73
5.1	Estudio cinético de formación/desaparición de marcadores de daño térmico.....	73
5.1.1	Hidroximetilfurfural (HMF).....	73
5.1.2	Grupos sulfhidrilo (-SH)	75
5.1.3	Ácido ascórbico (AA)	77
5.1.4	Riboflavina (Rbf).....	84
5.2	Análisis de marcadores de daño térmico en leche desnatada tratada en condiciones industriales	89
5.3	Estudio de los marcadores fluorescentes durante el tratamiento térmico.....	96

5.3.1	Fluorescencia del triptófano (F_{Trp}).....	96
5.3.2	Fluorescencia de los compuestos intermedios de la reacción de Maillard (F_{CM}).....	101
5.3.3	Fluorescencia de Ditirosina (F_{Dt}).....	104
5.3.4	Fluorescencia de la riboflavina (F_{Rbf}).....	105
5.4	Obtención de modelos matemáticos, a partir de un sistema modelo, para predicción de hidroximetilfurfural, grupos sulfhidrilo, ácido ascórbico y riboflavina.....	110
5.4.1	Hidroximetilfurfural (HMF).....	111
5.4.2	Grupos sulfhidrilo.....	112
5.4.3	Ácido ascórbico.....	114
5.4.4	Riboflavina.....	116
5.5	Validación y recalibrado de los modelos cinéticos para la predicción de daño térmico en leche procesadas en condiciones industriales.....	117
5.5.1	Validación de los modelos cinéticos.....	118
5.5.2	Recalibrado de modelos cinéticos.....	121
5.6	Validación y recalibrado de los modelos de fluorescencia para estimación del daño térmico en muestras procesadas en condiciones industriales.....	124
5.6.1	Validación de los modelos matemáticos a partir de compuestos fluorescentes.....	124
5.6.2	Recalibrado de modelos de fluorescencia para predicción de daño térmico en el equipo de sobremesa.....	130
5.7	Calibración y validación cruzada para el equipo portátil.....	136
6	Cuantificación rápida de riboflavina en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ”.....	143
6.1	Introducción.....	143

6.2	Materiales y métodos	144
6.3	Resultados y discusión.....	145
6.3.1	Resultados de la calibración del método	145
6.3.2	Resultados de la validación del método	146
6.3.3	Resultados del contraste de diferentes métodos de cuantificación de riboflavina	147
6.4	Conclusiones.....	148
7	Conclusiones	151
8	Bibliografía.....	155

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.3.1. Resumen de la concentración y métodos de cuantificación del ácido ascórbico.....	15
Tabla 2.3.2. Parámetros cinéticos de degradación del ácido ascórbico en alimentos.	16
Tabla 2.3.3. Resumen de concentración y métodos de cuantificación de riboflavina.	17
Tabla 2.3.4. Parámetros cinéticos de degradación de la riboflavina en los alimentos.	18
Tabla 2.3.5. Resumen de la concentración y métodos de cuantificación de –SH.20	
Tabla 2.3.6. Parámetros cinéticos de cambio de concentración de grupos –SH. 21	
Tabla 2.3.7. Parámetros cinéticos de formación de hidroximetilfurfural.....	23
Tabla 2.4.1. Los fluoróforos predominantes en la industria láctea.....	38
Tabla 4.1.1. Longitudes de onda de excitación y emisión, y el scan de emisión empleados para la determinación de fluorescencia de los fluoróforos.....	61
Tabla 4.1.2. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro portátil.....	62
Tabla 4.1.3. Contenido de los blancos empleados en la determinación de grupos – SH.....	64
Tabla 5.1.1. Efecto del tratamiento térmico a 80 °C sobre la formación del hidroximetilfurfural en leche desnatada reconstituida.....	74
Tabla 5.1.2. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas para la formación de hidroximetilfurfural durante el tratamiento térmico en leche, estudiadas a 80 °C. 75	
Tabla 5.1.3. Efecto del tiempo de tratamiento térmico a 80 °C sobre la desaparición de los grupos sulfhidrilo en leche desnatada reconstituida.....	77
Tabla 5.1.4. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas para la desaparición de grupos sulfhidrilo (–SH) durante el tratamiento térmico.....	77

Tabla 5.1.5. Análisis de varianza de los factores de estudio sobre la degradación del ácido ascórbico.....	78
Tabla 5.1.6. Efecto del tratamiento térmico sobre la degradación del ácido ascórbico.....	79
Tabla 5.1.7. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas de desaparición del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico.	81
Tabla 5.1.8. Parámetros cinéticos del ácido ascórbico en la leche de primer orden.	81
Tabla 5.1.9. Análisis de varianza de los factores experimentales sobre la degradación de la riboflavina.....	84
Tabla 5.1.10. Efecto del tratamiento térmico sobre la pérdida de la riboflavina... ..	86
Tabla 5.1.11. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas de desaparición de riboflavina durante el tratamiento térmico en leche desnatada.	86
Tabla 5.1.12. Parámetros cinéticos para el modelo de primer orden de la riboflavina en la leche desnatada.	87
Tabla 5.2.1. Promedio de valores de los marcadores de daño térmico evaluados en leche desnatada producidas en condiciones industriales.....	90
Tabla 5.2.2. Concentración del hidroximetilfurfural en diferentes tipos de leche. ..	91
Tabla 5.4.1. Modelos de predicción de la formación del hidroximetilfurfural en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a 80 °C.	111
Tabla 5.4.2. Modelos de predicción de la desaparición de los grupos sulfhidrilo en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a 80 °C.....	113
Tabla 5.4.3. Modelos de predicción de la degradación del ácido ascórbico en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a diferentes temperaturas.	114
Tabla 5.4.4. Modelos generales de predicción de la degradación del ácido ascórbico en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a todas las temperaturas.	115

Tabla 5.4.5. Modelos de predicción de la degradación de la riboflavina en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a diferentes temperaturas.	116
Tabla 5.4.6. Modelos generales de predicción de la degradación de la riboflavina en leche mediante fluorescencia “ <i>front-face</i> ” a todas las temperaturas.	117
Tabla 5.6.1. Parámetros de factor de proporcionalidad de medidas de fluorescencia entre ambos equipos.	125
Tabla 5.6.2. Resultados de la validación de los modelos para la predicción del hidroximetilfurfural.	126
Tabla 5.6.3. Resultados de la validación de los modelos para la predicción de grupos sulfhidrilo.	127
Tabla 5.6.4. Resultados de la validación de los modelos para la predicción del ácido ascórbico.	128
Tabla 5.6.5. Resultados de la validación de los modelos para la predicción de riboflavina.	129
Tabla 5.6.6. Nuevos indicadores y coeficientes del modelo recalibrado para predecir la concentración del hidroximetilfurfural.	131
Tabla 5.6.7. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración de grupos sulfhidrilo.	132
Tabla 5.6.8. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración del ácido ascórbico.	134
Tabla 5.6.9. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración de la riboflavina.	135
Tabla 5.7.1. Modelos matemáticos calibrados para el equipo portátil.	137
Tabla 5.7.2. Indicadores matemáticos de los modelos calibrados y validados para la predicción del daño térmico en leche desnatada.	138
Tabla 6.3.1. Cuantificación de la riboflavina en leches desnatadas en polvo (LDP) y UHT comerciales por diferentes métodos.	147

Tabla 6.3.2. Cuantificación de la riboflavina en leches enteras comerciales (UHT) por diferentes métodos.....	148
---	-----

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.1. Uso de la leche para productos lácteos. Reproducido de (FAO., 2015).	7
Figura 2.2.1. Pasteurizador por lotes (LTLT), reproducido de www.packocooling.com.	10
Figura 2.2.2. Pasteurizador HTST, reproducido de http://www.inoxpa.co	11
Figura 2.2.3. Intercambiador de calor tubular, reproducido de http://www.tetrapak.com	12
Figura 2.2.4. Autoclave para productos envasados, reproducido de JERSA (2016).	13
Figura 2.3.1. Desnaturalización de proteínas y la producción de puentes disulfuro. Adaptado de (Walstra et al., 2006) y (Bylund, 1995).	19
Figura 2.3.2. Representación esquemática de la formación de furfural a partir de grupo ϵ -amino libres de la lisina y lactosa en la reacción de Maillard: (A) a través de compuestos de Amadori y (B) la isomerización de lactosa. Reproducido de Chávez- Servín et al. (2005).	22
Figura 2.4.1. Estados electrónicos del espín de moléculas. Reproducido de Skoog et al. (2008)	28
Figura 2.4.2. Diagrama parcial de los niveles de energía para un sistema fotoluminiscente. Reproducido de Skoog et al. (2008).	30
Figura 2.4.3. (A) Geometría de ángulo recto, (B) geometría “front-face” (45°), (C) geometría “front-face” (60°), y (D) geometría de ángulo de 45° con celda triangular. Reproducido de Dankowska (2016).	31
Figura 2.4.4. Partes de un fluorímetro o espectrofluorímetro. Reproducido de (Skoog et al., 2008)	33
Figura 2.4.5. Esquema de uso de espectrofotómetros de fluorescencia de fibra óptica. Reproducido de Ocean Optics (http://oceanoptics.com/ , 2016).	34

Figura 2.4.6. Máxima de excitación y emisión de los fluoróforos en productos lácteos (Andersen y Mortensen, 2008).....	37
Figura 2.4.7. Estructura de los aminoácidos aromáticos (Lakowicz, 2006b).	39
Figura 2.4.8. Diagrama de cintas de una unidad de β -LG de bovino. Las ubicaciones de Trp 19 y Trp 61 se indican (Taheri-Kafrani et al., 2010).	40
Figura 2.4.9. Estructura de la riboflavina.	41
Figura 2.4.10. Reacción de Maillard, reproducido de Bastos et al. (2012).	43
Figura 2.4.11. Formación de ditirosina (Saeed et al., 2006).....	45
Figura 3.2.1. Plan de trabajo para obtener modelos de predicción de la [HMF] y [-SH].	52
Figura 3.2.2. Plan de trabajo para obtener modelos de predicción de [AA] y [Rbf].	53
Figura 3.2.3. Plan de trabajo para validar y recalibrar los modelos de predicción con tratamientos térmicos en planta piloto.	54
Figura 3.2.4. Etapa I: Desarrollo y validación del modelo matemático.	55
Figura 3.2.5. Etapa II: contraste de validez en leches comerciales.	55
Figura 4.1.1. Equipo de tratamiento térmico en continuo Tetra Therm ® Aseptic Pilot utilizado en los experimentos.	60
Figura 4.1.2. A) Espectrofotómetro de sobremesa y B) portátil.....	61
Figura 5.1.1. Formación del hidroximetilfurfural en leche reconstituida desnatada a 80 °C	73
Figura 5.1.2. Desaparición de los grupos sulfhidrilo en leche reconstituida desnatada a 80 °C.....	76
Figura 5.1.3. Efecto de la temperatura respecto a la concentración del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico	78

Figura 5.1.4. Efecto del tiempo respecto a la concentración del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico.....	80
Figura 5.1.5. Efecto de la temperatura (70, 80 y 90 °C) sobre la velocidad de degradación del ácido ascórbico en la leche.....	82
Figura 5.1.6. Valores observados respecto a estimados del ácido ascórbico según modelo cinético de orden uno.	83
Figura 5.1.7. Efecto de la temperatura respecto a la disminución de la concentración de la riboflavina durante el tratamiento térmico.....	84
Figura 5.1.8. Efecto del tiempo respecto a la disminución de la concentración de la riboflavina durante el tratamiento térmico.	85
Figura 5.1.9. Efecto de la temperatura (70, 80 y 90 °C) sobre la velocidad de degradación de la riboflavina en la leche desnatada en base a un modelo cinético de orden uno.	88
Figura 5.1.10. Valores experimentales respecto a estimados de concentración de riboflavina en leche desnatada.....	89
Figura 5.2.1. Contenido de hidroximetilfurfural (HMF) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.	91
Figura 5.2.2. Gráfico del contenido de grupos sulfhidrilo (-SH) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.	93
Figura 5.2.3. Gráfico del contenido del ácido ascórbico (AA) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.	94
Figura 5.2.4. Gráfico del contenido de riboflavina (Rbf) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.	95

Figura 5.3.1. Espectros de emisión de fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.....	98
Figura 5.3.2. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 70 °C.....	98
Figura 5.3.3. Espectros de emisión de fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.....	100
Figura 5.3.4. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 80 °C.....	100
Figura 5.3.5. Espectros de la emisión de la fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.....	101
Figura 5.3.6. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 90 °C.....	101
Figura 5.3.7. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.	103
Figura 5.3.8. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.	103
Figura 5.3.9. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.	103
Figura 5.3.10. Cambios en la intensidad de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard a emisión de 424 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.	103
Figura 5.3.11. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.....	105

Figura 5.3.12. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.....	105
Figura 5.3.13. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.....	105
Figura 5.3.14. Cambios en la intensidad de fluorescencia de ditirosina, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.	105
Figura 5.3.15. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo.	107
Figura 5.3.16. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo.	107
Figura 5.3.17. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo.	107
Figura 5.3.18. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.	107
Figura 5.3.19. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 70 °C durante diferentes tiempos.....	108
Figura 5.3.20. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 80 °C durante diferentes tiempos.....	108
Figura 5.3.21. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 90 °C durante diferentes tiempos.....	108
Figura 5.3.22. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.	108
Figura 5.3.23. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 70 °C durante diferentes tiempos.....	109
Figura 5.3.24. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 80 °C durante diferentes tiempos.....	109
Figura 5.3.25. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 90 °C durante diferentes tiempos.....	109

Figura 5.3.26. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.	109
Figura 5.4.1. Relación entre los valores de hidroximetilfurfural (HMF) experimentales versus con valores estimados (modelo II).....	112
Figura 5.4.2. Relación entre los valores de –SH totales experimentales <i>versus</i> con valores estimados (modelo I).	113
Figura 5.4.3. Relación entre los valores de riboflavina experimental <i>versus</i> valores estimados (modelo III).....	115
Figura 5.4.4. Relación entre los valores de riboflavina experimental <i>versus</i> valores estimados (modelo III).....	117
Figura 5.5.1. Dispersión de residuales contra valores experimentales de hidroximetilfurfural.	119
Figura 5.5.2. Dispersión de residuales contra valores predichos de grupos sulfhidrilo.	119
Figura 5.5.3. Dispersión de residuales contra valores experimentales de ácido ascórbico.	120
Figura 5.5.4. Dispersión de residuales contra valores experimentales de la concentración de la riboflavina.	120
Figura 5.5.5. Representación gráfica de valores observados <i>versus</i> valores del modelo recalibrado para el hidroximetilfurfural.....	121
Figura 5.5.6. Representación gráfica de valores observados <i>versus</i> valores del modelo recalibrado para grupos sulfhidrilo totales.	122
Figura 5.5.7. Representación gráfica de valores observados <i>versus</i> valores del modelo recalibrado para el ácido ascórbico.	123
Figura 5.5.8. Representación gráfica de valores observados <i>versus</i> valores del modelo recalibrado para la riboflavina.....	123
Figura 5.6.1. Valores experimentales <i>versus</i> estimados (modelo II) de la concentración del hidroximetilfurfural.	126

Figura 5.6.2. Valores experimentales <i>versus</i> estimados (modelo II) de la concentración de grupos sulfhidrilo.	127
Figura 5.6.3. Valores experimentales <i>versus</i> estimados (modelo III) de la concentración del ácido ascórbico.	128
Figura 5.6.4. Valores experimentales <i>versus</i> estimados (modelo I) de la concentración de riboflavina.	130
Figura 5.6.5. Representación gráfica del modelo II <i>versus</i> concentración experimental del hidroximetilfurfural.	132
Figura 5.6.6. Representación gráfica de valores del modelo II <i>versus</i> valores experimentales de grupos sulfhidrilo.	133
Figura 5.6.7. Representación gráfica valores del modelo III <i>versus</i> valores experimentales del ácido ascórbico.	134
Figura 5.6.8. Representación gráfica de valores del modelo II <i>versus</i> valores experimentales de riboflavina.	135
Figura 6.3.1. Recta de calibración a concentraciones conocidas de riboflavina en leche reconstituida desnatada.	145
Figura 6.3.2. Relación entre los valores de riboflavina estimada y real.	146

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AA	Ácido ascórbico
BSA	Albúmina de suero bovino
CM	Compuestos intermedios de la reacción de Maillard
Dt	Ditirosina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F _{CM}	Fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard
F _{Dt}	Fluorescencia de la ditirosina
FFF	" <i>front-face fluorescence</i> "
F _{Rbf370}	Fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación 370 nm
F _{Rbf450}	Fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación 450 nm
F _{Rbf267}	Fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 267 nm
F _{Trp}	Fluorescencia del triptófano
HHST	Higher Heat Shorter Time
HMF	Hidroximetilfurfural
HTST	High Temperature Short Time
ppb	Partes por billón
PLS	Mínimos cuadrados parciales
ppm	Partes por millón
Rbf	Riboflavina
-SH	Grupos sulfhidrilo
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Trp	Triptófano
Trp19	Residuos de triptófano en la posición 19
Trp61	Residuos de triptófano en la posición 61
UHT	Ultra High Temperatura
α-LA	Alfa-lactoalbúmina
β-LG	Beta-lactoglobulina
λ _{FTrp}	Longitud de onda de máxima intensidad de fluorescencia del triptófano

Capítulo 1

1 Interés del estudio

La leche, desde el punto de vista nutricional, es considerada un alimento casi completo para el hombre por su equilibrada composición nutricional. Por sus características es susceptible a la contaminación y degradación por microorganismos, así como por las enzimas nativas o de origen microbiano. Esto obliga a la industria láctea a utilizar diferentes procesos para conservar sus cualidades nutritivas y extender su vida útil.

En la actualidad, el tratamiento térmico (termización, pasteurización o esterilización) de la leche cruda es imprescindible antes de su consumo con la finalidad de inactivar ciertas enzimas (p. ej., lipasas, proteasas) y destruir los microorganismos patógenos para garantizar la inocuidad para la salud humana y prolongar su vida útil. Durante este proceso se producen importantes cambios funcionales, nutricionales y organolépticos, según la intensidad del tratamiento aplicado. Uno de los efectos más significativos es la desnaturalización de las proteínas de suero que, en función del producto a elaborar, puede resultar recomendable (fabricación de yogur) o indeseable (elaboración de queso). Por ejemplo, la desnaturalización excesiva de proteínas séricas prolonga el tiempo de gelificación en la elaboración de queso resultando en geles blandos y de elevada humedad (Fox et al., 2015). El tratamiento térmico excesivo también induce otros efectos indeseables como reacciones de pardeamiento no enzimático, alteración del sabor, reducción del valor nutritivo e inactivación de los inhibidores de crecimiento bacteriano. Por lo tanto, en la industria láctea las condiciones de tratamiento térmico deben ser elegidas de tal manera que los resultados deseados (seguridad higiénica y aumento de su vida útil) se consigan, mientras que los cambios no deseables (es decir, pérdida de propiedades nutricionales, funcionales y organolépticas) se reduzcan al mínimo.

Por todo ello, la industria láctea lleva más de tres décadas intentando caracterizar el daño térmico mediante distintos marcadores o indicadores nativos (químicos y/o biológicos). Según Pellegrino *et al.* (1995), hay dos grupos de marcadores potenciales identificados. La primera categoría de marcadores, Tipo I, se corresponde con componentes lábiles al calor, tales como las proteínas de suero,

enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa) y vitaminas, que resultan estructural o funcionalmente modificados por el tratamiento térmico.

La segunda categoría de marcador, Tipo II, corresponde a la formación de nuevas sustancias, como la lactulosa, a partir de la isomerización de lactosa y productos de Maillard como el hidroximetilfurfural (HMF), entre otros. Para analizar cada uno de estos marcadores se requiere de métodos instrumentales, que son laboriosos y lentos. Así mismo, dichos métodos, generalmente, suelen también requerir preparación de muestra o equipos sofisticados y costosos, además de reactivos caros.

En los últimos años, el interés se ha dirigido hacia técnicas de medición no destructiva, rápida, exacta, reproducible y de bajo coste, entre las que principalmente destaca la espectroscopía de infrarrojo próximo (NIR) y la de fluorescencia. La espectroscopía de fluorescencia tradicional, es un método óptico rápido y sensible, que ha mostrado su potencial como procedimiento alternativo para la cuantificación de ciertos marcadores de daño térmico. Sin embargo, la instrumentación óptica necesaria es todavía compleja, costosa y no se puede utilizar en matrices turbias como la leche. El reciente avance de la fluorescencia “*front-face*” (FFF) que permite la medición directa de muestras turbias, representa una oportunidad única para el desarrollo de un método en línea para la cuantificación del daño térmico mediante marcadores nativos fluorescentes lácteos.

Se espera que los resultados de esta tesis contribuyan a sentar varias de las bases necesarias para el desarrollo de una tecnología FFF de determinación en línea del daño térmico que permita mejorar la monitorización y control de los tratamientos térmicos en leche, minimizando los daños y facilitando la toma de decisiones en relación con el uso de la leche tratada (p. ej., destinar los lotes a los fines más adecuados en base a su funcionalidad). El impacto que dicha tecnología óptica tendría en la calidad y consistencia organoléptica y nutricional de los productos lácteos, en la garantía de la seguridad alimentaria y en el cumplimiento de las normas reguladoras, junto a la actual inexistencia de un método simple, rápido, exacto y universal de determinación del daño térmico motiva la presente investigación.

Capítulo 2

2 Revisión bibliográfica

2.1 Situación actual y perspectivas del sector lácteo

Según la FAO. (2015) en los últimos 30 años la producción de leche aumentó en un 50% a nivel mundial. Europa representa el 28% de la producción total de leche siendo el segundo productor en el mundo después de Asia. La Figura 2.1.1 muestra cifras del aprovechamiento y uso de la leche; el ~43% es destinado al consumo de leche fresca y otras, y el resto a otros derivados lácteos (queso, yogur, etc). En España, más del 50% de la producción se destina a la elaboración de leche líquida de consumo directo (MAPA, 2015).

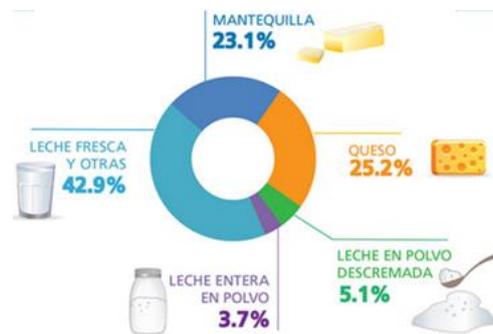


Figura 2.1.1. Uso de la leche para productos lácteos. Reproducido de (FAO., 2015).

La leche y sus derivados lácteos tienen un alto valor nutricional y se consumen en todo el mundo (Yang et al., 2016). El consumo de leche líquida per cápita aumentó en España un ~50% durante los últimos 50 años. Actualmente el consumo per cápita es de ~73 litros por año (MAPA, 2015). Según FAO. (2013), se espera que el consumo anual de productos lácteos aumente de 1,6 a 2,8% durante la próxima década, mostrando mayor dinamismo el mercado de leche líquida. Además, se estima que a finales de esta década la demanda mundial de leche y otros productos lácteos líquidos se incrementará cerca de un 30% en África, Asia y América Latina, en gran parte debido al crecimiento demográfico, aumento de las rentas familiares, mejora del nivel de vida e incremento de urbanización.

Para satisfacer esta demanda futura, la industria láctea jugará un papel importante en la producción y conservación de productos lácteos de alta calidad, que garantice la calidad higiénica y nutricional de la leche. En la actualidad,

existen diversas técnicas para su conservación (evaporación, secado, acidificación, radiación, tratamiento por frío y calor) que buscan prolongar y conservar las características nutricionales y organolépticas de la leche original, siendo el tratamiento térmico la técnica más empleada en el mundo. En España, del total de la leche consumida, el 96% corresponde a leche esterilizada, el 3% a pasteurizada y un 1% restante a leche cruda (MAPA, 2015).

2.2 El tratamiento térmico en la industria láctea

La leche cruda, debido al alto valor nutritivo (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), elevada actividad de agua y pH neutro, es uno de los alimentos más vulnerables y constituye un excelente medio de cultivo en presencia de microorganismos, cuya proliferación puede resultar beneficiosa, p. ej., las bacterias lácticas, o por el contrario puede ocasionar deterioro fisicoquímico y organoléptico, que limita la durabilidad de la leche, o incluso puede generar efecto patógeno. Por tanto, se hace imprescindible el tratamiento térmico, que debe ser elegido adecuadamente para conservar en la mayor medida posible el valor nutricional y las características sensoriales y fisicoquímicas de la leche.

La esterilización comercial y la pasteurización son los procesos más frecuentes aplicados a la leche (Diez et al., 2008). Durante el tratamiento térmico como se ha indicado anteriormente, ocurren algunos cambios en su composición química (Walstra et al., 2006), entre los que destacan pérdida de vitaminas, disminución del pH, precipitación de fosfato de calcio, desnaturalización de las proteínas del suero e interacción con la caseína, isomerización de la lactosa, reacción de Maillard y las modificaciones micelares (Tamime, 2009). Los cambios inducidos por el tratamiento térmico son convenientes o inconvenientes en función del producto a elaborar.

Por ello, en la práctica, la intensidad del tratamiento térmico se suele adaptar según el producto a elaborar. El yogur requiere un tratamiento más intenso que el queso, porque se consigue mayor viscosidad y menor tendencia a la liberación del suero al incorporar las proteínas séricas desnaturalizadas al gel (Lee y Lucey, 2010). Sin embargo, para el queso no es conveniente la desnaturalización de las

proteínas del suero, que de producirse provocaría una coagulación defectuosa (Law y Tamime, 2010).

2.2.1 Termización

Este procedimiento se aplica en granjas para evitar el deterioro hasta la recogida de la leche. También se emplea en centrales lecheras de gran tamaño, donde no es posible pasteurizar y procesar toda la leche inmediatamente después de su recepción (Madrid, 2016).

Es un tratamiento térmico de menor intensidad que la pasteurización que consiste en calentar la leche cruda a temperaturas de 57– 68 °C durante 15 s, seguido de refrigeración inmediata (Walstra et al., 2006). La leche se puede almacenar durante tres días a un máximo de 8 °C (Tamime, 2009). El objetivo no es higienizar la leche (eliminación de bacterias patógenas) sino reducir el crecimiento de la mayoría de bacterias psicrótrofas y psicrófilas permitiendo mejorar la calidad de conservación de la leche (Ryser, 2011), dado que algunas de ellas producen lipasas y proteasas muy termorresistentes (Walstra et al., 2006).

La termización no origina cambios irreversibles, por lo que una vez tratada, la leche debe resultar positiva a la prueba de la fosfatasa alcalina a diferencia de la leche pasteurizada. La leche termizada es habitualmente sometida a pasteurización o un tratamiento más severo para su uso posterior (Tamime, 2009).

2.2.2 Pasteurización baja

La pasteurización es el tratamiento térmico más utilizado en leche y productos lácteos fluidos (Ryser, 2011). Está destinada a reducir el número de microorganismos nocivos en la leche a niveles que no impliquen ningún peligro significativo para la salud del consumidor (Tamime, 2009), garantizando la seguridad higiénica. Además, incrementa la vida útil a una semana o más tiempo cuando se mantiene refrigerada (Walstra et al., 2006), al contribuir a inactivar microorganismos alterativos y ciertas enzimas hidrolíticas.

La pasteurización tradicional de la leche inactiva la fosfatasa alcalina, pero no la peroxidasa, mientras que las micelas de caseína se mantienen fundamentalmente estables (Kulmyrzaev et al., 2005), siendo mínimos los cambios en las características químicas, físicas y organolépticas del producto.

La pasteurización puede realizarse como una operación discontinua (pasteurización baja por lotes o pasteurización lenta a baja temperatura -LTLT-) en la que el producto se calienta y se retiene en una cisterna cerrada a 63-65 °C durante 30 min (Figura 2.2.1). Este tratamiento se aconseja para cantidades de leche de hasta 2000 L, y con escasa carga bacteriana. Para cantidades mayores, se aconseja el método de pasteurización rápida (HTST), realizada en equipo continuo.



Figura 2.2.1. Pasteurizador por lotes (LTLT), reproducido de www.packocooling.com.

La pasteurización a alta temperatura corto tiempo (HTST) se realiza en un intercambiador de calor de placas o tubulares, donde la leche se calienta a 72 - 75 °C y se mantiene a esta temperatura durante unos segundos (15-20) o mediante una combinación de tiempo y temperatura equivalente que consigan los mismos efectos (Esteire et al., 2014) y es el tratamiento estándar para leche que debe ser transformada en queso (Figura 2.2.2).



Figura 2.2.2. Pasteurizador HTST, reproducido de <http://www.inoxpa.co>.

2.2.3 Pasteurización alta

La pasteurización alta se caracteriza por inactivar la enzima lactoperoxidasa. En esta categoría se distinguen varios procesos: *Higher-Heat/Shorter-Time* (HHST) que aplica un calentamiento de 85 °C durante 20 s, si bien a veces se emplean temperaturas mayores y tiempos más cortos (p. ej., 90 °C, 0,5 s; 95 °C, 0,1 s), también se utilizan a veces temperaturas de 100 a 130 °C durante 4 a 16 s (Sodini et al., 2004). Este tratamiento más intenso es suficiente para inactivar la lactoperoxidasa (Madrid, 2016), implica también la inactivación de la mayoría de las células vegetativas bacterianas y enzimas, excepto la proteínasa de la leche (plasmina) y algunas proteinasas y lipasas bacterianas resisten total o parcialmente el tratamiento.

La leche destinada a la producción de productos lácteos fermentados (yogur) es normalmente objeto de un calentamiento intenso para desnaturalizar las proteínas del suero y mejorar las propiedades de retención de agua (Madrid, 2016). Además de que las proteínas del suero pierden solubilidad, se puede apreciar un sabor a cocido, aunque el valor nutritivo no sufre cambios significativos (Walstra et al., 2006).

2.2.4 Esterilización UHT

La leche cruda o termizada se esteriliza a ultra alta temperatura (UHT) mediante el calentamiento a temperaturas de 138 a 145 °C durante un tiempo de 1 a 10 s, usualmente de 3 a 5 s (Roginski et al., 2002). Después del tratamiento térmico es envasada en condiciones asépticas, muy frecuentemente en envases de complejo cartón-polietileno-aluminio (Hernandez, 2010).

La esterilización UHT es un proceso en flujo continuo (Figura 2.2.3) destinado a obtener un producto comercialmente estéril, que implica la destrucción total de las formas vegetativas y esporuladas de las bacterias, y la inactivación de la mayoría de las enzimas presentes en la leche.

El objetivo del procesamiento UHT es producir un producto estable, prolongando la vida útil a temperatura ambiente (Deeth y Datta, 2011). Diversos estudios confirman que la vida útil se extiende hasta seis meses (Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005; Tran et al., 2008). Esto se logra con la sinergia del tratamiento térmico y el envasado aséptico para la conservación de la calidad del producto.



Figura 2.2.3. Intercambiador de calor tubular, reproducido de <http://www.tetrapak.com>.

Durante el tratamiento térmico ocurre la desnaturalización parcial de las proteínas y el pardeamiento no enzimático, llamado también reacción de Maillard (Jansson et al., 2014). Algunos de los compuestos intermedios de Maillard tienen propiedades fluorescentes (F_{CM}). Estos cambios químicos afectan al sabor y la estabilidad física. Las cualidades nutritivas se ven poco afectadas, excepto las vitaminas hidrosolubles que son las más afectadas con pérdidas de hasta el 20% (Walstra et al., 2006).

2.2.4.1 Esterilización convencional

En este tipo de tratamiento térmico, la leche es sometida normalmente en autoclave, a 115 -120 °C durante un tiempo de 15 – 30 min. El objetivo es garantizar esterilidad comercial en la leche, asegurando la destrucción de las formas vegetativas y esporas de microorganismos, previniendo el deterioro microbiano durante el almacenamiento (Hinrichs y Atamer, 2011). La leche esterilizada es muy estable durante un largo periodo de conservación de hasta 9 meses (Hernandez, 2010) y no requiere refrigeración.



Figura 2.2.4. Autoclave para productos envasados, reproducido de JERSA (2016).

Debido al tratamiento térmico intenso se modifican en forma considerable las características físicas, químicas y organolépticas de la leche, con desnaturalización de la proteína del suero en un ~60%. Los aminoácidos (principalmente lisina) forman combinaciones complejas con la lactosa, dando origen a la reacción de Maillard que ocasiona coloración parda, generándose compuestos fluorescentes, repercutiendo, en el aumento de la acidez de la leche entre otros efectos.

La leche esterilizada tiene un valor nutricional inferior respecto a las anteriores (pasteurizada y UHT), debido a las pérdidas en las vitaminas hidrosolubles, siendo la vitamina C y varias vitaminas del grupo B (p. ej., riboflavina) las más afectadas. El tratamiento de calor se aplica a la leche envasada herméticamente cerrados en envases blancos de polietileno de alta densidad opacas a la luz, aunque hasta fechas recientes se han utilizado frecuentemente botellas de vidrio (Madrid, 2016). Cabe resaltar que esta técnica está siendo sustituida por la

esterilización UHT, menos agresiva que la esterilización, conservando mejor el valor organoléptico y nutricional de la leche.

2.3 Principales marcadores químicos de daño térmico y su cuantificación en la industria láctea

El efecto del tratamiento térmico en los componentes químicos de la leche (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales) es muy importante para las características del producto final. Estas modificaciones varían de acuerdo a la tecnología aplicada y a la combinación temperatura-tiempo. Los efectos de los procesos térmicos usados en la industria láctea pueden ser evaluados mediante determinaciones químicas de varios compuestos específicos (Morales et al., 2000).

Tal y como se ha mencionado en el capítulo anterior. Pellegrino et al. (1995) describen dos grupos de marcadores o indicadores que pueden ser usados para evaluar el daño térmico durante el tratamiento térmico. En esta memoria de investigación ahondaremos en cuatro indicadores de daño durante el procesado de leche, tres de ellos pertenecientes al tipo I (Ácido ascórbico, riboflavina y grupos sulfhidrilo) y uno de tipo II (hidroximetilfurfural).

2.3.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA), es la forma principal de la vitamina C, puede ser sintetizado a partir de D-glucosa o D-galactosa (Fox et al., 2015). Considerada la menos estable entre las vitaminas, es soluble en agua y sensible a la luz, el calor y el aire que estimulan su oxidación. Se altera en presencia de riboflavina e iones metálicos tales como el cobre y el hierro (Walstra et al., 2006).

En la Tabla 2.3.1 se muestran las cantidades promedio de dicha vitamina en diferentes tipos de leche, siendo las concentraciones más alta y baja las de yegua y vacuno respectivamente. Así mismo, para la cuantificación del AA en la leche y otros alimentos. En los últimos años predomina el método HPLC, seguido por el enzimático (Romeu-Nadal et al., 2006) y calorimétrico (Antonelli et al., 2002), entre otros.

Tabla 2.3.1. Resumen de la concentración y métodos de cuantificación del ácido ascórbico.

Tipo de leche	[] (mg/L)	Método Instrumental	Referencia
Leche de vaca	nd	HILC-HPLC	(Zuo et al., 2015)
Leche de vaca	9,80	HPLC	(Chotyakul et al., 2014)
Leche de vaca	11,0	Calorimétrico	(Antonelli et al., 2002)
Leche de vaca	10,5	HPLC	(Timmons et al., 2001)
Leche de vaca	26,0	HPLC	(Andersson y Öste, 1994)
L. semides de vaca	14,3	HPLC	(Gliguem y Birlouez-Aragon, 2005)
Leche de yegua	100,0	Espectrofotómetro	(Markiewicz-Keszycza et al., 2015)
Leche humana	53,4	UHPLC	(Lozano et al., 2014)
Leche humana	30,0	Enzimático	(Romeu-Nadal et al., 2006)
Leche fermentada	30,1	Cronopotenciometría	(Stojanović et al., 2013)

HILC, cromatografía líquida con interacción hidrofílica; UHPLC, cromatografía líquida de ultra alta presión; [], concentración; nd, no detectado.

La leche de vaca no es una buena fuente de ácido ascórbico. Frutas y legumbres pueden contener hasta 100 veces más. Sin embargo, su presencia en leche es esencial para la protección del ácido fólico (Ryley y Kajda, 1994). También es de interés por su potencial como indicador de daño térmico por su termolabilidad (Sun et al., 2012).

Según Walstra et al. (2006), las pérdidas del AA en el proceso de pasteurización y esterilización UHT son del 20%, mientras que en esterilización en botella es el 60%. Varios autores confirman que durante la pasteurización hay una reducción de AA hasta un ~25% (Fox et al., 2015; Romeu-Nadal et al., 2008; Walstra et al., 2006). En leche UHT llega a disminuir hasta un 30% (Haddad y Loewenstein, 1983; Walstra y Jenness, 1984). Por lo, tanto su contenido final depende del tratamiento, presencia de oxígeno y condiciones de almacenamiento. La pérdida durante el almacenamiento se debe al pardeamiento no enzimático. Esta alteración se produce principalmente por la oxidación del AA a furfural, desprendiéndose CO₂ con aparición de HMF como consecuencia de la degradación de azúcares.

En la Tabla 2.3.2 se observan los resultados de algunos parámetros cinéticos de destrucción térmica de AA en diversos alimentos, donde predominan las investigaciones en frutas y verduras. No hemos logrado encontrar investigaciones que revelen estudios cinéticos en leche ni en productos lácteos,

probablemente por no ser una fuente relevante de dicha vitamina para el ser humano.

Tabla 2.3.2. Parámetros cinéticos de degradación del ácido ascórbico en alimentos.

Alimento	T _{ref} (°C)	k _T (min ⁻¹)	Q ₁₀	E _a (kJ/mol)	Z (°C)	Orden	Referencia
Beikost	50	0,004	-	84,15	-	1 ^o	(Bosch et al., 2013)
Beikost	23 -37	-	-	18,60	-	1 ^o	(Palazón et al., 2009)
Leche infantil	37	2,7x10 ⁻⁶	-	73,82	-	1 ^o	(Romero, 2008)
Leche de vaca	100	-	1,71	60 - 120	-	1 ^o	(Fox et al., 2015)
Zumo de naranja	50-100	0,03	-	35,9	64,0	1 ^o	(Dhuique-Mayer et al., 2007)
Zumo de naranja	90	0,17	-	37,12	30	1 ^o	(Vikram et al., 2005)
Zumo de naranja	60 - 90	-	-	14,00 -16,50	-	1 ^o	(Ulgen y Ozilgen, 1991)
Zumo de naranja	70 – 98	-	-	97,40	24,90	1 ^o	(Johnson et al., 1995)
Zumo de limón	20 - 92	-	-	46,50	44,60	1 ^o	(Alvarado y Viteri, 1989)
Zumo de mandarina	20 - 92	-	-	44,60	46,50	1 ^o	(Alvarado y Viteri, 1989)
Pulpa de mango	65 - 85	0,06	-	35,87	-	1 ^o	(Mendoza-Corvis et al., 2015)
Pulpa de mango	60 - 80	0,06	1,41	34,02	66,44	1 ^o	(Ordóñez y Yoshioka, 2012)
Fruto de guayaba	75 - 95	1,45	1,35	31,68	76,73	1 ^o	(Ordóñez et al., 2013)
Fruto de marula	80 - 125	0,007	-	29,00	-	1 ^o	(Hiwilepo-van Hal et al., 2012)
Guisantes	110 -132	-	-	164,0	164,0	1 ^o	(Lathrop y Leung, 1980)

k_T, constante de reacción cinética; Q₁₀, coeficiente de temperatura; E_a, energía de activación; Z, constante de resistencia térmica.

2.3.2 Riboflavina

La riboflavina (Rbf), llamada también vitamina B₂, es soluble en agua, muy resistente al calor seco, soluciones acidas y al aire (oxígeno); pero es muy lábil a la acción de la luz, siendo alterada tanto por la luz visible como ultravioleta. También, es lábil a la descomposición térmica bajo condiciones alcalinas (Lešková et al., 2006). Es precursora de los coenzimas flavínicos flavín mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD) (Koop et al., 2014). Esta vitamina es sintetizada solamente por microorganismos y vegetales. Los animales no pueden sintetizarla (Bueno-Solano et al., 2009) como la mayoría de las vitaminas.

La leche de vaca es considerada como la mejor fuente alimenticia de riboflavina, contenida en promedio de ~1,80 mg/L (Walstra et al., 2006). Pero investigaciones recientes indican una concentración hasta 3,2 mg/L (Cilliers et al., 2014); variando ésta de acuerdo a la raza, alimentación y estación, entre otros factores.

El tratamiento térmico tiene sólo efectos insignificantes sobre las concentraciones de riboflavina (Nohr et al., 2011), encontrándose sólo daños leves o ninguna variación en el contenido de Rbf entre la leche cruda, pasteurizada y UHT (directo e indirecto) (Walstra et al., 2006). Sin embargo, puede ser alterada o destruida durante calentamientos prolongados. Por ello, la esterilización convencional causa mayores pérdidas, de hasta 18%, en leche desnatada (Nohr et al., 2011), mientras que en leche entera el porcentaje de destrucción no pasa del 10% (Veisseyre, 1988). Esta diferencia es probablemente debida a que la Rbf se encuentra más protegida en leche entera que en leche desnatada (Fox et al., 2015), ya que los glóbulos de grasa aparentemente tienen algún efecto bloqueante o supresor sobre la carga térmica, haciendo la transferencia de calor menos eficiente (Van Boekel, 1998).

En la Tabla 2.3.3 se recogen algunos resultados de la concentración de la riboflavina en la leche. Es de destacar que la leche humana es pobre en riboflavina ~0,4 mg/L. Así mismo, se observa el predominio de la técnica HPLC de fase reversa con detección UV ó fluorescente (Poulsen et al., 2015) para cuantificación de la riboflavina en la industria láctea, seguido por los métodos fluorimétricos, microbiológicos y espectrofotométricos (Bueno-Solano et al., 2009).

Tabla 2.3.3. Resumen de concentración y métodos de cuantificación de riboflavina.

Tipo de leche	[] (mg/L)	Método instrumental	Referencia
Leche en polvo ^a	1,01	HPLC-Fluorimétrico	(Osório et al., 2016)
Leche en polvo ^a	13,4	HPLC-Fluorimétrico	(Zandomenoghi et al., 2007)
Leche ^a	1,93	HPLC-UV-vis	(Poulsen et al., 2015)
Leche ^a	1,97	HPLC-Fluorimétrico	(Koop et al., 2014)
Leche ^a	1,23	HPLC-UV-vis	(Muñoz et al., 1994)
Leche ^a	2,10	Microbiológico	(Ziegler y Keevil, 1944)
Formula infantil	1,50	HPLC-DAD	(Zand et al., 2012)
Leche de cabra	1,18	HPLC-UV-vis	(Güneşer y Karagül Yüceer, 2012)
Leche de camello	0,57	Fluorométrico	(Farah et al., 1992)
Leche UHT ^a	1,15	HPLC-UV-vis	(Asadullah et al., 2010)
Leche UHT ^a	1,44	HPLC-UV-vis	(Bueno-Solano et al., 2009)

[], concentración; DAD, detector diodo array; ^a, vaca.

Los parámetros cinéticos de degradación de Rbf en diversos alimentos se recopilan en la Tabla 2.3.4, donde se aprecia que la desaparición de la RBF sigue una reacción de primer orden. En la leche y productos lácteos se ha estudiado su comportamiento no sólo durante el almacenamiento sino también durante el tratamiento térmico, probablemente por ser considerados como una de las mejores fuentes naturales de Rbf en la dieta del hombre.

Tabla 2.3.4. Parámetros cinéticos de degradación de la riboflavina en los alimentos.

Alimento	T _{ref} (°C)	k _T (min ⁻¹)	E _a (kJ/mol)	Z (°C)	Orden	Referencia
Alimento infantil	129	1x10 ⁻³	87	-	1º	(Taimmanenate, 1980)
Leche infantil	20 - 45	3x10 ⁻⁶	33,43 – 113,0	-	1º	(Galdi et al., 1989)
Leche de vaca	1,7 - 10	2x10 ⁻⁵	27,60	-	1º	(Singh et al., 1975)
Licudo de soja	90 - 140	2x10 ⁻²	83,30	36	1º	(Kwok et al., 1998)
Soja verde	50 - 120	1x10 ⁻²	29,80	-	1º	(Nisha et al., 2005a)
Macarrones	50 - 90	-	11,00	-	1º	(Ayranci y Kaya, 1993)
Espinacas	90	2,5x10 ⁻³	21,72	-	1º	(Nisha et al., 2005b)

k_T, constante de reacción cinética; E_a, energía de activación; Z, constante de resistencia térmica.

2.3.3 Grupos sulfhidrilo (-SH)

La β-lactoglobulina (β-LG) es la principal proteína del suero de leche y representa el ~50% de las seroproteínas (Fox et al., 2015). Es rica en aminoácidos azufrados como la cisteína de la cual contiene cinco residuos (Jankowski y Sichel, 2003). Esta proteína se encuentra en la mayoría de los mamíferos; excepto en la leche humana y el camello, entre otras especies. Dependiendo del pH, la β-LG puede existir como monómero, dímero o agregados (Cosio et al., 2000). Un monómero de β-LG contiene dos puentes disulfuro y un grupo sulfhidrilo que, en su forma nativa, no está expuesto (Kehoe et al., 2011). Tras el tratamiento térmico se despliega la proteína, producto de la desnaturalización y queda accesible el grupo -SH, aumentando así el número de grupos tiol reactivos que interaccionan entre sí generando puentes disulfuro, tal como se observa en la Figura 2.3.1, lo que se traduce en formación de agregados solubles o en unión de las proteínas desnaturalizadas a la superficie de las micelas de caseína, en función del pH (Taterka y Castillo, 2015). Estos cambios dependen mucho del grado de calentamiento y factores tales como la acidificación, tratamientos

previos o la presencia de otras proteínas séricas y globulares, que también sufren desnaturalización.

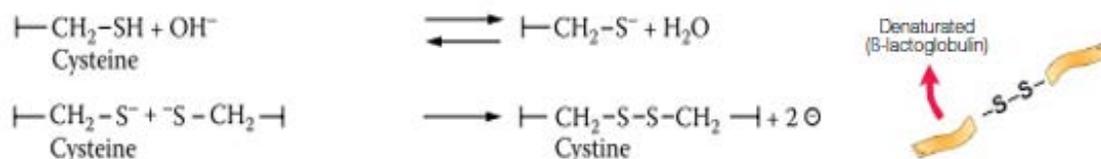


Figura 2.3.1. Desnaturalización de proteínas y la producción de puentes disulfuro. Adaptado de (Walstra et al., 2006) y (Bylund, 1995).

La desnaturalización térmica de la β -LG ocurre entre los 50-90 °C, pero es reversible siempre que la temperatura no supere los 65-70 °C (Bertrand-Harb et al., 2002). La β -LG a temperaturas de 72 – 73 °C inicia a sufrir cambios estructurales irreversibles. La liberación del —SH no sólo depende de la temperatura del proceso térmico sino también de su duración. Tanto Jiménez-Guzmán et al. (2002), aplicando un tratamiento de 85 °C durante 30 min, como Kirchmeier et al. (1985) a 90 °C durante 5 min, encontraron que las proteínas del suero se desnaturalizan por completo, por lo que conduce a un máximo de grupos sulfhidrilo expuestos (o activos) que van progresivamente disminuyendo probablemente como consecuencia de la oxidación de grupos tiol activos mediante formación de puentes disulfuro; resultando componentes volátiles de azufre, tales como: sulfuro de hidrógeno (H_2S), metanotiol (MeSH) y sulfuro de dimetilo (DMS), compues importantes especialmente para el sabor a cocido de leche (de Wit y Nieuwenhuijse, 2008).

Varios estudios han hallado una correlación muy significativa entre la aparición de los grupos —SH libres y la desnaturalización de la β -LG, siendo, por tanto, la formación de grupos tiol libreuno de los criterios para medir el grado de desnaturalización (Romero, 1991). Por lo tanto, los grupos —SH puede ser usados como índice de calentamiento, categorización y clasificación de leches comerciales, así como marcador de daño oxidativo de los alimentos (Briviba et al., 2016).

La α -lactoalbúmina y las seroalbúminas, tiene cuatro y diecisiete puentes disulfuro respectivamente. De estas proteínas, la segunda presenta un grupo tiol, por lo que puede ligarse a otras proteínas, mediante puentes disulfuro.

Según Walstra et al. (2006), bajo la acción del calor a temperaturas mayores de 60 °C los –SH quedan accesibles al desplegarse la proteína, pudiendo reaccionar con otros grupos tiol reactivos formando así complejos con β -LG así como con Kappa-caseína y α_{s2} -caseína (Alais, 1985; Taterka y Castillo, 2015; Vasbinder et al., 2003).

En la Tabla 2.3.5 se recogen las concentraciones de –SH libres y totales de leche cruda y sus derivados. También se aprecia que el método de cuantificación predominante es el método Ellman, según Guingamp et al. (1993) por ser un método simple, rápido y de fácil aplicación en la medición rutinaria; si bien Cosio et al. (2000) desarrollaron un sensor amperimétrico para la monitorización directa, rápida y fiable del contenido de tiol; sin embargo, la aplicabilidad de este método no ha trascendido su aplicabilidad según las revisiones bibliográficas.

Tabla 2.3.5. Resumen de la concentración y métodos de cuantificación de –SH.

Productos lácteos	[-SH]	Método	Tipo de medida	Referencia
Leche ^a	0,50 μ m/L	Ellman	Activación	(Güneşer et al., 2013)
MPC80	10,0 μ m/g	Ellman	Activacion	(Mao et al., 2012)
β -LG	35,0 μ m/g	Ellman	Activacion	(Zhong et al., 2012)
Leche	5,90 μ m/g	Colorimetrico	Total	(Owusu-Apenten, 2005)
Leche	1,52 μ m/g	Ellman	Total	(Guingamp et al., 1993)
Desnatada UHT	1,50 μ m/g	Ellman	Activación	(Clare et al., 2005)
Entera UHT	22-57 μ m/g	Sensor amperímetro	Activación	(Cosio et al., 2000)

MPC80, concentrado de proteína de leche al 80%; ^a, cabra.

En la Tabla 2.3.6 se observan algunos valores cinéticos de modificación de la concentración de grupos –SH. Habitualmente se determina la concentración de grupos –SH libres (i.e., activos) y con menos frecuencia la desaparición de grupos –SH totales, tal como se observa en el cuadro anterior. En ambos casos responde a una cinética de primer orden.

Tabla 2.3.6. Parámetros cinéticos de cambio de concentración de grupos –SH.

Muestra	T _{ref} (°C)	k _T (min ⁻¹)	Q ₁₀	E _a (kJ/mol)	Z (°C)	Orden	Referencia
Leche ^c	80	0,14	-	148,2 ^a	-	1 ^o	(Sava et al., 2005)
Leche ^c	80	0,16	-	151,2 ^b	17,4	1 ^o	(Romero, 1991)
Proteínas	100	-	4-75	150,5 ^b	-	-	(Walstra et al., 2006)
Leche ^d	80	0,13	-	114,1 ^b	-	1 ^o	(Owusu-Apenten y Chee, 2004)
Leche ^d	90	0,80	-	-	-	1 ^o	(Koka et al., 1968)

^a, disminución de –SH; ^b, aumento de –SH; Q₁₀, coeficiente térmico; E_a, energía de activación; Z, constante de resistencia térmica; ^c, leche entera; ^d, leche desnatada.

2.3.4 Hidroximetilfurfural

El 5-hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído que contiene un ciclo furano que se forma por la degradación de azúcares durante el procesamiento térmico y/o almacenamiento de la leche, a través de dos mecanismos distintos (Figura 2.3.2): a) isomerización de la lactosa y b) reacciones de Maillard. Este último método involucra la reacción entre el azúcar reductor (lactosa) y un aminoácido (lisina) para dar glicosamina-N-sustituida que genera un producto de Amadori y, en etapas posteriores, compuestos tales como el HMF y otros, que son los principales compuestos intermedios producidos en la reacción de Maillard (Morales y Jiménez-Pérez, 1999). Dicho proceso afecta a la calidad y al *flavor*, originando deterioro del valor nutritivo y vida útil de los productos (Demirhan et al., 2015) así como formación de compuestos furánicos.

El HMF se ha utilizado como un indicador de la intensidad del tratamiento térmico así como del tiempo y condiciones de almacenamiento, permitiendo diferenciar distintos tipos de leches procesadas (Morales y Jiménez-Pérez, 1999). Su concentración tiende a aumentar durante el calentamiento y se puede utilizar también como un marcador del desarrollo de la reacción de Maillard (Rajchl et al., 2013). Actualmente, es un parámetro ampliamente utilizado para evaluar la carga de los procesos térmicos en la industria láctea (Morales et al., 2000).

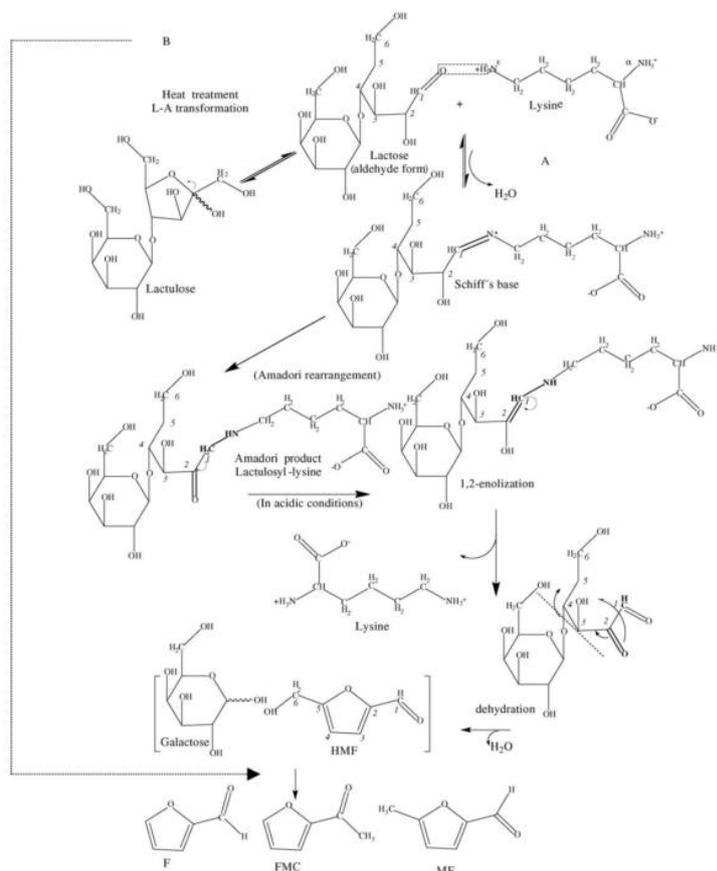


Figura 2.3.2. Representación esquemática de la formación de furfural a partir de grupo ε-amino libres de la lisina y lactosa en la reacción de Maillard: (A) a través de compuestos de Amadori y (B) la isomerización de lactosa. Reproducido de Chávez-Servín et al. (2005).

Se han desarrollado varios métodos para cuantificar el HMF en alimentos, siendo algunos de ellos: cromatografía de gases (GC) (Kamalabadi et al., 2015), cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector electroquímico (HPAEC-ECD) (Guan et al., 2012) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Morales et al., 1992), siendo esta última una de las técnicas más utilizada en la actualidad. También, el método espectrofotométrico, desarrollado por Keeney y Bassette (1959) para productos lácteos, sigue siendo usado desde mediados del siglo pasado, por ser una técnica simple y de aceptada precisión (Richards et al., 2016).

En la Tabla 2.3.7 se recopilan los datos cinéticos de formación del HMF encontrados en la bibliografía. Las concentraciones del HMF reportadas por Fink y Kessler, (1986) indican que existe un rango distinto entre los valores de HMF en leches UHT (<10 μmol/L) y esterilizada en botella (> 30 μmol/L). Según Morales y Jiménez-Pérez, (1999) la concentración de HMF es inversamente

proporcional a la cantidad de grasa contenida en las muestras de leche, debido, posiblemente, a que la grasa de leche reduce la carga de calor durante los tratamientos térmicos, como ya se ha indicado anteriormente.

Tabla 2.3.7. Parámetros cinéticos de formación de hidroximetilfurfural.

Tipo de leche	T _{ref} (°C)	Q ₁₀	E _a (kJ/mol)	Z (°C)	Orden	Referencia
Entera ^a	90 - 140	-	90,21	-	Seudo-0	(Claeys et al., 2001)
Entera ^a	105	-	116,4	-	Seudo-0	(Claeys et al., 2003)
Entera ^a	90 - 140	-	118,5	-	Seudo-0	(Morales et al., 1995)
Entera ^a	50 - 60	2,7	139,0	23,5	-	(Fink y Kessler, 1986) ¹
Entera ^a	75 - 130	2,3	135,0	27,8	-	(Peri et al., 1988) ¹
Entera ^a	100 - 147	2,6	-	23,7	-	(Konietzko, 1980) ¹
Entera ^a	130 - 150	2,3	-	27,8	-	(Mottar, 1981) ¹
Entera ^a	110	-	105,6	-	Seudo-0	(Claeys et al., 2002)
L. cabra	85 - 95	1,9	96,31	-	Seudo-0	(Güneşer et al., 2013)
L. búfal	130 - 145	2,0	93,90	32,5	Seudo-0	(Singh y Patil, 1989)
Semidesnt	105	-	113,4	-	Seudo-0	(Claeys et al., 2003)
Desnatada	105	-	110,5	-	Seudo-0	(Claeys et al., 2003)
Leche UHT	9 - 45	-	19,25	-	Uno	(Singh et al., 2009)

¹citado por (Schlimme et al., 1994); ^a, vaca; Q₁₀, coeficiente térmico; E_a, energía de activación; Z, constante de resistencia térmica.

2.4 Métodos rápidos alternativos de análisis para control de los tratamientos térmicos en la industria láctea

La mayoría de los análisis correspondientes a los marcadores térmicos habituales, incluidos los estudiados en la presente memoria de tesis, son normalmente realizados mediante métodos instrumentales convencionales y complicados que van desde HPLC, espectrofotométricos, enzimáticos, amperimétricos, etc. La mayoría de estos métodos pueden ser precisos; pero, tal como se precisa en la sección anterior, son demasiado lentos. Requieren de un proceso arduo de preparación de muestras, instrumentación sofisticada, personal cualificado, insumos químicos caros, resultando también poco amigables con el medio ambiente. Además, no son adecuados para su implementación en sistemas de control de procesos en línea.

La sociedad actual reclama productos de gran calidad a precios más competitivos que, además, cumplan con una regulación alimentaria cada vez

más exigente. No sólo es necesario garantizar su salubridad sino también controlar su procesado a lo largo de toda la cadena de producción.

Tradicionalmente, las medidas más habituales realizadas durante el procesado de alimentos correspondían, en muchos casos, a parámetros simples como temperatura, presión, volumen, etc. Sun et al. (2009) indican que el control de procesos en la actualidad requiere conocer información adecuada y compleja a tiempo real (“*just-in-time*”), como puede ser la composición o concentraciones de uno o más componentes, o incluso propiedades estructurales.

El creciente interés por realizar análisis de forma rápida y económica así como por optimizar la producción mediante análisis en línea (“*on-line*”, “*in-line*”) ha dirigido la investigación hacia la puesta a punto de nuevos métodos analíticos de control de procesos o a la adaptación de los ya existentes para determinación a tiempo real. Dicho interés, combinado con la incorporación de los últimos avances en el desarrollo de sensores de diversa naturaleza, hacen de estos dispositivos unas herramientas de gran interés en la industria alimentaria para monitorizar cambios importantes durante el procesado. Además, estas innovaciones permiten introducir mejoras en la automatización de los sistemas de análisis y control de procesos (Singh y Jayas, 2013), para asegurar la calidad y seguridad alimentaria (Huang, 2013) favoreciendo asimismo la sustitución de forma progresiva de los “analistas de laboratorio” por “analistas de proceso”.

Los sensores son dispositivos que transforman la respuesta a una propiedad física o química en una señal útil, normalmente de naturaleza eléctrica, que pueda ser procesada y, por tanto, que facilite información de interés de una manera rápida y sin necesidad de análisis muy complejos. Éstos pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a la naturaleza de la determinación que realizan. Sensores primarios que miden directamente una propiedad específica como p. ej., la temperatura o la densidad y sensores analíticos o inteligentes que detectan variaciones de un parámetro en función del tiempo y, mediante ecuaciones de predicción, estiman parámetros tecnológicos de control –p. ej., el tiempo de corte en la elaboración de queso–. De acuerdo con Kress-Rogers (2001), los sensores también se pueden clasificar según su uso en cuatro grupos. *Sensores “in-line”* que se instalan directamente en las paredes de una

conducción principal. Algunos sensores “*in-line*” se instalan en la cara interna de la conducción y entran en contacto con el alimento, mientras que otros se instalan sobre la pared externa, bien directamente o a través de una ventana, cuyo material depende del tipo de sensor. Los sensores “*on-line*”, al igual que los anteriores, se instalan en la pared de una conducción que se deriva de la conducción principal para alojar al sensor. Este tipo de sensores requieren, por tanto, el desvío provisional de una alícuota del alimento a través de un “*by-pass*”, que permite el retorno de la muestra al caudal principal tras la medida, o bien la extracción completa de la misma a través de una línea de sangrado. Finalmente, las medidas “*at-line*” y “*off-line*” se realizan mediante instrumentos de laboratorio localizados en el área de producción (medida “*at-line*”) o en un laboratorio químico (medida “*off-line*”). Una “Acción Concertada Europea” (ASTEQ, 2000) clasifica los sensores según la naturaleza de la señal en los siguientes grupos: a) *biosensores*, que emplean enzimas o anticuerpos; b) *sensores de agentes selectivos*, que emplean películas de ciertos compuestos o materiales complejos; c) *de ultrasonidos*; d) *de variación de frecuencia*; e) *eléctricos*; y f) *electromagnéticos*.

En la actualidad, los sensores electromagnéticos están cobrando mucho interés por sus ventajas específicas entre las que destacan su gran versatilidad, rapidez y carácter poco invasivo, entre otras. Este grupo de sensores incluye los *sensores ópticos*, cada vez más robustos, cuya incorporación está permitiendo la rápida evolución de los sistemas de control de procesos a tiempo real. Estos últimos, se clasifican en función de la longitud de onda que utilizan. Así p. ej., los sensores electromagnéticos que emplean radiación infrarroja se subdividen en sensores de infrarrojo cercano (700-2.500 nm), infrarrojo medio (2.500-30.000 nm), infrarrojo lejano (hasta 1.000.000 nm) y de termografía (1-15 μm). También podemos clasificar los sensores ópticos en sensores de absorción/transmisión y dispersión dependiendo del tipo de interacción luz/materia que se emplea en la medida.

Estos sensores ópticos están desarrollándose enormemente gracias al rápido avance de la espectroscopia, la optoelectrónica y la quimiometría; y presentan un gran potencial para el uso en línea en la mejora del control de procesado de

alimentos. En la industria láctea, cada vez está tomando mayor relevancia, tanto la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) como la espectroscopia de fluorescencia, por su capacidad de suministrar información cualitativa y cuantitativa, además, con un uso potencial para la automatización y el control de procesos.

La tecnología NIR se basa en que, cuando la luz (energía) incide sobre una muestra, una parte de los fotones se transmite a través de la misma, siendo el resto absorbida. La absorción de energía por la muestra produce que los enlaces entre carbono e hidrógeno (C-H), oxígeno e hidrógeno (O-H) y nitrógeno e hidrógeno (N-H), principales constituyentes de la estructura básica de las sustancias orgánicas, vibren en distintas formas (Givens y Deaville, 1999). En las últimas década se ha convertido en uno de los métodos analíticos más utilizados y prometedores en el área de los alimentos, para la predicción cuantitativa de grasa, proteína, lactosa, etc., (Aliakbarian et al., 2015). De igual modo Coppa et al. (2014) estudiaron la predicción del contenido de ácidos grasos en leche fresca y descongelada. Núñez-Sánchez et al. (2016) estimaron los ácidos grasos en leche de cabra. Revilla et al. (2017) predijeron también la vitamina A y E en leche de oveja. Chen et al. (2017) detectaron adulteración en leche con melamina.

Hasta el momento se han desarrollado diversos sensores NIR de interés para la industria láctea. Varios investigadores proponen el uso de sensores ópticos de dispersión empleando esta región del espectro. Castillo et al. (2000) desarrollaron modelos para la predicción el tiempo de coagulación y corte. Fagan et al. (2009) estudiaron la predicción de la humedad de la cuajada, pérdida de grasa y rendimiento de la cuajada. Arango et al. (2015) predijeron los parámetros de coagulación y sinéresis durante la elaboración de queso.

Otros investigadores proponen el uso de sensores ópticos de transmisión NIR. Así p. ej., Crofcheck et al. (2000) midieron el contenido de grasa en leche desnatada mientras que (Danao y Payne, 2003) detectaron la interface de transición entre dos líquidos diferentes que fluyen a través de los sistemas de conducción. Wang et al. (2015) evaluaron la frescura de la leche cruda.

Kucheryavskiy y Lomborg (2015) monitorizaron la calidad del suero –sólidos totales, proteínas y grasa- en un proceso de filtración.

Estos sensores son cada vez más utilizados por ser una técnica no destructiva ni invasiva, donde la preparación de la muestra es escasa o nula, la medida se realiza con rapidez y a un bajo coste. Además, permiten mediciones más frecuentes en todas las etapas, desde la adquisición de materias primas hasta el control de los productos acabados.

Sin embargo, tienen algunas desventajas, porque requiere calibración rigurosa con elevado número de muestras. Frecuentemente necesitan de calibraciones específicas y a veces sufren falta de sensibilidad para análisis de compuestos micro y traza.

En los últimos años, se ha demostrado que la técnica de fluorescencia es un método eficaz para el análisis de analitos a nivel de trazas en virtud de su alta sensibilidad, fácil manejo y relativa simplicidad de los instrumentos empleados (Yang et al., 2016). Debido a sus ventajas, se podrían desarrollar nuevas técnicas que monitoricen la variación de calidad durante el procesado térmico de la leche. La monitorización del proceso implicaría la reducción de costes de producción (Khairi et al., 2016) y la fabricación de productos de calidad mejorada.

En el siguiente apartado se desarrolla de forma específica el uso de las técnicas ópticas o espectroscópicas de emisión de fluorescencia, ya que el desarrollo de métodos de cuantificación de marcadores químicos de daño térmico mediante el aprovechamiento de los componentes fluorescentes nativos (intrínsecos) en la leche será el tema central de la presente memoria de tesis.

2.4.1 Espectroscopía de fluorescencia

La fluorescencia es uno de los fenómenos luminiscentes que tienen lugar con ciertos átomos y moléculas llamados fluoróforos capaces de absorber radiación de cierta longitud de onda específica y, posteriormente, emitir/liberar radiación en forma de luz a una longitud de onda mayor en un periodo de tiempo muy corto (ns, mil millonésima de segundo) (Karoui y Blecker, 2011). Rango de tiempo en el que ocurren muchos procesos a nivel molecular y por ello es sensible a los mismos. El estudio de la fluorescencia proporciona una valiosa información,

tanto cualitativa como cuantitativa, sobre aspectos estructurales de la molécula responsable, o de su relación con el medio que lo rodea (García-Segura et al., 2008).

La fluorescencia, a diferencia de la espectroscopia de absorción, permite realizar determinaciones analíticas con cierto grado de selectividad y límites de detección bastante más bajos, que puede ir desde algunos ppm hasta niveles de ppb (Christensen et al., 2006). La intensidad de la emisión fluorescente es directamente proporcional a la concentración de analito, lo cual permite su utilización con fines analíticos.

2.4.1.1 Teoría de la fluorescencia

Para comprender los fenómenos fotoluminiscentes se requiere un repaso sobre el espín del electrón y las diferencias entre los estados excitados sencillo/triple. Los fluoróforos son capaces de absorber fotones de una cierta longitud de onda, es decir, de un cierto color. Esta absorción, provoca que un electrón de la molécula que está en su estado sencillo fundamental, es el estado energético más bajo, donde los espines siempre están emparejados en un mismo orbital molecular (a). Al excitarlos uno de los electrones pasará a un orbital de mayor energía y los espines siguen formando pareja con el electrón del estado fundamental (b). En el estado excitado triple, los espines de los dos electrones son paralelos, es decir tienen la misma dirección y ya no están emparejados, por lo que su valor cuántico es opuesto (c) (Figura 2.4.1).

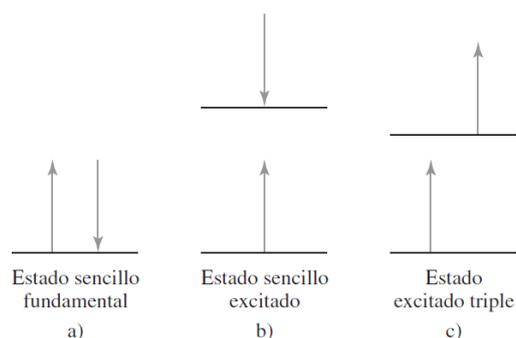


Figura 2.4.1. Estados electrónicos del espín de moléculas. Reproducido de Skoog et al. (2008)

Las dos posibles formas de emisión de fotones son: fluorescencia y fosforescencia. La primera se lleva a cabo desde un estado excitado simple o

singlete, mientras que la fosforescencia lo hace desde un estado triple o triplete. El tiempo de vida medio del estado triple excitado es mucho mayor (10^{-4} s a varios segundos) mientras que el estado sencillo excitado va desde 10^{-8} a 10^{-5} (García-Segura et al., 2008).

La Figura 2.4.2 muestra el fundamento del fenómeno electromagnético de la fotoluminiscencia; la fluorescencia en un proceso de tres etapas. Para ellos nos basaremos en el conocido diagrama de Jablonski. En el que las líneas rectas representan procesos radiantes y las líneas onduladas procesos no radiantes.

Primero, el fluoróforo o analito absorbe luz y uno de sus electrones experimenta una transición desde el estado fundamental a un estado electrónico de mayor energía o estado excitado. Una vez en el estado excitado, la molécula tiende a pasar al estado fundamental mediante una combinación de varias etapas mecánicas (García-Segura et al., 2008; Skoog et al., 2008).

Segundo, esta etapa es denominada proceso de desactivación no radiante (sin emitir radiación electromagnética), donde ocurren cambios conformacionales en el fluoróforo que interactúa con el entorno molecular de diferentes maneras, incluyendo la *a) relajación vibracional*. En la relajación vibracional, la molécula va pasando a modos vibracionales de menor energía dentro del estado excitado, hasta alcanzar el de mínima energía compatible con dicho estado. Este proceso se debe a los choques estadísticos entre esas moléculas, o entre éstas y las del disolvente. La energía liberada se convierte en energía cinética de las moléculas y se disipa en forma de calor. El desplazamiento de Stokes es conocido por el desplazamiento de la emisión de fluorescencia a longitudes de onda mayores (Christensen et al., 2006). La *b) conversión interna*, es otro proceso no radiativo de relajación. En la Figura 2.4.2 se ilustra por la flecha ondulada horizontal, es especialmente eficaz cuando los niveles de energía electrónicos son lo suficientemente cercanos para que se produzca un solapamiento de los niveles de energía vibracional, en este caso para la conversión de S_2 a S_1 . En el *c) cruce entre sistemas* se produce un cruce entre dos estados electrónicos de distinta multiplicidad (sencillo/triplete). La probabilidad de que se produzca un cruce entre sistemas es más alta si los niveles vibracionales de los estados se solapan. También aumenta la probabilidad en presencia de átomos pesados (bromo,

yodo) y/o moléculas paramagnéticas (oxígeno molecular) y por consiguiente disminuye la fluorescencia (Skoog et al., 2008). Como consecuencia de los procesos de *d) conversión externa*, la desactivación de un estado electrónico excitado puede comprender la interacción y la transferencia de energía entre la molécula excitada y el solvente u otros solutos con los cuales está en contacto. En este fenómeno el solvente tiene una gran repercusión en la intensidad de fluorescencia. La reducción en la cantidad de colisiones entre partículas (baja temperatura y elevada viscosidad) tienden por lo general a aumentar la fluorescencia (Skoog et al., 2008).

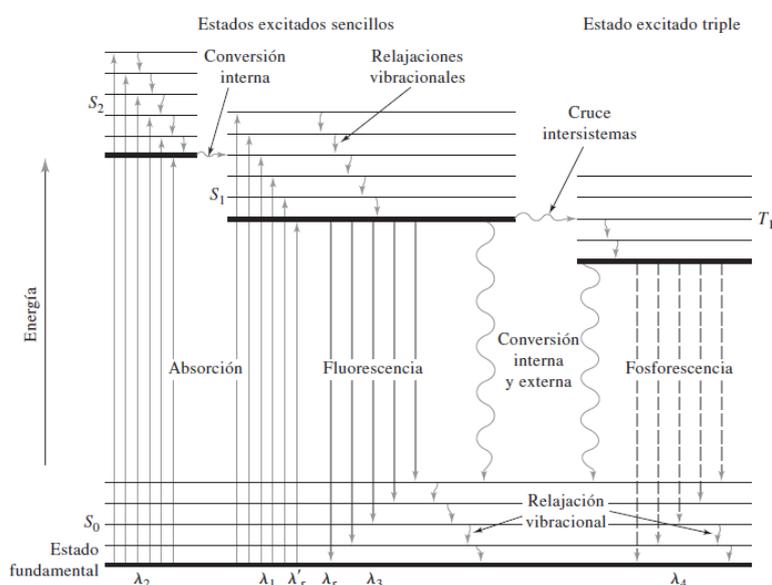


Figura 2.4.2. Diagrama parcial de los niveles de energía para un sistema fotoluminiscente. Reproducido de Skoog et al. (2008).

Tercero, este proceso, también llamado desactivación radiante, consiste en la liberación del exceso de energía en forma de luz, pero de una longitud de onda mayor (menor energía) a la de excitación; y pueden hacerlo de dos formas la fosforescencia y la fluorescencia. Esta última pasa desde el modo vibracional de menor energía del estado excitado S_1 a un modo vibracional S_0 del estado fundamental, emitiendo un fotón de luz (Figura 2.4.2).

2.4.1.2 Tipos de medida de fluorescencia en alimentos

La fluorescencia puede ser medida mediante diferentes geometrías de determinación. En alimentos transparentes o alimentos semitransparentes líquidos, lo más habitual es utilizar la configuración de ángulo recto 90° en la

fluorescencia convencional (Figura 2.4.3A). En la década de los 90, y haciendo uso de dicho método, se registraron varias investigaciones. Morales et al. (1996) diluyeron con tampón fosfato salino muestras de leche antes de medir la fluorescencia, mientras que Birlouez-Aragon et al. (1998) diluyeron con tampón acetato. Dankowska (2016) afirma que la aplicabilidad de la fluorescencia convencional de ángulo-recto es limitada como consecuencia de fenómenos de superposición espectral, efecto del filtro interno, así como dispersión y reflexión de luz. Dichos fenómenos pueden limitar su uso bajo ciertas condiciones especialmente con altas concentraciones de fluoróforos, reduciendo las posibilidades reales de aplicación de dicha metodología.

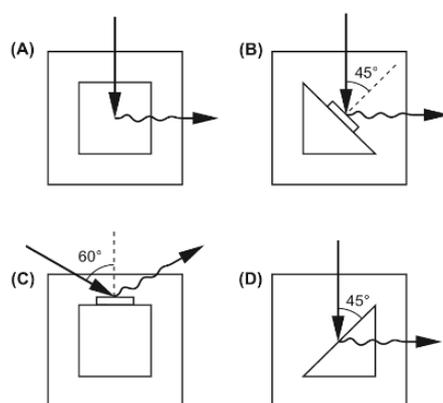


Figura 2.4.3. (A) Geometría de ángulo recto, (B) geometría "front-face" (45°), (C) geometría "front-face" (60°), y (D) geometría de ángulo de 45° con celda triangular. Reproducido de Dankowska (2016).

Para medir la fluorescencia en alimentos, tanto en líquidos (leche) como en sólidos o con absorbancias altas, la espectroscopia de fluorescencia "front-face" (FFF) es la más apropiada. Dicha técnica es usada para disminuir los efectos de filtro interno, causados por una elevada densidad óptica o turbidez excesiva de las muestras, donde las medidas de excitación y de radiación emitida, son llevadas a cabo en la misma superficie de la celda (Karoui y Blecker, 2011). Su principal diferencia con el método convencional, es el cambio de incidencia del ángulo, donde los fotones emitidos se recogen en un ángulo comprendido entre 30 y 60° (Kamal y Karoui, 2015).

Con esta técnica, además se minimiza la supresión o amortiguamiento, fenómeno también conocido como "quenching", término que se refiere a la transferencia o interacción de energía no radiante desde una especie excitada

hacia otras moléculas ajenas al fluoróforo, que lleva el nombre de “desactivador o quencher” (conversión externa). En muchos casos, como consecuencia de esa interacción, se puede producir una pérdida de emisión fluorescente (García-Segura et al., 2008).

Las propiedades de compuestos fluorescentes son dependientes del medio ambiente que rodea al compuesto (Lakowicz, 2006a). Cada fluoróforo tiene un espectro excitación y emisión característico, que podría ser utilizado para separar e identificar las moléculas, así como para diferenciar entre sustituciones y conformaciones de la misma molécula (Andersen y Mortensen, 2008). Normalmente, durante tratamientos tecnológicos inducen cambios en la estructura molecular de los alimentos, gracias a la intensidad de fluorescencia se puede utilizar en la caracterización de los cambios de dicho tratamiento (Hougaard et al., 2013).

2.4.1.3 Instrumentos para medir la fluorescencia en alimentos

Las partes principales de un fluorímetro o espectrofluorímetro son: a) la fuente de luz, que normalmente suele ser una lámpara de arco de xenón, que proporciona en la zona del UV-visible una luz policromática muy intensa; b) monocromador, que tiene la finalidad de seleccionar la longitud de onda de excitación. La muestra normalmente se deposita en cubetas rectangulares de cuarzo de forma que, en el método convencional, el eje formado por la muestra es perpendicular al eje de traductor, en caso de FFF se puede utilizar de 30 a 60°; c) transductor, los que más se utilizan son los tubos fotomultiplicadores, dispositivo que permite detectar luz con alta sensibilidad y es transformar una dicha señal; y d) equipo electrónico y el sistema de cómputo calculan la relación entre la intensidad de la fluorescencia y la intensidad del haz de referencia (Figura 2.4.4).

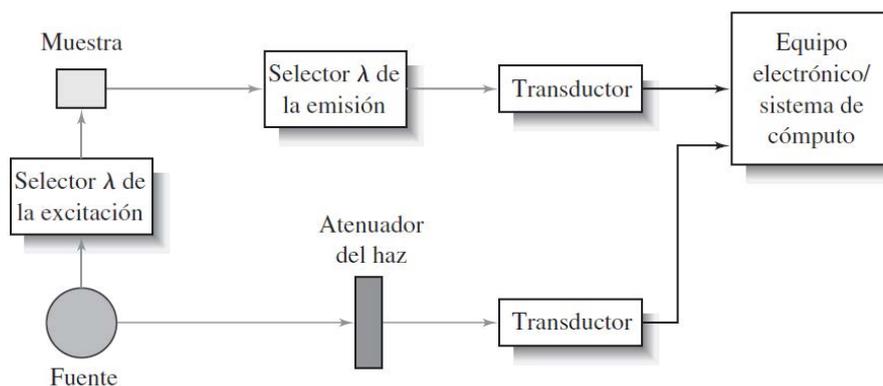


Figura 2.4.4. Partes de un fluorímetro o espectrofluorímetro. Reproducido de (Skoog et al., 2008)

Tanto el fluorímetro o espectrofluorímetro, son instrumentos comunes para medir la fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos que componen los alimentos. Los primeros no son tan eficaces como los segundos a la hora de seleccionar una longitud de onda, aun así, proporcionan buenos resultados de manera sencilla y barata en las determinaciones de concentración.

El espectrofluorímetro, permite una mejor selección de la longitud de onda, lo que resulta de mucha importancia en análisis cualitativos y cuantitativos y de vital importancia en el campo de la investigación de las características estructurales y electrónicas de las moléculas. El monocromador cumple la función de seleccionar la longitud de onda, por lo que facilita obtener espectros tanto de excitación y emisión.

Los espectrofluorímetros de fluorescencia de fibra óptica están despertando expectativas debido a su potencial ventaja, ya que pueden ser utilizados o adaptados en procesos de producción en línea. Permiten realizar análisis de fluorescencia sin que necesariamente tenga que estar la muestra cerca de la fuente de emisión y del detector. La fuente de emisión no es una lámpara, sino un láser o un LED (diodo emisor de luz). La luz viaja a través de un cable de fibra óptica (Figura 2.4.5).

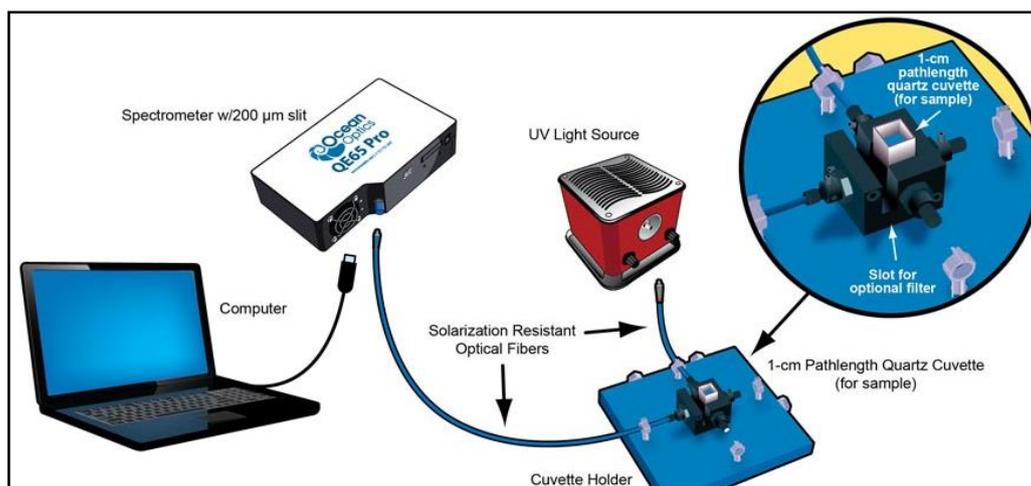


Figura 2.4.5. Esquema de uso de espectrofotómetros de fluorescencia de fibra óptica. Reproducido de Ocean Optics (<http://oceanoptics.com/>, 2016).

2.4.1.4 La fluorescencia en la industria de los alimentos

La aplicación de la fluorescencia en la industria alimentaria data del siglo pasado. Gran Bretaña se encontró con la necesidad de importar huevo en polvo durante la segunda guerra mundial y en los controles de calidad se observó una asociación entre la fluorescencia y la palatabilidad de producto (Pearce, 1943). Este mismo laboratorio observó un incremento de fluorescencia durante el almacenamiento de la leche en polvo (Jenness y Coulter, 1948). Tarassuk & Simonson (1950) informaron de la asociación entre la fluorescencia y pardeamiento no enzimático en la leche evaporada. Los autores mostraron la relación entre el tratamiento térmico, la fluorescencia y el desarrollo de pardeamiento, en función del factor tiempo-temperatura.

Desde hace 25 años, hubo un mayor empeño en el uso de la fluorescencia como una herramienta para medir la calidad y el efecto del calor en los alimentos. Morales et al. (1996) sometieron a la leche a diferentes condiciones de tiempo y temperatura, y se midió la intensidad de fluorescencia para obtener valores cinéticos de los parámetros para la formación de compuestos fluorescentes de intermedios de Maillard. Birlouez-Aragon et al. (2002) desarrollaron un método para estimar la intensidad del tratamiento térmico aplicado a la leche, basados en la fluorescencia de la desnaturalización de la proteína y la acumulación de compuestos intermedios de Maillard. Mungkarndee et al. (2016) caracterizaron e identificaron leches comerciales mediante patrones construidos con fluoróforos

(proteínas) lácteas. Estos estudios han sido desarrollados mediante la fluorescencia tradicional.

La tendencia futura de la espectroscopía de fluorescencia es la miniaturización y automatización el control de procesos. Este desarrollo reduciría el tiempo de análisis, mejorar la precisión y reducir el uso del volumen de reactivos. Además, el requerimiento de la monitorización en tiempo real ha alentado el desarrollo de sistemas de medida no destructivas. Y lo más importante no requiere un laboratorio o referencia de métodos de análisis, por lo tanto es un método de calibración más ecológico (Dankowska, 2016).

Otra de sus ventajas es su alta sensibilidad, especificidad (Diez et al., 2008). En la mayoría de los casos sólo se necesitan pequeñas cantidades de muestra. También se caracteriza por ser una técnica rápida, ampliamente explotada para estudios de la estructura molecular por su accesibilidad y fácil manejo.

Pérez-Marín et al. (2007) mencionan que, dentro de las desventajas del uso de la espectroscopia es la preparación del calibrado que es dificultosa, ya que es necesario disponer de muestras para ampliar el intervalo de concentración de las muestras problema (habitualmente un intervalo de concentración demasiado estrecho). Además, estas deben representar características físicas y químicas similares a las reales. Otra de las dificultades es la transferencia de las calibraciones entre instrumentos, puesto que pequeñas diferencias entre ellos pueden dar a lugar a errores importantes en los resultados y obligar esto a que, para analizar una misma muestra problema, sea necesario preparar un calibrado en cada instrumento.

El interés paulatino que muestra esta técnica, se puede medir por el número de investigaciones que se registra en diversas bases de datos bibliográficos (p.ej. web of science, trovador, etc), así, como también la introducción de nuevos instrumentos comercialmente disponibles para el análisis de fluorescencia.

La espectroscopia de fluorescencia se utiliza ampliamente para caracterizar y clasificar la calidad de los alimentos. Hassoun & Karoui (2015) monitorizaron el pescado bajo diferentes condiciones de refrigeración. Sahar & Dufour (2015) clasificación y caracterización del muslo de vaca. Ahmad et al. (2016) estimaron

parámetros reológicos, analíticos en harinas de trigo. Tan et al. (2015) clasificaron la cerveza según el fabricante. Lenhardt et al. (2015) caracterizaron la miel según el origen botánico. Además de diversas frutas y vegetales, tal como reporta Christensen et al. (2006).

2.4.1.5 Aplicación de la fluorescencia “*front-face*” en la industria láctea

La fluorescencia “*front-face*” (FFF) tiene la gran ventaja de registrar directamente en las muestras de leche intactas, el ángulo de iluminación puede variar entre 30° y 60° con el fin de evitar reflexión especular en la dirección perpendicular, donde se recupera la fluorescencia de emisión (Diez et al., 2008). Es una técnica que puede utilizarse como un instrumento en línea para el seguimiento y control de producción de la leche y sus derivados. Dufour y Riaublanc (1997) han demostrado la capacidad de la FFF para diferenciar muestras de leche tratadas térmicamente. Kulmyrzaev y Dufour (2002) utilizaron FFF para correlacionar la fluorescencia con los niveles de furosin y lactulosa en la leche UHT. Schamberger y Labuza (2006) evaluaron el desarrollo o la aparición de los compuestos de Maillard utilizando FFF durante el tratamiento térmico en leche mientras que Diez et al. (2008) usaron la FFF para predecir parámetros nutricionales en alimentos para lactantes tratados térmicamente.

Este método también fue empleado para verificación de la autenticidad en leche de oveja de acuerdo a su alimentación y genotipo (Hammami et al., 2010; Karoui et al., 2011), identificación de la procedencia de diferentes fabricantes y orígenes geográficos de leche descremada en polvo (Liu y Metzger, 2007; Ntakatsane et al., 2011), discriminación de leche cruda y tratada térmicamente (Blecker et al., 2012; Hougaard et al., 2013), e identificación de adulteraciones en la leche con aceites vegetales y mantequilla (Ntakatsane et al., 2013).

Por lo tanto, la FFF en combinación de quimiometría, tiene un enorme potencial para análisis rápido, así como en la aplicación de control de calidad en los sistemas alimentarios (Dufour y Riaublanc, 1997). El interés creciente por el aprovechamiento de la señal procedente de los compuestos fluorescentes en la leche, puede facilitar el desarrollo de sensores de fibra óptica para la monitorización *in-line* de los daños causados durante el tratamiento térmico.

2.4.2 Principales compuestos autofluorescentes en la leche

En la leche y derivados lácteos (crema, queso, yogurt, etc.) encontramos sustancias que presentan fluorescencia intrínseca como resultado de la presencia de grupos aromáticos en su estructura. En la Figura 2.4.6 se aprecia la mayoría de los compuestos fluorescentes que han sido identificados en la leche.

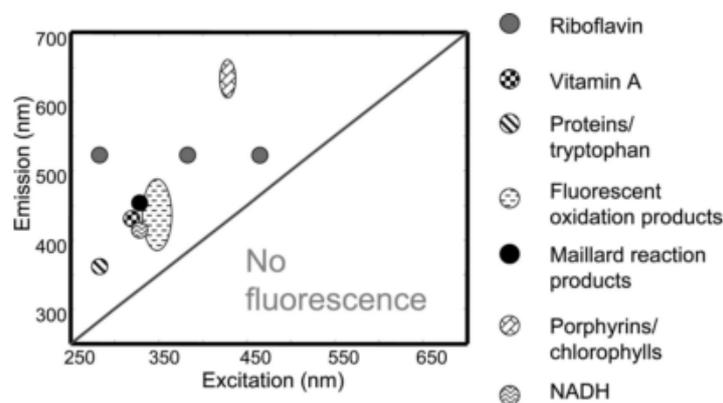


Figura 2.4.6. Máxima de excitación y emisión de los fluoróforos en productos lácteos (Andersen y Mortensen, 2008).

En la Tabla 2.4.1 se muestra que cada molécula fluorescente tiene longitudes de onda específicas, tanto de excitación como de emisión, que pueden ser usados para monitorizar e identificar sus fluoróforos nativos en leche. Varios autores coinciden elegir de manera rutinaria la longitud de onda de excitación para el triptófano (Feinberg et al., 2006; Schamberger y Labuza, 2006); compuestos intermedios de Maillard (Birlouez et al., 2005; Leclere y Birlouez, 2001); y riboflavina (Miquel Becker et al., 2003) que son los compuestos fluorescentes más estudiados hasta el momento. Respecto a la formación de la fluorescencia de la ditirosina, existe estudios basados en la oxidación inducida por luz, tanto en leche desnatada en polvo (Descalzo et al., 2013) y leche líquida (Scheidegger et al., 2010), hasta momento, no hay estudios que monitoricen dicho compuesto fluorescente, durante el tratamiento térmico.

Tabla 2.4.1. Los fluoróforos predominantes en la industria láctea.

Fluoróforos	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Referencia
Triptófano	290	305-400	(Hammami et al., 2013)
Compuestos de Maillard	330	420	(Diez et al., 2008)
Riboflavina	270, 370	518	(Christensen et al., 2006)
Riboflavina	450	480 - 650	(Madalena et al., 2016)
Ditirosina	315	410	(Scheidegger et al., 2010)

2.4.2.1 Fluorescencia del triptófano (Ftrp)

El triptófano (Trp) es un aminoácido esencial en la nutrición humana. En los últimos años está causando protagonismo e importancia en varios estudios de productos lácteos, gracias al aprovechamiento de su fluorescencia intrínseca, que constituye la fuente dominante de absorción UV y de emisión de proteínas (Lakowicz, 2006a). Cuenta con estructura bicíclica que consiste en un anillo de seis miembros (benceno) unido a otro de cinco miembros (pirrol); esta fusión de estructuras proporciona con frecuencia emisión fluorescente.

En la leche, la mayor parte de la intensidad de fluorescencia intrínseca se puede atribuir a las moléculas de caseína presentes en las micelas de caseína (α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -CN) y proteínas del suero (α -LA, β -LG, BSA) (Tayeh et al., 2009; Yazdi y Corredig, 2012). La fluorescencia de la proteína generalmente proviene de los residuos de fenilalanina, tirosina (Tyr) y Trp. Cuando se excita la leche a una longitud de onda de 280 nm emite fluorescencia del Trp y la Tyr, mientras que a 290 nm solo el Trp produce una emisión fluorescente (Estévez et al., 2017).

Tal como se muestra en la Figura 2.4.7, la contribución de la fenilalanina (solo un anillo bencénico y un grupo de metileno) en la fluorescencia intrínseca de la proteína es insignificante en virtud a su baja capacidad de absorción. Además, se caracteriza por su bajo rendimiento cuántico y absorptividad molar, por lo que, su fluorescencia se observa sólo en ausencia de la Tyr y Trp. Cuando una proteína contiene ambos fluoróforos (Trp y Tyr), el espectro de emisión suele estar dominado por el del triptófano (García-Segura et al., 2008; Ghisaidoobe y Chung, 2014), ya que el Trp es el más sensible y dispone de mayor rendimiento

cuántico. Hay varios factores que suelen hacer disminuir el rendimiento cuántico de las Tyrs en proteínas. Entre ellos, están la presencia del enlace peptídico y la posible transferencia de excitación a residuos del triptófano que se encuentran en sus inmediaciones. No obstante, que la principal razón parece ser el hecho de que en muchas proteínas globulares la Tyr se encuentra en la proximidad de otros residuos de aminoácidos que producen una desactivación de su fluorescencia, concretamente los grupos carboxílicos y los grupos amino (García-Segura et al., 2008).



Figura 2.4.7. Estructura de los aminoácidos aromáticos (Lakowicz, 2006b).

La F_{Trp} se utiliza ampliamente para estudiar las interacciones entre proteínas y otras moléculas, por su alta sensibilidad a la polaridad de su entorno (Liu y Guo, 2008). La β y κ -caseína tienen un residuo de Trp, la α -lactoalbúmina (α -LA) cuatro residuos de Trp; seroalbúmina bovina (BSA) tres residuos de Trp; y tanto α_{S1} -, α_{S2} -caseína como la β -LG tienen dos residuos de Trp por monómero (UniProt Consortium, 2015).

Tal como se indicó anteriormente, la β -LG es una pequeña proteína de 162 residuos de aminoácidos y posee dos residuos de Trp, el Trp19 y Trp61. En el **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.** se muestra que el Trp19 está situado en el entorno hidrofóbico o apolar y contribuye cerca del 80% del total de fluorescencia de la proteína nativa, mientras que el Trp61 está relativamente expuesto en la superficie de la molécula pero sólo contribuye el 20% de la fluorescencia del Trp, ya que su fluorescencia es extinguida en su mayor parte debido a la proximidad del puente disulfuro Cys 66-Cys 160 (Estévez et al., 2017). Los puentes disulfuro son eficaces para el bloqueo de la fluorescencia “*fluorescence quenchers*” (Palazolo et al., 2000). Albani et al. (2014) confirmaron que, únicamente el residuo Trp19 de la β -LG emite fluorescencia. La desnaturalización inducida por el tratamiento térmico de la leche expone el

residuo Trp19 a un ambiente hidrófilo condicionando la intensidad de fluorescencia (Rocha, 2013).



Figura 2.4.8. Diagrama de cintas de una unidad de β -LG de bovino. Las ubicaciones de Trp 19 y Trp 61 se indican (Taheri-Kafrani et al., 2010).

El Trp es un indicador fluorescente importante para la industria láctea. Christensen et al. (2006) mencionan que la emisión de fluorescencia es un indicador de la estructura de la proteína de los productos lácteos. El grupo indol es muy sensible al solvente y a las altas temperaturas. Por ello, gracias al espectro de emisión del Trp se puede tener una idea de su localización y, por tanto, del cambio en la estructura de la proteína. La desnaturalización de las proteínas expone residuos de Trp en un entorno más polar y su espectro estará desplazado hacia mayores longitudes de onda (Lakowicz, 2006a). Sin embargo, si un Trp se encuentra en el interior de la zona globular de una proteína, con bastante probabilidad se encontrará rodeado de residuos apolares, por lo que, su espectro estará desplazado hacia menores longitudes de onda (García-Segura et al., 2008; Taterka y Castillo, 2015).

Por las particularidades atribuidas al Trp, su fluorescencia (F_{Trp}) juega un papel relevante en la industria láctea y ha sido utilizada como marcador en diversas investigaciones. Dufour & Riaublanc (1997) caracterizaron las leches sometidas a distintos tratamientos térmicos. Dufour et al. (2001) y (Karoui et al., 2006) demostraron que existe una fuerte correlación entre F_{Trp} y la discriminación de quesos blandos; además, estos últimos autores caracterizaron queso semiduro (Raclette) según sus características fisicoquímica. Herbert et al. (1999) y Lopez y Dufour (2001) estudiaron las interacciones moleculares durante la coagulación

de la leche y leche reconstituida respectivamente, y encontraron que la cinética de coagulación tiene relación con la F_{Trp} . Mazerolles et al. (2001) relacionaron F_{Trp} con la estructura de la proteína del queso en cada fase de su maduración. Karoui et al. (2005) mencionan que la F_{Trp} es un buen discriminador de quesos Emmental elaborados a partir de leche cruda o termizada. Hougaard et al. (2013) también caracterizaron las leches tratadas térmicamente mediante la fluorescencia de la proteína (Trp).

2.4.2.2 Fluorescencia de riboflavina (F_{Rbf})

La Figura 2.4.9 muestra la estructura de la riboflavina, que está formada por un grupo de tres anillos, que forman la isoaloxazina y el ribitol derivado de la D-ribosa. Se clasifica en el grupo de las flavinas, caracterizada por ser un pigmento amarillo que en presencia de luz UV emiten una fluorescencia amarillo verdosa muy intensa. Las condiciones de medida de este compuesto se pueden ver en la Tabla 2.4.1.

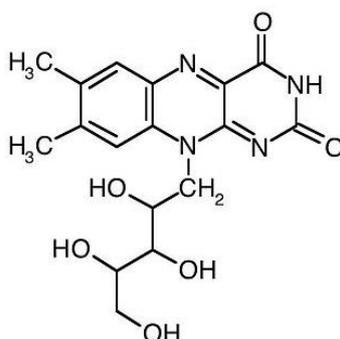


Figura 2.4.9. Estructura de la riboflavina.

La riboflavina se considera como el fotosensibilizador responsable de la fotooxidación y la oxidación temprana de lípidos, y es un iniciador de la degradación de los lípidos y de las proteínas durante la exposición a la luz (Andersen et al., 2006). Su autofluorescencia es importante durante el procesamiento de los productos lácteos (Christensen et al., 2006).

En diferentes tipos de queso y otros productos lácteos, diversos autores midieron el grado de degradación inducida por la luz y el aire durante el almacenado, produciéndose olor a oxidado que se correlaciona con la intensidad de fluorescencia de la riboflavina (Wold y Mielnik, 2000; Wold et al., 2006, 2005).

También Andersen et al. (2006) estudiaron los cambios inducidos en quesos Havarti, siendo la fotodegradación de riboflavina responsable de la oxidación del producto durante el almacenamiento. Veberg et al. (2007) encontraron en mantequilla que las medidas de fluorescencia de la oxidación de los lípidos fueron altamente correlacionadas con las evaluaciones sensoriales de sabor ácido y rancio, en todos los casos medidas una excitación de 380 nm.

Además, se estudió la autenticación de la leche con respecto al sistema de alimentación y el genotipo (Hammami et al., 2013; Karoui et al., 2011) consiguiéndose la correcta clasificación del 72 a 98% de las muestras. También se consiguió la caracterización de los cambios en leche descremada en polvo durante el almacenamiento (Liu y Metzger, 2007). Recientemente se ha estudiado la identificación de leches comerciales. Mungkarndee et al. (2016) obtuvieron espectros de emisión, usando una longitud de onda de excitación de 375 nm, información que permitió una clara clasificación de la leche según su tratamiento térmico.

Todas las investigaciones descritas en esta sección se realizaron aprovechando la fluorescencia de riboflavina. Como se observa, el uso de este marcador fluorescente en los últimos años se relaciona más frecuentemente con el estudio del almacenamiento que con el de los tratamientos térmicos.

2.4.2.3 Fluorescencia de compuestos de Maillard (F_{CM})

La reacción de Maillard se informó por primera vez en 1912 por Louis-Camille Maillard (Newton et al., 2012). Dicha reacción es también conocida como reacción de pardeamiento no enzimático y se origina por interacción entre grupos carbonilo de azúcares reductores y los grupos amino libres de los aminoácidos, péptidos o proteínas (Jiang et al., 2014). Hodge (1953) propuso un esquema, que se representa en la **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**, y que es aún considerado por algunos autores como p.ej., Bastos et al. (2012) como el más apropiado para describir esta reacción.

La reacción de Maillard comprende un conjunto de reacciones en cadena que conducen a la formación de pigmentos pardos con modificaciones del color, olor y sabor de diversos alimentos. La reducción de un azúcar y aminoácido forma

mediante condensación una base de Schiff que se somete a la transposición de Amadori (Hodge, 1953). El producto Amadori, después se divide en numerosos compuestos incluyendo algunas reductonas muy reactivas que pueden emitir fluorescencia y contribuyen en gran medida a los atributos de aroma y color de alimentos (Jiang et al., 2014). Por otro lado, también contribuye a la pérdida de ciertos valores nutricionales (p. ej., la lisina), la producción de compuestos potencialmente tóxicos y malos sabores (Schamberger y Labuza, 2007).

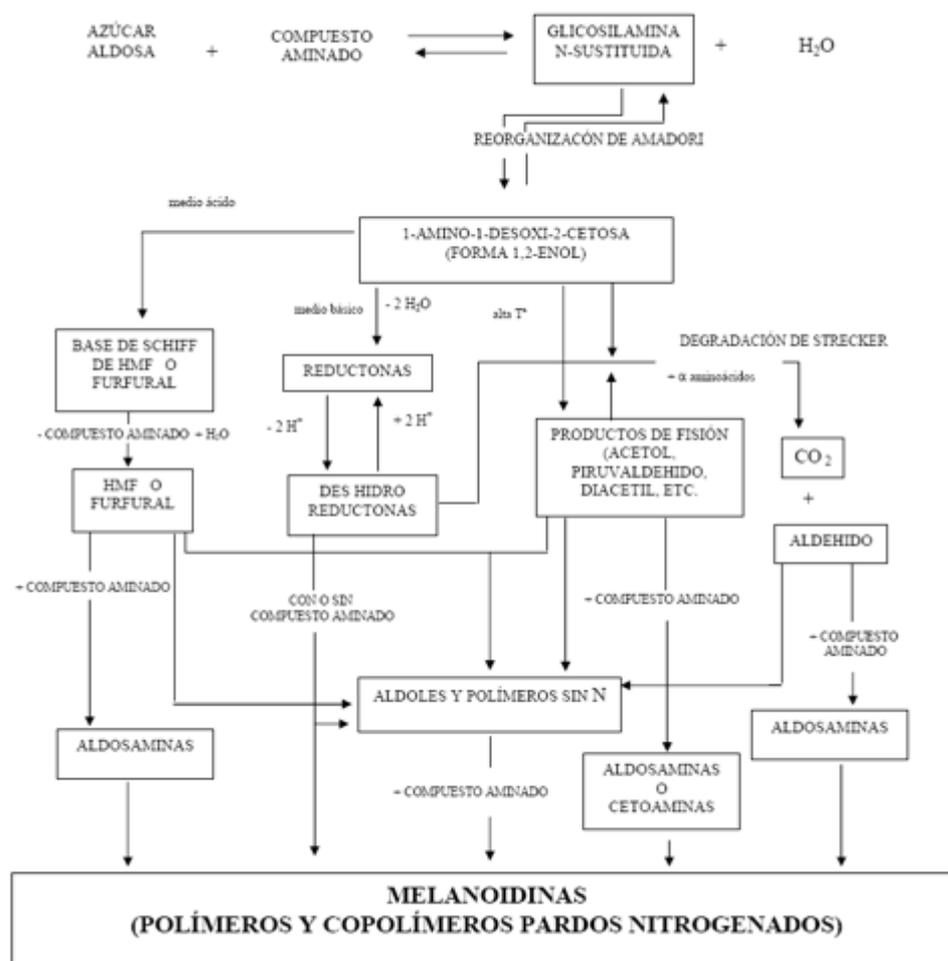


Figura 2.4.10. Reacción de Maillard, reproducido de Bastos et al. (2012).

Durante el tratamiento térmico de productos lácteos, los péptidos de caseína bovina han sido reconocidos como los precursores de la reacción de Maillard (Jiang et al., 2014). La reacción es catalizada por diversos metales (Fe, Cu, etc.,). Los fosfatos y la temperatura también aceleran considerablemente la reacción, como consecuencia de la cual se producen compuestos carbonilos intermedios o finales de la reacción de Maillard, que poseen anillos heterocíclicos

insaturados, responsables de la absorción de la luz ultravioleta y de su fluorescencia (Walstra et al., 2006).

La F_{CM} , es uno de los marcadores que está siendo más estudiado. Leclere y Birlouez (2001) indican que el tratamiento térmico de la leche a 60 – 80 °C, durante 15 – 90 h induce al incremento de la F_{CM} . Birlouez et al. (2005), Birlouez-Aragon et al. (2002) y Feinberg et al. (2006) clasificaron la leche tratada y los productos lácteos mediante la F_{CM} , que es muy sensible su señal a los cambios fisicoquímicos inducidos por el tratamiento térmico. De la combinación de proteína y azúcares lácteos resultó un incremento de la intensidad de fluorescencia y la generación de nuevos compuestos de reacción Maillard durante el tratamiento térmico a 57 °C durante 7 días (Oh et al., 2016). Rozycki et al. (2010) corroboran que el desarrollo de fluorescencia de los compuestos de Maillard durante el tratamiento térmico depende de la temperatura y la concentración de la proteína.

De las investigaciones realizadas y según Matiacevich et al. (2006) los productos de reacción de Maillard podrían ser considerados como marcadores fluorescentes que depende de factores de composición y/o de las condiciones ambientales.

2.4.2.4 Fluorescencia de ditirosina (F_{Dt})

Los residuos de aminoácidos aromáticos de las proteínas son particularmente sensibles a la oxidación. La ditirosina (Dt) es uno de los productos más importantes de la oxidación, que se distingue por la intensa fluorescencia a 420 nm, medible tras la excitación de 315 nm (DiMarco y Giulivi, 2007). En la Figura 2.4.11 se observa la formación de la ditirosina a partir de radicales tirosilo (Fenaille et al., 2004). Este mecanismo de oxidación comienza mediante la fotosensibilización de la riboflavina, la cual genera radicales libres que inducen a la oxidación proteica (formación de ditirosina), que según Descalzo et al. (2013) emite fluorescencia entre 350-430 nm. También, puede ser afectado por el tratamiento térmico el daño oxidativo de las proteínas en productos lácteos (Fenaille et al., 2006).

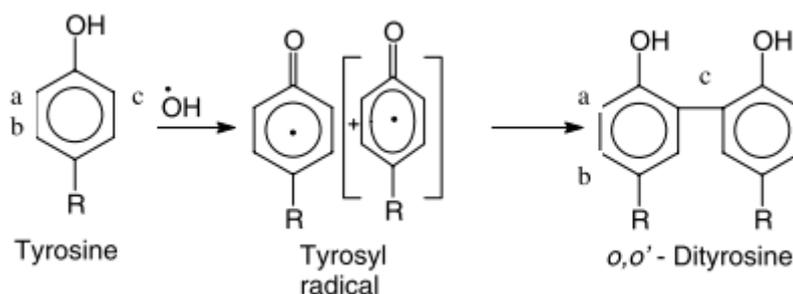


Figura 2.4.11. Formación de ditirosina (Saeed et al., 2006).

Se realizaron diversas investigaciones sobre la formación de la Dt en los productos lácteos. El grado de formación de la Dt en proteínas de la leche varía en función de la estructura proteica, siendo la β -caseína el principal precursor (Scheidegger et al., 2016), dependiendo también de la presencia de iones metálicos. Fenaille et al. (2004) encontraron niveles de Dt en leche en polvo comerciales por debajo de 393 μmol de ditirosina por mol de tirosina. Balestrieri et al., (2002) en queso mozzarella 0,12 nmol de Dt por g de proteína durante el procesado. Fenaille et al., (2006) determinaron que la Dt es indetectable en leche pasteurizada y UHT mientras que en algunas fórmulas infantiles en polvo se encontraron en altas cantidades.

La Dt podría utilizarse potencialmente como un buen marcador químico de oxidación de proteínas de leche (Fenaille et al., 2004). La intención del presente trabajo de investigación es aprovechar su fluorescencia durante el tratamiento térmico, ya que la monitorización de formación de radicales tirosilo y consiguiente generación de Dt es de valor práctico con el fin de mejorar los aspectos de aceptabilidad, nutricional y seguridad de las proteínas (Saeed et al., 2006), en leches tratadas térmicamente.

Capítulo 3

3 Objetivos y plan de trabajo

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar algoritmos de predicción de la concentración de cuatro marcadores de daño térmico (ácido ascórbico, riboflavina, hidroximetilfurfural y los grupos sulfhidrilo) basados en la determinación de indicadores nativos fluorescentes mediante fluorescencia “*front-face*” en leche, a fin de sentar las bases de una tecnología de fluorescencia para estimación en línea del daño térmico durante el tratamiento industrial de leche.

3.1.2 Objetivos específicos:

1. Puesta a punto de un sistema de laboratorio para la medición de fluorescencia “*front-face*” de sobremesa y de fibra óptica para uso en línea.
2. Puesta a punto de sistemas de laboratorio para cuantificación de marcadores físico-químicos de daño térmico (ácido ascórbico, riboflavina, hidroximetilfurfural y grupos sulfhidrilo) en muestras de leche procesadas térmicamente.
3. Desarrollo de modelos cinéticos y de predicción de los marcadores de daño térmico en un sistema modelo (leche desnatada en polvo), a partir de las medidas de fluorescencia “*front-face*” en el equipo de sobremesa.
4. Validación de los modelos cinéticos y de predicción con muestras procesadas en condiciones industriales medidas en un equipo de sobremesa y fibra óptica.
5. Recalibración de los modelos de predicción para leche procesada en condiciones industriales medidas en un equipo de sobremesa.
6. Calibración y validación de los nuevos modelos para el uso de fibra óptica.

3.1.3 Objetivo complementario:

7. Cuantificación rápida de riboflavina mediante fluorescencia “*front-face*” en leches comerciales, sin previa manipulación de muestra.

3.2 PLAN DE TRABAJO

La presente memoria está enmarcada dentro del plan general del proyecto AGL 2012-33957 titulado: Aplicación de indicadores nativos de fluorescencia para cuantificación rápida de daño térmico durante el procesado de leche. En dicho proyecto, se han caracterizado varios indicadores, siendo ineludible su indagación de cada uno de ellos. Por lo tanto, fue necesario trabajar de forma coordinada entre los investigadores del grupo de trabajo, debido a la existencia de numerosos marcadores. Por consiguiente, en la presente investigación se estudiaron los siguientes marcadores de daño térmico: hidroximetilfurfural (HMF), grupos sulfhidrilo (-SH), ácido ascórbico (AA) y riboflavina (Rbf).

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se realizaron cuatro experimentos. En los dos primeros se utilizó leche estándar desnatada en polvo. Este tipo de leche fue seleccionada para generar un sistema modelo con reducida variabilidad experimental, mientras que para el tercer experimento se utilizó leche fresca, procesada en la planta de tecnología de alimentos de la UAB. En el cuarto, además de leche desnatada, se utilizaron distintas leches comerciales.

En el **primer experimento** (Figura 3.2.1), la leche fue sometida a 80 °C por un tiempo de 0-180 min y 0-30 min para estudiar la cinética de formación y/o desaparición del HMF y –SH respectivamente. En las muestras obtenidas se midieron inmediatamente la fluorescencia de los compuestos fluorescentes intrínsecos como también las concentraciones de HMF y –SH. A partir de la información generada se desarrollaron modelos tanto cinéticos y de predicción para cuantificar mediante la FFF los compuestos mencionados anteriormente.

En el **segundo experimento** (Figura 3.2.2), la leche se sometió a diferentes tratamientos térmicos (70, 80 y 90 °C) por periodos de 0-60 min. Concluidos los tratamientos, se midió inmediatamente la fluorescencia de los indicadores nativos existentes en las muestras. Por otro lado, se almacenaron muestras a - 30 °C, para la posterior cuantificación química de AA y RBF. Con la información generada, se realizaron estudios cinéticos de destrucción de ambos compuestos y un análisis exhaustivo del efecto de las temperaturas y los tiempos respecto a los cambios generados en la intensidad de fluorescencia. Finalmente se desarrollaron de

predicción de la concentración de los marcadores químicos seleccionados a partir de medidas de fluorescencia.

Obtenidos los modelos matemáticos de predicción a nivel de laboratorio, el **tercer experimento** (Figura 3.2.3) tuvo como objetivo central validar y recalibrar, en aquellos casos que fue necesario, los modelos matemáticos con leche desnatada procesada en planta piloto, que fueron sometidas a termización, pasteurización HTST (*“High Temperature Short Time”*), pasteurización HHST (*“Higher Heat Shorter Time”* –*“ultrapasteurización”*–), esterilización UHT en continuo (*“Ultra High Temperature”*) y esterilización en botella o clásica. Para las validaciones de los modelos se utilizaron, el equipo de sobremesa y un equipo portátil (espectrofluorímetro FFF en línea).

El **cuarto experimento**, surgió durante la realización de pruebas preliminares de puesta a punto de las medidas de fluorescencia del marcador riboflavina, donde se midió la intensidad de la fluorescencia en leches reconstituidas a diferentes porcentajes de sólidos totales (10, 12, 14, 16, y 18%) obteniéndose una relación directa entre la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de sólidos totales con ($R^2 = 0,986$). A partir de estos resultados se derivó el interés por evaluar la posibilidad de cuantificar la riboflavina en leche sin previa manipulación de muestra mediante FFF. En la etapa I (Figura 3.2.4) del experimento 4, se desarrolló y validó el modelo matemático para leche desnatada mientras que en la etapa II (Figura 3.2.5) de dicho experimento, se contrastó la validez del modelo en muestras comerciales (polvo y líquidas) con métodos de cuantificación química realizadas tanto en laboratorios de la UAB como en un laboratorio externo certificado.

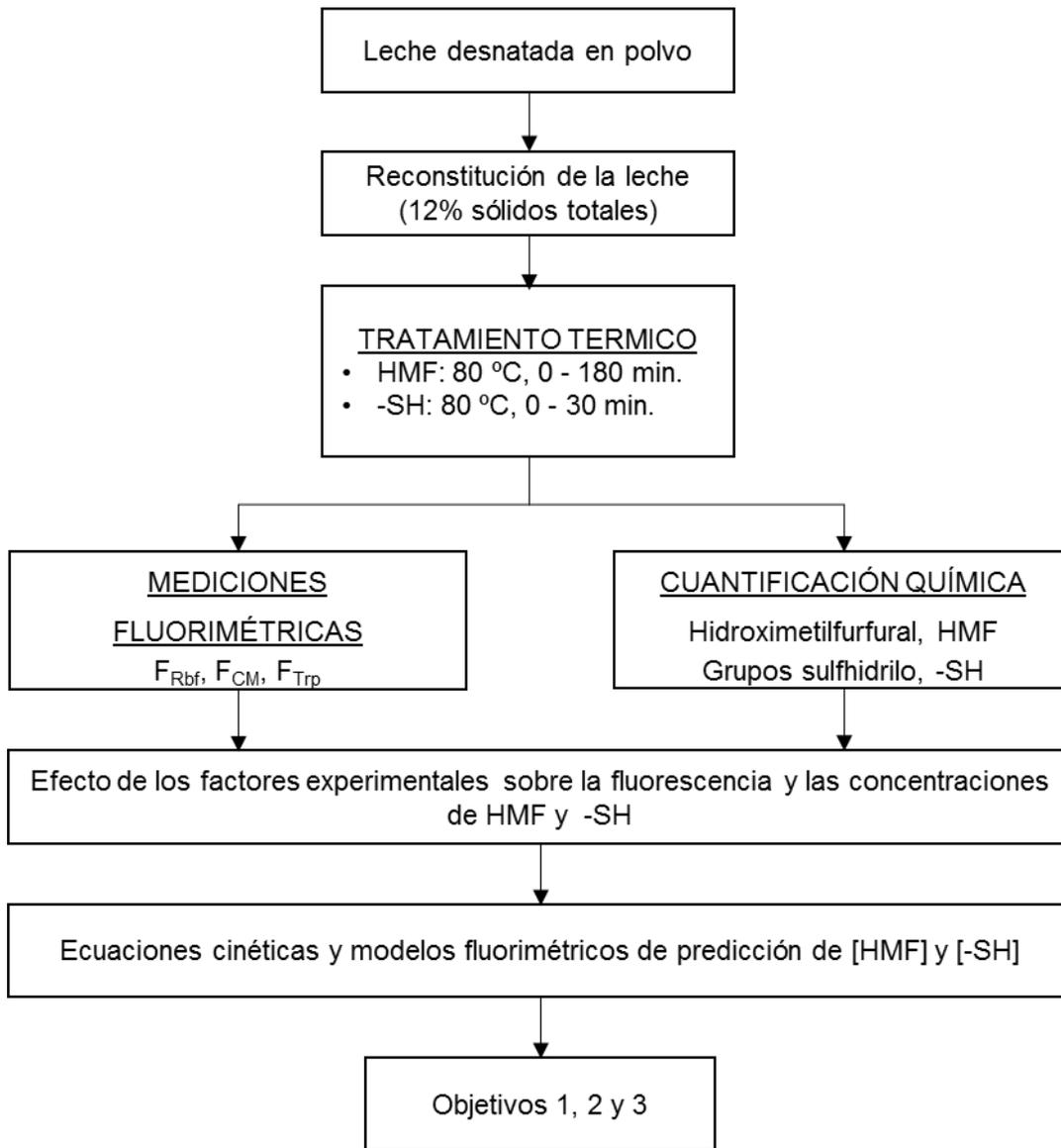


Figura 3.2.1. Plan de trabajo para obtener modelos de predicción de la [HMF] y [-SH].

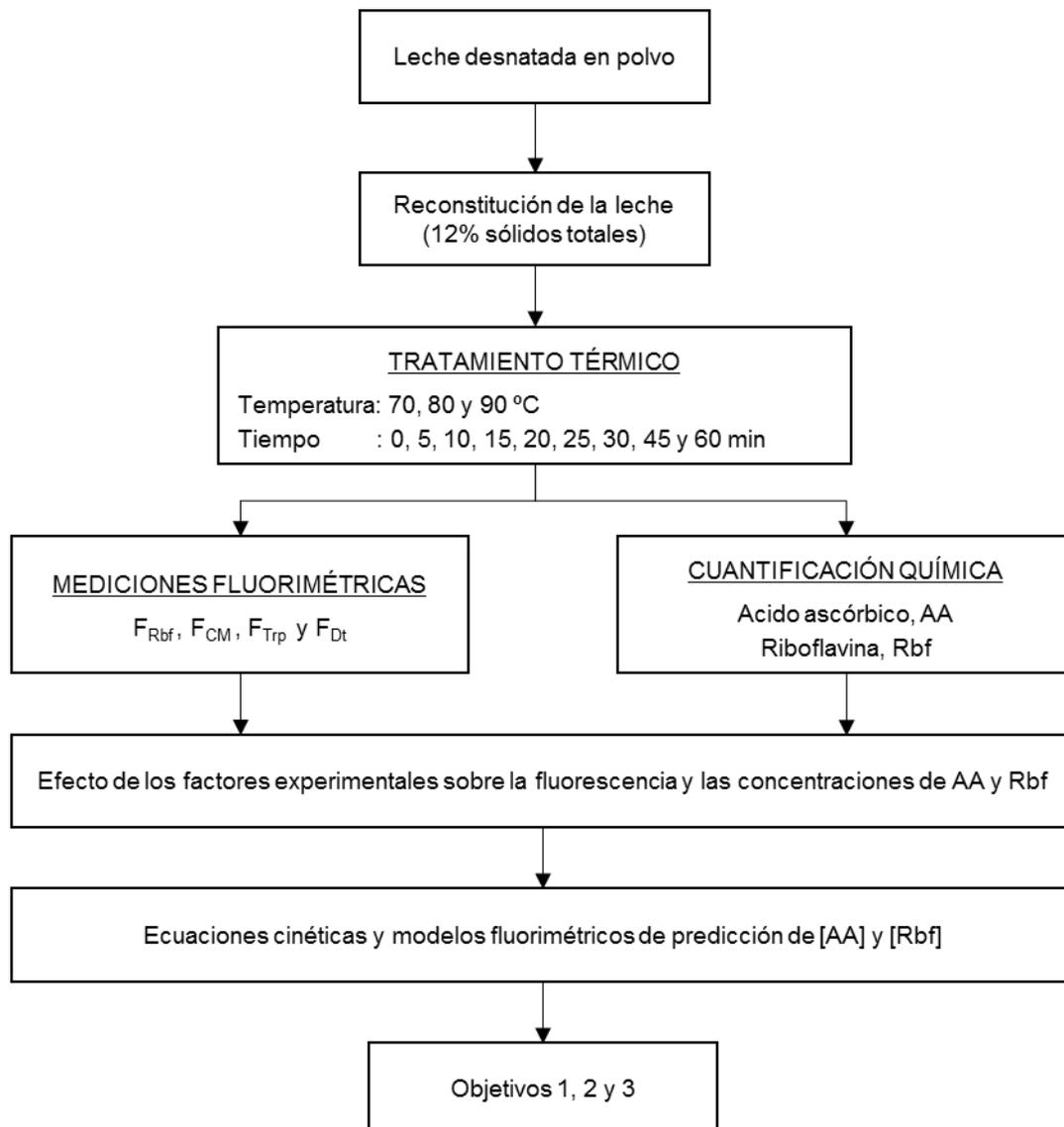


Figura 3.2.2. Plan de trabajo para obtener modelos de predicción de [AA] y [Rbf].

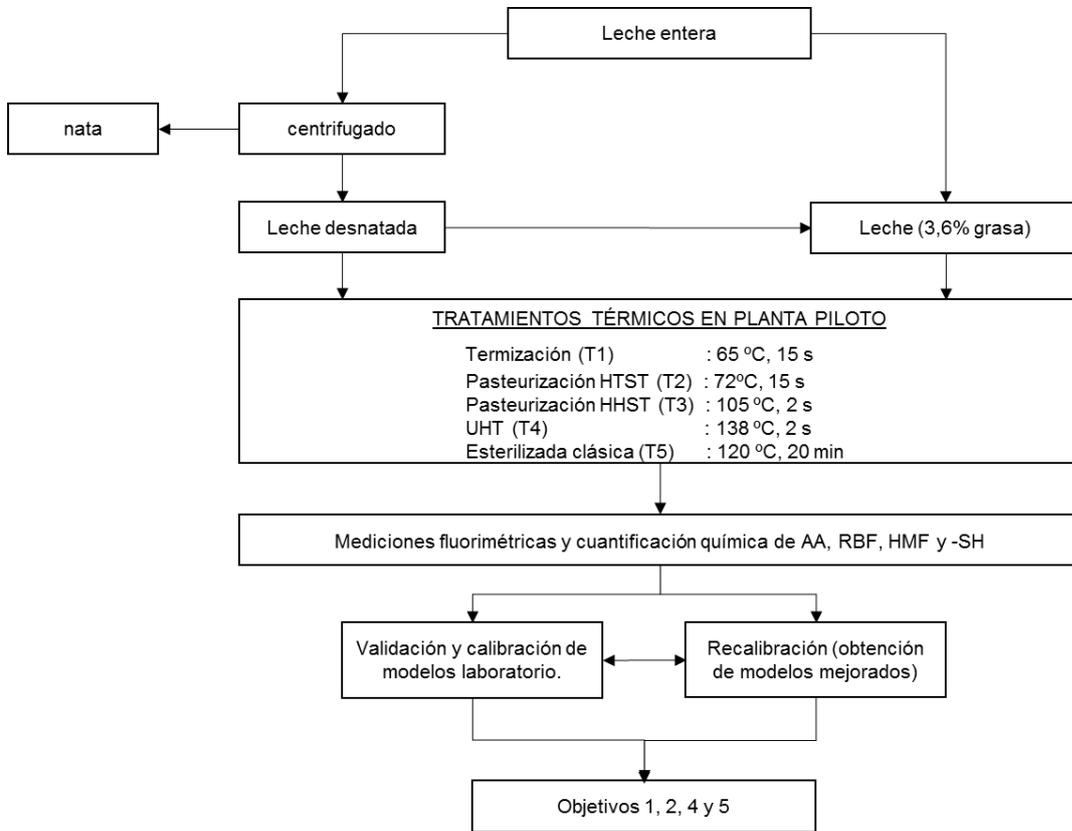


Figura 3.2.3. Plan de trabajo para validar y recalibrar los modelos de predicción con tratamientos térmicos en planta piloto.

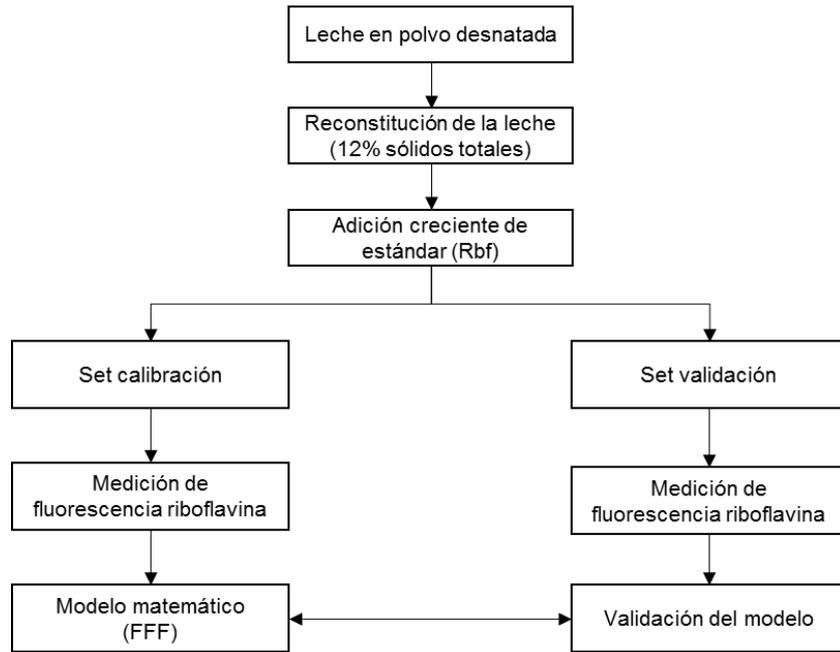


Figura 3.2.4. Etapa I: Desarrollo y validación del modelo matemático.

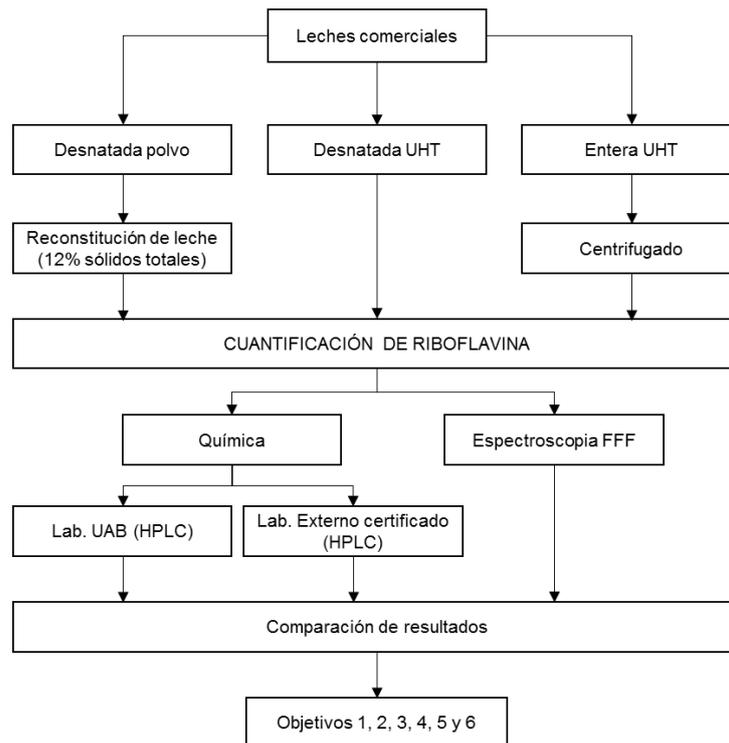


Figura 3.2.5. Etapa II: contraste de validez en leches comerciales.

Capítulo 4

4 Materiales y métodos

4.1 Recepción de leche

Para el 1º, 2º y 4º experimento, los estudios se realizaron con leche estándar desnatada en polvo desecada mediante atomización, de alta calidad funcional y microbiológica (extra-grade, “*low heat*”,) suministrada por Chr. Hansen S.L. (Barcelona, España). La leche fue reconstituida al 12% (w/w) con agua destilada atemperada a 40 °C, agitando durante 15 min a 150 rpm. Luego se dejó reposar durante 30 min en la oscuridad para facilitar la correcta hidratación de los constituyentes y evitar la fotodegradación de algunos compuestos (riboflavina) de la leche.

Para el 3º experimento, se trabajó con leche cruda entera procedente de la granja Can Badó (La Roca del Vallès, Barcelona). Se utilizaron aproximadamente 150 litros para cada réplica. Este fue sometido a diversos tratamientos térmicos industriales en la planta de tecnología de alimentos de la UAB, tal como se ha descrito en el capítulo de “objetivos y plan de trabajo”.

Para el 4º experimento, además de haber utilizado leche en polvo desnatada “*low heat*” para construir el modelo matemático, se adquirió leche de diversas marcas comerciales en polvo desnatadas y líquidas UHT (entera y desnatada) para validar el modelo matemático de cuantificación de la Rbf.

4.2 Tratamientos térmicos aplicados a la leche

Para el 1º y 2º experimento, a fin de estudiar la evolución cinética de los marcadores químicos de daño térmico, el tratamiento térmico se aplicó a muestras de 10 mL de leche para hidroximetilfurfural, 5 mL para riboflavina, 2 mL para los grupos sulfhidrilo y ácido ascórbico, en tubos de ensayo con rosca (pyrex) 30 mL de capacidad cerrados herméticamente e inmersos en un baño termostático modelo OvanTherm TC00E C (Suministros Grupo Esper S.L., Badalona-España). La temperatura empleada en el 1º experimento fue 80 °C, mientras en el 2º experimento se trabajó a 70, 80 y 90 °C.

Para el 3º experimento, los tratamientos térmicos a la leche desnatada fueron aplicados en la planta piloto. Estos tratamientos fueron **termización**,

pasteurización HTST (“*High Temperature Short Time*”), **pasteurización HHST** (“*Higher Heat Shorter Time*” – “*ultrapasteurización*”), **esterilización continuo UHT** (“*Ultra High Temperature*”), todos ellos aplicados en un intercambiador tubular modelo Tetra Therm ® Aseptic Pilot (Tetra Pak, Lund-Suecia) como el que se muestra en la **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.** La **esterilización en botella** o clásica se realizó en autoclave Modelo 1000-LC ref. 1024 (Calderería Ramón Naves S.L., Barcelona-España).

Las condiciones de temperatura-tiempo utilizados en dichos tratamientos ya han sido mencionadas en el plan de trabajo de la presente memoria de tesis (Figura 3.2.3).



Figura 4.1.1. Equipo de tratamiento térmico en continuo Tetra Therm ® Aseptic Pilot utilizado en los experimentos.

Para el 4º experimento, el objetivo fue desarrollar un algoritmo para predecir la concentración de riboflavina en leches comerciales en polvo y líquidas (UHT), no fue necesario someter a tratamiento térmico las muestras de leche. Para la validación del modelo se adquirieron leches comerciales de diversas marcas comerciales.

4.3 Determinación de fluorescencia

En el 1º y 2º experimento, las medidas espectroscópicas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro (Figura 4.1.2A) modelo Cary Eclipse (Agilent Technologies, Madrid-España). Este dispositivo está equipado con una lámpara pulsada de xenón de 15 W y un accesorio con geometría “*front-face*” ajustado a un ángulo de incidencia de 35º, que minimiza tanto los fenómenos de reflexión especular por parte de la superficie de la cubeta como de absorción interna por

parte de la muestra. Las medidas se realizaron empleando cubetas de cuarzo Suprasil (Agilent Technologies, Madrid-España).

Todas las medidas de los fluoróforos estudiadas fueron adquiridas utilizando longitudes de onda de excitación puntuales, obteniéndose espectros de emisión tal como se muestra en la Tabla 4.1.1. El *slit* utilizado en todos los casos fue de 5 nm para la excitación y la emisión.

Tabla 4.1.1. Longitudes de onda de excitación y emisión, y el scan de emisión empleados para la determinación de fluorescencia de los fluoróforos.

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Triptófano	290	300-450
Compuestos de Maillard	330	350-500
Riboflavina	267, 370, 450	470-570
Ditirosina	315	350-500

Para la construcción de los modelos matemáticos de predicción mediante marcadores fluorescentes se utilizó el valor máximo de intensidad de la fluorescencia de cada fluoroforo.



Figura 4.1.2. A) Espectrofotómetro de sobremesa y B) portátil.

En el 3º experimento, con la finalidad de validar los modelos matemáticos obtenidos del 1º y 2º experimento, se realizaron medidas de fluorescencia en dos tipos de espectrofotómetros (sobremesa y portátil). Esta última corresponde a un espectrofotómetro portátil Modelo *QEPro* (Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, USA) con 2 lámparas cada una de las cuales albergan en su interior tres LEDs

(Sandhouse, Florida, ahora Ocean Optics, Inc., Dunedin, Florida, USA) cuyas condiciones de trabajo se reflejan en la siguiente tabla.

Tabla 4.1.2. Condiciones de trabajo del espectrofotómetro portátil.

Fluoróforo	Excitación (nm)	Emisión (nm)
Triptófano	290	300-450
Compuestos intermedios de Maillard	325	350-500
Riboflavina	265, 365 y 455	470-570
Ditirosina	315	350-500

En el 4º experimento, las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando el espectrofotómetro sobremesa (Figura 4.1.2A). En este estudio, las medidas de longitud de onda de excitación y la emisión fueron 370 y 530 nm respectivamente.

Antes de proceder con las mediciones de fluorescencia, las muestras de leche en polvo fueron reconstituidas según lo indicado en la sección 4.1 de materiales y métodos; mientras las muestras de leche entera fueron centrifugadas en un equipo modelo 4K-15, SN.93250 (Sigma laboratory centrifuge, Osterode am Harz - Germany) a 2500 RPM durante 20 min con el propósito de separar la grasa.

4.4 Cuantificaciones químicas de marcadores de daño térmico

4.4.1 Cuantificación del hidroximetilfurfural

La técnica empleada para la determinación química de HMF viene definida por el método de Keeney & Bassette (1959). Dicho método determina el HMF total, que recoge no sólo la concentración de HMF libre detectada en leche que se produce a partir de la reacción de Maillard (descomposición del producto de Amadori lactulosil-lisina) sino también el HMF formado por la degradación de la lactosa vía transformación Lobry De Bruyn-Alberda van Ekenstein (LA) que, de hecho, es la vía mayoritaria de formación de HMF en leche (Morales y Jiménez-Pérez, 1999).

Se partió de alícuotas de 10 mL de leche reconstituida a las que se les añadió 5 mL de ácido oxálico 0,3 N (18,9 g de ácido oxálico diluido en 1 L de agua destilada). La mezcla se colocó en tubos de 20 mL de vidrio pírax que se mantuvieron, tapados, en una estufa a 102 °C durante 1 h. Seguidamente, los tubos se refrigeraron con agua fría hasta temperatura ambiente (~21 °C) y se les añadió 5 mL de ácido

tricloroacético (TCA) al 40% en agua destilada (*w/w*) y, tras mezclar, se filtró con papel de filtro Whatman N°42. Tras el filtrado, se pipetearon 4 mL del permeado en un tubo pírrex de 15 mL y se añadió 1 mL de ácido tiobarbiturico (TBA) 0,05 M preparado con agua destilada. Tras la homogeneización de la mezcla, ésta se mantuvo durante 40 min en un baño termostático a 40 °C, tras lo que la muestra se enfrió hasta temperatura ambiente, según lo indicado anteriormente.

Finalmente, se leyó la absorbancia (*A*) a 443 nm con un espectrofotómetro (mod. UV2310, Dinko Instruments, España) empleando una cubeta de cuarzo Suprasil® (mod.104-QS, Hellma Müllheim, Alemania) contra un blanco preparado de la misma manera, pero sustituyendo la leche por agua.

Para calcular la concentración de HMF ($\mu\text{mol/L}^{-1}$) se utilizó la siguiente ecuación proporcionada por el método:

$$[\text{HMF}] (\mu\text{molL}^{-1}) = (A - 0,055) \times 87,5$$

4.4.2 Cuantificación de los grupos sulfhidrilo totales

Para la determinación de los grupos sulfhidrilo/tiol ($-\text{SH}$) totales en las muestras de leche, se utilizó el método rápido de determinación propuesto por (Guingamp et al., 1993). Este método se basa en la reducción, en medio ligeramente básico y en presencia de urea, del reactivo de Ellman, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) que forma ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico, de color amarillo, gracias al poder reductor de los grupos tiol.

Se recogió una alícuota de 0,5 mL de la leche desnatada y se le añadió 0,5 mL de agua destilada (1:1 (*v/v*)). Seguidamente se adicionó 1 mL de tampón urea 8 M (pH 8,5), preparado previamente en tampón borato 0,03 M llevado a pH con ácido bórico. A la mezcla se adicionaron también 50 μL de DTNB, suministrado por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.), preparado previamente disolviendo 20 mg de DTNB en 5 mL de disolución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,2 M ajustada previamente a pH 6 con hidróxido de sodio 1 N. Tras la adición del tampón urea, la mezcla se homogeneizó mediante un vortex suave (mod. IKA MS3 basic, IKA Works Inc., EE.UU.) y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente.

Posteriormente, a la mezcla se añadió 0,5 mL de EDTA 0,2 M (pH 6) y 2 mL de agente clarificante específico para productos lácteos (Clarificant Reagent® for dairy products, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) previamente atemperado en baño termostático a 37 °C. Tras homogenizar vigorosamente la muestra con vortex potente (mod. IKA MS2 minishaker, IKA Works Inc., EE.UU.), ésta se emplazó en un baño termostático a 37 °C durante 10 min. Finalmente, la muestra se enfrió en un baño de hielo picado hasta una temperatura de 21 °C e inmediatamente después se midió la A a 412 nm contra un blanco (blanco 1) que contenía todos los reactivos excepto la leche.

La correcta clarificación de las muestras se verificó leyendo la A del blanco 2 (sin DTNB) contra el blanco 3 (sin leche y sin DTNB). Los valores de $A < 0,12$ indicaron una clarificación correcta. En la Tabla 4.1.3 se recogen los componentes de cada uno de los blancos empleados en la determinación de grupos tiol.

Tabla 4.1.3. Contenido de los blancos empleados en la determinación de grupos –SH.

Blancos	Leche	Reactivos	DTNB
Blanco 1		X	X
Blanco 2	X	X	
Blanco 3		X	

Fuente: (Guingamp et al., 1993)

Finalmente, tras las determinaciones espectrofotométricas, se calculó la concentración de grupos –SH a partir de una curva de calibrado de L-cisteína de 0-0,1 gr/L, que se preparó para cada ensayo disolviendo la cisteína en agua destilada. Los datos de la concentración se convirtieron a ($\mu\text{mol-SH. g}^{-1}$); g, equivale a los gramos de sólidos totales no grasos.

Las determinaciones de pH de todos los reactivos utilizados se realizaron mediante un electrodo de penetración de vidrio (mod. 5233, Crison Instruments S.A., España) conectado a un pH-metro, previamente calibrado a dos puntos con soluciones estándar de pH 7,00 y 4,01 (Crison Instruments S.A.).

4.4.3 Cuantificación del ácido ascórbico

Las mediciones cromatográficas se realizaron usando un Dionex P680 HPLC UV-Vis detector (Dionex, Germering, Germany). La columna analítica utilizada fue un Tracer Extraxil ODS 2 C18; 0,46 mm x 250 nm y partículas de diámetro 5 x 5 mm I.D. (Tecknokroma, Barcelona, España). La concentración del ácido ascórbico fue analizada por el método de Romeu-Nadal et al. (2006) con algunas modificaciones.

Las muestras de leche (1,50 mL), previamente congeladas contenidas en tubos Eppendorf (Eppendorf microtubes 3810X, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) se descongelaron en un baño de agua, protegiendo de la luz y se centrifugaron (Hettich Universal, Mikro 12-24, Germany) a 12000 RPM durante 15 minutos. De la fase acuosa se extrajeron cuidadosamente 0,4 mL y se añadió 1,00 mL de una solución de ácido meta-fosfórico al 0,55% (w/v) en un nuevo tubo Eppendorf y la mezcla se agitó manualmente durante 30 s y se centrifugó durante 10 min a 12000 RPM. Para la obtención de la muestra final, el sobrenadante se hizo pasar por un filtro (Nylon syringe, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) de 0,22 μm a tubos viales para HPLC.

La muestra se inyectó directamente en el sistema HPLC, y la separación se realizó por elución isocrática usando una fase móvil de agua Milli-Q con ácido acético (0,1%, v/v) y metanol en una proporción de 95:5 (v/v). El caudal de eluyente fue 0,7 mL/min, la temperatura de la columna a 25 °C y el tiempo de análisis de cada muestra fue 20 min.

El ácido ascórbico se identificó comparando el tiempo de retención del pico de la muestra a 254 nm. La cuantificación se llevó a cabo usando patrones de ácido ascórbico, construyéndose una curva de calibración. La solución estándar se preparó a diferentes concentraciones de ácido ascórbico (1; 5; 10; 20 y 30 ppm) mediante disolución del ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, España) en ácido meta-fosfórico 0,55% (w/v) disuelto con agua Milli-Q.

4.4.4 Cuantificación de la riboflavina

Las mediciones cromatografías se realizaron usando un Dionex P680 HPLC UV-Vis detector (Dionex, Germering, Germany). La columna analítica utilizada fue Waters Spherisorb ODS 2 C18, con un relleno de partículas de 5 μm de diámetro,

4,6 mm x 150 mm (Tecknokroma, Barcelona, España). La concentración de la riboflavina fue analizada por el método de Albala-Hurtado et al. (1997). La separación cromatográfica se realizó en condiciones isocráticas en una fase móvil de 5 mM de ácido octanosulfónico, 0,5% de trietilamina, 24% de ácido acético glacial y 15% de metanol. El caudal de eluyente fue 1,0 mL/min y la temperatura de la columna fue de 25 °C. El tiempo de análisis de cada muestra fue de 20 min.

Se preparó una solución madre de riboflavina con una concentración de 100 ppm en 2,4% (v/v) de ácido acético, a partir de la cual se obtuvieron soluciones de calibración (0,5; 1; 2; 4 mg /L) diluyendo la solución madre en ácido acético acuoso al 2,4%. Todas las soluciones estándar fueron filtradas a través de un filtro (Nylon syringe) de 0,22 µm a viales para su inyección en el HPLC.

Se pesaron con precisión 5 g de leche líquida o reconstituida en un tubo de centrifuga a los cuales se añadieron 0,5 g de ácido tricloroacético. La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 s y posteriormente se centrifugó (Sigma laboratory centrifuge, 4K-15, SN. 93250, Osterode am Harz, Germany) durante 15 min a 2500 RPM para separar las dos fases. El sobrenadante se llevó a otro tubo y se añadieron 0,5 mL de ácido tricloroacético al 4% al residuo sólido obtenido. Tras mezclarlo bien durante 1 min y se centrifugó a 2500 RPM durante 10 min. Los dos extractos ácidos se combinaron en un tubo de 10 mL. Las muestras se mantuvieron en todo momento protegidas de la luz, se filtraron a través de filtros de 0,22 µm antes de su inyección en el HPLC.

4.5 Modelización de datos cinéticos

1º experimento

El tratamiento térmico promueve reacciones que afectan a la calidad general de los alimentos. La pérdida de calidad implica tanto factores subjetivos que no se pueden cuantificar fácilmente, como p. ej. el sabor, así como los factores cuantificables, tales como la degradación de nutrientes (Awuah et al., 2007).

Para la modelización de la aparición/desaparición de los marcadores de daño térmico y obtención de datos cinéticos correspondientes, previamente se evaluaron ecuaciones cinéticas de orden cero, uno y dos, a fin de seleccionar el modelo cinético más apropiado en cada caso. El efecto de la temperatura sobre la velocidad

de reacción se modelizó mediante la ecuación de Arrhenius (Van Boekel, 2008). Para la estimación de la constante cinética y su energía de activación, una vez identificado el orden de reacción, se utilizaron las siguientes ecuaciones.

- a. Velocidad de reacción, es la variación de la concentración de un producto de reacción o de sustrato de partida con respecto al tiempo:

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k_T [C]^n.$$

En esta expresión, el símbolo \pm nos indica que el sustrato químico seleccionado puede incrementarse o puede disminuir con el tiempo, v es la velocidad de reacción que corresponde a la diferencia de concentración respecto al tiempo (t), k es la constante de velocidad en función de la temperatura y n el orden de reacción.

A partir de dicha ecuación diferencial, se obtiene las siguientes ecuaciones mediante integración entre $t=0$ cuando $[c] = [c]_0$ y t (cuando $[c] = [c]_t$).

- b. Ecuación cinética de orden cero

$$[C]_t = [C]_0 + kt.$$

- c. Ecuación cinética de primer orden

$$\ln \frac{[C]_t}{[C]_0} = kt.$$

- d. Ecuación cinética de segundo orden

$$\frac{1}{[C]_t} = \frac{1}{[C]_0} + kt.$$

- e. Ley de Arrhenius

$$k_t = A_0 e^{-E_a/RT}.$$

Donde, A_0 es la constante o factor pre-exponencial, E_a es la energía de activación del proceso (expresada en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R es la constante general de los gases ($0,0083141 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) y, finalmente, T es la temperatura expresada en K ($^{\circ}\text{C}+273$). A partir de esta expresión se puede obtener, por sustitución del valor k , ecuaciones de “orden cero”, “orden uno” y “orden dos”.

Como en el experimento solo se trabajó a una sola temperatura (80°C), para obtener la ecuación cinética se siguieron los siguientes pasos:

f. Ecuación de Arrhenius aplicada a dos condiciones de temperatura T_1 y T_2 :

$$k_1 = A_0 e^{-E_a/RT_1}.$$

$$k_2 = A_0 e^{-E_a/RT_2}.$$

Dividiendo ambos miembros de las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$\frac{k_1}{k_2} = e^{\left(-\frac{E_a}{RT_1} + \frac{E_a}{RT_2}\right)}.$$

Entonces, despejando k_1 de la ecuación anterior se obtiene:

$$k_1 = k_2 e^{\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right)}$$

Donde asumiendo T_1 y T_2 como temperaturas de trabajo y de referencia respectivamente y sustituyendo a la ecuación cinética seleccionado, p.ej. si fuese la ecuación cinética de primer orden, quedaría de la siguiente manera:

$$[C]_t = [C]_0 e^{\left[k_{trb} \times e^{-\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T_{trb}}\right)} \right] t}$$

Dónde: k_{trb} y T_{trb} , son datos del compuesto, en este caso del HMF ó -SH; t, tiempo (min), E_a , energía de activación de referencia bibliográfico.

2º experimento, para modelizar las ecuaciones cinéticas de predicción mediante tiempo- temperatura, para el AA y la Rbf, de todos los pasos desarrollados hasta el momento, el paso f se obvió, debido a que se trabajaron a 3 temperaturas.

Los parámetros cinéticos se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones descritas previamente por (Ordóñez et al., 2013)

g. Tiempo de reducción decimal, D ,

$$D_T = \frac{\ln(10)}{k_T}.$$

h. Coeficiente térmico, Q_{10} ,

$$Q_{10} = \left[\frac{k_2}{k_1} \right]^{\frac{10}{T_2 - T_1}}$$

i. Constante de resistencia térmica o valor Z

$$Z = \frac{10\text{Ln}(10)}{\text{Ln}Q_{10}}$$

Todos los datos cinéticos fueron analizados mediante el análisis de regresión, utilizando MS Excel 2013.

4.6 Obtención de modelos de predicción

Los datos fueron procesados y analizados utilizando “*Statistical Analysis System*” (SAS, versión 9.2, 2009, SAS institute Inc., Cary, NC, EEUU). Los coeficientes de correlación de Pearson, r , se determinaron mediante el procedimiento de Correlación (CORR).

La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) es un método para relacionar dos matrices de datos, X e Y, por un modelo multivariado línea. Para obtener los mejores modelos de predicción de una, dos y tres variables, se utilizó el procedimiento de máximo R^2 (REG, MAXR) de SAS para la predicción de la concentración de los marcadores químicos de daños térmico estudiados (AA, Rbf, HMF y –SH) a partir de F_{Trp} , F_{CM} , F_{Rbf267} , F_{Rbf370} , F_{Rbf450} y F_{Dt} con propiedad de que la precisión de predicción del modelo mejora con el aumento del número de variables. El procedimiento para obtener los modelos de predicción de todos los marcadores estudiados, se realizó correlacionando con las intensidades máximas de fluorescencia obtenidas de los espectros de emisión de cada marcador fluorescente.

4.7 Validación de los modelos matemáticos de predicción

Validación de los modelos

En esta primera etapa se validaron todos los modelos generados en el 1º y 2º experimento, para ello se utilizó el 100% de las muestras de leche desnatada procesadas en el 3º experimento (condiciones industriales).

Para validar las medidas de fluorescencia generadas por el equipo portátil (espectrofluorímetro), fue necesario realizar un factor de corrección respecto a las medidas del equipo de sobremesa con la finalidad de lograr una equivalencia entre ambos equipos para aplicarlas a los modelos obtenidos anteriormente.

Recalibrado de los modelos matemáticos

Para recalibrar los modelos cinéticos, fue necesario el uso de la herramienta Solver que trae el paquete computacional de Microsoft office Excel. Dicha herramienta tiene la capacidad de ajustar y/o estimar valores óptimos (máximo o mínimo) para una fórmula, en este caso para el modelo cinético.

Los modelos de predicción desarrollados mediante los compuestos fluorescentes, que previamente fueron validadas mediante índices matemáticos y estadísticos a partir de valores como el coeficiente de determinación (R^2), error estándar de predicción (SEP) y coeficiente de variabilidad (CV), que no fueron suficientemente fiables. Se llevó a un recalibrado, este consistió en añadir los datos experimentales de las muestras procesadas en condiciones industriales (3º experimento) a los datos adquiridos por el sistema modelo (leche desnatada).

4.8 Calibrado y validado de modelos para el equipo portátil

Para el calibrado fue necesario utilizar los datos de las tres replicas (experimento III) y su respectiva validación cruzada “*leave-one-out cross*”, este tipo de validación consiste en validar los mismos datos de calibración, pero dejando cada vez una muestra afuera. Este procedimiento se realizó debido a que los modelos calibrados con el equipo de sobremesa, no son suficientemente adaptables debido a las diferencias existentes entre los equipos (sistema óptico, factor de conversión).

Capítulo 5

5 Resultados y discusión

5.1 Estudio cinético de formación/desaparición de marcadores de daño térmico

5.1.1 Hidroximetilfurfural (HMF)

Los resultados del HMF y –SH corresponden al primer experimento de esta memoria de tesis doctoral.

HMF es uno de los principales compuestos intermedios producidos por la reacción de Maillard, formado a partir de los compuestos Amadori o de la isomerización de la lactosa a elevadas temperaturas. Es un compuesto libre de nitrógeno y ha servido a menudo como un indicador de la intensidad de calor aplicado a la leche por diferentes tratamientos de higienización (Morales y Jiménez-Pérez, 1999).

La cantidad HMF total encontrada de en leche no tratada térmicamente fue 9,37 $\mu\text{mol/L}$ (Tabla 5.1.1). Este valor es mayor que los obtenidos por Vargas (2006) con una concentración de 3,46 $\mu\text{mol/L}$, Morales et al. (1996) con valores de 3,6 a 6,1 $\mu\text{mol/L}$ y Konietzko y Reuter (1986), que encontraron de 2,7 a 8,7 $\mu\text{mol/L}$. Este mayor contenido probablemente se debe a que la leche utilizada en este experimento fue sometida previamente a secado por atomización. Además, otros autores indican que las amplias diferencias de los valores serian debidas al uso del método de cuantificación colorimétrico, ya que el ácido tiobarbiturico puede reaccionar con otros compuestos de Maillard que contienen un grupo aldehído (Datta et al., 2002; Morales et al., 1992).

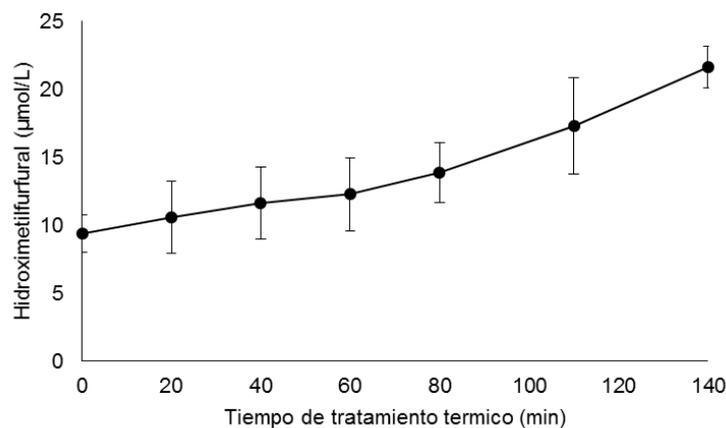


Figura 5.1.1. Formación del hidroximetilfurfural en leche reconstituida desnatada a 80 °C

La temperatura, el pH, la humedad y el tiempo de tratamiento térmico son factores que afectan con el desarrollo del HMF. Este último factor determinó el aumento de su concentración en el tratamiento térmico a 80 °C (Tabla 5.1.1). En un estudio similar en leche de cabra Guneser et al. (2013) reportaron que, en el minuto 40 y 80 a 85 °C la concentración se incrementó hasta ~25 y ~50% del HMF respectivamente. Estos últimos resultados solo fueron ligeramente superiores a los nuestros, una diferencia de 5 °C en la temperatura de tratamiento térmico debería de haber tenido un efecto mayor en la variación del contenido en HMF. Sin embargo, esto puede explicarse por la diferencia composición de la leche, según Claeys et al. (2003) observaron un efecto negativo del contenido de grasa en la leche en la formación del HMF, ya la grasa que cumpliría una función protectora o amortiguamiento de calor.

Tabla 5.1.1. Efecto del tratamiento térmico a 80 °C sobre la formación del hidroximetilfurfural en leche desnatada reconstituida.

	Tiempo (min)						
	0	20	40	60	80	110	140
HMF (µmol/L)	9,37±1,3	10,57±2,6	11,66±2,6	12,29±2,7	13,88±2,2	17,30±3,5	21,62±1,5
Formación (%)	0	12,85	24,45	31,16	48,1	84,61	130,63

HMF, hidroximetilfurfural

En la Tabla 5.1.2 se observan los coeficientes de determinación y las constantes de velocidades de la reacción de formación del HMF a 80 °C, calculadas en base a diferentes modelos cinéticos: orden pseudo cero, uno y dos. En los tres modelos cinéticos se obtuvieron valores de $R^2 > 0,9$. El mayor valor de R^2 sugiere que, la generación de HMF siguió una cinética de primer orden. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Singh et al. (2009) afirman que la formación del HMF en leche UHT siguió una reacción cinética de primer orden en un rango de temperatura de 9-45 °C. Otros investigadores han ajustado sus resultados a modelos de orden pseudo-cero (Claeys et al., 2003, 2001; Güneşer et al., 2013) durante tratamientos térmicos en leche.

Ibarz et al. (1997) al estudiar el efecto del tratamiento térmico a niveles de (70, 80 y 90 °C) sobre zumos de pera concluyeron que la cinética de formación del HMF es de primer orden. Sin embargo, Garza et al. (1996) indican que en zumo de manzana resulta difícil aseverar la cinética de formación del HMF entre el cero y primer orden.

Tabla 5.1.2. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas para la formación de hidroximetilfurfural durante el tratamiento térmico en leche, estudiadas a 80 °C.

ECUACIONES	R ²	k (min ⁻¹)
Orden 0: [HMF]= [HMF] ₀ + kt	0,9423	0,0839
Orden 1: ln[HMF]= ln[HMF] ₀ + kt	0,9962	0,0058
Orden 2: 1/[HMF]= 1/[HMF] ₀ + kt	0,9866	-0,0004

N=14; número de réplicas, N_r=2; R², coeficiente de determinación; k, constante cinética; HMF, hidroximetilfurfural; t, tiempo (min).

De acuerdo con Singh y Patil (1989), las reacciones de formación de compuestos como el HMF son bastante complejas al depender de una variedad de etapas de conversión química que generalmente complican el esclarecimiento del orden de reacción. Además, la escasa formación de HMF, como consecuencia de evaluación de temperaturas moderadas o de tiempos de tratamiento relativamente cortos, puede llevar a que el orden uno pueda evaluarse como de pseudo-cero o vicerversa.

5.1.2 Grupos sulfhidrilo (-SH)

Las proteínas del suero como las caseínas contienen en su estructura residuos de cisteína, excepto la α_{s1}-caseína (UniProt Consortium, 2015). Estas pueden formar enlaces de puentes disulfuro. Estos puentes se forman cuando interaccionan dos moléculas de cisteína dando lugar a un proceso de agregación. La β-LG es el más importante portador de -SH en la leche y contienen dos -S-S- (puente disulfuro) y un grupo -SH en la posición cisteína 121, encontrándose este último en el interior de la estructura proteína nativa (Croguennec et al., 2004). Dicha proteína juega un papel clave durante el tratamiento térmico de la leche, ya que está implicada en el proceso de desnaturalización y la agregación a través de intercambio de disulfuro, y en la formación de enlaces disulfuro entre una de sus subunidades y la κ-caseína (Cosio et al., 2000).

En la Figura 5.1.2 se aprecia el efecto del tiempo de tratamiento térmico sobre la desaparición de los -SH totales en la leche desnatada. La cantidad encontrada en leche no tratada térmicamente fue ~0,98 μmol/g sobre sólidos totales no grasos. Este valor se encuentra dentro del rango de 0,72 – 2,21 μmol/g en leche desnatada cruda (Guingamp et al., 1993, 1999). También concuerdan nuestros resultados con lo obtenido por Patrick y Swaisgood (1976), que encontraron 1,0 a 1,3 μmol/g y

Beveridge et al. (1974) con 1,33 $\mu\text{mol/g}$ para leche en polvo reconstituida. Recientemente, Rocha (2013), encontró 0,75 $\mu\text{mol/g}$ en el mismo alimento, siendo este último valor ligeramente menor a lo nuestro.

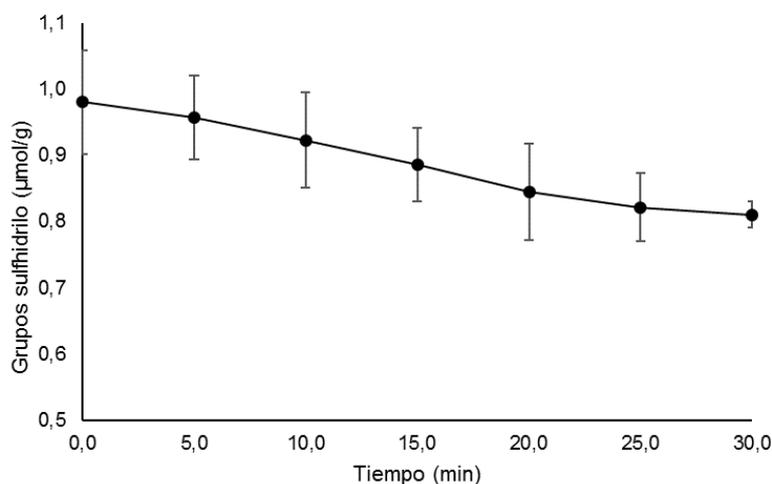


Figura 5.1.2. Desaparición de los grupos sulfhidrilo en leche reconstituida desnatada a 80 °C.

Como se observa en la Tabla 5.1.3, la concentración de los $-\text{SH}$ totales disminuye a medida que se alarga el tiempo de tiempo de tratamiento térmico. El porcentaje de pérdida de $-\text{SH}$ totales a 15 y 30 min fue 9,61 y 17,29% respectivamente. Este último valor de pérdida de $-\text{SH}$ total es similar al 17,5% obtenido por Sava et al. (2005) tras someter a la leche a 82,5 °C, durante 45 min. La disminución en el contenido total de $-\text{SH}$ se atribuye a la oxidación de grupos sulfhidrilo expuestos durante la desnaturalización de las $\beta\text{-LG}$, así como, en reacciones de intercambio intermoleculares (Owusu-Apenten, 2005).de los $-\text{SH}$ totales disminuye a medida que se alarga el tiempo de tiempo de tratamiento térmico. El porcentaje de pérdida de $-\text{SH}$ totales a 15 y 30 min fue 9,61 y 17,29% respectivamente. Este último valor de perdida de $-\text{SH}$ total es similar al 17,5%, a lo obtenido por Sava et al. (2005) tras someter a la leche a 82,5 °C, durante 45 min. La disminución en el contenido total de $-\text{SH}$ se atribuye a la oxidación de grupos sulfhidrilo expuestos durante la desnaturalización de las $\beta\text{-LG}$, así como, en reacciones de intercambio intermoleculares (Owusu-Apenten, 2005).

Tabla 5.1.3. Efecto del tiempo de tratamiento térmico a 80 °C sobre la desaparición de los grupos sulfhidrilo en leche desnatada reconstituida.

	Tiempo (min)						
	0	5	10	15	20	25	30
-SH(μmol/g)	0,98±0,08	0,95±0,06	0,92±0,07	0,88±0,05	0,84±0,07	0,82±0,05	0,81±0,02
Pérdida (%)	0	2,31	5,88	9,61	13,79	16,16	17,29

- SH, grupos sulfhidrilo

En la **Tabla 5.1.4.** Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas para la desaparición de grupos sulfhidrilo (-SH) durante el tratamiento térmico. Tabla 5.1.4 se muestran los coeficientes de determinación y las constantes de velocidad de reacción de la degradación de los -SH totales a 80 °C obtenidos mediante diferentes modelos cinéticos de orden: cero, uno y dos. En los tres modelos cinéticos se obtuvieron valores de $R^2 > 0,98$, lo que indica que la reacción de desaparición de grupos -SH se ajustaría razonablemente a los tres tipos de cinética evaluada. Sava et al. (2005) encontraron que la disminución del contenido de los grupos -SH totales se ajusta a un modelo de primer orden. Este antecedente concuerda con nuestros resultados, dado que la cinética de primer orden presenta un valor de R^2 ligeramente mayor al resto de modelos cinéticos estudiados.

Tabla 5.1.4. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas para la desaparición de grupos sulfhidrilo (-SH) durante el tratamiento térmico.

ECUACIONES	R^2	k (min ⁻¹)
Orden 0: $[-SH] = [-SH]_0 + kt$	0,9823	-0,0061
Orden 1: $\ln[-SH] = \ln[-SH]_0 + kt$	0,9827	-0,0068
Orden 2: $1/[-SH] = 1/[-SH]_0 + kt$	0,9821	0,0076

N=14; número de réplicas, N=2; R^2 , coeficiente de determinación; k, constante cinética; -SH, grupos sulfhidrilos; t, tiempo (min).

5.1.3 Ácido ascórbico (AA)

El AA ascórbico es una de vitaminas hidrosolubles más termolábiles. Por ello, a pesar de que la leche no es una fuente principal de esta vitamina, podría ser aprovechado como un marcador potencial de daño térmico de la leche durante su procesado.

En la Tabla 5.1.5 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA), donde se aprecia el efecto significativo de los factores de tiempo (t), temperatura (T), y la interacción entre ellas (t x T) sobre la degradación del AA. Tal como se

esperaba, las réplicas (REP) no influyeron en los resultados medidos de la degradación del AA, durante el tratamiento térmico.

Tabla 5.1.5. Análisis de varianza de los factores de estudio sobre la degradación del ácido ascórbico.

Fuente	GL	F-valor	p>F
Tiempo (t)	8	1674	<0,0001
Temperatura (T)	2	164	<0,0001
t x T	16	3,77	0,0001
Replica (REP)	2	0,81	0,45

GL, grados de libertad.

No se observó una diferencia significativa en el efecto del tratamiento térmico entre 70 y 80 °C sobre el contenido de AA ($p=0,53$). El aumento de temperatura a 90 °C sí que causó una disminución significativa ($p<0,0001$) en el contenido del AA respecto al efecto de los tratamientos a 70 y 80 °C (Figura 5.1.3).

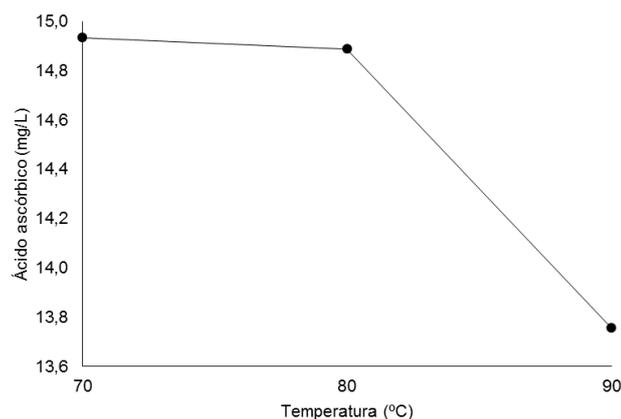


Figura 5.1.3. Efecto de la temperatura respecto a la concentración del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico

En la Tabla 5.1.6 se aprecian los efectos de la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico sobre la concentración del AA en leche reconstituida. La cantidad encontrada de AA en leche no tratada térmicamente es 19,50 mg/L, valor que se encuentra en el rango de concentraciones reportadas por otros autores (Esteire et al., 2014; Fox et al., 2015; Nalame et al., 2009). Su concentración depende de las condiciones biológicas (raza, alimentación, etc.) y, posiblemente, de la estación del año, siendo aparentemente más alta en invierno (Tamime, 2009).

La pérdida del AA incrementa con el aumento de la temperatura. Así mismo, la disminución de la concentración es significativamente dependiente del tiempo de tratamiento térmico en todas las temperaturas ensayadas (Tabla 5.1.6)

Tabla 5.1.6. Efecto del tratamiento térmico sobre la degradación del ácido ascórbico.

Tiempo (min)	70 °C		80 °C		90 °C	
	mg/L	% Pérdida	mg/L	% Pérdida	mg/L	% Pérdida
0	19,50 ± 0,11 ^a	0,00	19,50 ± 0,11 ^a	0,00	19,50 ± 0,11 ^a	0,00
5	18,49 ± 0,18 ^b	5,21	18,17 ± 0,26 ^b	6,83	17,05 ± 0,25 ^b	12,57
10	17,49 ± 0,19 ^c	10,30	17,35 ± 0,19 ^c	11,05	16,24 ± 0,37 ^c	16,75
15	16,49 ± 0,50 ^d	15,46	16,70 ± 0,07 ^d	14,40	15,32 ± 0,40 ^d	21,47
20	15,66 ± 0,49 ^e	19,68	15,72 ± 0,08 ^e	19,39	14,27 ± 0,27 ^e	26,81
25	14,37 ± 0,14 ^f	26,34	14,23 ± 0,19 ^f	27,06	13,01 ± 0,20 ^f	33,31
30	13,15 ± 0,16 ^g	32,57	13,11 ± 0,26 ^g	32,79	11,27 ± 0,11 ^g	42,21
45	10,78 ± 0,28 ^h	44,71	10,96 ± 0,32 ^h	43,81	9,99 ± 0,49 ^h	48,77
60	8,460 ± 0,23 ⁱ	56,62	8,250 ± 0,11 ⁱ	57,70	7,160 ± 0,35 ⁱ	63,27

N=27; número de réplicas, N_r=3; ^{a-i}, medidas con la misma letra dentro de una columna no son significativamente diferentes.

Tal como se mencionó, el AA es bastante termolábil y es rápidamente destruido cuando la leche es sometida a tratamiento térmico. Nuestros resultados confirman su termolabilidad. Meha (1994) observó valores de destrucción de 26 y 36% para tratamientos de 30 min a 80 y 90 °C respectivamente. Damjanovic y Birlouez-Aragon (2011) hallaron pérdidas de hasta ~23% debidas a tratamientos a 80 °C durante 9,5 min en alimentos infantiles, siendo por tanto ligeramente mayores a nuestros resultados. En otras investigaciones, la reducción fue aún mayor que en nuestros resultados. Por ejemplo, Bendicho et al. (2002) encontraron pérdidas de hasta ~50% en tratamiento de 30 min a 63 °C en leche desnatada, mientras que (Haddad y Loewenstein (1983) hallaron ~21% tras tratar la leche a 80 °C durante 16 s. Se ha demostrado que la temperatura y la matriz son factores importantes que afectan a la estabilidad del AA (Stešková et al., 2006).

Así mismo, en la Figura 5.1.4 se puede observar el efecto del tiempo sobre la pérdida del AA durante el tratamiento térmico. Según las medias de mínimos cuadrados (LSM) el efecto tiempo en la disminución del AA resultó ser significativo (p<0,0001).

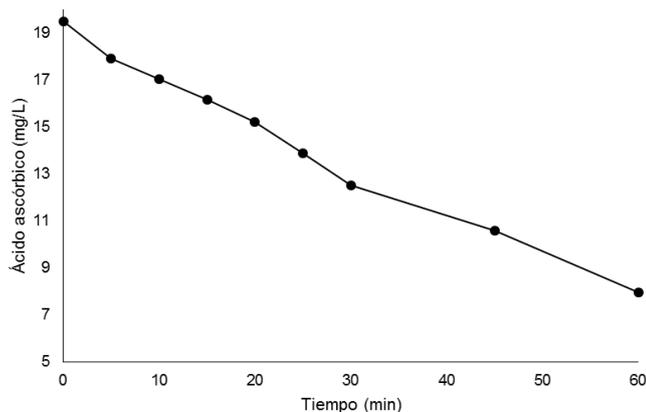


Figura 5.1.4. Efecto del tiempo respecto a la concentración del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico.

En la Tabla 5.1.7 se muestran los coeficientes de determinación y la velocidad de reacción cinética de la degradación del AA a diferentes temperaturas (70, 80 y 90 °C), siguiendo modelos de orden cero, uno y dos. En los tres modelos cinéticos se obtuvieron valores de $R^2 > 0,9$, pero el mayor valor de R^2 observado a 70 y 90 °C corresponde al primer orden, mientras a 80 °C existe una ligera diferencia a favor del orden cero. Por lo tanto, nuestros datos parecen sugerir que la desaparición del AA sigue una cinética de primer orden. Estudios previos confirman dicho orden de reacción. Por ejemplo, Bihel & Birlouez-Aragon (1998) en alimento fortificado con minerales y AA indican cinética de primer orden; Bendicho et al. (2002) en leche y Stešková et al. (2006) en una compilación de varios trabajos en alimentos fortificados confirman una degradación cinética de primer orden. También, diversos autores reafirman un comportamiento similar en zumo de frutas (Rojas y Gerschenson, 2001), zumo de naranja (Vikram et al., 2005), alimento a base de fruta para bebés-Beikost (Bosch et al., 2013). Finalmente, también Lee y Labuza (1975) demostraron que la degradación del AA a las temperaturas usuales de la industria, a partir de 60 °C, es de primer orden, por lo que ésta se seleccionó para calcular los parámetros cinéticos de degradación del AA.

Tabla 5.1.7. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas de desaparición del ácido ascórbico durante el tratamiento térmico.

ECUACIONES	70 °C		80 °C		90 °C	
	R ²	k _t	R ²	k _t	R ²	k _t
ORDEN 0: [AA]= [AA] ₀ + kt	0,989	-0,187	0,992	-0,187	0,964	-0,194
ORDEN 1: ln[AA]= ln[AA] ₀ + kt	0,990	-0,014	0,986	-0,014	0,980	-0,016
ORDEN 2: 1/[AA]= 1/[AA] ₀ + kt	0,962	0,001	0,951	0,001	0,947	0,001

N=27; número de réplicas, N_r=3; R², coeficiente de determinación; k_t (min⁻¹), velocidad de reacción; AA, ácido ascórbico; t, tiempo.

En la Tabla 5.1.8 se pueden apreciar los parámetros cinéticos de primer orden de la degradación del AA en la leche. La constante de velocidad de reacción a 90 °C fue 0,016 min⁻¹. Este valor concuerda con lo observado por Karhan et al. (2004) y es ligeramente menor a lo reportado por Bendicho et al. (2002) que encontró 0,08 min⁻¹. El tiempo de vida media también se encuentra dentro del rango de estudios previos. Karhan et al. (2004) encontraron en rosa canina, un alimento del que se aprovechan sus frutos, que el t_{0,5} es igual a 91 min, Mendoza-Corvis et al. (2015) observaron un valor t_{0,5} de ~20 min en pulpa de mango, tratada a 70 °C. Ordóñez et al., (2013) encontraron un bajo tiempo de vida media resultando ser ~1 min a 70 °C en frutos de guayaba. Esté mismo autor encontró en pulpa de mango tratada a 70 °C un valor de 49 min (Ordóñez y Yoshioka, 2012), siendo este último valor más aproximado a nuestros resultados. Igualmente, el tiempo de reducción decimal (D_T) está dentro de los rangos obtenidos en trabajo previos. Vieira et al. (2000) reportó un rango de 770 a 24100 min en frutas tratadas a 75 °C. El valor Z resultó ser mayor que en los datos bibliográficos; p.ej., en frutos de guayaba ~77 °C (Ordóñez et al., 2013), 66 °C en pulpa de mango (Ordóñez y Yoshioka, 2012). El valor Q₁₀ encontrado resultó ser ligeramente menor respecto a otras investigaciones. Por ej.: Ordóñez et al. (2013) 1,35 en frutos de guayaba, Ordóñez y Yoshioka (2012) 1,4 en pulpa de mango, Karhan et al. (2004) 1,2 en pulpa de rosa canina.

Tabla 5.1.8. Parámetros cinéticos del ácido ascórbico en la leche de primer orden.

T °C	k _T (min ⁻¹)	D _T (min)	t _{0,5} (min)	Q ₁₀	Z (°C)	E _a (kJ/mol)
70	-0,0140	164,29	49,46			
80	-0,0141	163,13	49,11	1,06	369,19	6,4
90	-0,0159	145,03	43,66			

k_T , velocidad de reacción; D_T , tiempo de reducción decimal; $t_{0,5}$, tiempo de vida media; Q_{10} , coeficiente térmico; E_a , la energía de activación; Z , valor Z .

En la Figura 5.1.5 se exhibe la correlación entre $\ln k$ y T^{-1} en la leche, asumiendo un modelo cinético de primer orden, para la degradación del AA con un $R^2 = 0,78$. De la pendiente de esta regresión lineal puede obtenerse la $E_a = R \cdot 770,48$, resultando ser 6,4 kJ/mol. Este valor es menor a lo encontrado por Bendicho et al. (2002) y Damjanovic y Birlouez-Aragon (2011) que reportan valores de 63,66 kJ/mol para leche desnatada y 67,94 kJ/mol para fórmula infantil respectivamente. Sin embargo, Bihel y Birlouez-Aragon (1998) hallaron 9,5 kJ/mol en alimento fortificado con vitamina C y hierro. De hecho, en alimentos líquidos se encontró un amplio rango valores de E_a de 7,54 - 125,6 kJ/mol (Lee y Labuza, 1975), en el que encajan los nuestros.

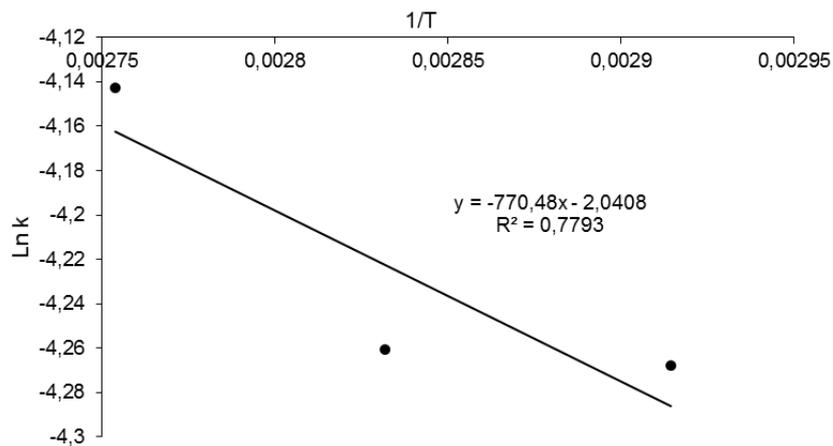


Figura 5.1.5. Efecto de la temperatura (70, 80 y 90 °C) sobre la velocidad de degradación del ácido ascórbico en la leche.

Tras revisar diversos trabajos de investigación se confirma que obtienen parámetros diferentes de E_a , inclusive en las mismas frutas (Ordóñez y Yoshioka, 2012; Ordóñez et al., 2013). Estas diferencias registradas pueden ser consecuencia de la composición química de los alimentos incluidas diferencias en el contenido de la humedad, temperaturas empleadas, y la matriz biológica (Mendoza-Corvis et al., 2015).

Sustituyendo la ecuación de Arrhenius en la ecuación cinética del orden uno interesada, obtendríamos una ecuación general para predecir la concentración de AA a un tiempo dado y a una temperatura de tratamiento térmico determinada.

La ecuación quedaría de la siguiente manera: $[AA] = [AA]_0 \times e^{\left(0,13 \times t \times e^{\frac{-770,48}{T}}\right)}$,

donde AA, concentración final (mg·L⁻¹); AA₀, concentración inicial (mg·L⁻¹); t, tiempo (min); T, temperatura (K); el valor 0,13, es el factor preexponencial A₀ que viene dada del intercepto de la regresión lineal. Este último valor se encuentra en un rango amplio de 5,03x10⁻⁸ (p<95%) y 335689 (p>95%).

En la Figura 5.1.6 se muestra la regresión entre los valores experimentales y los valores estimados por el modelo cinético obtenido, que arrojo un valor de R² = 0,967, SEP = 0,75 mg/L y CV = 5,18%, que confirma la idoneidad del modelo matemático obtenido para la predicción de la concentración del AA dentro del rango de temperaturas y tiempos estudiado.

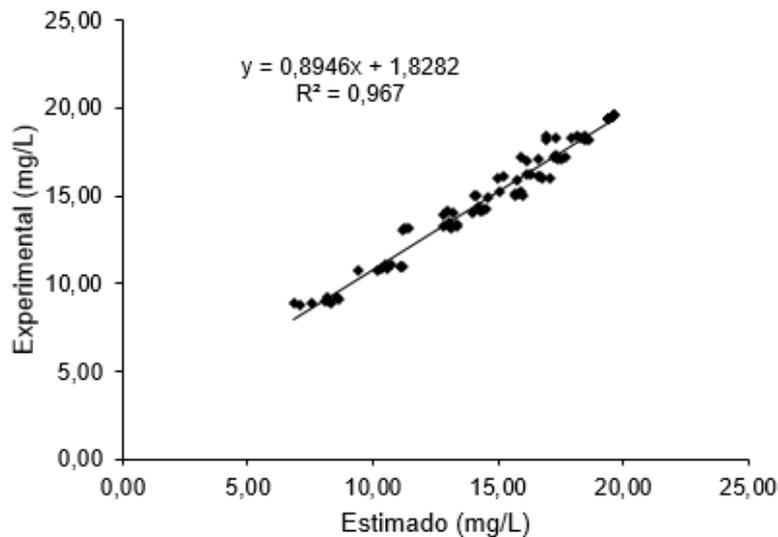


Figura 5.1.6. Valores observados respecto a estimados del ácido ascórbico según modelo cinético de orden uno.

De los resultados obtenidos se confirma que el AA es muy sensible al procesado. En especial, es lábil al calentamiento, se oxida fácilmente en presencia de oxígeno y la velocidad de oxidación aumenta cuando se eleva la temperatura. Nuestros resultados concuerdan con los valores de literatura, que fueron estudiados no sólo durante el tratamiento térmico, sino también, durante el almacenamiento. Nótese que Sun et al. (2012) describen el AA como un indicador trascendental para evaluar el daño térmico en la industria láctea, considerándolo como un marcador para retención de nutrientes.

5.1.4 Riboflavina (Rbf)

Tal como ocurrió con el AA, los factores estudiados tales como el tiempo, la temperatura y la interacción (t x T), resultaron ser efectos significativos ($p < 0,0001$), mientras el efecto de la réplica no fue significativa (Tabla 5.1.9).

Tabla 5.1.9. Análisis de varianza de los factores experimentales sobre la degradación de la riboflavina

Fuente	GL	F-valor	p>F
Tiempo (t)	8	51,29	<0,0001
Temperatura (T)	2	100,67	<0,0001
t x T	16	6,36	<0,0001
Replica (REP)	2	0,87	0,42

GL, grados de libertad; p, probabilidad.

La Figura 5.1.7 deriva de la tabla anterior, a partir de las medias de mínimos cuadrados (LSM). Durante el tratamiento térmico, la temperatura es una variable altamente significativa ($P < 0,0001$).

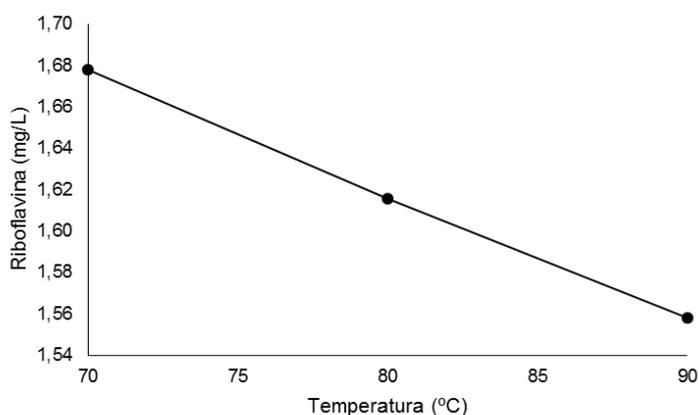


Figura 5.1.7. Efecto de la temperatura respecto a la disminución de la concentración de la riboflavina durante el tratamiento térmico.

La Figura 5.1.8 también deriva del análisis de varianza de la Tabla 5.1.9. se puede observar el efecto del tiempo sobre la pérdida de Rbf durante el tratamiento térmico, que resultó ser significativo ($P < 0,0001$).

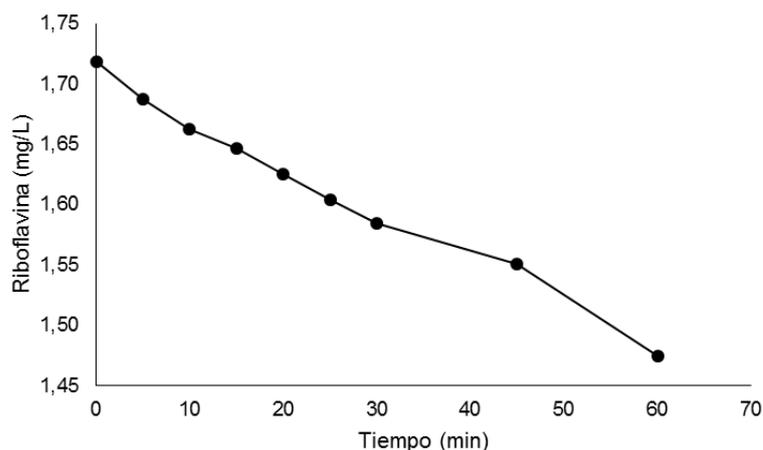


Figura 5.1.8. Efecto del tiempo respecto a la disminución de la concentración de la riboflavina durante el tratamiento térmico.

En la Tabla 5.1.10 se dan a conocer los efectos de la temperatura y tiempo sobre la concentración de Rbf en leche durante el tratamiento térmico. En leche no tratada térmicamente se encontró una concentración de 1,72 mg/L de Rbf. Numerosos estudios revelan que nuestros resultados se hallan entre los valores encontrados por diversos estudios: desde 0,60 mg/L (Hand y Sharp, 1939) hasta 1,74 mg/L (Poulsen et al., 2015). Las variaciones en su concentración son principalmente debidas a la raza y/o biotipos (p. ej., la leche de vacas Jersey y Guernsey contienen más riboflavina que las vacas Holstein), a su alimentación y a efectos climáticos -la leche producida en verano contiene niveles ligeramente más altos que en invierno (Fox et al., 2015).

Meha (1994) encontró disminuciones de 2 y 4% de Rbf durante tratamientos térmicos por 30 min a 80 y 90 °C respectivamente en leche, valores que son inferiores a nuestros resultados. Esta diferencia podría corresponder a que la Rbf se destruye en menor medida en leches con alto contenido en grasas que en leche descremada (Fox et al., 2015). Saad (1980), citado por (Meha, 1994), encontró una pérdida del 12% de Rbf como consecuencia de una pasteurización baja (63 °C, 30 min). Dicha pérdida, sólo es observada a 90 °C durante 30 min en el presente trabajo.

Tabla 5.1.10. Efecto del tratamiento térmico sobre la pérdida de la riboflavina.

Tiempo (min)	70 °C		80 °C		90 °C	
	mg/L	% Pérdida	mg/L	% Pérdida	mg/L	% Pérdida
0	1,72 ± 0,02 ^a	0,00	1,72 ± 0,02 ^a	0,00	1,72 ± 0,02 ^a	0,00
5	1,71 ± 0,01 ^{ab}	0,47	1,69 ± 0,02 ^{ab}	1,82	1,67 ± 0,03 ^{ab}	2,99
10	1,70 ± 0,02 ^{abc}	1,15	1,65 ± 0,02 ^{bc}	3,94	1,64 ± 0,02 ^b	4,56
15	1,68 ± 0,02 ^{bcd}	1,86	1,65 ± 0,03 ^{bc}	3,79	1,6 ± 0,04 ^{cb}	6,78
20	1,68 ± 0,01 ^{bcd}	2,16	1,65 ± 0,01 ^{bc}	4,01	1,55 ± 0,04 ^{cd}	10,04
25	1,67 ± 0,03 ^{cde}	3,12	1,61 ± 0,04 ^{cd}	6,51	1,54 ± 0,04 ^{cd}	10,34
30	1,67 ± 0,01 ^{de}	2,79	1,58 ± 0,02 ^d	7,82	1,50 ± 0,04 ^d	12,67
45	1,65 ± 0,01 ^{ef}	3,98	1,52 ± 0,06 ^e	11,34	1,48 ± 0,06 ^d	13,88
60	1,63 ± 0,01 ^f	5,43	1,47 ± 0,04 ^e	14,47	1,33 ± 0,05 ^e	22,55

N=27; número de réplicas, N_r=3; ^{a-f}, medias con la misma letra no son significativamente diferentes en la misma columna.

En la Tabla 5.1.11 se comparan diferentes ecuaciones cinéticas de desaparición de la Rbf durante el tratamiento térmico. El modelo cinético de primer orden es el que mejor explica los resultados de disminución de la concentración de la Rbf. Si bien, es cierto que a 70 °C se ajustan ligeramente mejor a un modelo de orden cero, dicha diferencia podría deberse a que, cuando los cambios sufridos en la concentración de analito durante el estudio son muy reducidos es difícil estimar con certeza el orden de reacción. Varias investigaciones encontraron que la desaparición de la RBF responde a una cinética de primer orden en leche de soja (Kwok et al., 1998), soja verde entera (Nisha et al., 2005a) o espinaca (Nisha et al., 2005b).

Tabla 5.1.11. Comparación de diferentes ecuaciones cinéticas de desaparición de riboflavina durante el tratamiento térmico en leche desnatada.

ECUACIONES	70 °C		80 °C		90 °C	
	R ²	k _T	R ²	k _T	R ²	k _T
ORDEN 0: [Rbf]= [Rbf] ₀ + kt	0,969	-0,0015	0,971	-0,0042	0,973	-0,0062
ORDEN 1: ln[Rbf]= ln[Rbf] ₀ + kt	0,965	-0,0009	0,983	-0,0027	0,983	-0,0041
ORDEN 2: 1/[Rbf]= 1/[Rbf] ₀ + kt	0,965	0,0005	0,959	0,0017	0,956	0,0027

N=27; número de réplicas, N_r=3; R², coeficiente de determinación; k_T (min⁻¹), constante cinética; RBF (mg/L), riboflavina; t (min), tiempo.

En la Tabla 5.1.12 se aprecian los parámetros cinéticos estimados asumiendo una cinética de destrucción de primer orden para la Rbf en la leche. Como era de esperar, los valores de las constantes de reacción variaron notablemente con la

temperatura del tratamiento térmico, aumentando el valor de la constante al aumentar la temperatura de tratamiento, a pesar de que la riboflavina es considerada la vitamina más estable al calor entre las vitaminas hidrosolubles (Walstra et al., 2006). En soja verde, tiempo de reducción decimal y vida media a 90 °C fueron 3268 min y 122 min respectivamente (Nisha et al., 2005a); el primer valor es mayor y el segundo menor en relación a nuestros resultados. El valor de Z es ligeramente menor a lo encontrado por Kwok et al. (1998) que obtuvieron 36 °C en leche de soja.

Tabla 5.1.12. Parámetros cinéticos para el modelo de primer orden de la riboflavina en la leche desnatada.

T °C	k_T (min ⁻¹)	D_T (min)	$T_{0,5}$ (min)	Q_{10}	Z (°C)	E_a (kJ/mol)
70	-0,0009	2560,79	770,87			
80	-0,0027	864,84	260,34	2,13	30,41	75,84
90	-0,0041	563,11	169,51			

k_T , constante cinética; D_T , tiempo de reducción decimal; $t_{0,5}$, tiempo de vida media; Q_{10} , coeficiente térmico; E_a , la energía de activación; Z, valor Z.

En la Figura 5.1.9 se representa la ecuación de Arrhenius para la degradación de la Rbf en la leche en base a un modelo cinético de primer orden con un $R^2 = \sim 0,95$. Se determinó que la energía mínima requerida para que inicie la degradación térmica de Rbf es 75,84 kJ/mol. Este valor es mayor que en leche entera ($\sim 27,5$ kJ/mol) estudiada durante el almacenamiento (Singh et al., 1975), y muy próximo a 83,3 kJ/mol reportado en leche de soja (Kwok et al., 1998). Así mismo, Galdi et al. (1989) encontraron un amplio rango de valores de 33,43 a 113 kJ/mol en leche infantil, almacenada a 20 - 25 °C durante meses.

Son escasos los autores que han abordado el estudio cinético de la degradación de Rbf en leche durante el tratamiento térmico. Sin embargo, en otros alimentos se ha documentado una variación considerable en los parámetros cinéticos de este compuesto. Por ejemplo, la E_a en espinaca fue 21,72 kJ/mol (Nisha et al., 2005b), en soja verde 29,82 kJ/mol (Nisha et al., 2005a) y en macarrones 11,00 kJ/mol (Ayranci y Kaya, 1993). Estas diferencias registradas pueden ser consecuencia de los rangos de temperatura, la matriz biológica, composición química de los alimentos, el pH y la presencia de luz durante el proceso de producción (Saidi y Warthesen, 1995).

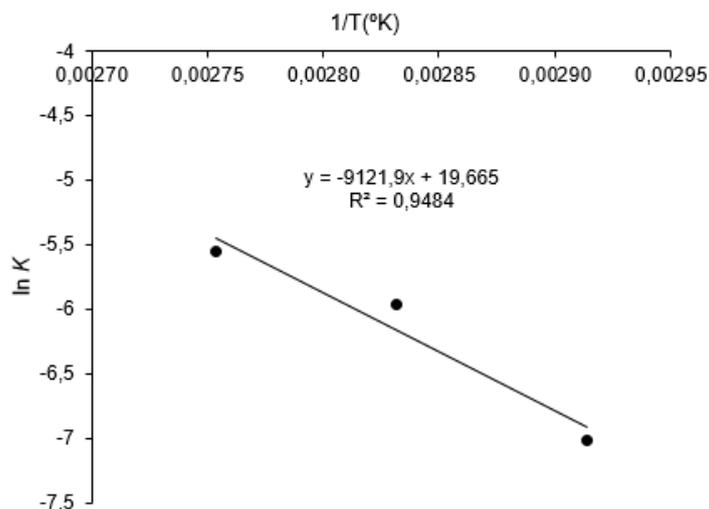


Figura 5.1.9. Efecto de la temperatura (70, 80 y 90 °C) sobre la velocidad de degradación de la riboflavina en la leche desnatada en base a un modelo cinético de orden uno.

Al igual que para el AA, se puede representar la ecuación correspondiente a una cinética del orden uno para predecir la concentración de Rbf en función del tiempo y a una temperatura de tratamiento térmico determinada:

$$[Rbf]_t = [Rbf]_0 \times e^{\left(3,47 \times 10^8 \times t \times e^{\frac{-9121}{T}}\right)},$$

donde: $[Rbf]_t$, concentración final a tiempo t (mgL^{-1}); $[Rbf]_0$, concentración inicial (mgL^{-1}); t , tiempo (min); T , temperatura (K); el valor $3,47 \times 10^8 \text{ min}^{-1}$, es el factor preexponencial (A_0). Este último valor es mayor a lo encontrado en la literatura, Nisha et al. (2005a) encontró en soja verde un valor de 2565 min^{-1} .

En la Figura 5.1.10 se muestran los valores experimentales respecto a valores estimados por el modelo cinético obtenido con un $R^2 = 0,868$. Los índices del SEP y CV son $0,03 \text{ mg/L}$ y $2,26\%$ respectivamente. Dichos resultados confirman que el modelo matemático obtenido para la predicción de la concentración de Rbf con variables de tiempo-temperaturas es aceptable, especialmente a concentraciones de riboflavina más alta.

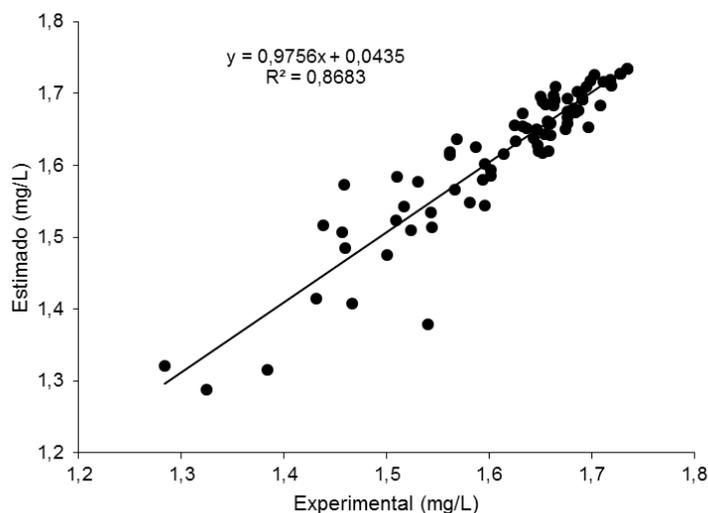


Figura 5.1.10. Valores experimentales respecto a estimados de concentración de riboflavina en leche desnatada.

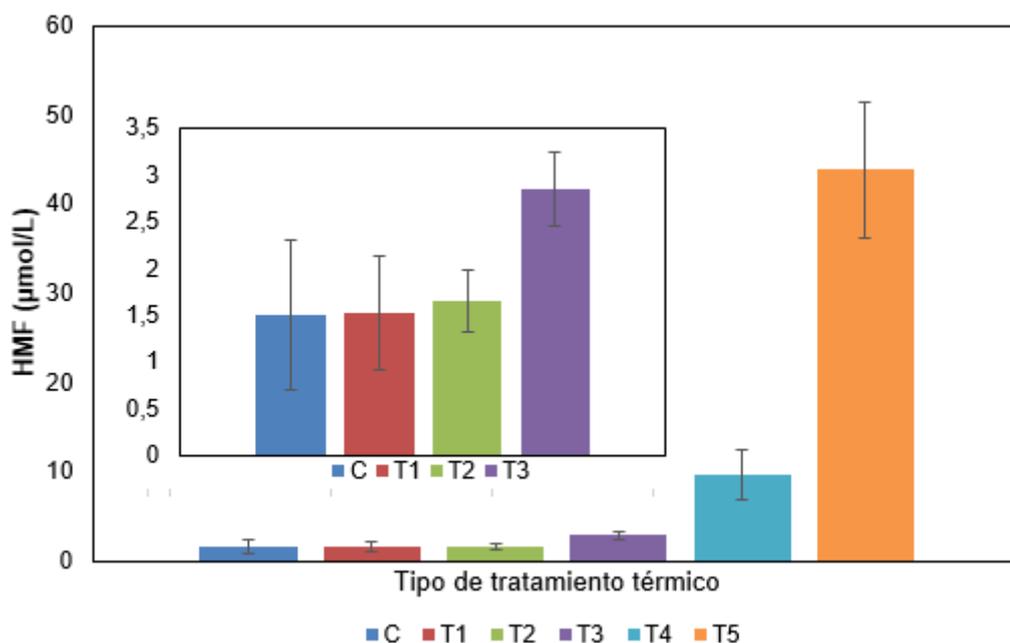
Con los resultados se confirma que la Rbf es termoestable, dado que sólo se degrada en porcentajes pequeños (p. ej. ~22% a 90 °C, durante 60 min). Normalmente en la industria láctea la Rbf ha sido estudiada durante el proceso de almacenamiento en diversos envases en presencia de luz para evaluar su fotodegradación. Sin embargo, los resultados nos indican que también puede ser un marcador potencial para monitorizar el daño térmico durante la aplicación del calor. Los parámetros cinéticos adquiridos podrían ayudar a predecir el daño térmico en la leche y diseñar tratamientos que lo minimicen.

5.2 Análisis de marcadores de daño térmico en leche desnatada tratada en condiciones industriales

Los resultados de los análisis químicos de este apartado corresponden al tercer experimento. En la Tabla 5.2.1 se muestran los resultados promedios de los marcadores de daño térmico evaluados en leche desnatada producidos en condiciones industriales.

Los tratamientos C, T1, T2 y T3 no fueron significativamente diferentes entre sí para HMF. Los tratamientos T4 y T5 fueron significativamente diferentes entre ellos y también con el resto de tratamientos. A partir de los resultados puede establecerse

que el tipo de tratamiento térmico está relacionado con la formación del HMF (Tabla



5.2.1 y

Figura 5.2.1).

Tabla 5.2.1. Promedio de valores de los marcadores de daño térmico evaluados en leche desnatada producidas en condiciones industriales.

Tipo de leche	HMF ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	-SH ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	AA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rbf ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
C (cruda)	1,501 ^a	1,38 ^a	21,77 ^a	1,33 ^a
T1 (65 °C, 15 s)	1,521 ^a	1,26 ^b	20,27 ^b	1,32 ^a
T2 (72 °C, 15 s)	1,652 ^a	1,21 ^b	18,33 ^c	1,30 ^a
T3 (105 °C, 2 s)	2,841 ^a	0,88 ^c	16,58 ^d	1,27 ^a
T4 (138 °C, 4 s)	9,567 ^b	0,65 ^d	15,48 ^d	1,24 ^a
T5 (120 °C, 20 min)	43,85 ^c	0,12 ^e	7,39 ^e	1,04 ^b

N=18; HMF, Hidroximetilfurfural; -SH, Grupos sulfhidrido; AA, Ácido ascórbico; Rbf, Riboflavina; letras distintas en columnas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

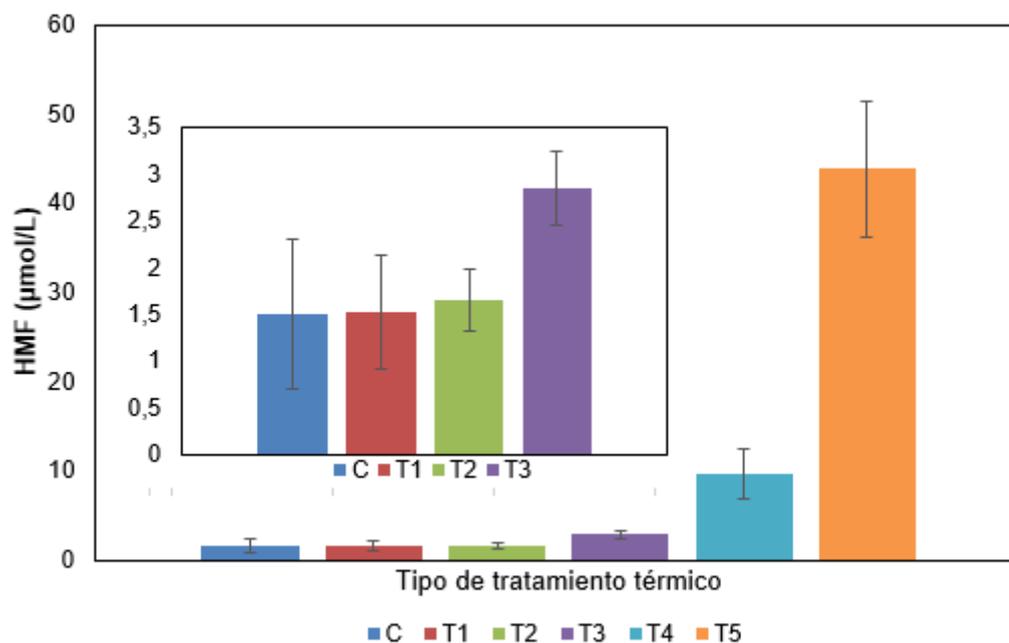


Figura 5.2.1. Contenido de hidroximetilfurfural (HMF) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.

En la Tabla 5.2.2 se resumen las concentraciones del HMF en leche tratada en condiciones industriales recopilada de diversas investigaciones. Nuestros resultados están dentro del rango de los parámetros encontrados.

De acuerdo a nuestros resultados y los datos bibliográficos, el HMF es más útil para distinguir la leche sometida a altas temperaturas tales como la UHT y esterilizada en botella de aquellas con tratamientos más moderados. Pellegrino et al. (1995) afirmaron que el HMF es un indicador potencial de procesos térmicos severos.

Tabla 5.2.2. Concentración del hidroximetilfurfural en diferentes tipos de leche.

Tipo de leche	Condiciones de procesado	[HMF]	Autor
Leche cruda	-	1,0	(Morales y Jiménez-Pérez, 1999)
Leche cruda	-	3,6 - 7,3	(Fink y Kessler, 1986)
Leche cruda	-	0,9 – 1,8	(Morales et al., 1996)
Leche cruda	-	2,7 – 8,7	(Konietzko y Reuter, 1986)
Leche cruda	-	3,3 – 4,3	(Kind y Reuter, 1990)
Leche termizada	65 °C, 10 s	1,5	(Morales y Jiménez-Pérez, 1999)
Leche pasteurizada	85 °C, 30 s	2,5	(Morales y Jiménez-Pérez, 1999)
Leche pasteurizada	-	8,2	(Fink y Kessler, 1986)
Leche UHT	140 °C, 3 s	8,7	(Morales et al., 2000)
Leche UHT	-	10	(Fink y Kessler, 1986)

Leche UHT	-	2	(Konietzko y Reuter, 1986)
Leche esterilizada	116 °C, 15 min	22	(Morales et al., 2000)
Leche esterilizada	-	30 - 140	(Fink y Kessler, 1986)
Leche esterilizada	-	12	(Konietzko y Reuter, 1986)
Leche esterilizada	-	17	(Morales et al., 1996)

[HMF] ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); concentración del hidroximetilfurfural.

Las concentraciones de –SH totales en leche desnatada tratada térmicamente en condiciones industriales se muestran en la Tabla 5.2.1 y Figura 5.2.2. Tras el tratamiento térmico ocurre un despliegue de la proteína, producto de la desnaturalización, exponiéndose los grupos –SH activos y generando puentes disulfuro, lo que ocasiona una disminución de –SH total en la leche.

El tratamiento control fue significativamente diferente al resto de tratamientos. Los tratamientos T1 y T2 no fueron significativamente diferentes entre sí, mientras que los tratamientos T3, T4 y T5 fueron significativamente diferentes entre sí y con el resto.

En leche desnatada cruda la concentración de –SH totales fue $\sim 1,38 \mu\text{mol/g}$. Este resultado concuerda con lo obtenido por Guingamp et al. (1993; 1999) que obtuvieron un rango de $0,72 - 2,21 \mu\text{mol/g}$ en leche desnatada cruda. También coincide con los resultados de Patrick y Swaisgood (1976) y Beveridge et al. (1974) que encontraron de $1,0$ a $1,3 \mu\text{mol/g}$ y $1,33 \mu\text{mol/g}$, respectivamente, ambos estudios en leche en polvo desnatada.

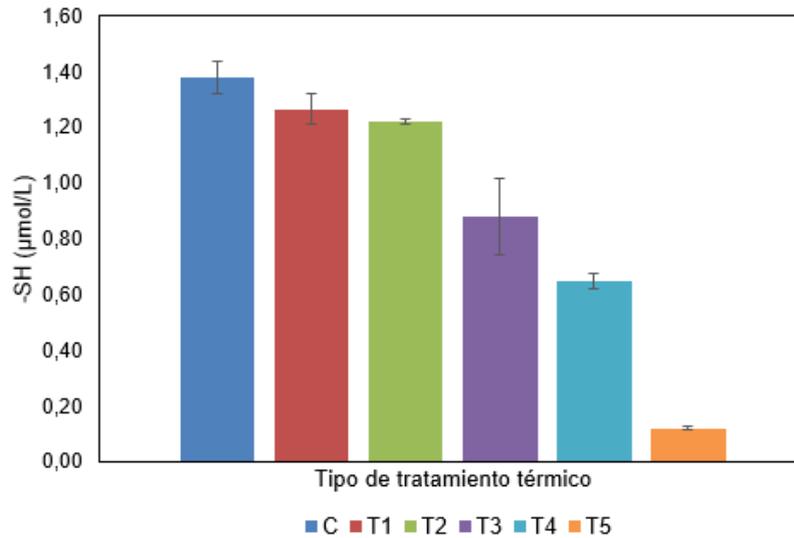


Figura 5.2.2. Gráfico del contenido de grupos sulfhidrido (-SH) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.

El porcentaje de pérdida respecto del control para T1, T2 y T3 fue ~8, ~12 y ~36% respectivamente. Este último valor está dentro de los valores reportados por Cosio et al. (2000) y Guingamp et al. (1993) que obtuvieron reducciones de 22% y 32% respectivamente en leches pasteurizadas comerciales. El tratamiento de leche UHT implicó pérdidas de hasta ~53%, valor que es menor a los reportados por Guingamp et al. (1993) y Cosio et al. (2000) quienes encontraron pérdidas de hasta 66 y 72% respectivamente en leches comerciales UHT. La leche esterilizada en botella sufrió una pérdida de ~91%, valor que es mayor a los reportados por Taylor y Richardson (1980) que encontraron disminución de hasta 73% en leche desnatada (130 °C, 30 min). Sin embargo, nuestros valores en leche UHT son más aproximados a los observados por Guingamp et al. (1993) y Cosio et al. (2000) que encontraron pérdidas de 83 y ~88% respectivamente en leches esterilizadas comerciales. El uso de distintos sistemas de autoclave puede ser responsable de las variaciones encontradas. En nuestro caso, el autoclave discontinuo estático causó un efecto intenso en las muestras.

Por lo tanto, este marcador (-SH) podría ser una herramienta útil para distinguir la leche sometidas a diversos tratamientos térmicos habituales en la industria láctea.

El contenido de AA en la leche, con una variación de 8,5 a 27,5 mg/L (Walstra et al., 2006) es bajo comparado con otros alimentos como zumo de frutas y algunos

vegetales. Además es considerada la menos estable entre las vitaminas y puede sufrir oxidación, favorecida por la presencia de metales o exposición a la luz y, claramente, por temperaturas elevadas (Walstra et al., 2006).

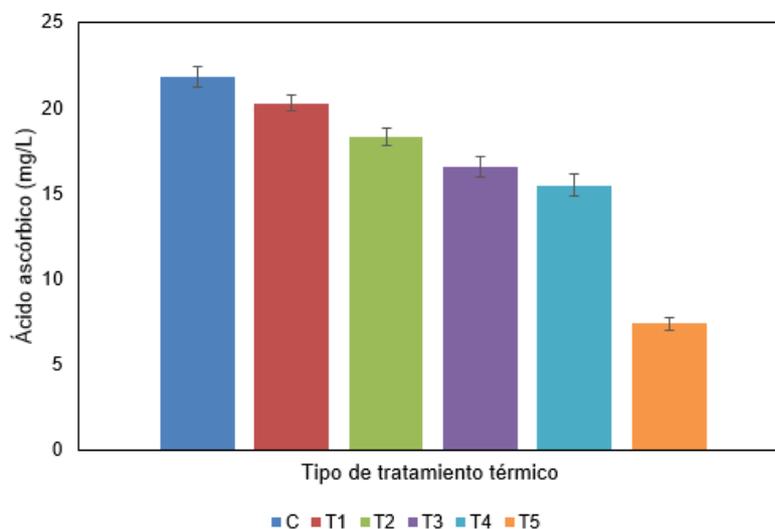


Figura 5.2.3. Gráfico del contenido del ácido ascórbico (AA) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.

El valor de AA en leche cruda desnatada fue de 21,77 mg/L. Este resultado se encuentra dentro del amplio rango mencionado anteriormente (Tabla 5.2.1). Algunos autores han reportado diferencias estacionales en la concentración de AA en la leche. Parece ser más alta en invierno (Fox et al., 2015; Lindmark-Månsson et al., 2003). Además de la estación del año, la raza de la vaca y la etapa de lactancia parecen ser factores importantes que causan la variación en el contenido de vitamina C de la leche fresca (Yasmin et al., 2012).

El porcentaje de pérdida del AA en leche sometida a pasteurización alta (T3) alcanzó hasta un ~24%. Este valor es similar al encontrado por otros autores (Fox et al., 2015; Walstra et al., 2006) que registraron pérdidas de hasta un 25%. En el tratamiento por UHT (método de calentamiento indirecto) causó pérdidas hasta ~29%, valor que concuerda con lo reportado por Walstra y Jenness (1984) y Haddad y Loewenstein (1983) quienes detectan pérdidas de hasta ~30% en ambas investigaciones. En la leche esterilizada en botella se degradó hasta el ~66%, valor que también es equivalente a los reportes de Ryley y Kajda (1994) y Walstra y

Jeness (1984) quienes indican pérdidas mayores al 50%. Estas ligeras diferencias son probablemente debido a las condiciones de tratamiento térmico.

Los resultados del AA contenido en diferentes tipos de leche desnatada son presentados en la Tabla 5.2.1 y la Figura 5.2.3, donde se observa que la concentración de AA es afectada significativamente entre tratamientos, excepto en leche T3 y T4 donde no fue detectada diferencia significativa, lo que confirmaría que este compuesto, además de ser un indicador de retención de nutrientes, tendría la capacidad de discernir los tipos de leche.

La leche y los productos lácteos son una importante fuente dietética de Rbf. Esta vitamina es considerada termoestable, lábil a la luz y oxígeno (Nohr et al., 2011). En la Tabla 5.2.1 y Figura 5.2.4 se muestran los resultados de la concentración de Rbf en leche desnatada tratada térmicamente a varios niveles de intensidad en condiciones industriales. La concentración de Rbf en leche desnatada cruda fue 1,33 mg/L. Este resultado concuerda con lo obtenido por Güneşer y Karagul Yuçeer (2012), Asadullah et al. (2010) y Muñoz et al. (1994) que obtienen valores desde 1,1 a 1,44 mg/L de riboflavina. Sin embargo otros autores han encontrado mayores de 1,7 mg/L Rbf (Nohr et al., 2011; Walstra et al., 2006). Estas diferenciaciones dependen de la dieta, raza y estación, entre otros factores (Fox et al., 2015).

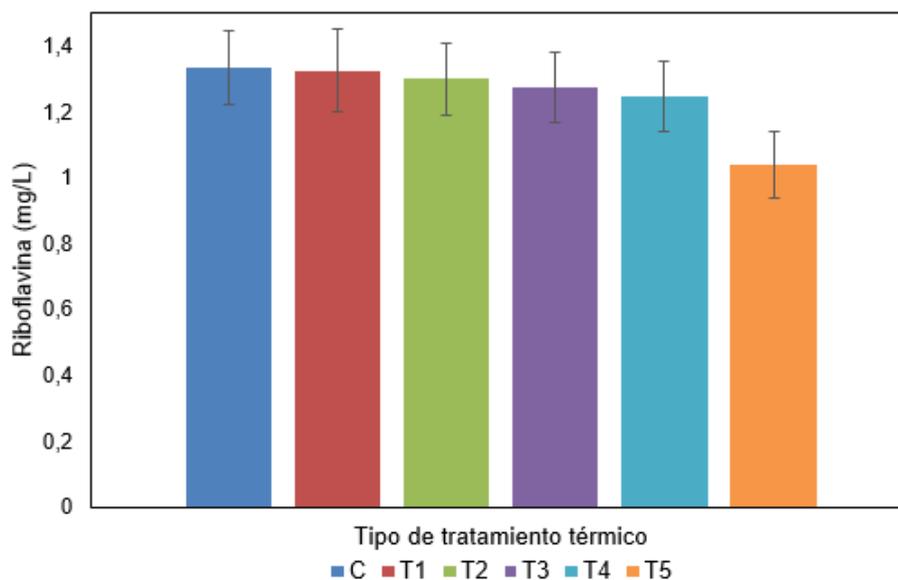


Figura 5.2.4. Gráfico del contenido de riboflavina (Rbf) en leches tratadas en condiciones industriales. C, cruda; T1, termizada; T2, pasteurizada baja; T3, pasteurizada alta; T4, UHT y T5, esterilizada en botella.

El porcentaje de pérdida de Rbf de los tratamientos T1, T2, T3, T4 Y T5 fueron ~0,7, ~3, ~5, ~7, y ~21% respectivamente. Meha (1994) halló una pérdida del 1% a 73 °C, 15 s, muy similar a nuestros resultados. Sunaric et al. (2012) encontraron una pérdida de 7,1% en leche desnatada UHT comercial analizada tras cinco días de almacenamiento a 4 °C, coincidente con nuestro resultado. Nohr et al. (2011) encontraron en leche desnatada esterilizada en botella una pérdida de ~18%, valor que es ligeramente menor respecto a nuestro resultado, pero nuestros resultados como los de Nohr et al. (2011) son mayores a los datos obtenidos por Veisseyre (1988) que muestra pérdidas <10%.

Las concentraciones de Rbf no son significativamente diferentes entre la muestra control respecto al T1, T2, T3 y T4 valores que corroboran Badui (2006) y Fox et al. (2015) quienes, no encontraron diferencia significativa. Estos resultados confirman la estabilidad de la Rbf al calor, no siendo significativamente afectado mediante pasteurización y por procesos de UHT. Sin embargo, la leche esterilizada en botella (T5) presenta una concentración de Rbf significativamente menor respecto al resto de muestras.

5.3 Estudio de los marcadores fluorescentes durante el tratamiento térmico

Como se indicó en la sección de materiales y métodos, los marcadores fluorescentes de la leche desnatada fueron inmediatamente medidos tras someter las muestras a tratamiento térmico.

5.3.1 Fluorescencia del triptófano (F_{Trp})

La F_{Trp} es la fuente dominante de la fluorescencia intrínseca de las proteínas. Los cambios en su intensidad, como resultado de las modificaciones estructurales de las proteínas, permiten estudiar las interacciones entre proteínas y/o entre éstas y otras moléculas, por su alta sensibilidad a los cambios en la polaridad del medio (Ghisaidoobe y Chung, 2014; Li et al., 2015). Los tratamientos térmicos cambian la fluorescencia de las proteínas principalmente a través de las modificaciones causadas en las proteínas séricas. La β -LG es la principal proteína sérica, y contiene 162 residuos de aminoácidos, siendo dos de ellos de Trp. El de la posición 19 (Trp19) está presente en la zona hidrofóbica y el de la posición 61 (Trp61), está en la superficie de la proteína. El Trp61 contribuye con el 20% a la emisión de

fluorescencia del Trp mientras que la emisión de fluorescencia del Trp19 proporciona el 80% de la fluorescencia total de la proteína nativa (Estévez et al., 2017).

En la Figura 5.3.1 se reflejan los espectros de emisión de fluorescencia del Trp en función del tiempo de tratamiento térmico (0 a 60 min) a 70 °C. La leche sin previo tratamiento térmico resultó emitir la fluorescencia máxima del triptófano a ~340 nm. Diez et al. (2008) encontraron la máxima intensidad de F_{Trp} a 340 nm en alimentos infantiles. Liu y Metzger (2007) la observaron a 338 nm en leche en polvo desnatada sin previo tratamiento térmico. Dichos resultados concuerdan con nuestros resultados.

En la Figura 5.3.2 se recogen los comportamientos de la intensidad de F_{Trp} durante el tratamiento térmico a 70 °C. La F_{Trp} resulta prácticamente invariable en el rango de tiempos estudiado. Los resultados concuerdan con lo obtenido por Schamberger y Labuza (2006), quienes encontraron cambios no significativos en la intensidad de F_{Trp} en muestras de leche pasteurizadas a 3 y 15 s entre 70 y 140 °C. Por ello, este mismo autor indica que la medición de la F_{Trp} solamente parece ser útil para distinguir la leche que ha sufrido un tratamiento térmico severo. Dufour y Riaublanc (1997) mencionan que sólo hay un ligero descenso en la intensidad de fluorescencia debido al tratamiento térmico de la leche a 70 °C durante 20 min.

En la Figura 5.3.2 se muestran los cambios de $\lambda_{F_{\text{Trp}}}$ (longitud de onda de la máxima intensidad de fluorescencia del triptófano) durante el tratamiento térmico a 70 °C. En ella se aprecia que no existe cambio alguno de longitud de onda en el pico de máxima emisión de fluorescencia manteniéndose este en 340 nm durante el tratamiento. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Diez et al. (2008), que afirman que en muestras no calentadas y de bajo tratamiento térmico su máxima intensidad fue ~340 nm. También Kulmyrzaev et al. (2005) aducen que la λ de máxima emisión del Trp se desplazó muy levemente de 342 nm para leche cruda hasta 343 nm para leche calentada a 72 °C, 30 min, desplazamiento que no es significativo. Del mismo modo, Anema y McKenna (1996) aseveran que la β -LG en leche entera reconstituida en ningún caso sufrió más que una ligera desnaturalización a 70 °C, por lo que podríamos deducir que la desnaturalización originada en las condiciones ya explicadas, aparentemente, no es suficiente como

para inducir un desplazamiento significativo de la longitud de onda de máxima emisión.

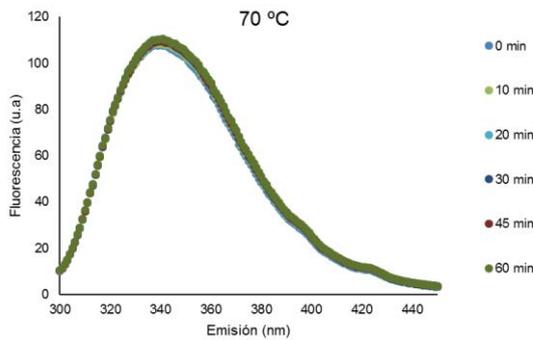


Figura 5.3.1. Espectros de emisión de fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.

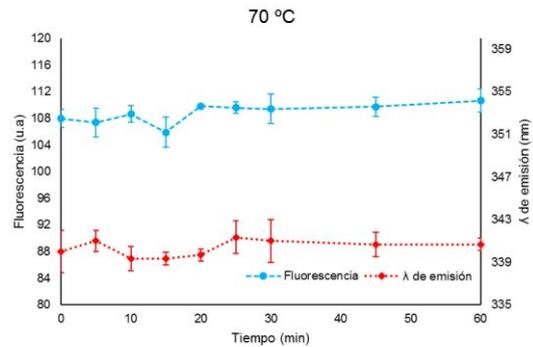


Figura 5.3.2. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 70 °C.

El efecto de la temperatura en los cambios de la fluorescencia del Trp coincide con la aparición de los grupos –SH debido a la desnaturalización de las proteínas. Koka et al. (1968) afirman que a 70 °C no existe ninguna liberación apreciable de grupos –SH. Este resultado fue corroborado por Kirchmeier et al. (1985) y Romero (1991) afirmando que la aparición de los grupos –SH activos tienen lugar a partir de 72 y 73 °C respectivamente. Del mismo modo, Alais (1985) encontró que a 72 °C, 5 min la desnaturalización de las proteínas del suero sólo es del 6%, alcanzando el 25% a los 30 min y hasta el 40% después de 60 min. Este valor fue corroborado por Kulmyrzaev et al. (2005), quienes encontraron que la β -LG se desnaturaliza un ~38% como consecuencia de un tratamiento a 72 °C, 30 min. Todo lo anterior significaría que a 70 °C la desnaturalización alcanzada por las proteínas séricas influye muy levemente en los cambios en la intensidad de fluorescencia y la longitud de onda de máxima emisión.

En la Figura 5.3.3 se muestran los espectros de emisión de la F_{Trp} a 80 °C. En dicha figura se muestra el comportamiento de la F_{Trp} y también se observa el desplazamiento hacia el rojo (*red-shift*) de la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de F_{Trp} . El comportamiento de la intensidad de fluorescencia se ajusta a un modelo polinómico existiendo un ligero aumento de la intensidad F_{Trp} hasta el minuto 20, con claro descenso posterior. Este fenómeno corrobora lo

obtenido por Ayala (2014) con la misma matriz. Yazdi y Corredig (2012) también observaron un incremento de la intensidad del F_{Trp} en leche desnatada sometida a 80 °C durante 10 min. Anand et al. (1998) utilizaron la espectroscopía de fluorescencia para estudiar la desnaturalización térmica de la proteína del suero y fueron capaces de caracterizar con éxito un proceso de desnaturalización en dos etapas utilizando el método. En este estudio, trataron térmicamente leche durante 3 min a diferentes temperaturas moderadas y encontraron que la fluorescencia del triptófano aumenta linealmente con un aumento del tratamiento térmico de 71.1 °C a 79.4 °C alcanzando un máximo a 79.4 °C, no observando diferencia alguna a 82.2 °C. Doreen (2010) también encontró incremento de la fluorescencia en proteína del suero tratada térmicamente a 85 °C durante 3 min en comparación con proteína suero nativa. Este mismo autor, relaciona directamente el aumento de fluorescencia con lo que él denomina la primera fase de desnaturalización, consistente en el despliegue de las proteínas y consiguiente exposición de residuos de triptófano fluorescente. Sería dicha exposición de residuos del Trp la que, según Doreen, generaría aumento de la intensidad de fluorescencia.

Por otra parte, nótese que el descenso de la intensidad de fluorescencia sólo se comienza a observar tras 20 min de tratamiento a 80 °C. De hecho, Jovanović et al. (2005) afirman que un tratamiento térmico a 80 °C durante 20 min produce el 80- 85% de la desnaturalización de las proteínas séricas, tiempo en que empieza el descenso de la intensidad de F_{Trp} . Dicho descenso ha sido también observado por Qi et al. (2015) y Schamberger y Labuza (2006), y es coherente con las observaciones de Taterka et al. (2014). También Marangoni et al. (2000) encontraron una disminución en la intensidad de la fluorescencia de la proteína nativa respecto a la proteína totalmente desnaturalizada, tratada a 80 °C durante 30 min. Según Kulmyrzaev et al. (2005) los restos de Trp expuestos al ambiente hidrófilo debido al despliegue de las proteínas inducido por calor, comenzarían a quedar protegidos de la fase acuosa por otras moléculas de proteína como resultado de la interacción proteína–proteína, resultado de los procesos iniciales de agregación proteica. A este proceso Doreen (2010) le denomina la segunda fase de la agregación de proteínas. La disminución de la intensidad de fluorescencia en esta etapa se atribuye a la pérdida significativa de la estructura terciaria como resultado de la agregación (cuaternaria). En este momento, los residuos del Trp ya

no están expuestos, lo que aparentemente resulta en la pérdida de fluorescencia, probablemente por efecto bloqueante por la formación de puentes de azufre. De hecho, Palazolo et al. (2000) y Estévez et al. (2017) mencionan que los puentes disulfuro son eficaces en el bloqueo de la fluorescencia “*fluorescence quenchers*” inducido por las agregaciones. Por tanto, la disminución de la F_{Trp} se debe probablemente a un menor rendimiento cuántico de fluorescencia que resulta de los cambios conformacionales como consecuencia de la interacción proteína-proteína.

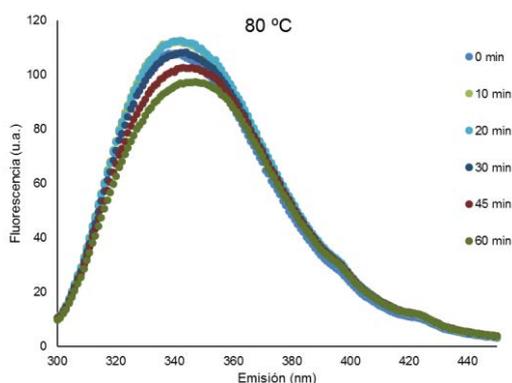


Figura 5.3.3. Espectros de emisión de fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.

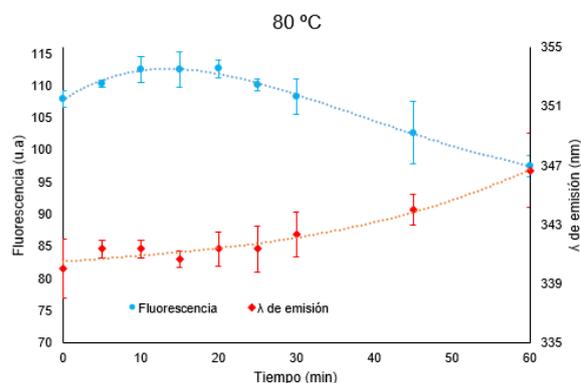


Figura 5.3.4. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 80 °C.

Igualmente, en la figura se refleja el desplazamiento de la longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima a lo largo del tratamiento térmico (i.e., el desplazamiento hacia el rojo es más pronunciado en función del tiempo de tratamiento a 80 °C), desplazamiento que, aparentemente, se ajusta a un modelo lineal polinómico (Figura 5.3.4). De acuerdo con nuestras observaciones, Halder et al. (2012) observaron el desplazamiento hacia el rojo, desde 333 nm a 25 °C hasta 347 nm tras un tratamiento de 5 min a 80 °C. Por su parte, Birlouez-Aragon et al. (1998) encontraron que el Trp presenta su máxima fluorescencia a 337 nm cuando está en un entorno hidrófobo y a 350 nm cuando el Trp se encuentra en un entorno hidrófilo.

La Figura 5.3.5 muestra los cambios en el espectro de emisión de F_{Trp} a 90 °C. Esta vez se observa más nítidamente el descenso de la F_{Trp} y el desplazamiento de la λ_{Trp} hacia el rojo. Si bien a los 5 min de tratamiento térmico la intensidad es aún

similar a la leche no tratada térmicamente, a partir de dicho tiempo se aprecia un claro y continuo descenso. El descenso de la F_{Trp} a partir del minuto cinco estaría nuevamente más relacionado con el predominio de los procesos de interacción entre proteínas desnaturizadas que con la desnaturización en sí, ya que según Jovanović et al. (2005) y Khedkar et al. (2016) tras 5 min de tratamiento a 90 °C la desnaturización de las proteínas del suero ya es completa. Como se observa en la Figura 5.3.6, la F_{Trp} se ajusta bien a un modelo lineal con pendiente negativa, con una clara disminución de la F_{Trp} está dado por un modelo polinómico.

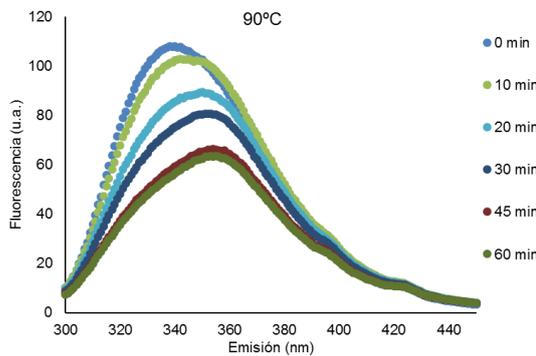


Figura 5.3.5. Espectros de la emisión de la fluorescencia del triptófano en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.

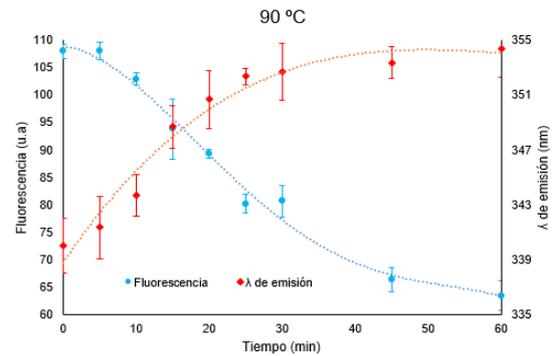


Figura 5.3.6. Cambios en la intensidad de fluorescencia del triptófano y de la longitud de onda de la fluorescencia máxima del triptófano, durante el tratamiento térmico a 90 °C.

Por otro lado, el desplazamiento al rojo de λ_{FTrp} durante el tratamiento térmico a 90 °C es coherente con el observado a 80 °C, si bien tiende a estabilizarse a tiempos largos, adaptándose mejor, a esta temperatura a un modelo polinómico (Figura 5.3.6). Tal como se ha indicado, este fenómeno es conocido como desplazamiento hacia el espectro de emisión rojo (Diez et al., 2008; Lakowicz, 2006a) y se atribuye a la exposición de residuos de Trp de un entorno apolar a la fase acuosa de la leche (Estévez et al., 2017; Geddes y Lakowicz, 2006). Recientemente, Svensson y Andersen (2014) informaron de que las condiciones fisicoquímicas del entorno tales como polaridad, la viscosidad, y la disponibilidad de grupos cargados podrían afectar el resto de triptófano y de sus propiedades de fluorescencia.

5.3.2 Fluorescencia de los compuestos intermedios de la reacción de Maillard (F_{CM})

La reacción de Maillard, también denominada pardeamiento no enzimático, tiene lugar entre los grupos carbonilo (lactosa) y amino (lisina) durante el procesamiento

y almacenamiento de alimentos (Schamberger y Labuza, 2006). Juega un papel importante en la determinación de características de los alimentos incluyendo aroma, color, sabor y textura. En la etapa inicial de la reacción de Maillard se forman compuestos de Amadori, que no son fluorescentes. Pero en etapas intermedias se forman compuestos tales como derivados de pirrol e imidazol, además en esta etapa se forman compuestos no coloridos que absorben la luz UV, así como compuestos fluorescentes (Bosch et al., 2007).

Las Figura 5.3.7, Figura 5.3.8 y Figura 5.3.9 muestran los espectros de emisión de la F_{CM} a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada. Se observa claramente que se generaron dos picos muy pronunciados. Según las revisiones bibliográficas, la F_{CM} se produce mediante excitación a 330 nm y emisión 420 nm (Bosch et al., 2007; Becker et al., 2003; Wold et al., 2002). Se confirmaría, por tanto, que el primer pico de 424 nm corresponde a los compuestos intermedios de Maillard. Este resultado concuerda con lo obtenido en estudios en leche en polvo (Ayala, 2014; Liu y Metzger, 2007). Birlouez-Aragon et al. (1998) y Schamberger y Labuza (2006) encontraron el pico máximo de emisión a 440 nm medido a una excitación de 360 nm en leche. A esta misma longitud de onda de excitación, Kamal y Karoui (2016) localizaron la F_{CM} a 420 nm en leche de camello sometido a un tratamiento térmico de 70 a 75 °C, durante 30 min. El segundo pico apareció a ~450 nm, guardando más similitud con el pico de emisión observado a 440 nm por Schamberger y Labuza (2006), si bien ellos excitaron la muestra a una longitud de onda de 360 nm (a diferencia de la longitud empleada por nosotros de 330nm). Dicho pico podría corresponder a algún otro compuesto intermedio o avanzado de la reacción de Maillard.

En la Figura 5.3.10 se muestra el comportamiento de la F_{CM} a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada en función del tiempo de tratamiento térmico. A 70 °C existe un claro incremento de la intensidad de fluorescencia. Birlouez-Aragon et al. (1998) encontraron que hay un incremento exponencial de la F_{CM} en solución β -LG – lactulosa. Morales et al. (1996) mencionan que la acumulación de fluorescencia es claramente dependiente del tiempo y la temperatura del tratamiento. Así mismo, Leclere y Birlouez (2001) demostraron que la F_{CM} está relacionado con el daño de la lisina durante el calentamiento de la leche. Leclère et al. (2002) encontraron un

incremento lineal de la intensidad en alimentos infantiles tratados incubados a 60 °C durante 120 horas. A 80 °C se aprecia un incremento considerable hasta el minuto 30 y posteriormente desciende la intensidad de fluorescencia. No obstante, a 90 °C solo hay un incremento hasta el minuto 5 con descenso posterior de la señal de fluorescencia. El descenso de la F_{CM} observado en la figura anterior podría estar relacionado con el efecto de filtro interno ("*inner filter effect*") que ocurre en aquellos casos en que el fluoróforo está en concentraciones muy elevadas y provoca menos fluorescencia que la correspondiente al mismo fluoróforo, esto debido a la pérdida de potencia radiante de la radiación de excitación, está intensidad de la radiación está relacionado también con la disminución de la fluorescencia que llega al detector (Geddes y Lakowicz, 2006).

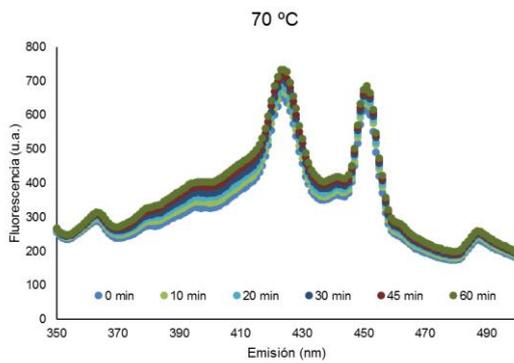


Figura 5.3.7. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.

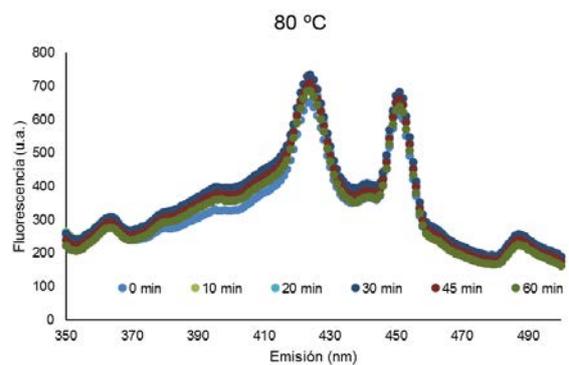


Figura 5.3.8. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.

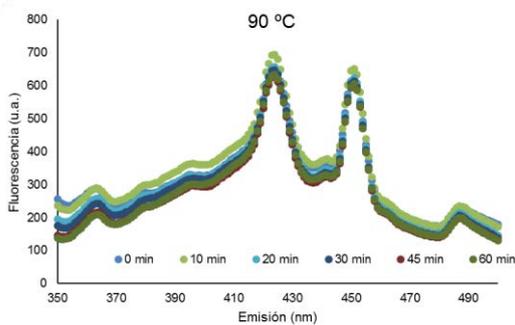


Figura 5.3.9. Espectros de emisión de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.

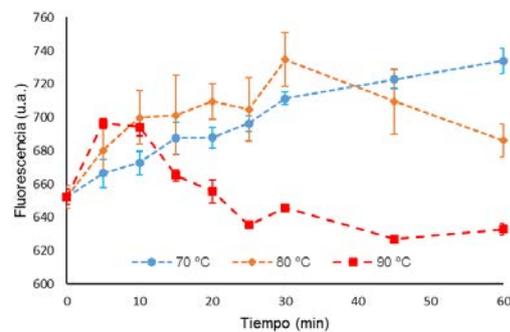


Figura 5.3.10. Cambios en la intensidad de fluorescencia de compuestos intermedios de Maillard a emisión de 424 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

5.3.3 Fluorescencia de Ditirosina (F_{Dt})

La ditirosina es producto de la oxidación de las proteínas a partir de radicales tirosilo, responsable de disminuir la digestibilidad de las proteínas y el suministro nutricional. También se ha demostrado que la lactoperoxidasa, una enzima presente en la leche, podría conducir a la formación de Dt en presencia de peróxido de hidrógeno (Fenaille et al., 2004). El grado de formación de la Dt a partir de las proteínas de la leche varía en función de la estructura de dichas proteínas, siendo la β -caseína (estructura secundaria) el principal precursor que la β -LG (estructura terciaria), debido a la menos rígida conformación (Scheidegger et al., 2016). Aumentan como consecuencia de los tratamientos térmicos o fotooxidación en muestras de leche expuestas a UV o luz fluorescente (Scheidegger et al., 2010).

El grado de formación de ditirosina en las proteínas de la leche varía dependiendo de la estructura de la proteína son más bajas en proteínas globulares que en estructuras menos bien ordenadas, como las proteínas de caseína (α -, β - o κ -caseína) Debido a la destrucción del Trp, junto con la oxidación de otros aminoácidos (Dalsgaard et al., 2011), la complejidad de la matriz y la presencia de iones metálicos. Aumentan como consecuencia de los tratamientos térmicos o fotooxidación en muestras de leche expuestas a UV o luz fluorescente (Scheidegger et al., 2013, 2010).

La F_{Dt} es detectada a una longitud de onda de emisión de 410 nm, previamente excitada a 315 nm (Scheidegger et al., 2016). En nuestra investigación se identificó la F_{Dt} utilizando un rango de emisión de 350 a 500 nm (Figura 5.3.11 - Figura 5.3.13). La máxima intensidad de fluorescencia ocurrió a 429 nm, lo que concuerda con lo obtenido por Ayala (2014) quien también estudió la misma matriz biológica en condiciones de tratamiento térmico similares. Este valor de longitud de onda de emisión es mayor con lo observado por Brandao et al. (2017) en leches en polvo de vaca y cabra dentro de un rango de emisión de 340 a 600 nm, ubicándose el pico máximo a 410 nm.

En la Figura 5.3.14 se aprecia el comportamiento de la F_{Dt} a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada durante el tratamiento térmico. Este fluoróforo tiene un comportamiento similar a la F_{CM} por lo que la correlación de Pearson entre las intensidades de fluorescencia de ambos compuestos alcanza un valor de 0,95 ($p < 0,0001$).

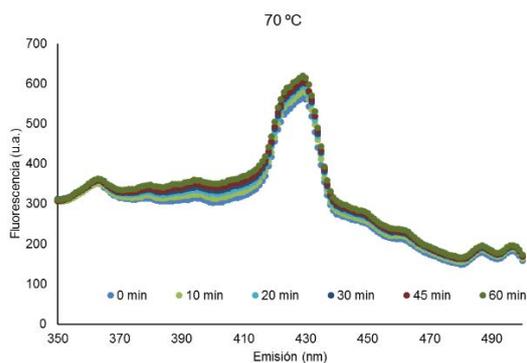


Figura 5.3.11. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo de tratamiento.

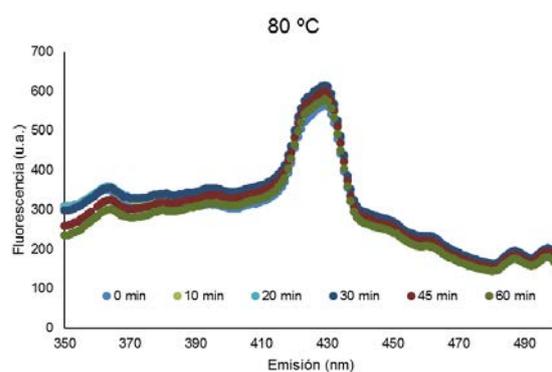


Figura 5.3.12. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo de tratamiento.

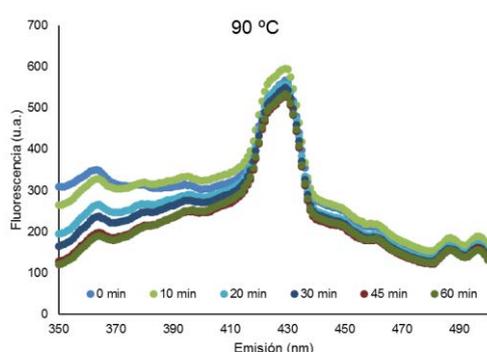


Figura 5.3.13. Espectros de emisión de fluorescencia de ditirosina en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo de tratamiento.

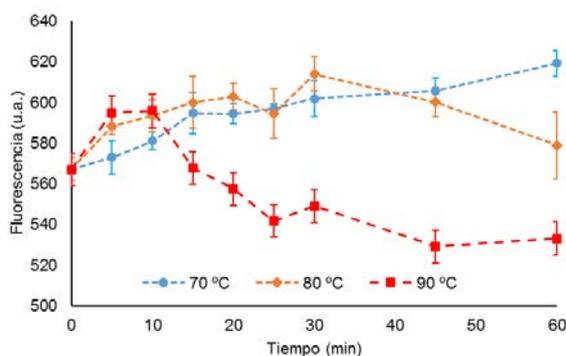


Figura 5.3.14. Cambios en la intensidad de fluorescencia de ditirosina, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

5.3.4 Fluorescencia de la riboflavina (F_{Rbf})

La riboflavina, llamada también vitamina B₂, es soluble en agua, relativamente termoestable y lábil a la acción de la luz (Koop et al., 2014). Christensen et al. (2006) clasificó la riboflavina entre los 11 fluoróforos relevantes que se encuentran en los alimentos, emitiéndose su fluorescencia a 518 nm. Este compuesto es considerado como el fotosensibilizador responsable de la fotooxidación y la oxidación temprana de lípidos y por lo tanto es un iniciador de la degradación de los lípidos y de las proteínas durante la exposición a la luz (Andersen et al., 2006). Por tanto su autofluorescencia es importante durante el procesado de los productos lácteos (Andersen y Mortensen, 2008; Andersen et al., 2006; Christensen et al.,

2005; Geddes y Lakowicz, 2006; Mungkarndee et al., 2016; Ntakatsane et al., 2013).

En la Figura 5.3.15 - 5.3.17 se ilustran los espectros de fluorescencia de la riboflavina a una excitación de 267 nm en muestras tratadas térmicamente a 70, 80 y 90 °C. Se observa un pico ancho alrededor de 535 nm. La ubicación de este pico es muy similar al encontrado por Fox y Thayer (1998) Fox y Thayer (1998) que mencionan que la emisión se produce alrededor de 525 y 531 nm. En el yogur la emisión se encuentra entre 500 y 550 nm (Christensen et al., 2005) y en quesos a 530 nm (Andersen et al., 2006), siendo esta última ligeramente menor a la longitud de onda de emisión observada en nuestros resultados.

En la Figura 5.3.18 se observa el comportamiento de la F_{Rbf} excitada a 267 nm a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada durante el tratamiento térmico. A 70 °C se aprecia una máxima intensidad de fluorescencia al minuto 15, posteriormente disminuye y logra un comportamiento estable hasta el minuto 60. A 80 °C la fluorescencia máxima se registró al minuto 30 con posterior descenso gradual y a 90 °C se observa dos máximas intensidades de fluorescencia en el minuto 10 y 45. De los resultados podríamos afirmar que el comportamiento de la fluorescencia de la riboflavina durante el tratamiento térmico no dio una respuesta consistente ni tendencia clara, en ninguna de las tres temperaturas.

Según un estudio realizado por Christensen et al. (2005) en yogures, no se observó la excitación de la riboflavina a 267 nm. Los autores aducen que esto podría ser debido a la absorción de luz por otras moléculas. Al parecer éste es el motivo por el que normalmente, en estudios recientes, no es utilizada dicha longitud de onda, para su investigación en productos lácteos.

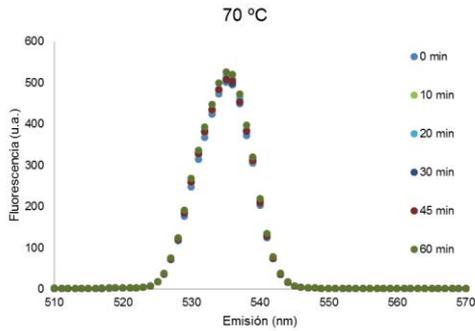


Figura 5.3.15. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 70 °C en función del tiempo.

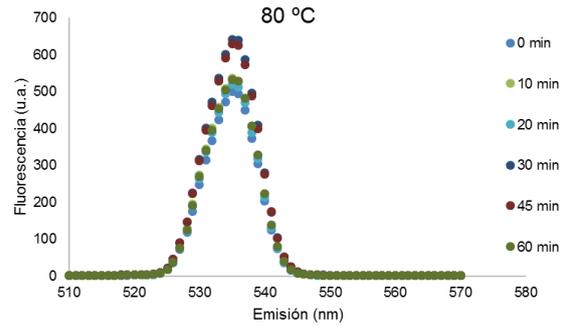


Figura 5.3.16. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 80 °C en función del tiempo.

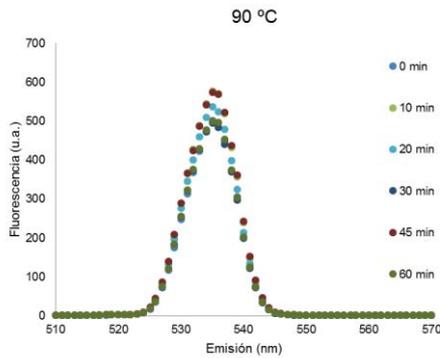


Figura 5.3.17. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm en leche desnatada tratada a 90 °C en función del tiempo.

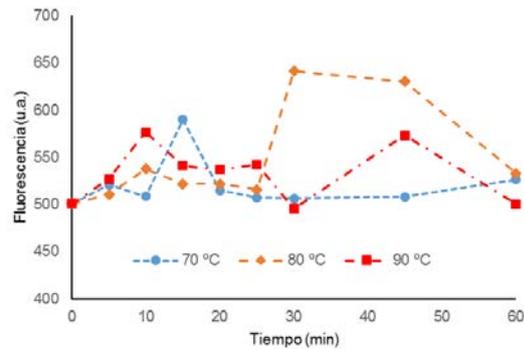


Figura 5.3.18. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 267 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

La Figura 5.3.19 – 5.3.21 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la riboflavina a una excitación de 370 nm. El pico máximo de emisión se observa alrededor de 507 nm. En leche adulterada con aceite vegetal se identificó un pico correspondiente con un máximo de emisión en el rango de 515 a 525 nm, con una disminución de la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la adulteración (Ntakatsane et al., 2013). En queso Havarti se observaron máximos de fluorescencia a 530 nm (Mortensen et al., 2003) y 520 nm (Andersen y Mortensen, 2008) y en productos lácteos a 525 nm (Wold et al., 2002). Recientemente Ayala (2014) y Liu y Metzger (2007) obtuvieron la máxima emisión a 507 y 510 nm respectivamente en leche desnatada, valores que están dentro del rango de 500 a 550 nm medidos en yogurt fresco (Christensen et al., 2005).

En la Figura 5.3.22 se muestra el comportamiento de la F_{Rbf} a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada durante el tratamiento térmico, excitada a 370 nm. En todas las temperaturas incrementa la intensidad de fluorescencia a lo largo del tratamiento térmico, siendo ligeramente mayor en tratamientos térmicos a temperaturas más elevadas.

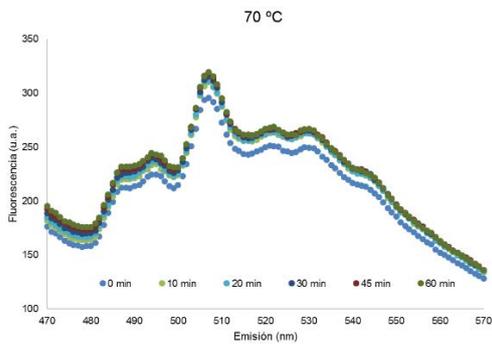


Figura 5.3.19. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 70 °C durante diferentes tiempos.

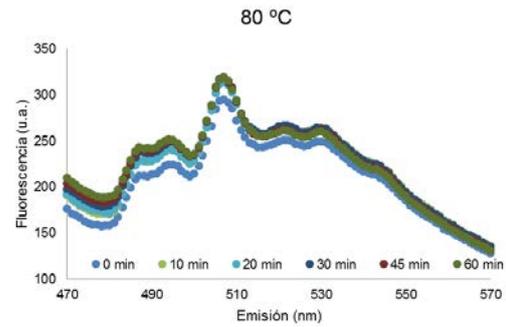


Figura 5.3.20. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 80 °C durante diferentes tiempos.

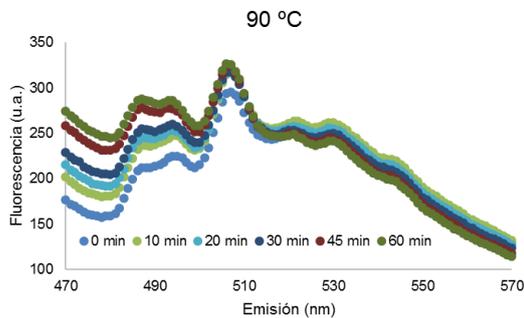


Figura 5.3.21. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 90 °C durante diferentes tiempos.

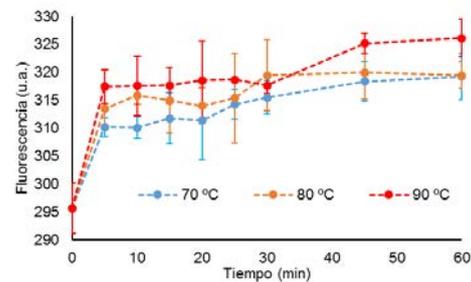


Figura 5.3.22. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

A una excitación de 450 nm, la máxima emisión de fluorescencia se registró a ~530 nm en diversos productos lácteos (Andersen y Mortensen, 2008; Mortensen et al., 2003). En yogur fresco la fluorescencia de la riboflavina se dispone dentro del rango de 500 a 550 nm (Christensen et al., 2005). En la Figura 5.3.23 – 5.3.25 se muestran los espectros obtenidos a diferentes temperaturas. En ellas se refleja que el pico máximo de intensidad de fluorescencia se ubica a ~522 nm.

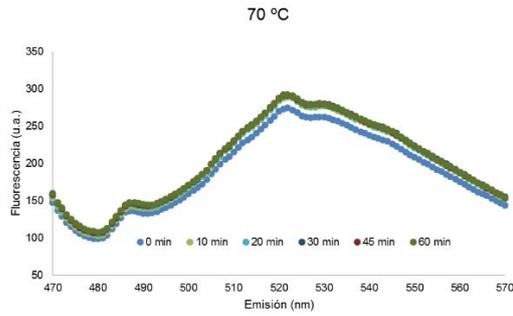


Figura 5.3.23. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 70 °C durante diferentes tiempos.

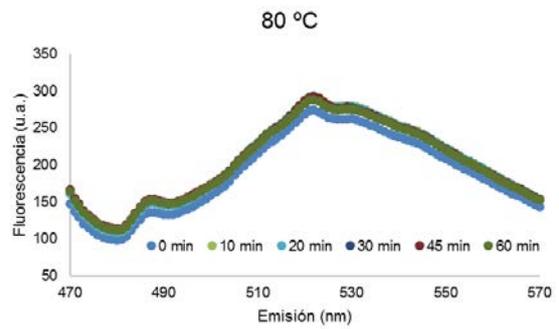


Figura 5.3.24. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 80 °C durante diferentes tiempos.

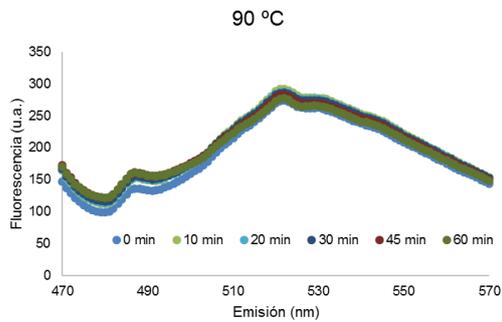


Figura 5.3.25. Espectros de emisión de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm en leche desnatada tratada a 90 °C durante diferentes tiempos.

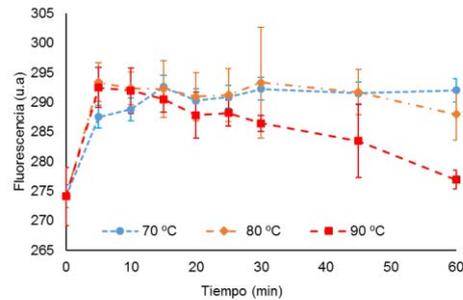


Figura 5.3.26. Cambios en la intensidad de fluorescencia de riboflavina excitada a 370 nm, durante el tratamiento térmico a diferentes temperaturas.

En la Figura 5.3.26 se observa el comportamiento de la F_{Rbf} excitada a 450 nm a 70, 80 y 90 °C en leche desnatada durante el tratamiento térmico. A 70 °C se aprecia un incremento hasta el minuto 15, y luego se mantiene casi inalterada su fluorescencia. A 80 y 90 °C, en ambos casos, hay un incremento brusco hasta el min 5 y posteriormente una disminución, mucho más pronunciada en leche tratada a 90 °C.

5.4 Obtención de modelos matemáticos, a partir de un sistema modelo, para predicción de hidroximetilfurfural, grupos sulfhidrilo, ácido ascórbico y riboflavina

En esta sección de la memoria de tesis doctoral se obtienen modelos para predecir las concentraciones de los marcadores químicos de daño térmico en función de la información de las medidas de FFF. Para llevar a cabo el desarrollo de algoritmos de predicción, fue necesario cuantificar los marcadores de daño térmico por métodos convencionales y medir la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos intrínsecos (nativos o desarrollados durante el tratamiento térmico) en muestras de leche tratadas térmicamente, tal como se aprecia en las Figura 3.2.1 y Figura 3.2.2.

Se obtuvieron varios modelos de predicción de [HMF], [-SH], [AA] y [RBF]. Mediante el método *Máximo R²* de SAS se generaron los mejores modelos de predicción de una, dos y tres variables, empleando como predictores potenciales las siguientes variables de fluorescencia: F_{Trp} , F_{CM} , F_{Dt} , F_{Rbf267} , F_{Rbf370} , F_{Rbf450} y λ_{Ftrp} (longitud de onda de máxima intensidad de fluorescencia del triptófano). Es decir, el modelo univariable y/o multivariable lineal relaciona variables experimentales (valores de máximos de intensidad de fluorescencia) con propiedades conocidas (concentración del analito), en este caso un marcador de daño térmico, siendo el objetivo la predicción de dicho marcador en las muestras (leche) a analizar. Este procedimiento de calibración, la relación matemática desarrollada se corresponde con la ecuación de calibración y el grupo de muestras de composición conocida se designa como colectivo de calibración. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permitirá predecir la composición físico-química de muestras similares en características a las del colectivo de calibración, pero independientes de éstas. Teniendo en cuenta las exigencias normativas actuales, es cada vez más necesario desarrollar métodos rápidos y eficientes, para lograr la y mejora del control de procesado y de la calidad de los alimentos (Bunaciu et al., 2016).

5.4.1 Hidroximetilfurfural (HMF)

Se desarrollaron varios modelos de predicción para estimar la concentración del HMF a partir de los diferentes marcadores fluorescentes evaluados, generados a 80 °C en un rango de 0 a 140 min, debido a que solo se trabajó a esta temperatura. En la Tabla 5.4.1 se muestran los mejores modelos de predicción con uno, dos y tres predictores. En todos se incluye como predictor principal F_{Trp} . Esto es probablemente debido a que la F_{Trp} es inversamente proporcional a la concentración del HMF con un $r = 0,89$ ($P < 0,0001$). La estrecha correlación del HMF con la F_{Trp} podría estar relacionado indirectamente con la desnaturalización de las proteínas del suero. Nótese que la aparición del HMF es un fenómeno que ocurre inducido por calor, como consecuencia de las interacciones entre glúcidos reductores y proteínas.

Tabla 5.4.1. Modelos de predicción de la formación del hidroximetilfurfural en leche mediante fluorescencia “front-face” a 80 °C.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R^2	SEP	CV
I [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp}$	36,6*	-0,24*	-	-	0,79	2,12	15,35
II [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM}$	8,55	-0,28*	0,04	-	0,84	1,95	14,15
III [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM} + \beta_3 F_{Rbf370}$	-15,7	-0,27*	0,035	0,07	0,85	1,99	14,42

N=14; R^2 , coeficiente de determinación; SEP ($\mu\text{mol/L}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variabilidad; β_0 - β_3 , coeficientes de regresión; [HMF] ($\mu\text{mol/L}$), concentración de hidroximetilfurfural; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm; * $p < 0,05$.

En los modelos que utilizan dos y tres predictores se incluyen también como predictores F_{Rbf370} y F_{CM} , si bien éstos resultaron no ser significativos para la predicción de HMF. Este compuesto es formado en las etapas intermedias de la reacción de Maillard por lo que se podría presumir que, la F_{CM} debería de estar involucrada directamente con el aumento de la concentración del HMF. Pero la correlación entre ambos resultó ser tan sólo $r = -0,283$ durante el tratamiento térmico de 80°C.

El modelo seleccionado de la tabla anterior es el que lleva dos predictores, debido al menor error de predicción y coeficiente de variabilidad, dicho modelo podría ser de fácil aplicación. En la Figura 5.4.1 se muestra la distribución de los valores experimentales *versus* los estimados, en ella se observa una adecuada distribución sobre la línea de equivalencia. Este resultado estimula a seguir perfeccionando y

dotando de mayor robustez los modelos de predicción de HMF, con la finalidad de ser aplicados en tratamientos térmicos habituales en la industria láctea.

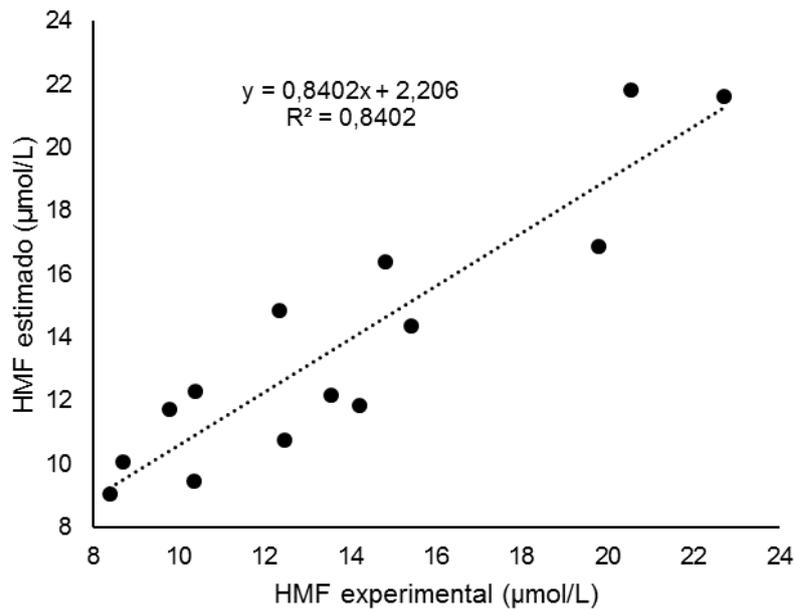


Figura 5.4.1. Relación entre los valores de hidroximetilfurfural (HMF) experimentales versus con valores estimados (modelo II)

5.4.2 Grupos sulfhidrilo

Se lograron desarrollar modelos de predicción de concentración de grupos sulfhidrilo a partir de los diferentes marcadores fluorescentes evaluados. La Tabla 5.4.2 muestra los mejores modelos matemáticos de predicción con uno, dos y tres predictores a 80 °C, tal como en el caso anterior solo trabajó a dicha temperatura. En todos los modelos de predicción se incluye la F_{CM} . Así mismo, según la correlación de Pearson, existe una relación inversa entre la concentración de $-SH$ y dicho predictor, con $r = -0,866$ ($P < 0,0001$).

En el modelo II incluye la F_{Trp} , pero dicho predictor no resulta ser significativo, probablemente debido a que presenta una baja correlación ($r = -0,44$) con la concentración de $-SH$. Por su parte, el modelo III incluye λ_{FTrp} que también tiene una correlación de Pearson baja con $-SH$ ($r = -0,41$). A pesar de ello aparecen en los modelos de predicción.

Tabla 5.4.2. Modelos de predicción de la desaparición de los grupos sulfhidrido en leche mediante fluorescencia “front–face” a 80 °C.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	R^2	SEP	CV
I $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM}$	2,50*	-0,002*	-	0,75	0,041	4,59
II $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Trp}$	1,71*	-0,003*	0,009	0,78	0,040	4,52
III $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 (F_{Trp} * \lambda_{FTrp})$	1,67*	-0,003*	$3,2 \times 10^{-5}$	0,78	0,041	4,64

N=14; R^2 , coeficiente de determinación; SEP ($\mu\text{mol/g}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variabilidad; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; $[-SH]$, concentración de grupos sulfhidrido; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; λ_{FTrp} , longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; * $p < 0,05$.

En la tabla anterior se observa que los modelos II y III tienen la misma habilidad para predecir la concentración de los –SH totales en la leche desnatada. En este caso fue elegido como el mejor modelo I, esto debido a que solo lleva un predictor; además los indicadores tanto el SEP como el CV son muy similares entre los modelos. En la Figura 5.4.2 se presentan los valores experimentales *versus* valores estimados de –SH totales. Tal como se mencionó para la estimación del HMF, este modelo requeriría mayor robustez, por lo que se recomienda seguir investigando a otras temperaturas.

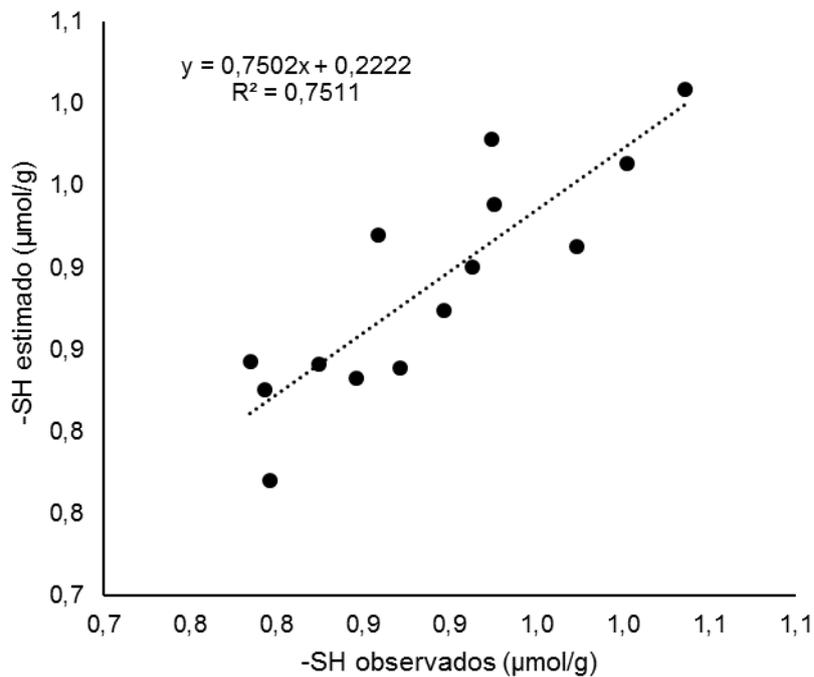


Figura 5.4.2. Relación entre los valores de –SH totales experimentales *versus* con valores estimados (modelo I).

5.4.3 Ácido ascórbico

Para obtener los modelos matemáticos tanto para el AA como para la Rbf el estudio se realizó a 70, 80 y 90 °C entre 0 y 60 min. Se obtuvieron varios modelos de predicción de la concentración del ácido ascórbico a partir de los diferentes marcadores fluorescentes evaluados.

La Tabla 5.4.3 se muestran los mejores modelos de predicción del AA para cada temperatura analizada. Los modelos contienen hasta tres predictores.

Tabla 5.4.3. Modelos de predicción de la degradación del ácido ascórbico en leche mediante fluorescencia “front- face” a diferentes temperaturas.

	Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R ²	SEP	CV	T
I	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM}$	102,7*	-0,13*	-	-	0,93	0,94	6,30	
II	[AA]= $\beta_0 + \beta_2 F_{CM} + \beta_1 F_{Rbf450}$	86,71*	-0,14*	0,09*	-	0,95	0,84	5,67	70
III	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Rbf450} + \beta_3 \lambda_{FTrp}$	44,58	-0,14*	0,09*	0,13	0,95	0,86	5,68	
IV	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}$	423,8*	-1,19*	-	-	0,62	2,20	14,81	
V	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp} + \beta_2 F_{CM}$	435,7	-1,15*	-0,04*	-	0,83	1,98	13,33	80
VI	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM} + \beta_3 F_{Rbf267}$	0,921	0,65*	-0,09*	-0,01*	0,87	1,45	9,72	
VII	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp}$	-5,315*	0,22*	-	-	0,91	1,11	8,08	
VIII	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{Dt}$	16,74*	0,28*	-0,05*	-	0,94	0,91	6,60	90
IX	[AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_3 F_{Dt} + \beta_2 \lambda_{FTrp}$	36,51	0,27*	-0,05*	-0,05	0,95	0,91	6,66	

N = 27; R², coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variabilidad; T (°C), temperatura; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [AA], concentración del ácido ascórbico; F_{Trp}, fluorescencia del triptófano; λ_{FTrp} , longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{CM}, fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf267}, fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 267 nm; F_{Rbf450}, fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; F_{Dt}, fluorescencia de la diitrosina; *p<0,05.

A 70 °C se incorpora como principal predictor F_{CM}, que tiene una correlación inversa con el AA con una r = -0,96 (p>0,0001). Así mismo, se observa que los R² de los modelos de predicción son superiores a 0,90 tanto a 70 °C como a 90 °C. Sin embargo, a 80 °C, F_{Trp} y λ_{FTrp} tienen una correlación de r = 0,74 y r = -0,78 (p<0,0001) respecto la degradación del AA y los indicadores matemáticos arrojan un R² no superior a 0,87 y valores más altos de SEP que el resto. A 80 °C el R² disminuye probablemente debido a la baja correlación de F_{CM} y AA (r = 0,36). De igual modo, el principal predictor a 90 °C es F_{Trp} que tiene una relación directa respecto a la degradación del AA en leche tratada térmicamente con un r = 0,95 (p<0,0001) mientras que la correlación de dicha vitamina con la F_{Dt} presenta un valor de r = 0,72 (p<0,0001). Los valores de R², también son superiores a 0,90 tal como sucede a 70 °C.

Tabla 5.4.4. Modelos generales de predicción de la degradación del ácido ascórbico en leche mediante fluorescencia “front-face” a todas las temperaturas.

	Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R^2	SEP	CV
I	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370}$	108*	-0,3*	-	-	0,50	2,54	17,51
II	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370} + \beta_2 F_{Rbf450}$	78,8*	-0,39*	0,2*	-	0,60	2,26	15,56
III	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{Rbf450} + \beta_3 F_{CM}$	40,2*	0,3*	0,06	-0,11*	0,73	1,88	13,00

N = 81; R^2 , coeficiente de determinación; CV (%), coeficiente de variación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [AA] (mg/L), ácido ascórbico; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf267} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 267 nm; F_{Rbf370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm; F_{Rbf450} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; * $p < 0,05$.

En la Tabla 5.4.4 se recogen los modelos matemáticos generales (a las tres temperaturas estudiadas) obtenidos para estimar [AA]. El mejor modelo corresponde al modelo III que dispone de tres predictores, seguido del modelo que tiene dos predictores y por último el que tiene solo un predictor que tiene el coeficiente de determinación más bajo y el valor más alto de SEP. F_{Rbf450} y F_{Rbf370} resultaron ser inversamente proporcionales a la concentración del AA con valores $r = -0,14$ y $r = -0,70$ respectivamente, siendo esta última correlación significativa $p < 0,0001$. La F_{Trp} tiene una correlación de Pearson de 0,55 ($P < 0,0001$). En la Figura 5.4.3 se observa que los valores estimados provocan ligeros errores a concentraciones bajas del AA.

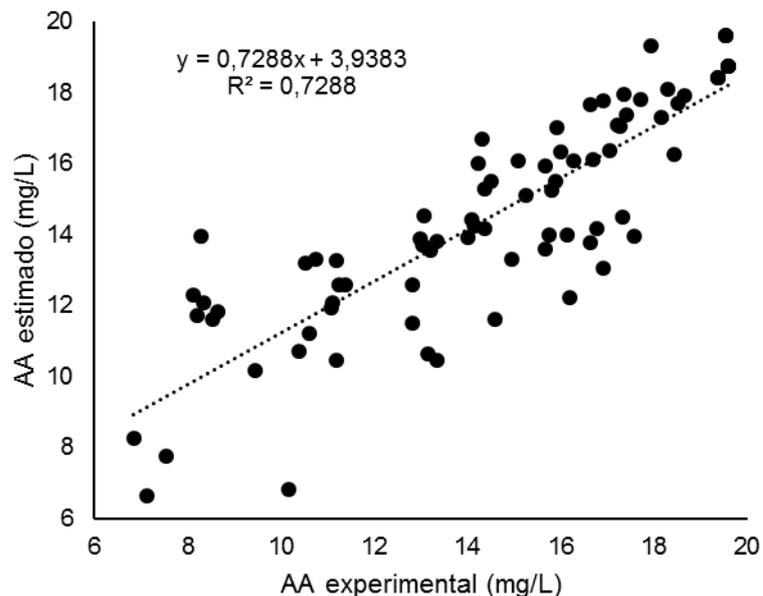


Figura 5.4.3. Relación entre los valores de riboflavina experimental *versus* valores estimados (modelo III).

5.4.4 Riboflavina

Para la predicción de la concentración de Rbf también se consiguieron varios modelos a partir de los marcadores fluorescentes. Dichos algoritmos de predicción fueron construidos a 70 °C, 80 °C y 90 °C, además de modelos generales (a las tres temperaturas). En la Tabla 5.4.5 se observan varios modelos de predicción de [Rbf] obtenidos a diferentes temperaturas de tratamiento térmico. Para cada temperatura se seleccionaron modelos hasta con tres predictores.

Tabla 5.4.5. Modelos de predicción de la degradación de la riboflavina en leche mediante fluorescencia “front-face” a diferentes temperaturas.

	Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R ²	SEP	CV	T
I	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM}$	2,40*	-0,001*	-	-	0,80	0,014	0,84	
II	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Dt}$	2,55*	-5,5X10 ⁻⁴	-8,4X10 ⁻⁴	-	0,83	0,013	0,80	70
III	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Dt} + \beta_3 F_{Rbf450}$	2,43*	-5,8X10 ⁻⁴	-9,8X10 ^{-4*}	-8,4X10 ⁻⁴	0,84	0,013	0,78	
IV	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{F_{Trp}}$	11,0*	-0,027*	-	-	0,62	0,051	3,14	
V	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM}$	1,39*	0,013*	-0,002*	-	0,83	0,054	2,81	80
VI	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM} + \beta_3 F_{Rbf267}$	1,31*	0,015*	-0,002*	2,1X10 ^{-4*}	0,86	0,032	1,99	
VII	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp}$	0,98*	0,006*	-	-	0,83	0,049	3,15	
VIII	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM}$	1,51*	0,007*	-0,001	-	0,85	0,047	3,00	90
IX	[Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{CM} + \beta_3 F_{Rbf450}$	1,15*	0,007*	-0,001*	0,002	0,86	0,046	2,96	

N = 27; R coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; T (°C), temperatura; β_0 - β_3 , coeficientes de regresión; [Rbf], riboflavina; $\lambda_{F_{Trp}}$, longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf267} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 267 nm; F_{Rbf450} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; F_{Dt} , fluorescencia de la ditirosina; *p<0,05

El cuadro anterior refleja que a 70 °C se incorporan como principales predictores la F_{CM} y la F_{Dt} siendo ambos inversamente proporcionales a [Rbf] con valores de correlación de Pearson $r = -0,89$ ($p < 0,0001$). Sin embargo, a 80 °C los predictores principales son F_{Trp} y $\lambda_{F_{Trp}}$ habiendo una correlación respecto [Rbf] de $r = 0,73$ y $r = -0,79$ ($p < 0,0001$) respectivamente. Igualmente, a 90 °C existe una alta relación tanto de la F_{Trp} como del $\lambda_{F_{Trp}}$ con la [Rbf] de $r = 0,91$ y $r = -0,81$ ($p < 0,0001$) respectivamente.

En la Tabla 5.4.6 se aprecian los modelos matemáticos generales obtenidos con datos de las tres temperaturas estudiados para la estimación de Rbf. Dichos modelos llevan hasta tres predictores, el primer modelo lleva como predictor $\lambda_{F_{Trp}}$, en mérito a la relación indirecta con la [Rbf], de $r = -0,80$ ($p < 0,0001$). En los modelos II y III predomina la F_{Trp} , probablemente porque la F_{Trp} está relacionada con la degradación de la [Rbf] en $r = 0,80$ ($p < 0,0001$).

Tabla 5.4.6. Modelos generales de predicción de la degradación de la riboflavina en leche mediante fluorescencia “front- face” a todas las temperaturas.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R ²	SEP	CV
I [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1\lambda_{F_{Trp}}$	6,81*	-0,015*	-	-	0,64	0,057	3,57
II [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{Trp} + \beta_2F_{CM}$	1,87*	0,008*	-0,001*	-	0,72	0,049	3,06
III [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{Trp} + \beta_2F_{CM} + \beta_3\lambda_{F_{Trp}}$	4,07*	0,006*	-0,001*	-0,006*	0,81	0,043	2,65

N = 81; R coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; β_0 - β_3 , coeficientes de regresión; RBF, riboflavina; $\lambda_{F_{Trp}}$, longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; *p<0,05.

En la Figura 5.4.4 se observa la relación entre los valores experimentales y los estimados de la concentración de Rbf a partir del modelo III. Este se seleccionó por tener los mejores indicadores de ajuste, que es mejor a concentraciones altas del analito, sugiriendo que la información contenida en F_{Trp} , F_{CM} y $\lambda_{F_{Trp}}$ tendría potencial para estimar [Rbf].

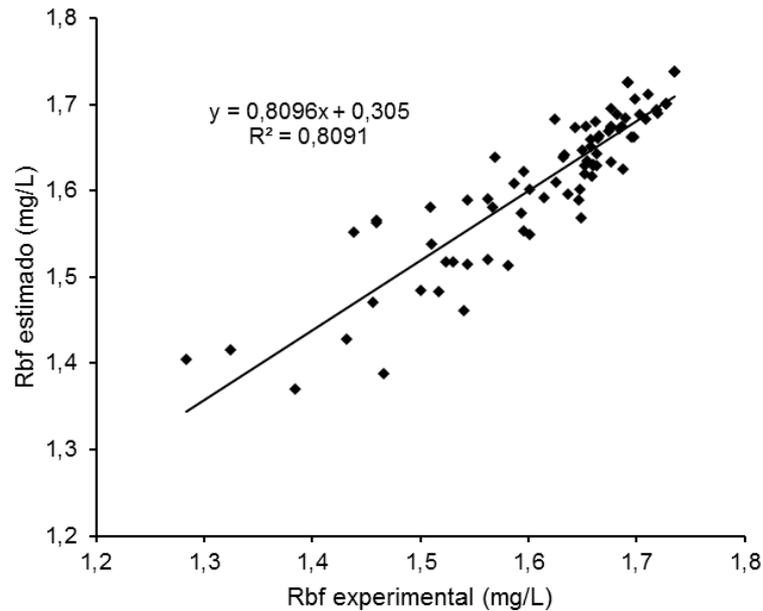


Figura 5.4.4. Relación entre los valores de riboflavina experimental versus valores estimados (modelo III).

5.5 Validación y recalibrado de los modelos cinéticos para la predicción de daño térmico en leche procesada en condiciones industriales

La validación normalmente consiste en el análisis de un grupo de muestras independientes y diferentes del conjunto de muestras utilizadas para la calibración, en este caso generadas con tratamientos térmicos típicamente aplicados en la industria láctea. La aplicabilidad de los modelos desarrollados se verifica al

comparar los valores estimados con datos de muestras independientes en las que las concentraciones de los analitos fueron analizadas por métodos alternativos o convencionales. De esta manera es posible comprobar una correcta descripción del comportamiento del modelo para determinar si las predicciones son lo suficientemente fiables para poder aplicarse de forma rutinaria.

5.5.1 Validación de los modelos cinéticos

La validación de los modelos cinéticos de los marcadores de daño térmico se efectuó con muestras procesadas en condiciones industriales (tercer experimento). De dichas muestras, la leche esterilizada sometida a tratamiento mediante autoclave (proceso no isotérmico) fue excluida del proceso de validación ya que no se han tenido en cuenta los periodos de calentamiento y enfriamiento en los modelos cinéticos desarrollados en el capítulo 5.1, al considerarse despreciable los tiempos de ascenso y descenso de temperatura en comparación con los tiempos de tratamiento evaluados.

Para la obtención del modelo cinético de formación del HMF y de la degradación de los –SH totales fue necesario obtener la energía de activación (E_a) a partir de datos bibliográficos para ambos compuestos, ya que el primer experimento se realizó a una sola temperatura (80 °C). Los valores de energía de activación seleccionados fueron 110,5 kJ·mol·K⁻¹ para el HMF (Singh et al., 2009) y 61,8 kJ·mol·K⁻¹ para –SH (Galani y Apenten, 1999). La constante cinética y la temperatura de referencia empleadas se corresponden con datos indicados previamente (secciones 5.1.1 y 5.1.2; Tablas 5.1.2 y 5.1.4 respectivamente).

Siguiendo los pasos establecidos en el apartado 4.5 se obtiene el modelo cinético para predecir las concentraciones tanto de HMF como de –SH, en función de tiempo-temperatura.

$$[HMF]_t = [HMF]_0 e^{\left[0,0058 \times e^{-\frac{19,25}{0,0083} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353,15}\right)}\right] t}$$

$$[-SH]_t = [-SH]_0 e^{\left[-0,0068 \times e^{-\frac{61,8}{0,0083} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353,15}\right)}\right] t}$$

Dónde: T, es temperatura (K); t, tiempo (min); [HMF], µmol/L y [-SH], µmol/g.

En la Figura 5.5.1 se muestra el análisis de residuales *versus* los valores experimentales. En dicha figura se observa la variabilidad de los errores, siendo esta mayor para concentraciones altas de HMF. Es decir, a mayores temperaturas de procesamiento los residuos son todos mayores en valor absoluto y negativos, existiendo una subestimación. El error estándar de predicción (SEP) fue 3,82 $\mu\text{mol/L}$ y un coeficiente de variabilidad (CV) de 111,84%. Dichos resultados muestran que el modelo no estima con exactitud.

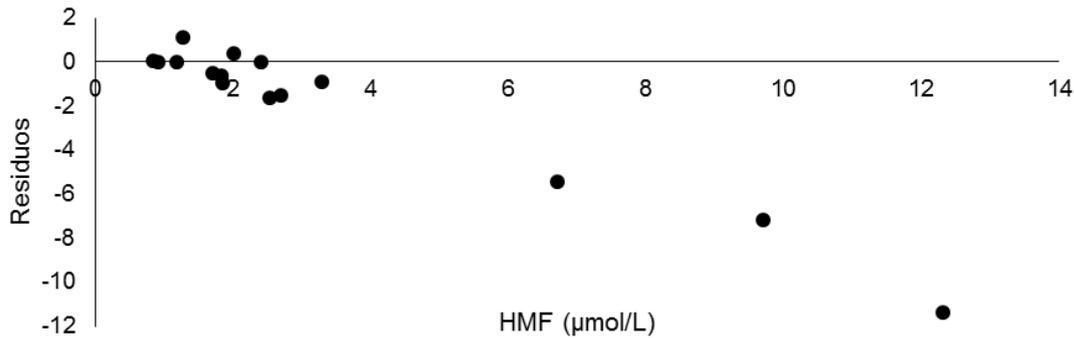


Figura 5.5.1. Dispersión de residuales contra valores experimentales de hidroximetilfurfural.

En la Figura 5.5.2 se muestra el análisis de residuales respecto a los valores experimentales de $-\text{SH}$. La variabilidad de los errores para el modelo cinético de predicción del $-\text{SH}$ no muestra una distribución de los residuos homogénea. Se observa una sobrestimación a concentraciones bajas de $-\text{SH}$ total, lo que demostraría la escasa probabilidad de predicción a tratamientos sometidos a altas temperaturas tales como el UHT y la pasteurización alta (105 $^{\circ}\text{C}$, durante 2 s). Los parámetros estadísticos registraron un error estándar de predicción (SEP) de 0,41 $\mu\text{mol/g}$ y un coeficiente de variabilidad (CV) de 37,96%.

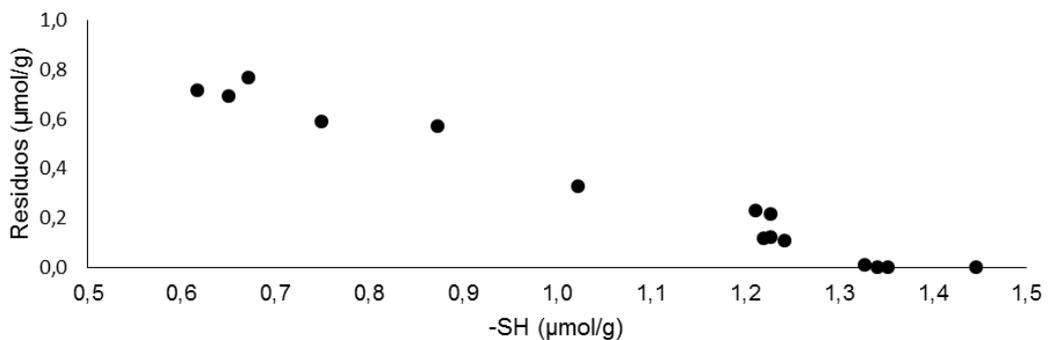


Figura 5.5.2. Dispersión de residuales contra valores predichos de grupos sulfhidriilo.

Por su parte, en relación con la validación del modelo cinético construido en el apartado 5.1.3 para la predicción del AA a temperaturas de 70, 80 y 90 °C en un rango de 0 a 60 min con leche desnatada, en la Figura 5.5.3 se muestran los análisis de residuales respecto a los valores experimentales. Se observa una apropiada distribución de los residuos, con un error estándar de predicción (SEP) de 4,00 mg/L y un coeficiente de variabilidad (CV) fue 22%. Estos resultados son alentadores y sugieren la necesidad de introducir mejoras ampliando el set de calibración a fin de mejorar las estimaciones. .

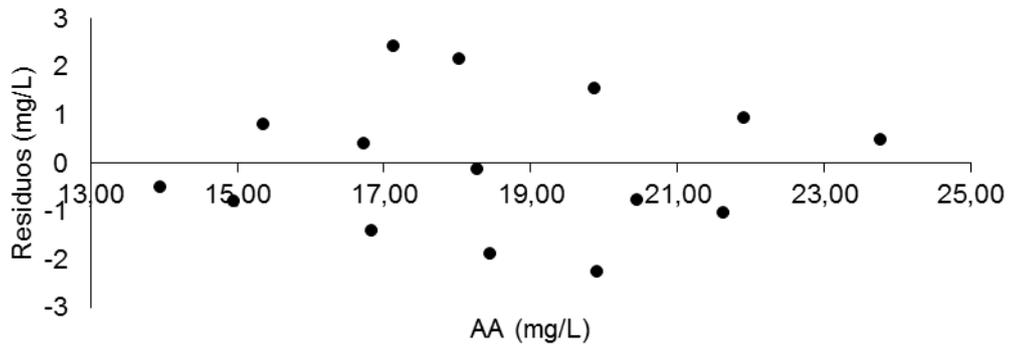


Figura 5.5.3. Dispersión de residuales contra valores experimentales de ácido ascórbico.

En relación con el modelo cinético para la predicción de la Rbf, al igual que el AA fue obtenido en el apartado 5.1.4 de este capítulo. En la Figura 5.5.4 se muestran los análisis residuales de la concentración de la Rbf *versus* los valores observados. El error estándar de predicción (SEP) fue 0,10 mg/L y el coeficiente de variabilidad (CV) fue 8 %, reflejando que el modelo cinético podría predecir la concentración de RBF a partir del tiempo y temperatura de tratamiento de leche desnatada.

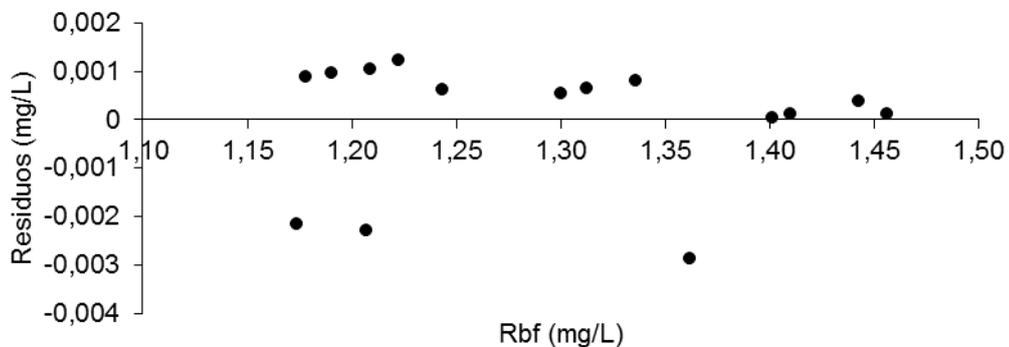


Figura 5.5.4. Dispersión de residuales contra valores experimentales de la concentración de la riboflavina.

5.5.2 Recalibrado de modelos cinéticos

Este procedimiento consistió en agregar el conjunto de datos de las muestras procesadas en condiciones industriales (temperaturas altas y tiempos cortos) al conjunto de datos del sistema modelo, con el fin de perfeccionar y ampliar el uso para temperaturas altas y tiempos cortos. Para el recalibrado de los modelos cinéticos fue necesario el uso de la herramienta de análisis de Solver de Excel.

En el proceso de recalibrado para el hidroximetilfurfural se logró mejorar el modelo obtenido en la sección anterior. El SEP fue 2,0 $\mu\text{mol/L}$, el $R^2 = 0,90$ y el CV fue $\sim 24\%$, este último un descenso del $\sim 75\%$ respecto al CV de validación. En la Figura 5.5.5 se observa una distribución adecuada sobre el eje de equivalencia, excepto un valor que podría ser considerado como un *outlier*, por ser un valor marcadamente subestimado. Si se eliminara dicho elemento, el R^2 incrementaría a 0,95. Este modelo mejorado podría ser aplicado para estimar la concentración de HMF a partir de parámetros temperatura-tiempo, pudiendo ser mejorado mediante un aumento suficiente del número de observaciones, especialmente en el rango de temperaturas y tiempos más habituales en las condiciones de precisado industrial. Además, se estimó una $E_a = 185 \text{ kJ}\cdot\text{mol/K}$. Este valor es superior al amplio rango encontrado en la revisión de la bibliografía, ue va desde ~ 19 hasta $\sim 140 \text{ kJ}\cdot\text{mol/K}$.

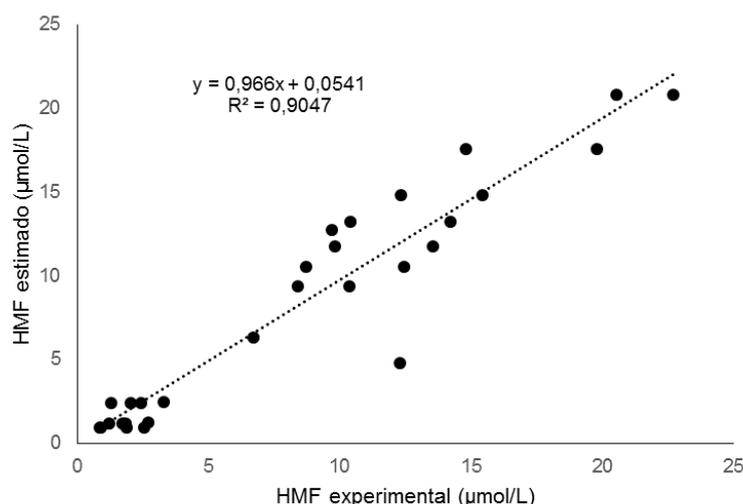


Figura 5.5.5. Representación gráfica de valores observados *versus* valores del modelo recalibrado para el hidroximetilfurfural.

El recalibrado del modelo cinético para la predicción de los –SH, resultó tener un SEP de 0,17 $\mu\text{mol/g}$ y CV de $\sim 18\%$. Este último valor descendió a la mitad del CV de la validación. También, se estimó la $E_a=164,9$ $\text{kJ}\cdot\text{mol/K}$, este valor es ligeramente menor al amplio rango de 200 – 600 $\text{kJ}\cdot\text{mol/K}$ para la desnaturalización de térmica de proteínas (Walstra et al., 2006). La Figura 5.5.6 muestra que existe una sobreestimación de los valores, que corresponden a las muestras de los tratamientos de pasteurización alta (105 $^{\circ}\text{C}$, durante 2 s), que podrían considerarse como datos *outlier*. Si dichos datos se eliminaran el R^2 ascendería hasta 0,91; también, el CV descendería al 9,5%. Estos resultados muestran que el modelo recalibrado podría ser una herramienta útil para predecir la cantidad de los –SH totales, a partir de las medidas de temperatura-tiempo, si bien sería recomendable, como en los casos anteriores, aumentar el número de observaciones con especial incidencia en los rangos de temperaturas altas y tiempos cortos.

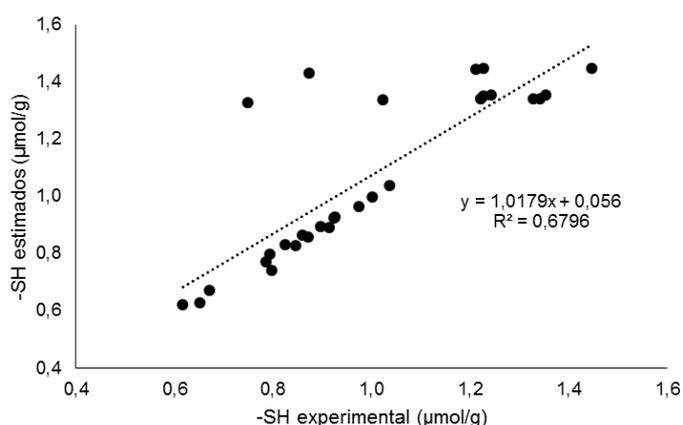


Figura 5.5.6. Representación gráfica de valores observados *versus* valores del modelo recalibrado para grupos sulfhidrilo totales.

El modelo cinético recalibrado para la estimación del AA, arrojó valores satisfactorios. Indicadores tales como el SEP, CV y R^2 resultaron ser 1,9 mg/L , 12% y 0,81 respectivamente. Los dos primeros valores disminuyeron a la mitad respecto a los indicadores obtenidos en la validación. También, se observó una mejor estimación de la E_a y la constante preexponencial (A_0) resultando valores de ~ 44 $\text{kJ}\cdot\text{mol/K}$ y 46166 m^{-1} respectivamente. El primer valor se encuentran dentro del rango de valores encontrados en la bibliografía (Tabla 2.3.2) y el segundo es similar a lo encontrado en frutos de guayaba (Ordóñez et al., 2013). La Figura 5.5.7 muestra que existe una ligera sobrestimación del AA a concentraciones de

~17 mg/L. Estos resultados reflejan que el modelo recalibrado podría ser aplicado mejorado tras su mejora a fin de predecir la cantidad de AA en leches sometidas a tratamiento térmico.

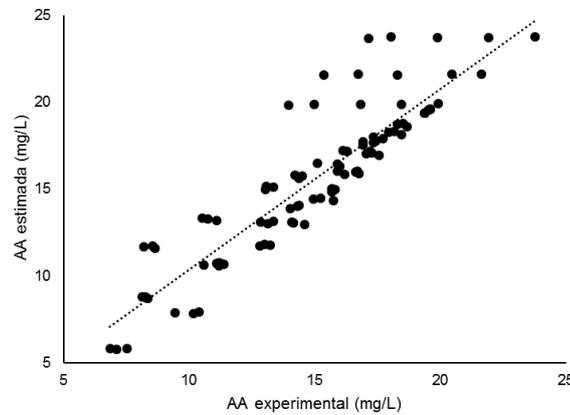


Figura 5.5.7. Representación gráfica de valores observados *versus* valores del modelo recalibrado para el ácido ascórbico.

En el proceso de recalibrado del modelo cinético de la Rbf, se registraron resultados prometedores, dado que el SEP fue 0,04 mg/L, el CV = 2,40% y R^2 de 0,94. También se ajustaron la E_a y el factor preexponencial (A_0) resultando valores de 64,66 kJ·mol/K y 8521722 m^{-1} respectivamente. Se confirmaría que la E_a es un valor fiable, dado que se encuentra dentro de los valores reportados en la literatura (Tabla 2.3.4). La Figura 5.5.8 muestra que existe una adecuada distribución de los valores estimados, lo cual sugiere que de los modelos evaluados, este es el que mayor potencial de aplicación presenta para predecir la concentración de Rbf en leches sometidas a tratamiento térmico.

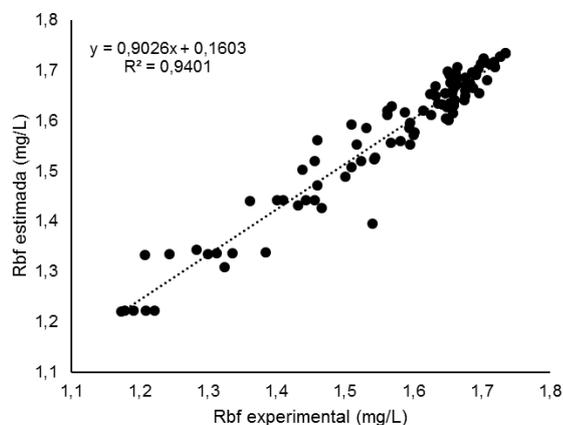


Figura 5.5.8. Representación gráfica de valores observados *versus* valores del modelo recalibrado para la riboflavina.

5.6 Validación y recalibrado de los modelos de fluorescencia para estimación del daño térmico en muestras procesadas en condiciones industriales

La aplicación de la espectroscopía de fluorescencia y la quimiometría son cada vez más interesantes para el análisis de procesos en la industria biotecnológica, farmacéutica y de alimentos (Faassen y Hitzmann, 2015). En esta última, está generando gran protagonismo, debido a las múltiples investigaciones en áreas tales como en leche (Botsoa et al., 2013; Ntakatsane et al., 2011), queso (Karoui et al., 2005), cerveza (Sikorska et al., 2008) y otros alimentos. Estas técnicas son herramientas cada vez más útiles para la determinación de la autenticidad y/o la detección de adulteración y predicción de la concentración de algunas sustancias en alimentos (Capuano et al., 2014).

La validación de los algoritmos es usada para predecir una o más propiedades (composición química, origen, evaluación sensorial, etc.) de las muestras no utilizadas para la obtención del modelo matemático. De tal forma, se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del sistema en estudio. Por esta razón la evaluación de la capacidad predictiva es un requerimiento muy importante (Nollet, 2004).

5.6.1 Validación de los modelos matemáticos a partir de compuestos fluorescentes

Los modelos de predicción de marcadores de daño térmico obtenidos a partir de compuestos fluorescentes validados en esta sección se corresponden con los presentados en el apartado 5.4.

Es preciso señalar que las mediciones de compuestos fluorescentes se realizaron con dos tipos de espectrofluorímetros (Sección 4.3) que proporcionan datos de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, dependientes de la configuración de cada equipo de medida. Por tanto, obviamente, las medidas del equipo portátil no podrían ser aplicadas directamente a los modelos matemáticos construidos en el apartado 5.4, ya que éstos fueron construidos con el equipo de sobremesa, siendo necesario convertir los datos de fluorescencia obtenidos en el equipo portátil si se espera utilizar los coeficientes de la calibración original. Por lo

tanto, es preciso buscar un factor de conversión que permita "traducir/normalizar" la intensidad del equipo portátil en relación a la correspondiente del equipo de sobremesa, para cada uno de los compuestos fluorescentes.

En la Tabla 5.6.1 se presentan los factores de conversión de los compuestos fluorescentes entre ambos equipos. La F_{Trp} , es la variable que mejor se correlaciona entre ambos equipos, lo que haría presumir que modelos que lleven sólo este predictor proporcionen predicciones que no sean significativamente diferentes. Sin embargo, la F_{Rbf450} es el compuesto que muestra bajos índices de correspondencia tales como un R^2 de tan sólo 0,03 por lo que, presumiblemente, las ecuaciones de predicción que incorporen este predictor presentarían menor fiabilidad.

Tabla 5.6.1. Parámetros de factor de proporcionalidad de medidas de fluorescencia entre ambos equipos.

	λ_{FTrp}	F_{Trp}	F_{CM}	F_{Rbf370}	F_{Rbf450}
R²	0,88	0,94	0,84	0,64	0,03
b	1,003±0,001	0,903±0,017	0,41±0,01	402,58±5,14	36,85±0,64

R², coeficiente de determinación; b; pendiente o factor de proporcionalidad; λ_{FTrp} , longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm; F_{Rbf450} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm.

En la Tabla 5.6.2 se recogen los principales descriptores estadísticos de los modelos validados para la estimación de la concentración del HMF. Se observa cómo dichos modelos logran un $R^2 > 0,9$, para el equipo de sobremesa excepto el modelo III que reporta un $R^2 = 0,84$, lo que indicaría una buena relación entre los valores experimentales y los estimados. Sin embargo, de acuerdo al SEP y al CV el modelo aún no sería adecuado para el uso práctico. La validación de la aplicación de los modelos de predicción de la concentración de HMF al fluorímetro portátil mostraron el mismo patrón que la validación en el equipo de sobremesa, pero con valores de ajuste ligeramente peores.

Tabla 5.6.2. Resultados de la validación de los modelos para la predicción del hidroximetilfurfural.

Modelos	Sobremesa			Portátil		
	R ²	SEP	CV	R ²	SEP	CV
I [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{T_{Tp}}$	0,94	9,77	96,27	0,92	9,21	91,93
II [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{T_{Tp}} + \beta_2 F_{CM}$	0,90	6,58	64,88	0,75	7,85	90,79
III [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{T_{Tp}} + \beta_3 F_{CM} + \beta_2 F_{Rb370}$	0,84	14,1	138,9	0,61	16,79	165,4

R², coeficiente de determinación; [HMF] ($\mu\text{mol/L}$), concentración de hidroximetilfurfural; SEP ($\mu\text{mol/L}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $F_{T_{Tp}}$, fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rb370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm.

En virtud a valores observados, el mejor modelo fué el II, que lleva como predictores la fluorescencia del triptófano ($F_{T_{Tp}}$) y la fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard (F_{CM}). A pesar de ser el mejor modelo puede apreciarse que todavía hay una gran discrepancia entre los valores estimados, destacando las muestras tratadas mediante UHT y esterilización en botella (Figura 5.6.1).

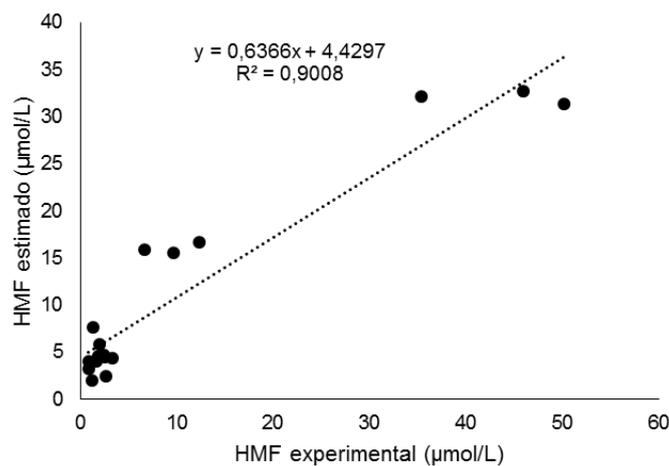


Figura 5.6.1. Valores experimentales versus estimados (modelo II) de la concentración del hidroximetilfurfural.

Los principales descriptores estadísticos de los modelos validados para la estimación de la concentración de $-SH$ se recogen la Tabla 5.6.3. Se observa que los tres modelos tienen un $R^2 < 0,9$. A pesar del buen valor en el coeficiente de determinación la validación de los modelos proporciona $CV > 34\%$, lo que indica que no son suficientemente fiables para ser aplicados a escala práctica. El modelo I podría calificarse como el mejor modelo por la simplicidad (un sólo predictor) y por los bajos índices de SEP y CV; sin embargo, el R^2 es menor respecto a los otros dos modelos. Como era de esperar la aplicación de dichos modelos para el equipo

portátil no fue satisfactorias a pesar del aparente coeficiente de determinación bueno, para el modelo II y III.

Tabla 5.6.3. Resultados de la validación de los modelos para la predicción de grupos sulfhidrilo.

Modelos	Sobremesa			Portátil		
	R ²	SEP	CV	R ²	SEP	CV
I [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM}$	0,76	0,32	34,70	0,46	0,37	40,3
II [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Trp}$	0,85	0,62	68,20	0,76	0,71	77,5
III [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 (F_{Trp} * \lambda_{FTrp})$	0,86	0,63	68,58	0,75	0,52	56,3

R², coeficiente de determinación; [-SH] ($\mu\text{mol/g}$), concentración de grupos sulfhidrilo totales; SEP ($\mu\text{mol/g}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; λ_{FTrp} , longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf267} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 267 nm.

Los modelos II y III mostraron menor eficacia ya que presentaron valores estimados negativos para las muestras esterilizadas en autoclave. Por tanto el modelo I resultó ser el mejor respecto a los demás, sin embargo muestra mayor nivel de error en muestras de leche UHT (subestimado) y dos valores del tratamiento de pasteurización alta (105°C, 2 s) que se encuentran por encima de la línea de equivalencia (Figura 5.6.2). Dichos resultados también incitan a seguir estudiando para obtener un modelo más robusto.

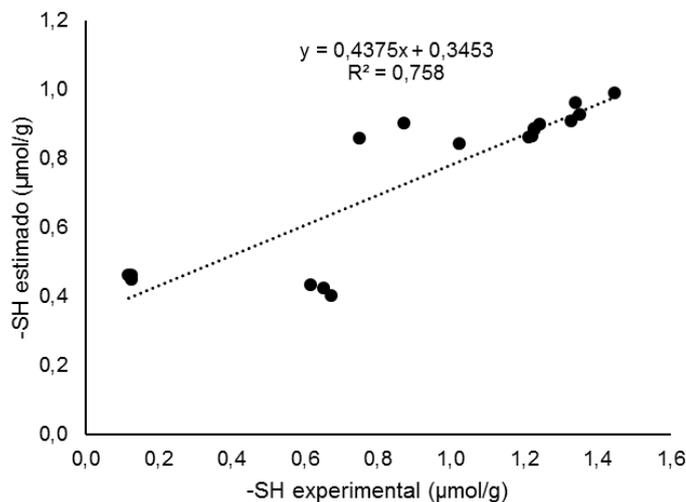


Figura 5.6.2. Valores experimentales *versus* estimados (modelo II) de la concentración de grupos sulfhidrilo.

Para el proceso de la validación de los modelos matemáticos para estimar el AA, se seleccionaron tres modelos matemáticos. Los modelos I y II pertenecen a los modelos generales (Tabla 5.4.4) y el III de la Tabla 5.5.3 corresponde a uno de los

modelos construido sólo a 90 °C. Los modelos I y II, indican una ausencia de correlación entre los valores observados y los estimados según los R²; mientras que el modelo III, que sólo lleva un predictor, es el mejor estimador del AA según muestran los indicadores (Tabla 5.6.4). Este mismo modelo resulto ser el mejor para el equipo portátil, lo cual era de esperar debido a la alta correlación existente de F_{Trp} entre ambos equipos, tal como ya se había anticipado en la sección. La dependencia de un sólo predictor beneficia el uso del modelo, gracias a su simplicidad.

Tabla 5.6.4. Resultados de la validación de los modelos para la predicción del ácido ascórbico.

Modelos	sobremesa			Portátil		
	R ²	SEP	CV	R ²	SEP	CV
I [AA]=β ₀ + β ₁ F _{Rbf370}	0,09	7,59	45,68	0,43	5,71	34,33
II [AA]=β ₀ + β ₁ F _{Rbf370} + β ₂ F _{Rbf450}	0,10	25,2	151,0	0,39	25,2	146,1
III [AA]=β ₀ + β ₁ F _{Trp}	0,81	2,82	16,95	0,71	3,88	23,18

R², coeficiente de determinación; [AA] (mg/L), concentración de ácido ascórbico; SEP (mg/L), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; F_{Trp}, fluorescencia del triptófano; F_{Rbf370}, fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm; F_{Rbf450}, fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm.

La observación de los valores estimados y observados muestra que el modelo III no sigue una distribución homogénea sobre el eje de equivalencia (Figura 5.6.3). Aunque los valores de ajuste no son malos, la aplicación del modelo necesitaría mejoras previas.

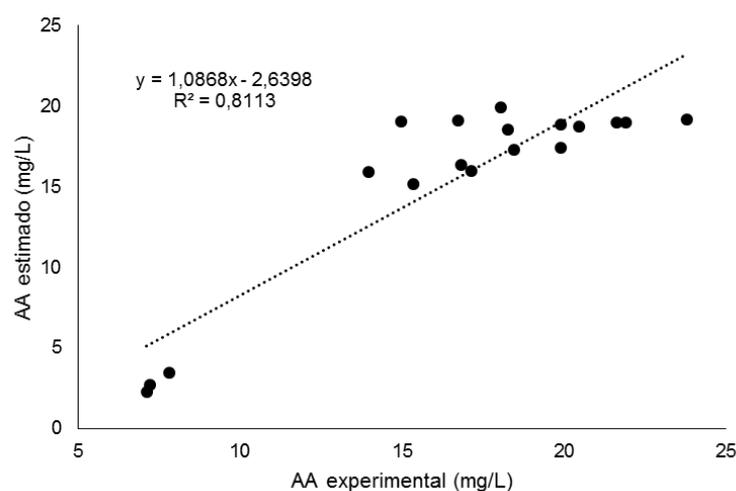


Figura 5.6.3. Valores experimentales *versus* estimados (modelo III) de la concentración del ácido ascórbico.

Para la predicción de la concentración de la Rbf se seleccionaron los tres mejores modelos: I, II y III que corresponden a los modelos matemáticos de la Tabla 5.4.6. En general, dichos modelos matemáticos que están recogidos en la Tabla 5.6.5 tienen un $R^2 < 0,60$. El modelo matemático I tiene el valor más alto R^2 . Los modelos II y III tienen CV menor que el modelo I cuando se aplican al equipo de sobremesa. Pero un análisis más detallado mostró que en realidad el modelo I fue el que mostro mejor ajuste en el rango de concentraciones de riboflavina estudiados.

Tabla 5.6.5. Resultados de la validación de los modelos para la predicción de riboflavina.

Modelos	Sobremesa			Portátil		
	R ²	SEP	CV	R ²	SEP	CV
I [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1\lambda_{F_{TTP}}$	0,53	0,39	31,13	0,59	0,39	31,09
II [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{TTP} + \beta_2F_{CM}$	0,47	0,33	26,48	0,53	0,42	33,53
III [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{TTP} + \beta_2F_{CM} + \beta_3\lambda_{F_{TTP}}$	0,47	0,32	26,03	0,52	0,40	32,00

R², coeficiente de determinación; [Rbf] (mg/L), concentración de riboflavina; SEP (mg/L), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $\lambda_{F_{TTP}}$, longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{TTP} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard.

La falta de un mejor ajuste podría deberse a la extrapolación del modelo construido con los resultados de los experimentos isoterms, así como al efecto matriz (modificaciones en el perfil de fluorescencia entre leche en polvo –usada para calibración- y leche cruda –empleada para validación-, y a la baja concentración de fluorescencia en las muestras de leche cruda (fuera del rango de calibración). El modelo fue construido con una concentración mínima de 1,33 mg de Rbf por litro. La leche desnatada cruda utilizada para procesar en condiciones industriales presento una concentración equivalente a la muestra con menor concentración en el conjunto de datos de calibración, mientras que la concentración más baja correspondió a la leche esterilizada en autoclave (1,04 mg/L). Por lo tanto, estos valores están fuera del intervalo de la observación original y están sujetas a una mayor incertidumbre y a mayor riesgo de producir resultados erróneos. De los resultados se sugiere proceder a un recalibrado para obtener un modelo más robusto.

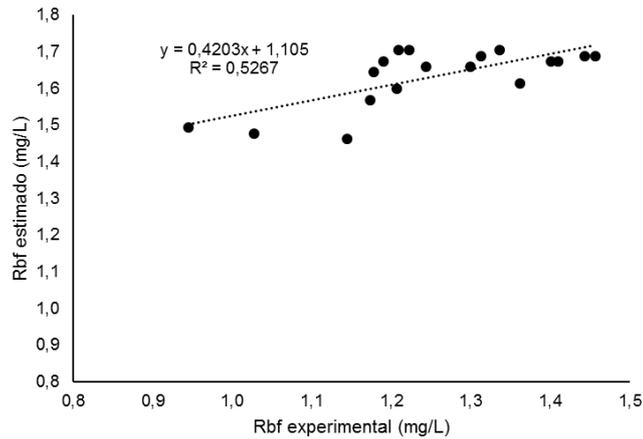


Figura 5.6.4. Valores experimentales *versus* estimados (modelo I) de la concentración de riboflavina.

En el equipo portátil se validó con las medidas de fluorescencia de las muestras procesadas en condiciones industriales, previamente corregidas en base un factor de conversión. En la mayoría de los casos resultaron ser menos eficaces que los aplicados sobre el equipo de sobremesa de acuerdo a los indicadores tales como R^2 , SEP y CV. Esto es lógico, ya que las medidas de fluorescencia en ambos equipos demuestran ser diferentes para los mismos compuestos p. ej. la F_{rbf450} entre ambos equipos tienen una correlación de 0,16. Estos resultados demuestran que en la mayoría de los casos no son aplicables los modelos construidos por un equipo de sobremesa; excepto, si el modelo lleva un solo predictor tal como podría ser la F_{trp} que tienen una correlación de 0,97. Por consiguiente, se sugiere calibrar los modelos independientemente para cada equipo.

5.6.2 Recalibrado de modelos de fluorescencia para predicción de daño térmico en el equipo de sobremesa

Este apartado tiene la finalidad de mejorar los modelos matemáticos que fueron seleccionados para su respectiva validación, mediante ajuste de los coeficientes de regresión. Para este procedimiento se procedió a agregar el conjunto de datos de las muestras procesadas en condiciones industriales (temperaturas altas y tiempos cortos –set de validación–) al conjunto de datos del sistema modelo (set de calibración inicial), ampliando así el rango y el número de observaciones con el fin de perfeccionar y mejorar los indicadores estadísticos, a la vez que se evita la extrapolación.

La Tabla 5.6.6 muestra los indicadores estadísticos y los coeficientes corregidos de las ecuaciones lineales del recalibrado de los modelos para HMF. En el calibrado el CV fue menor al 20%; pero al recalibrarlos estos indicadores no mejoran, lo cual se atribuye, por una parte a posibles diferencias en el perfil de fluorescencia entre la leche en polvo empleada en la calibración inicial y la leche cruda tratada en condiciones industriales (set de validación) y por otra a los amplios rangos de concentración de HMF en leche. Por ej., la leche cruda contenía sólo 1,5 µmol/L, mientras que su concentración en leche esterilizada procesada en autoclave fue 43,84 µmol/L en promedio.

Tabla 5.6.6. Nuevos indicadores y coeficientes del modelo recalibrado para predecir la concentración del hidroximetilfurfural.

	Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R ²	SEP	CV
I	[HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}}$	59,0*	-0,49*	-	-	0,87	4,52	38,50
II	[HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}} + \beta_2 F_{\text{CM}}$	26,6	0,03*	-0,40*	-	0,90	3,96	33,69
III	[HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}} + \beta_2 F_{\text{CM}} + \beta_3 F_{\text{Rbf370}}$	22,3	-0,42*	0,03	0,03	0,91	3,96	33,71

N=32; R², coeficiente de determinación; SEP (µmol/L), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; β_0 - β_3 , coeficientes de regresión; [HMF] (µmol/L), concentración del hidroximetilfurfural; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; F_{Rbf370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm; *p<0,05.

La Figura 5.6.5 refleja la estimación de la concentración del HMF a partir del modelo II del cuadro anterior, dicho modelo fue seleccionado por su simplicidad ya que sólo lleva dos predictores. En la gráfica se observan varios grupos que corresponden a: leche esterilizada en autoclave (aquellos que tienen concentraciones mayores de ~35 µmol/L), leche UHT (las concentraciones que se ubican en el medio de la línea de equivalencia) y leche en polvo que van desde 8 a 25 µmol/L, finalmente, las muestras con baja concentración de HMF conciernen al resto de las muestras.

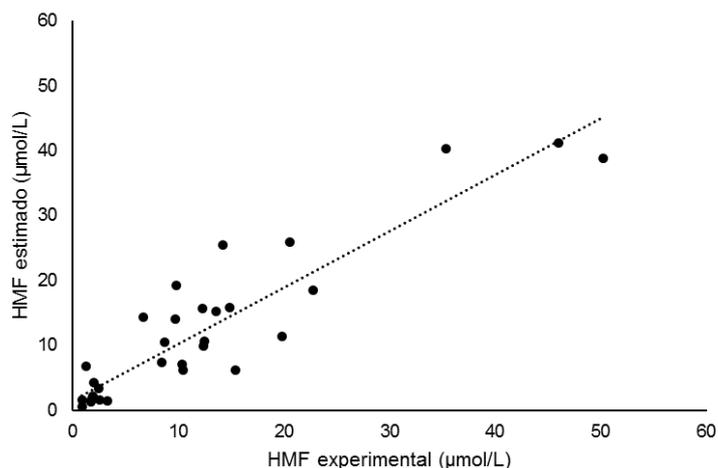


Figura 5.6.5. Representación gráfica del modelo II versus concentración experimental del hidroximetilfurfural.

La Tabla 5.6.7 refleja los nuevos coeficientes e indicadores de los modelos recalibrados en relación con los grupos –SH. En los modelos recalibrados tanto el CV como el SEP fueron mayores respecto a los modelos calibrados a partir de las muestras del sistema modelo (Tabla 5.4.2). Este incremento de los indicadores es probablemente debido, como en el caso del HMF, a las diferencias de perfil de fluorescencia entre las dos matrices consideradas y a la ampliación del rango de concentraciones de –SH, incluyendo tanto tratamientos muy intensos como la esterilización o tratamientos en continuo a tiempos cortos.

Tabla 5.6.7. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración de grupos sulfhidrido.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	R^2	SEP	CV
I $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM}$	3,29*	-0,003*	-	0,61	0,21	23,59
II $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 F_{Trp}$	1,64*	-0,002*	-0,007*	0,70	0,19	20,91
III $[-SH]=\beta_0 + \beta_1 F_{CM} + \beta_2 (F_{Trp} * \lambda_{Ftrp})$	1,73*	-0,002*	$1,9 \times 10^{-5}$ *	0,69	0,19	21,13

N=32; R^2 , coeficiente de determinación; SEP ($\mu\text{mol/g}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [-SH] ($\mu\text{mol/g}$), grupos sulfhidrido totales; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; λ_{Ftrp} , longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; * $p < 0,05$

El mejor modelo matemático seleccionado fue el II por tener un R^2 mayor que el resto, incluyendo además sólo dos predictores (F_{CM} y F_{Trp}). En la Figura 5.6.6 se observa un grupo de valores por encima de la línea de regresión, que corresponden todos a las muestras del sistema modelo, mientras que todas las muestras situadas por debajo de la línea de regresión corresponden a las muestras procesadas en condiciones industriales. Esta distribución de observaciones (y su linealidad)

sugieren claramente que la recalibración en condiciones industriales y con un número ampliado de observaciones permitiría utilizar dicho modelo de predicción. En este sentido, si la recalibración se hubiese abordado sólo con los datos procesados en condiciones industriales, se habría obtenido un $R^2 = 0,87$, $SEP = 0,15 \mu\text{mol/g}$ y un $CV = 17,29\%$.

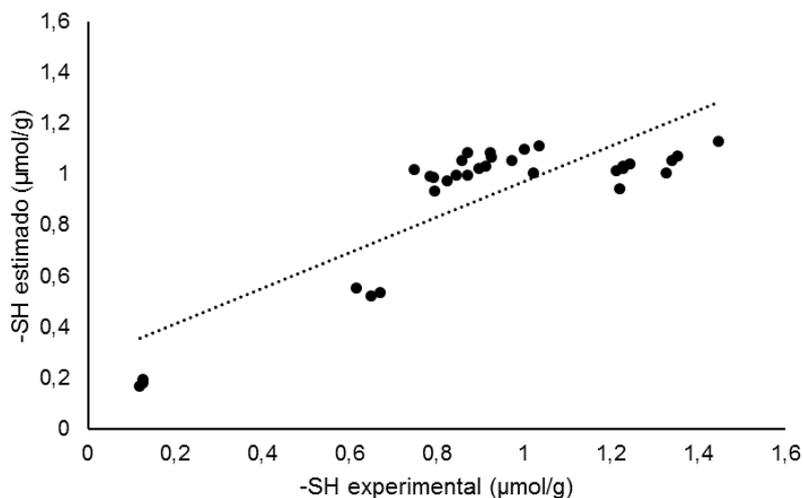


Figura 5.6.6. Representación gráfica de valores del modelo II versus valores experimentales de grupos sulfhidrilo.

En la Tabla 5.6.8 se presenta los nuevos indicadores y coeficientes de los modelos de predicción de la concentración del AA. Dos de ellos pertenecen a los modelos generales (Tabla 5.4.4) y el tercero al grupo de 90 °C (Tabla 5.4.3). En general, los dos primeros modelos presentan indicadores similares respecto a los modelos calibrados. En los casos anteriores se tendía a observar un leve empeoramiento en la recalibración, que en este caso no se produce probablemente porque el principal indicador, que es la F_{Rb1370} , tiene una relación inversamente proporcional con AA de $r = -0,95$ ($p < 0,0001$) en muestras sometidas a tratamientos térmicos en condiciones industriales. La ausencia de mejora durante la calibración probablemente se deba a las mismas razones argumentadas para HMF y -SH. El modelo III resulta ser el más fiable para predecir la concentración del AA.

Tabla 5.6.8. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración del ácido ascórbico.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	R^2	SEP	CV
I [AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370}^b$	83,4*	-0,22*	-	0,59	2,49	16,71
II [AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370} + \beta_2 F_{Rbf450}^b$	83,4*	-0,22*	$3,5 \times 10^{-4}$	0,59	2,50	16,80
III [AA]= $\beta_0 + \beta_1 F_{Trp}^a$	-2,10	0,18*	-	0,83	1,84	12,35

^aN = 45; ^bN = 99; R^2 , coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [AA], concentración del ácido ascórbico; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{Rbf370} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 370 nm F_{Rbf450} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; * $p < 0,05$

El modelo III tiene la ventaja de ser más fácil de implementar en la práctica habitual, por llevar un sólo predictor. Cabe destacar que en el calibrado, este modelo matemático ya contaba con un $R^2 = 0,95$ pero al añadir las muestras industriales para su recalibrado dicho valor disminuyó a un $R^2=0,83$. Este ligero descenso se debe a la leve disminución de la correlación entre la concentración del AA y F_{Trp} ($r=0,90; p < 0,0001$) en las muestras procesadas en condiciones industriales, respecto al valor $r = 0,95$ ($P < 0,0001$) en las muestras del sistema modelo. En la Figura 5.6.7 se muestra la distribución de los valores estimados contra los valores experimentales.

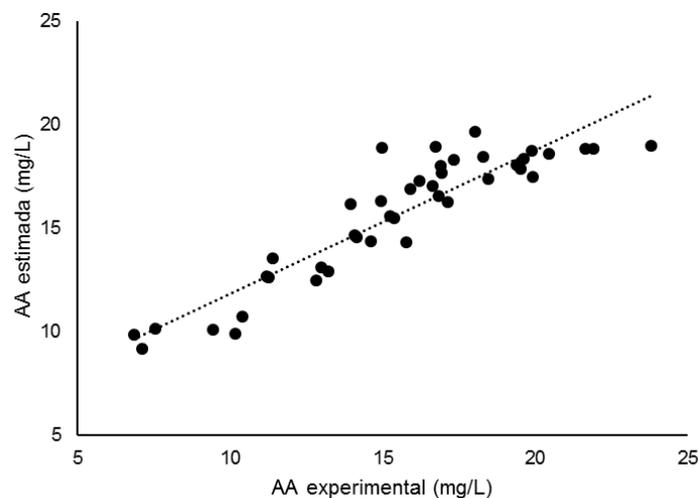


Figura 5.6.7. Representación gráfica valores del modelo III versus valores experimentales del ácido ascórbico.

En la Tabla 5.6.9 se aprecia los indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para estimar la riboflavina. Se observa un incremento tanto en el SEP como en CV respecto a los modelos calibrados (Tabla 5.4.6). Este incremento probablemente podría ser explicado con los mismos argumentos ya expuestos para

HMF, –SH y AA. En leche en polvo la concentración de Rbf se encuentra en un rango de 1,33 a 1,72 mg/L; sin embargo, los valores en la leche cruda sometida a tratamientos industriales resultaron ser menores de 1,33 mg/L.

Tabla 5.6.9. Nuevos indicadores y coeficientes de los modelos recalibrados para predecir la concentración de la riboflavina.

Modelos matemáticos	β_0	β_1	β_2	β_3	R ²	SEP	CV
I [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1\lambda_{F_{Trp}}$	6,26*	-0,013*	-	-	0,16	0,16	10,41
II [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{Trp} + \beta_2F_{CM}$	1,86*	0,005*	-0,001*	-	0,45	0,13	8,46
III [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1F_{Trp} + \beta_2F_{CM} + \beta_3\lambda_{F_{Trp}}$	1,65	0,005*	-0,001*	0,0005	0,45	0,13	8,51

N = 99; R², coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [RBF], concentración de riboflavina; $\lambda_{F_{Trp}}$, longitud de onda de máxima intensidad de la fluorescencia del triptófano; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; *p<0,05

En la Figura 5.6.8 se reflejan los valores estimados del modelo II *versus* datos experimentales. Se observan con nitidez dos grupos, el conjunto de datos que se encuentran cerca de la línea de equivalencia corresponde, a los datos del sistema modelo, mientras los datos con mayor dispersión pertenecen a la leche procesada industrialmente. Es muy probable que la recalibración con un número de observaciones suficientemente grande permitiría mejorar el modelo de predicción, especialmente teniendo en cuenta que con la recalibración actual ya se obtiene un CV<10%.

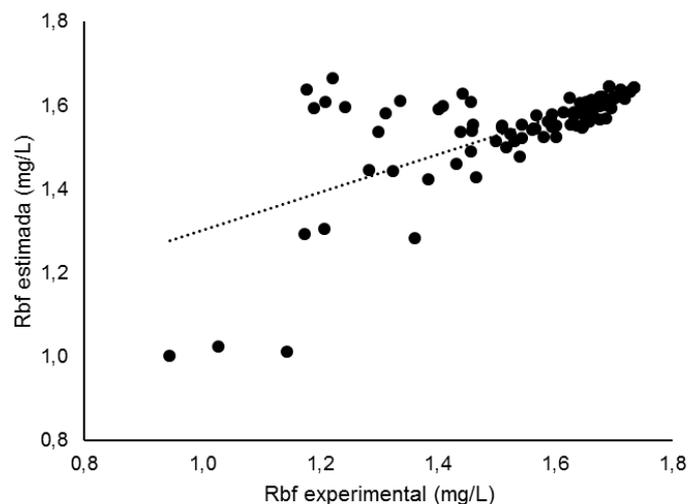


Figura 5.6.8. Representación gráfica de valores del modelo II versus valores experimentales de riboflavina.

5.7 Calibración y validación cruzada para el equipo portátil

En este apartado se realizó el recalibrado (generación de nuevos modelos de predicción) y su respectiva validación cruzada “*leave on out*” para los datos ópticos obtenidos mediante el fluorímetro portátil a partir de muestras con procesamiento industrial. Esta recalibración se planteó en virtud de las limitaciones observadas en la validación de los modelos y, especialmente teniendo en consideración el potencial de aplicación *inline* del fluorímetro portátil. La técnica de validación cruzada genera confianza para ensayar el potencial de predicción de los modelos matemáticos. Wong (2015) indica, que la validación cruzada se debe adoptar cuando el número de casos es pequeño, aprovechando al máximo el número de casos, para obtener un cálculo de valores estimados tan preciso como sea posible.

En la Tabla 5.7.1 se muestran tres modelos matemáticos calibrados hasta con tres predictores para la predicción de cada marcador térmico. En los algoritmos para la predicción de la concentración del HMF el predictor principal es F_{Trp} , probablemente debido a la relación inversa con [HMF] ($r = -0,96$; $p < 0,0001$) en muestras procesadas en condiciones industriales. Esta clara dependencia entre este compuesto y la fluorescencia del triptófano también se observó en el calibrado del sistema modelo (Tabla 5.4.1).

En los modelos, el predictor principal para estimar [-SH] (Tabla 5.7.1) es λ_{FTrp} que según la correlación de Pearson está directamente correlacionado con [-SH] con un $r = 0,94$ ($p < 0,0001$). Sin embargo, en muestras del sistema modelo (Tabla 5.4.2) este predictor sólo tiene una correlación de $r = -0,41$ con relación a la degradación de -SH. Esto explica por qué este predictor aparece en esta nueva calibración cuando estaba ausente de la calibración que se obtuvo con muestras del sistema modelo en el equipo de sobremesa.

En el caso de los modelos matemáticos para la estimación del AA (Tabla 5.7.1), en muestras procesadas en condiciones industriales se observa que el predictor principal es el λ_{FTrp} . Dicho parámetro tiene relación directa con el [AA] con un $r = 0,92$ ($p < 0,0001$). Este resultado concuerda con lo observado en el tratamiento térmico a 90 °C de leche en polvo desnatada reconstituida donde λ_{FTrp} tuvo una correlación directa con el AA de $r = -0,83$ ($P < 0,0001$), pero no fue seleccionado como un

indicador principal del AA en los modelos generales (Tabla 5.4.4). Esto probablemente fue debido a que a tratamientos térmicos de 70 °C no se aprecia el cambio de longitud de onda de la emisión máxima de fluorescencia del triptófano y esto pudo hacer que el indicador no fuese relevante para el conjunto de datos de calibración inicial.

En relación con los modelos calibrados para la estimación de la Rbf (Tabla 5.7.1) en muestras procesadas en condiciones industriales, el predictor F_{Rbf370} es el más importante. La F_{Rbf370} tiene una relación inversamente proporcional con la concentración de riboflavina de $r=-0,80$ ($p<0,0001$).

Tabla 5.7.1. Modelos matemáticos calibrados para el equipo portátil.

Modelos matemáticos		β_0	β_1	β_2	β_3
I	$[HMF]=\beta_0 + \beta_1 F_{Trp}$	57,06*	-0,54*	-	-
II	$[HMF]=\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{Rbf370}^2$	93,27*	-0,68*	-1,59E-9	-
III	$[HMF]=\beta_0 + \beta_1 F_{Trp} + \beta_2 F_{Rbf370}^2 + \beta_3 F_{Rbf450}^{-1}$	146,9*	-0,72*	-2,50E-9*	-226061
I	$[-SH]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^{-1}$	-32,85*	11609*	-	-
II	$[-SH]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^{-1} + \beta_2 F_{Rbf450}^2$	-28,52*	10369*	-1,82E-8*	-
III	$[-SH]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^{-1} + \beta_2 F_{Rbf450}^2 + \beta_3 \lambda_{FTrp}$	-31,80	10937	-1,82E-8*	4,7E-3
I	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^2$	194,32*	-0,001*	-	-
II	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^2 + \beta_2 F_{Rbf370}^{-1}$	230,94*	-0,002*	-1319764	-
III	$[AA]=\beta_0 + \beta_1 \lambda_{FTrp}^2 + \beta_2 F_{Rbf370}^{-1} + \beta_3 F_{Trp}^{-1}$	190,71*	-0,001*	-2555009*	-211,42*
I	$[Rbf]=\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370}^2$	1.89*	-4.19E-11*	-	-
II	$[Rbf]=\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370}^2 + \beta_2 \lambda_{FTrp}^{-1}$	-2.27	-2.71E-11*	1352.5	-
III	$[Rbf]=\beta_0 + \beta_1 F_{Rbf370}^2 + \beta_2 \lambda_{FTrp}^{-1} + \beta_3 \lambda_{FTrp}$	-475.71	-4.21E-11*	82747	0.69

N=18; R^2 , coeficiente de determinación; SEP ($\mu\text{mol/L}$), error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; $\beta_0 - \beta_3$, coeficientes de regresión; [HMF] ($\mu\text{mol/L}$), concentración de hidroximetilfurfural; [-SH] ($\mu\text{mol/g}$), concentración de grupos sulfhidrilo totales; [AA] (mg/L), concentración del ácido ascórbico; [Rbf] (mg/L), concentración de riboflavina; F_{Trp} , fluorescencia del triptófano; λ_{FTrp} , longitud de onda de máxima emisión de la intensidad de fluorescencia del triptófano; F_{Rbf370} , fluorescencia de riboflavina a una excitación de 370 nm; F_{Rbf450} , fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; F_{CM} , fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard; * $p<0,05$

En la Tabla 5.7.2 se detallan los indicadores tanto del calibrado como de la validación cruzada de los cuatro marcadores de daño térmico. En general se aprecia una similitud de los CV de calibración y validación cruzada de los algoritmos construidos. El HMF fue el compuesto que resultó con mayor CV que el resto, esto probablemente por la amplitud de los valores de dicho compuesto que se registraron en las muestras de leche sometidas a condiciones industriales. La leche esterilizada en autoclave fue la de más alto valor, con 43,85 $\mu\text{mol/L}$. Estos modelos presentan mayor fiabilidad y precisión que los modelos obtenidos por el sistema

modelo, dado que el CV de la validación fue superior al 90% (Tabla 5.6.2), mientras los modelos específicos para el equipo portátil registran valores menores del 45%. El modelo I podría ser seleccionado como el mejor modelo para predecir la cantidad de HMF debido a que cuenta sólo con un predictor lo cual facilita la estimación, siendo el valor del SEP (1,51 $\mu\text{mol/L}$) menor que el resto.

Los indicadores de la validación cruzada de los modelos matemáticos para estimar el -SH, ofrecen CV < 17%, valores que están por debajo de los valores registrados para los modelos matemáticos del sistema modelo que fueron > 30% (Tabla 5.6.3). Estos resultados sugieren que los modelos construidos específicamente para el equipo portátil son más precisos de acuerdo a los índices de validación (Tabla 5.7.2).

Tabla 5.7.2. Indicadores matemáticos de los modelos calibrados y validados para la predicción del daño térmico en leche desnatada.

Modelos matemáticos	calibrado			validación		
	R ²	SEP	CV	R ²	SEP	CV
I [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}}$	0,92	4,55	44,80	0,87	1,51	44,67
II [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}} + \beta_2 F_{\text{Rbf}370^2}$	0,93	4,37	43,02	0,86	1,85	42,73
III [HMF]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Trp}} + \beta_2 F_{\text{Rbf}370^2} + \beta_3 F_{\text{Rbf}450^{-1}}$	0,94	4,14	40,70	0,87	2,15	40,42
I [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^{-1}$	0,89	0,15	16,74	0,86	0,05	16,75
II [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^{-1} + \beta_2 F_{\text{Rbf}450^2}$	0,92	0,14	14,96	0,89	0,06	14,95
III [-SH]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^{-1} + \beta_2 F_{\text{Rbf}450^2} + \beta_3 \lambda_{\text{Ftrp}}$	0,92	0,04	15,29	0,88	0,07	15,52
I [AA]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^2$	0,84	2,03	12,22	0,81	0,70	12,22
II [AA]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^2 + \beta_2 F_{\text{Rbf}370^{-1}}$	0,85	2,00	12,04	0,80	0,88	12,04
III [AA]= $\beta_0 + \beta_1 \lambda_{\text{Ftrp}}^2 + \beta_2 F_{\text{Rbf}370^{-1}} + \beta_3 F_{\text{Trp}^{-1}}$	0,90	1,76	10,56	0,80	0,94	10,52
I [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Rbf}370^2}$	0,65	0,08	6,73	0,54	0,028	6,70
II [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Rbf}370^2} + \beta_2 \lambda_{\text{Ftrp}}^{-1}$	0,69	0,08	6,48	0,53	0,035	6,46
III [Rbf]= $\beta_0 + \beta_1 F_{\text{Rbf}370^2} + \beta_2 \lambda_{\text{Ftrp}}^{-1} + \beta_3 \lambda_{\text{Ftrp}}$	0,75	0,07	6,02	0,53	0,039	5,98

N = 18; R², coeficiente de determinación; SEP (mg/L) error estándar de predicción; CV (%), coeficiente de variación; [HMF] ($\mu\text{mol/L}$), concentración de hidroximetilfurfural; [-SH] ($\mu\text{mol/g}$), concentración de grupos sulfhidrilo totales; [AA] (mg/L), concentración del ácido ascórbico; [Rbf] (mg/L), concentración de riboflavina; F_{Trp}, fluorescencia del triptófano; λ_{Ftrp} , longitud de onda de máxima emisión de la intensidad de fluorescencia del triptófano; F_{Rbf370}, fluorescencia de riboflavina a una excitación de 370 nm; F_{Rbf450}, fluorescencia de la riboflavina a una longitud de onda de excitación de 450 nm; F_{CM}, fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard.

La validación cruzada de los algoritmos para predecir la concentración del AA en muestras de leche desnatada procesadas en condiciones industriales, registraron CV < 12,5%. Estos resultados son ligeramente menores a lo obtenido en la validación (Tabla 5.6.4) del modelo III que resulto CV = 16,95%. De nuevo, los

resultados permiten concluir que estos modelos podrían ser adecuados para el uso habitual de estimación de AA (Tabla 5.7.2).

En la Tabla 5.7.2 se muestran los resultados de los análisis de la validación cruzada de los modelos para la predicción de la Rbf, en leches procesadas en condiciones industriales. Los CV obtenidos son menores del 7%, valor que resultó ser casi cuatro veces menor que la validación de los modelos obtenidos del sistema modelo, que reflejaron ser superiores al 26% (Tabla 5.6.5). No obstante, estos modelos precisan seguir siendo perfeccionando mediante la incorporación de más observaciones de calibración previamente a su aplicación industrial dada su bajo $R^2 < 0,55$.

Capítulo 6

6 Cuantificación rápida de riboflavina en leche mediante fluorescencia “*front-face*”

RESUMEN

Se utilizó la técnica de espectroscopía de fluorescencia “*front-face*” (FFF) para la predicción rápida de la concentración de riboflavina (Rbf) en leche sin preparación previa de la muestra. El trabajo se desarrolló en dos etapas: una de calibración y la otra de validación del modelo de predicción. Así mismo se comparó con otros dos métodos convencionales de cuantificación basados en HPLC. Con calibración por adición estándar de riboflavina en leche desnatada (*low-heat*) reconstituida al 12% (w/w) con agua destilada, se observó que la intensidad de fluorescencia aumentaba a medida que la concentración de riboflavina era mayor, existiendo una relación lineal directa. En la validación del método se obtuvo un $R^2 = 0,99$ con un error estándar de predicción SEP = 0,16 mg/L. Los resultados obtenidos sugieren el uso potencial de la FFF como método inmediato y sencillo de cuantificación de riboflavina con uso potencial para determinaciones rápidas de laboratorio, así como para monitorización *inline* durante el procesado de leche.

Palabras clave – fluorescencia “*front-face*”, leche, riboflavina, predicción, cuantificación.

6.1 Introducción

Se han desarrollado diversos métodos para la identificación y cuantificación de la riboflavina en la leche. Entre ellos se encuentran: HPLC-FLD (Sunaric et al., 2012), HPLC-UV-Vis (Albala-Hurtado et al., 1997), microbiológicos (Bueno-Solano et al., 2009) y espectrofluorimétricos (AOAC official method 970.65). Todos ellos requieren la preparación, extracción y limpieza de muestra. Algunos de ellos, además, tienen baja especificidad y un tiempo de análisis largo (Esteve et al., 2001) y también necesitan de equipos sofisticados, reactivos costosos y personal cualificado (Zaïdi et al., 2008).

La espectroscopía de FFF es una técnica analítica que está siendo aplicada como una herramienta cuantitativa en varias áreas de la ciencia de los alimentos, como la industria cervecera (Sikorska et al., 2008), pesquera (Hassoun y Karoui, 2015), jugos de naranja y pomelo (Ammari et al., 2014), cereales y panificación (García

et al., 2016), cárnica (Sahar y Dufour, 2015), aceite de oliva (Kassouf et al., 2014) y láctea (Wold et al., 2015). Ofrece un gran potencial para el desarrollo de técnicas analíticas rápidas, no destructivas y con alta sensibilidad y especificidad (Miquel Becker et al., 2003) para la identificación y caracterización de diferentes micronutrientes y analitos directamente en alimentos.

La riboflavina o vitamina B₂ es una vitamina hidrosoluble que presenta fluorescencia nativa, propiedad que podría permitir la monitorización de los cambios asociados al procesado de los alimentos que la contienen, facilitando no sólo el uso de FFF para cuantificación rápida “*in situ*” de riboflavina sino también su uso como marcador rápido para desarrollo de sensores de control de proceso *inline*. Esta metodología posibilitaría el uso sencillo de sistemas de detección por fluorescencia, que no requiere de personal altamente cualificado, siendo económicamente rentable. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la cuantificación de riboflavina en leche mediante FFF sin previa manipulación de muestra.

6.2 Materiales y métodos

La metodología consistió en dos etapas. La primera etapa consistió en desarrollar y validar el modelo matemático, descrito en la sección del plan de trabajo en la Figura 3.2.4. Esta etapa se realizó en dos partes: a) preparación de un set de muestras de calibración mediante adición creciente de vitamina B₂ en leche (0, 1, 1,5, 2, 2,5, y 3 ppm); y b) preparación de un segundo set de validación (0, 0,3, 0,7, 1,2, 1,8, 2,1, 2,4 y 2,7 ppm de vitamina B₂ añadida a la leche). Se prepararon tres réplicas independientes de cada concentración. En esta etapa se utilizó leche en polvo desnatada “*low heat*” reconstituida al 12% (w/w) con agua destilada con un contenido inicial de riboflavina de 1.824 ppm.

Las determinaciones de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofotómetro sobremesa (Figura 4.1.2A) tal como se detalla en la sección 4.3. La longitud de onda de excitación fue de 370 nm y la longitud de emisión fue 530 nm.

En la segunda etapa se contrastó la validez del modelo matemático con leche comercial: leche desnatada en polvo (LPD) y UHT de varias marcas (Figura 3.2.5). Se midió la concentración de Rbf mediante el método de HPLC de Albala-Hurtado et al. (1997) y las mismas muestras se analizaron también por un laboratorio

certificado por el método (HPLC) siguiendo el método usado por Bueno-Solano et al. (2009). Finalmente, se estimó la cantidad de Rbf mediante el modelo desarrollado en la etapa uno a partir de la medida de fluorescencia.

La medida de fluorescencia en leches desnatadas se midió sin previa preparación de muestra, mientras que las muestras de leche entera fueron centrifugadas en un equipo modelo 4K-15,SN.93250 (Sigma laboratory centrifuge, Osterode am Harz - Germany) a 2500 RPM durante 20 min con el propósito de separar la grasa.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Resultados de la calibración del método

La Figura 6.3.1 muestra la relación entre la fluorescencia y la concentración de riboflavina (vitamina adicionada más contenido inicial) en leche desnatada. El rango de concentraciones empleado fue seleccionado en base al contenido habitual de riboflavina en la leche reportado en diferentes investigaciones científicas (Nohr et al., 2011). La intensidad de fluorescencia y la concentración de Rbf tienen una relación directa, resultando una recta de calibración lineal con un coeficiente de correlación, $R^2 = 0,98$.

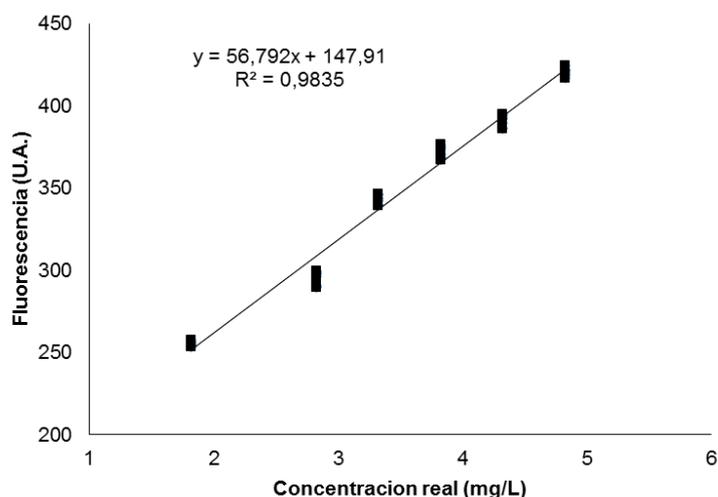


Figura 6.3.1. Recta de calibración a concentraciones conocidas de riboflavina en leche reconstituida desnatada.

Para la construcción de este modelo se partió del modelo lineal relacionando la intensidad de fluorescencia y la concentración de la riboflavina en leche desnatada reconstituida. Por consiguiente, la ecuación es: $F=56,79 \cdot [Rbf] + 147,92$. Este último

valor es el intercepto, lo que indicaría que la leche sin presencia de riboflavina ya contribuye con 147,92 u.a. de fluorescencia. Este valor se atribuye a la fluorescencia residual que no corresponde a la señal de la Rbf, y por lo tanto la restaremos para calcular su concentración.

6.3.2 Resultados de la validación del método

En la Figura 6.3.2 se presenta la cantidad de riboflavina estimada respecto a la riboflavina contenida en las muestras. El coeficiente de correlación fue $R^2 = 0,99$, con un error estándar de predicción (SEP) de 0,13 ppm y un coeficiente de validación (CV) de 4,14%. Además, se realizó la prueba de t-Student a un nivel de significación de $\alpha = 0,05$, indicando que existe una correlación lineal significativa entre los valores de reales respecto a su predicción, por lo tanto, el modelo obtenido se acepta como válido.

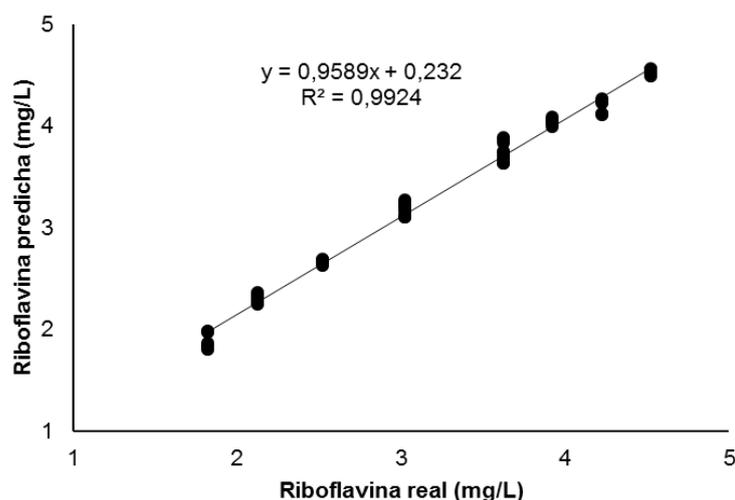


Figura 6.3.2. Relación entre los valores de riboflavina estimada y real.

Una vez validado el método se ha decidido reunir el conjunto de datos de calibración con el de validación para obtener un modelo más robusto. En este proceso se detectó un punto que se identificó como *outlier* y se eliminó de los análisis posteriores.

El modelo para predecir la concentración de la riboflavina en leche obtenido a partir del conjunto de calibración ampliado es:

$$[\text{Rbf}] = \frac{F_{370;530} - 160,4}{54,42},$$

Dónde: Rbf, mg/L; $F_{370;530}$, fluorescencia de la riboflavina a una excitación de 370 nm y emisión 530 nm.

6.3.3 Resultados del contraste de diferentes métodos de cuantificación de riboflavina

En la Tabla 6.3.1 se presentan los valores de riboflavina presentes en las diferentes muestras de leches desnatadas comerciales en polvo y líquida UHT analizados mediante tres métodos diferentes. El contenido encontrado de riboflavina en las leches (LDP-1, LDP-2, UHT-1 y UHT-2) no fue significativamente distinto ($p < 0,05$) al analizarlo mediante los tres métodos, excepto en la leche LDP-3, que corresponde a un producto enriquecido con calcio y vitamina K. En este caso el método 1 (FFF) es significativamente distinto respecto a los métodos 2 y 3 (HPLC-UAB y HPLC-laboratorio externo certificado). El enriquecido con calcio orgánico afecta al balance de la leche y hace que la calibración obtenida con leche en polvo sin enriquecer pierda validez. También se observa que el contenido de riboflavina en las muestras de leche LDP y UHT son ligeramente menores respecto a lo mencionado por Moreiras et al. (2013), que atribuyen valores de 2,04 y 1,7 mg/L respectivamente. Pero nuestros resultados se encuentran dentro del amplio rango de datos bibliográficos encontrado.

Tabla 6.3.1. Cuantificación de la riboflavina en leches desnatadas en polvo (LDP) y UHT comerciales por diferentes métodos.

Métodos	LDP-1		LDP-2		LDP-3		UHT-1		UHT-2	
	X ^c	S.D								
Método 1	1,69 ^a	0,05	1,70 ^a	0,03	1,84 ^a	0,01	1,22 ^a	0,01	1,26 ^a	0,01
Método 2	1,72 ^a	0,01	1,66 ^a	0,02	1,57 ^b	0,03	1,26 ^a	0,01	1,25 ^a	0,05
Método 3	1,82 ^a	0,12	1,62 ^a	0,11	1,54 ^b	0,11	1,30 ^a	0,20	1,30 ^a	0,20

^c Promedio de tres replicas (mg/L); ^{a,b} Las medidas seguidas por diferente subíndice representan diferencia significativa entre métodos ($p < 0,05$); LDP, leche desnatada en polvo; UHT, leche Ultra High Temperature (UHT); método 1; FFF; método 2, HPLC (UAB); método 3, HPLC (laboratorio externo certificado).

En la Tabla 6.3.2 se reflejan los valores de riboflavina en las muestras UHT enteras comerciales, analizados mediante los tres distintos métodos aplicados. Existe una diferencia significativa entre el primer método (FFF) y los demás (HPLC). Esto fue atribuido al alto contenido de la grasa en la muestra, que incrementa la intensidad de fluorescencia (nótese que la calibración se realizó con leche desnatada en polvo). Para evitar esta interferencia se centrifugaron las muestras antes de

cuantificar mediante fluorescencia *front-face*. Haciendo nuevamente las comparaciones estadísticas se encontró que no existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los métodos, una vez eliminado el efecto de la grasa.

Tabla 6.3.2. Cuantificación de la riboflavina en leches enteras comerciales (UHT) por diferentes métodos.

Métodos	Sin centrifugar				Centrifugado			
	UHT-1		UHT-2		UHT-1		UHT-2	
	X ^c	S.D						
Método 1	1,79 ^a	0,06	1,87 ^a	0,10	1,31 ^a	0,03	1,35 ^a	0,06
Método 2	1,29 ^b	0,04	1,24 ^b	0,06	1,29 ^a	0,04	1,24 ^a	0,06
Método 3	1,40 ^b	0,20	1,30 ^b	0,20	1,40 ^a	0,20	1,30 ^a	0,20

^c Promedio de tres replicas (mg/L); ^{a,b} Las medidas seguidas por letras subíndices que representan diferencia significativa entre métodos ($p < 0,05$); método 1; FFF; método 2, HPLC (UAB); método 3, HPLC (laboratorio externo certificado).

Los niveles de riboflavina obtenidos en la leche entera UHT en nuestra investigación son similares a los obtenidos por Amador-Espejo et al. (2015) y Muñoz et al. (1994) que fueron 1,29 y 1,23 mg/L respectivamente. Sin embargo, Sunaric et al. (2012) encontraron valores de hasta 1,81 mg/L, valor que es ligeramente mayor a los resultados encontrados. Estas diferencias en las concentraciones de riboflavina en la leche pueden deberse al tipo leche en polvo (desnatada) y líquida UHT (desnatada y entera) analizada, influida por factores tales como: la raza, la estación del año, alimentación, etc.

6.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren el uso potencial de la FFF como método inmediato y sencillo de cuantificación de riboflavina con uso potencial para la en leches desnatadas comerciales. En comparación con las mediciones por métodos convencionales, presenta la ventaja principal de ser una técnica rápida, no destructiva; además de no requerir el uso de reactivos, ni personal cualificado.

Para la cuantificación mediante FFF en las leches enteras se requiere una simple manipulación de muestra previa a las mediciones fluorimétricos (desnatado), si bien, otra alternativa es realizar el calibrado y la validación correspondiente para leche entera.

Capítulo 7

7 Conclusiones

- Las cinéticas de aparición y/o degradación de los marcadores químicos: hidroximetilfurfural, grupos sulfhidrilo, ácido ascórbico y riboflavina, se ajustan a modelos de primer orden.
- En el proceso del recalibrado de los modelos cinéticos, mejoraron los índices de estimación respecto a la validación. También, se estimaron las energías de activación (E_a) para el hidroximetilfurfural, grupos sulfhidrilo totales, ácido ascórbico y riboflavina que resultaron ser: 185, 165, 44 y 65 kJ·mol/K, respectivamente.
- El coeficiente de variación de los modelos cinéticos recalibrados para hidroximetilfurfural, y grupos sulfhidrilo fue mayor al 15%, mientras que para el ácido ascórbico fue 12%. El modelo de riboflavina es el más fiable con un coeficiente de variabilidad de un 2,4% para el equipo de sobremesa.
- Se ha determinado que los cambios de la intensidad la fluorescencia *front-face* del triptófano y el desplazamiento de la longitud de onda de máxima emisión de fluorescencia del triptófano están influidos por la desnaturalización de las proteínas y el consiguiente proceso de interacción proteína-proteína durante el tratamiento térmico.
- Se han construido modelos de predicción a partir de marcadores de fluorescencia *front-face* para la estimación de la concentración del hidroximetilfurfural, ácido ascórbico, riboflavina y grupos sulfhidrilo totales. Para los tres primeros marcadores el principal predictor es la fluorescencia del triptófano, mientras que para el último marcador es la fluorescencia de los compuestos intermedios de Maillard.
- De todos los marcadores fluorescentes elegidos en el trabajo, la fluorescencia de la riboflavina a una excitación de 267 nm y la fluorescencia de ditirosina parecen tener menor relevancia en la construcción de los modelos de predicción.
- El coeficiente de variación de los modelos de predicción recalibrados para hidroximetilfurfural y grupos sulfhidrilo fue mayor al 20%, mientras que para el ácido ascórbico fue 12%. El modelo de riboflavina es el más fiable con un coeficiente de variabilidad de un 2,4% para el equipo de sobremesa.

- Para el proceso de recalibrado fue necesario construir modelos matemáticos independientemente para cada equipo, siendo en la mayoría de los casos los predictores diferentes para cada equipo.
- Los modelos de predicción construidos para el equipo de fibra óptica proporcionan mejores predicciones para grupos sulfhidrilo, ácido ascórbico y riboflavina, respecto a los obtenidos para el equipo de sobremesa.
- Los modelos de predicción de los marcadores de daño térmico en base a determinaciones de fluorescencia requieren ser mejorados, antes de su implementación, mediante calibración *in situ* con el fluorímetro de fibra óptica en las condiciones industriales de trabajo previstas y mediante el uso de un número adecuado de observaciones.
- Los resultados obtenidos sugieren el uso potencial de la fluorescencia *front-face* como método inmediato y sencillo de cuantificación de riboflavina en leches desnatadas comerciales en comparación con las mediciones por métodos convencionales. Presenta la ventaja principal de ser una técnica rápida y no destructiva. Para la cuantificación en leches enteras se requiere una simple manipulación (desnatado) de muestra previa a las mediciones fluorimétricos. Otra alternativa es realizar el calibrado y la validación correspondiente para leche con distinto contenido de grasa.

Capítulo 8

8 Bibliografía

- Ahmad, M.H., Nache, M., Waffenschmidt, S., Hitzmann, B., 2016. A fluorescence spectroscopic approach to predict analytical, rheological and baking parameters of wheat flours using chemometrics. *J. Food Eng.* 182, 65-71.
- Alais, C., 1985. *Ciencia de la leche*, Primera Ed. ed. Paris.
- Albala-Hurtado, S., Veciana-Nogues, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Marine-Font, A., 1997. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 778, 247-253.
- Albani, J.R., Vogelaer, J., Bretesche, L., Kmiecik, D., 2014. Tryptophan 19 residue is the origin of bovine β -lactoglobulin fluorescence. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91, 144-150.
- Aliakbarian, B., Casale, M., Paini, M., Casazza, A.A., Lanteri, S., Perego, P., 2015. Production of a novel fermented milk fortified with natural antioxidants and its analysis by NIR spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* 62, 376-383.
- Alvarado, J., Viteri, N., 1989. Effect of temperature on the aerobic degradation of vitamin C in citrus fruit juices. *Arch. Latinoam. Nutr.* 39, 601-612.
- Amador-Espejo, G.G., Gallardo-Chacon, J.J., Nykänen, H., Juan, B., Trujillo, A.J., 2015. Effect Of Ultra High-Pressure Homogenization on hydro- and liposoluble milk vitamins. *Food Res. Int.* 77, 49-54.
- Ammari, F., Bendoula, R., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Rutledge, D.N., Roger, J.-M.M., 2014. 3D front face solid-phase fluorescence spectroscopy combined with Independent Components Analysis to characterize organic matter in model soils. *Talanta* 125, 146-152.
- Anand, K., Brody, E., Landry, E., Ward, E., 1998. Custom denaturation of whey protein: thermal effects, en: *International Dairy Publication*. Brussels - Belgium, pp. 101-115.
- Andersen, C.M., Mortensen, G., 2008. Fluorescence spectroscopy: A rapid tool for analyzing dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 56, 720-729.
- Andersen, C.M., Wold, J.P., Mortensen, G., 2006. Light-induced changes in semi-hard cheese determined by fluorescence spectroscopy and chemometrics. *Int. Dairy J.* 16, 1483-1489.
- Andersson, I., Öste, R., 1994. Nutritional quality of pasteurized milk. Vitamin B12, folate and ascorbic acid content during storage. *Int. Dairy J.* 4, 161-172.
- Anema, S., McKenna, A., 1996. Reaction kinetics of thermal denaturation of whey proteins in heated reconstituted whole milk. *J. Agric. Food Chem.* 44, 422-428.
- Antonelli, M., Dascenzo, G., Lagana, A., Pusceddu, P., 2002. Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination. *Talanta* 58, 961-967.
- Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M., 2015. Predicting coagulation and syneresis parameters of milk gels when inulin is added as fat substitute using infrared light backscatter. *J. Food Eng.* 157, 63-69.
- Asadullah, Khair-un-nisa, Tarar, O.M., Ali, S.A., Jamil, K., Begum, A., 2010. Study to evaluate the impact of heat treatment on water soluble vitamins in milk. *J. Pak. Med. Assoc.* 60, 909-912.

- ASTEQU, 2000. Artificial sensing techniques for the evaluation of quality [WWW Document]. Proj. No FAIR-CT97-3516. URL www.inapg.inra.fr/ens_rech/siab/asteq/index.htm.
- Awuah, G.B., Ramaswamy, H.S., Economides, A., 2007. Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 46, 584-602.
- Ayala, O., 2014. Formación de lactulosa durante el tratamiento térmico de la leche y su correlación con marcadores autofluorescentes. Modelización cinética. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Ayranci, G., Kaya, S., 1993. Kinetic analysis of the loss of some B-vitamins during the cooking of macaroni. *Nahrung* 37, 153-5.
- Badui, S., 2006. *Química de los alimentos*, Cuarta Edi. ed, Ed. Pearson educación. Mexico.
- Balestrieri, M., Spagnuolo, M.S., Cigliano, L., Storti, G., Ferrara, L., Abrescia, P., Fedele, E., 2002. Evaluation of oxidative damage in mozzarella cheese produced from bovine or water buffalo milk. *Food Chem.* 77, 293-299.
- Bastos, D.M., Monaro, É., Siguemoto, É., Séfora, M., 2012. Maillard Reaction Products in Processed Food : Pros and Cons. *Food Ind. Process. - Methods Equip.* 418. doi:10.5772/31925
- Bendicho, S., Espachs, A., Arántegui, J., Martín, O., 2002. Effect of high intensity pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *J. Dairy Res.* 69, 113-123.
- Bertrand-Harb, C., Baday, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertle, T., 2002. Thermal modifications of structure and co-denaturation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin induce changes of solubility and susceptibility to proteases. *Nahrung-Food* 46, 283-289.
- Beveridge, T., Toma, S.J., Nakai, S., 1974. Determination of -SH and -SS groups in some food proteins using Ellman's reagent. *J. Food Sci.* 39, 49-51.
- Bihel, S., Birlouez-Aragon, I., 1998. Inhibition of Tryptophan Oxidation in the Presence of Iron–Vitamin C by Bovine Lactoferrin. *Int. Dairy J.* 8, 637-641.
- Birlouez, I., Locquet, N., De St. Louvent, E., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Stahl, P., 2005. Evaluation of the Maillard reaction in infant formulas by means of front-face fluorescence, en: *Annals of the New York Academy of Sciences.* pp. 308-318.
- Birlouez-Aragon, I., Nicolas, M., Metais, A., Marchond, N., Grenier, J., Calvo, D., 1998. A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk. *Int. Dairy J.* 8, 771-777.
- Birlouez-Aragon, I., Sabat, P., Gouti, N., 2002. A new method for discriminating milk heat treatment. *Int. Dairy J.* 12, 59-67.
- Blecker, C., Habib-Jiwan, J.-M., Karoui, R., 2012. Effect of heat treatment of rennet skim milk induced coagulation on the rheological properties and molecular structure determined by synchronous fluorescence spectroscopy and turbiscan. *Food Chem.* 135, 1809-1817.
- Bosch, L., Alegría, A., Farré, R., Clemente, G., 2007. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage. *Food Chem.* 105, 1135-1143.
- Bosch, V., Cilla, A., García-Llatas, G., Gilabert, V., Boix, R., Alegría, A., 2013. Kinetics of ascorbic acid degradation in fruit-based infant foods during storage. *J. Food Eng.* 116, 298-303.

- Botosoa, E.P., Chèné, C., Karoui, R., 2013. Use of front face fluorescence for monitoring lipid oxidation during ageing of cakes. *Food Chem.* 141, 1130-1139.
- Brandao, M.P., de Carvalho dos Anjos, V., Bell., M.J. V., 2017. Time resolved fluorescence of cow and goat milk powder. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 171, 193-199.
- Briviba, K., Gräf, V., Walz, E., Guamis, B., Butz, P., 2016. Ultra high pressure homogenization of almond milk: Physico-chemical and physiological effects. *Food Chem.* 192, 82-89.
- Bueno-Solano, C., Campas-baypoli, O.N., Díaz-garcía, A.S., Izaguirre-flores, E.I., Verdugo-zamorano, W., Estrada-alvarado, M.I., 2009. Quantification of riboflavin (vitamin B2) in dairy products by HPLC. *Rev Chil Nutr* 36, 136-142.
- Bunaciu, A.A., Aboul-Enein, H.Y., Hoang, V.D., 2016. Vibrational spectroscopy used in milk products analysis: A review. *Food Chem.* 196, 877-84.
- Bylund, G., 1995. *Dairy processing Handbook*, Teknотext. ed, Tetra Pak Processing Systems. Lund - Sweden.
- Capuano, E., Rademaker, J., van den Bijgaart, H., M. van Ruth, S., 2014. Verification of fresh grass feeding, pasture grazing and organic farming by FTIR spectroscopy analysis of bovine milk. *Food Res. Int.* 60, 59-65.
- Castillo, M., Payne, F., Hicks, C., Lopez, M., 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *Int. Dairy J.* 10, 551-562.
- Chávez-Servín, J.L., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2005. Analysis of potential and free furfural compounds in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography: Evolution during storage. *J. Chromatogr. A* 1076, 133-140.
- Chen, H., Tan, C., Lin, Z., Wu, T., 2017. Detection of melamine adulteration in milk by near-infrared spectroscopy and one-class partial least squares. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 173, 832-836.
- Chotyakul, N., Pateiro-Moure, M., Martinez-Carballo, E., Saraiva, J.A., Torres, J.A., Perez-Lamela, C., 2014. Development of an improved extraction and HPLC method for the measurement of ascorbic acid in cows' milk from processing plants and retail outlets. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 679-688.
- Christensen, J., Becker, E.M., Frederiksen, C.S., 2005. Fluorescence spectroscopy and PARAFAC in the analysis of yogurt. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 75, 201-208.
- Christensen, J., Nørgaard, L., Bro, R., Engelsen, S.B., 2006. Multivariate autofluorescence of intact food systems. *Chem. Rev.* 106, 1979-1994.
- Cilliers, F.P., Gouws, P.A., Koutchma, T., Engelbrecht, Y., Adriaanse, C., Swart, P., 2014. A microbiological, biochemical and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 23, 94-106.
- Claeys, W.L., Ludikhuyze, L.R., Hendrickx, M.E., 2001. Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine in milk heated under isothermal and non-isothermal conditions. *J. Dairy Res.* 68, 287-301.

- Claeys, W.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2003. Kinetics of hydroxymethylfurfural, lactulose and furosine formation in milk with different fat content. *J. Dairy Res.* 70, 85-90.
- Claeys, W.L., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E., 2002. Intrinsic time temperature integrators for heat treatment of milk. *Trends Food Sci. Technol.* 13, 293-311.
- Coppa, M., Revello-Chion, A., Giaccone, D., Ferlay, A., Tabacco, E., Borreani, G., 2014. Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. *Food Chem.* 150, 49-57.
- Cosio, M.S., Mannino, S., Buratti, S., 2000. Electrochemical sensor detecting free sulfhydryl groups: evaluation of milk heat treatment. *J. Dairy Sci.* 83, 1933-8.
- Crofcheck, C.L., Payne, F.A., Hicks, C.L., Mengüç, M.P., Nokes, S.E., 2000. Fiber optic sensor response to low levels of fat in skim milk. *J. Food Process Eng.* 23, 163-175.
- Croguennec, T., O'Kennedy, B.T., Mehra, R., 2004. Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *Int. Dairy J.* 14, 399-409.
- Dalsgaard, T.K., Nielsen, J.H., Brown, B.E., Stadler, N., Davies, M.J., 2011. Dityrosine, 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and radical formation from tyrosine residues on milk proteins with globular and flexible structures as a result of riboflavin-mediated photo-oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7939-47.
- Damjanovic, S., Birlouez-Aragon, I., 2011. The FAST index – A highly sensitive indicator of the heat impact on infant formula model. *Food Chem.* 124, 1043-1049.
- Danao, M.C., Payne, F.A., 2003. Determining product transitions in a liquid piping system using a transmission sensor. *Trans. ASAE* 46, 415-421.
- Dankowska, A., 2016. 5 – Advances in Fluorescence Emission Spectroscopy for Food Authenticity Testing, en: Downey, G. (Ed.), *Advances in Food Authenticity Testing*. pp. 117-145.
- Datta, N., Elliott, A.J., Perkins, M.L., Deeth, H.C., 2002. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: Comparison of direct and indirect modes of heating 57.
- De Wit, R., Nieuwenhuijse, H., 2008. Kinetic modelling of the formation of sulphur-containing flavour components during heat-treatment of milk. *Int. Dairy J.* 18, 539-547.
- Deeth, H.C., Datta, N., 2011. Heat Treatment of Milk | Ultra-High Temperature Treatment (UHT): Heating Systems, en: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. pp. 699-707.
- Descalzo, A., Rossetti, L., Rizzo, S., Páez, R., Costabel, L., Taverna, M., 2013. Uso de la metodología de fluorescencia de fase frontal para la determinación de oxidación inducida por luz en leche en polvo con diferente contenido de antioxidantes naturales. *Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.*
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M., Amiot, M.J., 2007. Thermal degradation of antioxidant micronutrients in Citrus juice: Kinetics and newly formed compounds. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4209-4216.
- Diez, R., Ortiz, M.C., Sarabia, L., Birlouez-Aragon, I., 2008. Potential of front face fluorescence associated to PLS regression to predict nutritional parameters in heat treated infant formula models. *Anal. Chim. Acta* 606, 151-8.

- DiMarco, T., Giulivi, C., 2007. Current analytical methods for the detection of dityrosine, a biomarker of oxidative stress, in biological samples. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 108-120.
- Doreen, M., 2010. A comparison of analytical methods for quantifying denatured whey proteins and their correlation to solubility. California Polytechnic State University.
- Dufour, E., Devaux, M., Fortier, P., Herbert, S., 2001. Delineation of the structure of soft cheeses at the molecular level by fluorescence spectroscopy—relationship with texture. *Int. Dairy J.* 11, 465-473.
- Dufour, E., Riaublanc, A., 1997. Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products. I. Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks. *Lait* 77, 657-670.
- Er Demirhan, B., Demirhan, B., Sönmez, C., Torul, H., Tamer, U., Yentür, G., 2015. Short communication: determination of potential 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. *J. Dairy Sci.* 98, 818-22.
- Esteire, L., Cenzano, E., Madrid, A., 2014. *Queserías. Nuevo Manual Técnico, 1º Edición.* ed.
- Esteve, M.J., Farré, R., Frígola, A., García-Cantabella, J.M., 2001. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1450-4.
- Estévez, N., Fuciños, P., Bargiela, V., Picó, G., Valetti, N.W., Tovar, C.A., Rúa, M.L., 2017. Influence of pH on viscoelastic properties of heat-induced gels obtained with a β -Lactoglobulin fraction isolated from bovine milk whey hydrolysates. *Food Chem.* 219, 169-178.
- Faassen, S.M., Hitzmann, B., 2015. Fluorescence spectroscopy and chemometric modeling for bioprocess monitoring. *Sensors (Basel)*. 15, 10271-10291.
- Fagan, C.C., Castillo, M., O'Callaghan, D.J., Payne, F.A., O'Donnell, C.P., 2009. Visible-near infrared spectroscopy sensor for predicting curd and whey composition during cheese processing. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 3, 62-69.
- FAO., 2015. La leche en cifras [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/portal-lacteo/es/>
- FAO., 2013. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2013-2022, Mexico. ed. Texcoco.
- Farah, Z., Rettenmaier, R., Atkins, D., 1992. Vitamin content of camel milk. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 62, 30-33.
- Feinberg, M., Dupont, D., Efstathiou, T., Louapre, V., Guyonnet, J., 2006. Evaluation of tracers for the authentication of thermal treatments of milks. *Food Chem.* 98, 188-194.
- Fenaille, F., Parisod, V., Visani, P., Populaire, S., Tabet, J.C., Guy, P. a., 2006. Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *Int. Dairy J.* 16, 728-739.
- Fenaille, F., Parisod, V., Vuichoud, J., Tabet, J.-C., Guy, P.A., 2004. Quantitative determination of dityrosine in milk powders by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using isotope dilution. *J. Chromatogr. A* 1052, 77-84.

- Fink, R., Kessler, H.G., 1986. HMF values in heat-treated and stored milk. *Milchwissenschaft-Milk Sci. Int.* 41, 638-641.
- Fox, J.B., Thayer, D.W., 1998. Radical oxidation of riboflavin. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 68, 174-80.
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015. *Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edi. ed, Dairy chemistry and biochemistry.* Cork - Ireland.
- Galani, D., Apenten, R.K., 1999. Heat-induced denaturation and aggregation of beta-Lactoglobulin: kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34, 467-476.
- Galdi, M., Carbone, N., Valencia, M.E., 1989. Comparison of ferric glycinate to ferrous sulfate in model infant formulas - kinetics of vitamin losses. *J. Food Sci.* 54, 1530-1533.
- Garcia, R., Boussard, A., Rakotozafy, L., Nicolas, J., Potus, J., Rutledge, D.N., Cordella, C.B.Y., 2016. 3D-front-face fluorescence spectroscopy and independent components analysis: A new way to monitor bread dough development. *Talanta* 147, 307-14.
- García-Segura, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez, Á., Montero, F., Oñaderra, M., Vivanco, F., 2008. *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica, 1º edición. ed.* Madrid.
- Garza, S., Giner, J., Martin, O., Costa, E., Ibarz, A., 1996. Evolucion del color, azucares y HMF en el tratamiento termico de zumo de manzana/Colour, sugars and HMF evolution during thermal treatment of apple juice. *Food Sci. Technol. Int.* 2, 101-110.
- Geddes, C.D., Lakowicz, J.R., 2006. *Reviews in Fluorescence 2006, Reviews in Fluorescence.* Baltimore.
- Ghisaidoobe, A., Chung, S., 2014. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: A focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22518-22538.
- Givens, D.I., Deaville, E.R., 1999. The current and future role of near infrared reflectance spectroscopy in animal nutrition: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1131-1145.
- Gliguem, H., Birlouez-Aragon, I., 2005. Effects of sterilization, packaging, and storage on vitamin C degradation, protein denaturation, and glycation in fortified milks. *J. Dairy Sci.* 88, 891-9.
- Guan, Y.-G., Yu, P., Yu, S.-J., Xu, X.-B., Wu, X.-L., 2012. Short communication: Simultaneous analysis of reducing sugars and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde at a low concentration by high performance anion exchange chromatography with electrochemical detector, compared with HPLC with refractive index detector. *J. Dairy Sci.* 95, 6379-6383.
- Guingamp, M., Humbert, G., Linden, G., 1993. Determination of sulfhydryl groups in milk using Ellmans procedure and clarifying reagent. *J. Dairy Sci.* 76, 2152-2155.
- Guingamp, M.F., Humbert, G., Midon, P., Nicolas, M., Linden, G., 1999. Screening procedure for evaluating heat load in commercial milks. *Lait* 79, 457-463.
- Güneşer, O., Karagül Yüceer, Y., 2012. Effect of ultraviolet light on water-and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. *J. Dairy Sci.* 95, 6230-6241.
- Güneşer, O., Toklucu, A.K., Karagul-Yuceer, Y., 2013. Formation kinetics of hydroxymethylfurfural and brown coloured compounds in goat milk during heating. *Int. J. Dairy Technol.* 66, 14-19.

- Haddad, G.S., Loewenstein, M., 1983. Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.* 66, 1601-1606.
- Halder, U.C., Chakraborty, J., Das, N., Bose, S., 2012. Tryptophan dynamics in the exploration of micro-conformational changes of refolded β -lactoglobulin after thermal exposure: A steady state and time-resolved fluorescence approach. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 109, 50-57.
- Hammami, M., Dridi, S., Zaidi, F., Maamouri, O., Rouissi, H., Blecker, C., Karoui, R., 2013. Use of Front-Face Fluorescence Spectroscopy to Differentiate Sheep Milks from Different Genotypes and Feeding Systems. *Int. J. Food Prop.* 16, 1322-1338.
- Hammami, M., Rouissi, H., Salah, N., Selmi, H., Al-Otaibi, M., Blecker, C., Karoui, R., 2010. Fluorescence spectroscopy coupled with factorial discriminant analysis technique to identify sheep milk from different feeding systems. *Food Chem.* 122, 1344-1350.
- Hand, D.B., Sharp, P.F., 1939. The Riboflavin Content of Cow's Milk. *J. Dairy Sci.* 22, 779-783.
- Hassoun, A., Karoui, R., 2015. Front-face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring fish freshness stored under different refrigerated conditions. *Food Control* 54, 240-249.
- Herbert, S., Riaublanc, A., Bouchet, B., Gallant, D.J., Dufour, E., 1999. Fluorescence Spectroscopy Investigation of Acid-or Rennet-Induced Coagulation of Milk. *J. Dairy Sci.* 82, 2056-2062.
- Hernandez, A.G. (DRT), 2010. Leche y derivados lacteos, en: Panamericana (Ed.), *Tratado de Nutrición: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos, Volumen II*. Madrid, pp. 3-7.
- Hinrichs, J., Atamer, Z., 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier.
- Hiwilepo-van Hal, P., Bosschaart, C., van Twisk, C., Verkerk, R., Dekker, M., 2012. Kinetics of thermal degradation of vitamin C in marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *caffra*) as compared to other selected tropical fruits. *LWT - Food Sci. Technol.* 49, 188-191.
- Hodge, J.E., 1953. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 1, 928-943.
- Hougaard, A.B., Lawaetz, A.J., Ipsen, R.H., 2013. Front face fluorescence spectroscopy and multi-way data analysis for characterization of milk pasteurized using instant infusion. *LWT - Food Sci. Technol.* 53, 331-337.
- <http://oceanoptics.com/>, 2016. Fluorescence - Ocean Optics [WWW Document]. URL <http://oceanoptics.com/measurementtechnique/fluorescence/> (accedido 11.8.16).
- Huang, Y., 2013. *Robotics and Automation in the Food Industry*, Robotics and Automation in the Food Industry. Elsevier.
- Ibarz, A., Martín, O., Barbosa-Canovas, G.V., 1997. Cinética de pardeamiento no enzimático de zumo de pera concentrado Note./ Non-enzymatic browning kinetics of concentrated pear juice. *Food Sci. Technol. Int.* 3, 213-218.
- Jankowski, C.K., Sichel, D.I., 2003. Modelling of the β -lactoglobulin (BLG) oxidative folding. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 629, 185-196.

- Jansson, T., Clausen, M.R., Sundekilde, U.K., Eggert, N., Nyegaard, S., Larsen, L.B., Ray, C., Sundgren, A., Andersen, H.J., Bertram, H.C., 2014. Lactose-Hydrolyzed Milk Is More Prone to Chemical Changes during Storage than Conventional Ultra-High-Temperature (UHT) Milk. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7886-7896.
- Jenness, R., Coulter, S.T., 1948. Measurement of Fluorescent Materials in Milk and Milk Products. *J. Dairy Sci.* 31, 367-381.
- JERSA, 2016. Maquinaria para la Industria de Alimentos [WWW Document]. 12/05/2016. URL <http://www.jersa.com.mx/>
- Jiang, Z., Wang, L., Che, H., Tian, B., 2014. Effects of temperature and pH on angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and physicochemical properties of bovine casein peptide in aqueous Maillard reaction system. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 35-42.
- Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., 2002. Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *J. Dairy Sci.* 85, 2497-502.
- Johnson, J.R., Braddock, R.J., Chen, C.S., 1995. Kinetics of ascorbic-acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum-experimental rate constants. *J. Food Sci.* 60, 502-505.
- Jovanović, S., Bara, M., Ma, O., 2005. Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo* 55, 215-233.
- Kamal, M., Karoui, R., 2016. Monitoring of mild heat treatment of camel milk by front-face fluorescence spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* 1-8.
- Kamal, M., Karoui, R., 2015. Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 27-48.
- Kamalabadi, M., Ghaemi, E., Mohammadi, A., Alizadeh, N., 2015. Determination of furfural and hydroxymethylfurfural from baby formula using headspace solid phase microextraction based on nanostructured polypyrrole fiber coupled with ion mobility spectrometry. *Food Chem.* 181, 72-7.
- Karhan, M., Aksu, M., Tetik, N., Turhan, I., 2004. Kinetic modeling of anaerobic thermal degradation of ascorbic acid in rose hip (*rosa canina* L) pulp. *J. Food Qual.* 27, 311-319.
- Karoui, R., Blecker, C., 2011. Fluorescence Spectroscopy Measurement for Quality Assessment of Food Systems-a Review. *Food Bioprocess Technol.* 4, 364-386.
- Karoui, R., Dufour, E., De Baerdemaeker, J., 2006. Common components and specific weights analysis: a tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening. *Anal. Chim. Acta* 572, 125-33.
- Karoui, R., Dufour, É., Pillonel, L., Schaller, E., Picque, D., Cattenoz, T., Bosset, J.-O., 2005. The potential of combined infrared and fluorescence spectroscopies as a method of determination of the geographic origin of Emmental cheeses. *Int. Dairy J.* 15, 287-298.
- Karoui, R., Hammami, M., Rouissi, H., Blecker, C., 2011. Mid infrared and fluorescence spectroscopies coupled with factorial discriminant analysis technique to identify sheep milk from different feeding systems. *Food Chem.* 127, 743-8.

- Kassouf, A., El Rakwe, M., Chebib, H., Ducruet, V., Rutledge, D.N., Maalouly, J., 2014. Independent components analysis coupled with 3D-front-face fluorescence spectroscopy to study the interaction between plastic food packaging and olive oil. *Anal. Chim. Acta* 839, 14-25.
- Keeney, M., Bassette, R., 1959. Detection of Intermediate Compounds in the Early Stages of Browning Reaction in Milk Products. *J. Dairy Sci.* 42, 945-960.
- Kehoe, J.J., Wang, L., Morris, E.R., Brodkorb, A., 2011. Formation of Non-Native beta-Lactoglobulin during Heat-Induced Denaturation. *Food Biophys.* 6, 487-496.
- Khairi, M.T.M., Ibrahim, S., Yunus, M.A.M., Faramarzi, M., 2016. Contact and non-contact ultrasonic measurement in the food industry: a review. *Meas. Sci. Technology* 27, 1.
- Kind, E., Reuter, H., 1990. HMF formation during UHT-treatment of milk. *Kieler Milchwirtsch. Forschungsberichte* 42, 87-98.
- Kirchmeier, O., Kamal, N.M., Klostermeyer, H., 1985. Milcherhitzung und SH-Gruppenentwicklung. II. *Milchwissenschaft* 40, 722-723.
- Koka, M., Mikolajcik, E.M., Gould, I.A., 1968. Spectrophotometric Method for Determination of Heat-Activated Sulfhydryl Groups of Skimmilk. *J. Dairy Sci.* 51, 217-219.
- Konietzko, M., Reuter, H., 1986. Production of total hydroxymethylfurfural during the UHT treatment of whole milk. *Milchwissenschaft-Milk Sci. Int.* 41, 149-151.
- Koop, J., Monschein, S., Pauline Macheroux, E., Knaus, T., Macheroux, P., 2014. Determination of free and bound riboflavin in cow's milk using a novel flavin-binding protein. *Food Chem.* 146, 94-97.
- Kress-Rogers, E., 2001. *Instrumentation and Sensors for the Food Industry*, Second Edi. ed, Instrumentation and Sensors for the Food Industry. Elsevier, Cambridge - UK.
- Kucheryavskiy, S., Lomborg, C.J., 2015. Monitoring of whey quality with NIR spectroscopy a feasibility study. *Food Chem.* 176, 271-277.
- Kulmyrzaev, A., Dufour, É., 2002. Determination of lactulose and furosine in milk using front-face fluorescence spectroscopy. *Lait* 82, 725-735.
- Kulmyrzaev, A.A., Levieux, D., Dufour, É., 2005. Front-face fluorescence spectroscopy allows the characterization of mild heat treatments applied to milk. Relations with the denaturation of milk proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 502-507.
- Kwok, K.C., Shiu, Y.W., Yeung, C.H., Niranjana, K., 1998. Effect of thermal processing on available lysine, thiamine and riboflavin content in soymilk. *J. Sci. Food Agric.* 77, 473-478.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy principles of fluorescence spectroscopy*, Third Edit. ed, Springer. New York.
- Lathrop, P.J., Leung, H.K., 1980. Rates of ascorbic acid degradation during thermal-processing of Canned peas. *J. Food Sci.* 45, 152-153.
- Law, B.A., Tamime, A.Y., 2010. *Technology of Cheesemaking: Second Edition*, Second Edi. ed, Technology of Cheesemaking: Second Edition.

- Leclere, J., Birlouez, I., 2001. The fluorescence of advanced Maillard products is a good indicator of lysine damage during the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4682-4687.
- Leclère, J., Birlouez-Aragon, I., Meli, M., 2002. Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation. *Food Chem.* 76, 491-499.
- Lee, S.H., Labuza, T.P., 1975. Destruction of ascorbic acid as a function of water activity. *J. Food Sci.* 40, 370-373.
- Lee, W.J., Lucey, J.A., 2010. Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* doi:10.5713/ajas.2010.r.05
- Lenhardt, L., Bro, R., Zeković, I., Dramićanin, T., Dramićanin, M.D., 2015. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chem.* 175, 284-291.
- Lešková, E., Kubíková, J., Kováčiková, E., Košická, M., Porubská, J., Holčíková, K., 2006. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J. Food Compos. Anal.* 19, 252-276.
- Li, Y.H., Wang, W.J., Xu, X.J., Meng, Y.C., Zhang, L.W., Chen, J., Qiu, R., 2015. Short communication: Changes in fluorescence intensity induced by soybean soluble polysaccharide-milk protein interactions during acidification. *J. Dairy Sci.* 98, 8577-8580.
- Lindmark-Månsson, H., Fondén, R., Pettersson, H.E., 2003. Composition of Swedish dairy milk. *Int. Dairy J.* 13, 409-425.
- Liu, X., Metzger, L.E., 2007. Application of fluorescence spectroscopy for monitoring changes in nonfat dry milk during storage. *J. Dairy Sci.* 90, 24-37.
- Liu, Y., Guo, R., 2008. Aggregation properties of aqueous casein hydrolysate solutions at different pH. *Int. Dairy J.* 18, 1022-1027.
- Lopez, C., Dufour, E., 2001. The composition of the milk fat globule surface alters the structural characteristics of the coagulum. *J. Colloid Interface Sci.* 233, 241-249.
- Lozano, B., Castellote, A.I., Montes, R., Lopez-Sabater, M.C., 2014. Vitamins, fatty acids, and antioxidant capacity stability during storage of freeze-dried human milk. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65, 703-707.
- Madalena, D.A., Ramos, Ó.L., Pereira, R.N., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Malcata, F.X., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2016. In vitro digestion and stability assessment of β -lactoglobulin/riboflavin nanostructures. *Food Hydrocoll.* 58, 89-97.
- Madrid, A., 2016. *Ingeniería y producción de alimentos*, Primera Ed. ed. Madrid.
- Mao, X.Y., Tong, P.S., Gualco, S., Vink, S., 2012. Effect of NaCl addition during diafiltration on the solubility, hydrophobicity, and disulfide bonds of 80% milk protein concentrate powder. *J. Dairy Sci.* 95, 3481-3488.
- MAPA, 2015. *Informe del Consumo de Alimentación en España 2014*. Madrid.
- Marangoni, A.G., Barbut, S., McGauley, S.E., Marcone, M., Narine, S.S., 2000. On the structure of particulate gels—the case of salt-induced cold gelation of heat-denatured whey protein isolate. *Food Hydrocoll.* 14, 61-74.

- Markiewicz-Keszycska, M., Czyzak-Runowska, G., Wojtowski, J., Jozwik, A., Pankiewicz, R., Leska, B., Krzyzewski, J., Strzalkowska, N., Marchewka, J., Bagnicka, E., 2015. Influence of stage of lactation and year season on composition of mares' colostrum and milk and method and time of storage on vitamin C content in mares' milk. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2279-2286.
- Matiacevich, S.B., PILARBUERA, M., Pilar Buera, M., 2006. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chem.* 95, 423-430.
- Mazerolles, G., Devaux, M.F., Duboz, G., Duployer, M.H., Riou, N.M., Dufour, E., 2001. Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening. *LAIT* 81, 509-527.
- Meha, M.A., 1994. Vitamin C and riboflavin content in Camels milk: effects of heat treatments. *Food Chem.* 50, 153-155.
- Mendoza-Corvis, F.A., Hernández, E.J., Ruiz, L.E., 2015. Efecto del Escaldado sobre el Color y Cinética de Degradación Térmica de la Vitamina C de la Pulpa de Mango de Hilacha (*Mangifera indica* var *magdalena river*). *Inf. Tecnológica* 26, 09-16.
- Miquel Becker, E., Christensen, J., Frederiksen, C.S., Haugaard, V.K., 2003. Front-face fluorescence spectroscopy and chemometrics in analysis of yogurt: rapid analysis of riboflavin. *J. Dairy Sci.* 86, 2508-15.
- Morales, F., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 1996. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* 57, 423-428.
- Morales, F.J., Jiménez-Pérez, S., 1999. HMF formation during heat-treatment of milk-type products as related to milkfat content. *J. Food Sci.* 64, 855-859.
- Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 1995. New methodologies for kinetic study of 5-(hydroxymethyl)-furfural formation and reactive lysine blockage in heat-treated milk and model systems. *J. Food Prot.* 58, 310-315.
- Morales, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 1992. An enhanced liquid-chromatographic method for 5-hydroxymethylfurfural determination in UHT milk. *Chromatographia* 33, 45-48.
- Morales, F.-J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 2000. Characterization of industrial processed milk by analysis of heat-induced changes. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 193-200.
- Morales, F.-J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S., 1996. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Technol.* 31, 411-418.
- Moreiras, O., Carbajal, Á., Cabrera, L., Cuadrado, C., 2013. *Tablas De Composicion De Alimentos*, 16º Edició. ed. Madrid.
- Mortensen, G., Sørensen, J., Danielsen, B., Stapelfeldt, H., 2003. Effect of specific wavelengths on light-induced quality changes in Havarti cheese. *J. Dairy Res.* 70, 413-421.
- Mungkarndee, R., Techakriengkrai, I., Tumcharern, G., Sukwattanasinitt, M., 2016. Fluorescence sensor array for identification of commercial milk samples according to their thermal treatments. *Food Chem.* 197, 198-204.
- Muñoz, A., Ortiz, R., Murcia, M.A., 1994. Determination by HPLC of changes in riboflavin levels in milk and nondairy imitation milk during refrigerated storage. *Food Chem.* 49, 203-206.

- Nalame, N., Chaisri, W., Suriyasathaporn, W., 2009. Loss of l-ascorbic acid in commercial drinking milk caused by milk processing and storage times. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 40, 848-851.
- Newton, A.E., B.C., Fairbanks, A.J., D., Golding, M., F., Andrewes, P., Gerrard, J.A., B.F.G., 2012. The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products - Not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds. *Food Funct.* 3, 1231-1241.
- Nisha, P., Singhal, R.S., Pandit, A.B., 2005a. A study on degradation kinetics of riboflavin in green gram whole (*Vigna radiata* L.). *Food Chem.* 89, 577-582.
- Nisha, P., Singhal, R.S., Pandit, A.B., 2005b. A study on degradation kinetics of riboflavin in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *J. Food Eng.* 67, 407-412.
- Nohr, D., Biesalski, H.K., Back, E.I., 2011. Vitamins Riboflavin, en: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, pp. 704-706.
- Nollet, L.M.L., 2004. *Handbook of Food Analysis: Methods and Instruments in Applied Food Analysis*, en: Nollet, L.M.L. (Ed.), volume 3. Ghent, p. 1891.
- Ntakatsane, M.P., Liu, X.M., Zhou, P., 2013. Short communication: rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy. *J. Dairy Sci.* 96, 2130-6.
- Ntakatsane, M.P., Yang, X.Q., Lin, M., Liu, X.M., Zhou, P., 2011. Short communication: Suitability of fluorescence spectroscopy for characterization of commercial milk of different composition and origin. *J. Dairy Sci.* 94, 5375-80.
- Núñez-Sánchez, N., Martínez-Marín, A.L., Polvillo, O., Fernández-Cabanás, V.M., Carrizosa, J., Urrutia, B., Serradilla, J.M., 2016. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chem.* 190, 244-52.
- Oh, N.S., Young Lee, J., Lee, H.A., Joung, J.Y., Shin, Y.K., Kim, S.H., Kim, Y., Lee, K.W., 2016. Chemical characteristics and enhanced hepatoprotective activities of Maillard reaction products derived from milk protein-sugar system. *J. Dairy Sci.* 99, 947-958.
- Ordóñez, L.E., Portilla, M.A.O., Rodríguez, D.X.R., 2013. Cinética de degradación térmica de vitamina C en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Rev. Lasallista Investig.* 10, 44-51.
- Ordóñez, L.E., Yoshioka, L.S., 2012. Cinética de degradación térmica de vitamina C en pulpa de mango (*Manguifera indica* L.). *Vitae* 19, S81-S83.
- Osório, M. V., Marques, S.S., Oliveira, H.M., Barreiros, L., Segundo, M.A., 2016. Fluorometric method based on molecular recognition solid-phase extraction for determination of riboflavin in milk and infant formula. *J. Food Compos. Anal.* 45, 141-146.
- Owusu-Apenten, R., 2005. Colorimetric analysis of protein sulfhydryl groups in milk: Applications and processing effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 1-23.
- Palazolo, G., Rodríguez, F., Farruggia, B., Picó, G., Delorenzi, N., 2000. Heat treatment of beta-lactoglobulin: structural changes studied by partitioning and fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3817-22.

- Palazón, M.A., Pérez-Conesa, D., Abellán, P., Ros, G., Romero, F., Vidal, M.L., 2009. Determination of shelf-life of homogenized apple-based beikost storage at different temperatures using Weibull hazard model. *LWT - Food Sci. Technol.* 42, 319-326.
- Patrick, P.S., Swaisgood, H.E., 1976. Sulfhydryl and Disulfide Groups in Skim Milk as Affected by Direct Ultra-High-Temperature Heating and Subsequent Storage. *J. Dairy Sci.* 59, 594-600.
- Pearce, J., 1943. Behaviour and Nature of the Fluorescing Substances in Dried Egg Powders. *Can. J. Res.*
- Pellegrino, L., Resmini, P., Luf, W., 1995. Assessment (indices) of heat treatment of milk, en: Fox, P.F. (Ed.), *Heat - induced changes in milk*. International Dairy Federation, Brussels - Belgium, pp. 409-453.
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E., 2007. Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis. *Talanta* 72, 28-42.
- Poulsen, N., Rybicka, I., Poulsen, H.D., Larsen, L.B., Andersen, K.K., Larsen, M.K., 2015. Seasonal variation in content of riboflavin and major minerals in bulk milk from three Danish dairies. *Int. Dairy J.* 42, 6-11.
- Qi, P.X., Ren, D., Xiao, Y., Tomasula, P.M., 2015. Effect of homogenization and pasteurization on the structure and stability of whey protein in milk. *J. Dairy Sci.* 98, 2884-2897.
- Rajchl, A., Drgova, L., Gregrova, A., Cizkova, H., Sevcik, R., Voldrich, M., 2013. Rapid determination of 5-hydroxymethylfurfural by DART ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4737-4745.
- Revilla, I., Escuredo, O., González-Martín, M.I., Palacios, C., 2017. Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. *Food Chem.* 214, 468-477.
- Richards, M., Buys, E.M., De Kock, H.L., 2016. Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods. *Int. Dairy J.* 57, 56-61.
- Rocha, A., 2013. Aplicacion de indicadores nativos de fluorescencia para la cuantificación rápida de daño térmico durante el procesado de la leche. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Roginski, H., Deeth, H.C., Datta, N., 2002. Encyclopedia of Dairy Sciences, Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier. doi:10.1016/B0-12-227235-8/00200-5
- Rojas, A.M., Gerschenson, L.N., 2001. Ascorbic acid destruction in aqueous model systems: an additional discussion. *J. Sci. Food Agric.* 81, 1433-1439.
- Romero, C., 1991. Optimizacion de la leche tratada termicamente a travez de la medida de nuevos indices de calentamiento. Universidad Complutense de Madrid.
- Romero, F., 2008. Estabilidad de vitaminas, vida comercial y bioaccesibilidad de folatos-hierro en fórmulas infantiles de contituación y crecimiento. *Fac. Vet. y Cienc. y Tecnol. los Aliment.* Universidad de Murcia.
- Romeu-Nadal, M., Castellote, A.I., Gayà, A., López-Sabater, M.C., 2008. Effect of pasteurisation on ascorbic acid, dehydroascorbic acid, tocopherols and fatty acids in pooled mature human milk. *Food Chem.* 107, 434-438.

- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2006. Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830, 41-6.
- Rozycki, S.D., Buera, M.P., Piagentini, A.M., Costa, S.C., Pauletti, M.S., 2010. Advances in the study of the kinetics of color and fluorescence development in concentrated milk systems. *J. Food Eng.* 101, 59-66.
- Ryley, J., Kajda, P., 1994. Vitamins in thermal processing. *Food Chem.* 49, 119-129.
- Ryser, E.T., 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Encyclopedia of Dairy Sciences. Elsevier.
- Saeed, S., Gillies, D., Wagner, G., Howell, N.K., 2006. ESR and NMR spectroscopy studies on protein oxidation and formation of dityrosine in emulsions containing oxidised methyl linoleate. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1385-92.
- Sahar, A., Dufour, E., 2015. Classification and characterization of beef muscles using front-face fluorescence spectroscopy. *Meat Sci.* 100, 69-72. doi:10.1016/j.meatsci.2014.09.142
- Saidi, B., Warthesen, J.J., 1995. Effect of heat and homogenization on riboflavin photolysis in milk. *Int. Dairy J.* 5, 635-645.
- Sava, N., Van der Plancken, I., Claeys, W., Hendrickx, M., 2005. The kinetics of heat-induced structural changes of beta-lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 88, 1646-53.
- Schamberger, G.P., Labuza, T.P., 2007. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 1410-1417.
- Schamberger, G.P., Labuza, T.P., 2006. Evaluation of front-face fluorescence for assessing thermal processing of milk. *J. Food Sci.* 71, C69-C74.
- Scheidegger, D., Larsen, G., Kivatinitz, S.C., 2016. Oxidative consequences of UV irradiation on isolated milk proteins: Effects of hydrogen peroxide and bivalent metal ions. *Int. Dairy J.* 55, 64-71.
- Scheidegger, D., Pecora, R.P., Radici, P.M., Kivatinitz, S.C., 2010. Protein oxidative changes in whole and skim milk after ultraviolet or fluorescent light exposure. *J. Dairy Sci.* 93, 5101-9.
- Scheidegger, D., Radici, P.M., Vergara-Roig, V.A., Bosio, N.S., Pesce, S.F., Pecora, R.P., Romano, J.C.P., Kivatinitz, S.C., 2013. Evaluation of milk powder quality by protein oxidative modifications. *J. Dairy Sci.* 96, 3414-23.
- Schlimme, E., Ott, F.G., Kiesner, C., 1994. Reaction kinetics of the heat-induced formation of N6-methyladenosine in milk. *Int. Dairy J.* 4, 617-627.
- Sikorska, E., Gliszczyńska-Swigło, A., Insińska-Rak, M., Khmelinskii, I., De Keukeleire, D., Sikorski, M., 2008. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. *Anal. Chim. Acta* 613, 207-17.
- Singh, C.B., Jayas, D.S., 2013. Optical sensors and online spectroscopy for automated quality and safety inspection of food products, en: Caldwell, D., Italian Institute of Technology (Eds.), *Robotics and automation in the food industry: Current and future technologies*. Woodhead Publishing, pp. 111-129.

- Singh, R.P., Heldman, D.R., Kirk, J.R., 1975. Kinetic-analysis of light-induced riboflavin loss in whole milk. *J. Food Sci.* 40, 164-167.
- Singh, R.R.B., Patil, G.R., 1989. Formation kinetics of total hydroxymethylfurfural during UHT processing of buffalo milk. *Lait* 69, 131-136.
- Singh, R.R.B., Ruhil, A.P., Jain, D.K., Patel, A.A., Patil, G.R., 2009. Prediction of sensory quality of UHT milk - A comparison of kinetic and neural network approaches. *J. Food Eng.* 92, 146-151.
- Skoog, D., James, F., Crouch, S., 2008. *Principios de análisis instrumental*, Sexta. ed.
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G., 2004. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 113-137.
- Stešková, A., Morochovičová, M., Lešková, E., 2006. Vitamin C degradation during storage of fortified foods. *J. Food Nutr. Res.*
- Stojanović, Z., Švarc-Gajić, J., Vitas, J., Malbaša, R., Lončar, E., 2013. Direct chronopotentiometric method for ascorbic acid determination in fermented milk products. *J. Food Compos. Anal.* 32, 44-50.
- Sun, D.-W., Manzi, P., Pizzoferrato, L., 2012. Ultrahigh Temperature Thermal Processing of milk, en: Sun, D.-W. (Ed.), *Thermal Food Processing. New Technologies and Quality Issues*. p. 686.
- Sun, D.-W., Reddy Gangidi, R., Proctor, A., 2009. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier.
- Sunaric, S., Denic, M., Kocic, G., 2012. Evaluation of riboflavin content in dairy products and non-dairy substitutes. *Ital. J. Food Sci.* 24, 352-358.
- Svensson, V.T., Andersen, C.M., 2014. EEM fluorescence spectroscopy as a fast method to assess the brine composition of salted herring. *LWT - Food Sci. Technol.* 57, 775-781.
- Taheri-Kafrani, A., Asgari-Mobarakeh, E., Bordbar, A.-K., Haertlé, T., 2010. Structure–function relationship of β -lactoglobulin in the presence of dodecyltrimethyl ammonium bromide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 75, 268-274.
- Taimmanen, K., 1980. Determination of kinetic parameters in heat processing of baby food. Massey University.
- Tamime, A.Y., 2009. *Milk processing and quality management*, First Edit. ed. Ayr - UK.
- Tan, J., Li, R., Jiang, Z.-T., 2015. Chemometric classification of Chinese lager beers according to manufacturer based on data fusion of fluorescence, UV and visible spectroscopies. *Food Chem.* 184, 30-36.
- Tarassuk, N.P., Simonson, H.D., 1950. Browning and the fluorescence of evaporated milk. *Food Technol. Champaign* 4, 88-92.
- Taterka, H., Castillo, M., 2015. The effect of whey protein denaturation on light backscatter and particle size of the casein micelle as a function of pH and heat-treatment temperature. *Int. Dairy J.* 48, 53-59.

- Taterka, H., Rao, Q., Labuza, T., Castillo, M., 2014. Kinetic analysis of the pH-specific mechanisms of denatured whey protein interaction for the development of an optical light backscatter sensor, en: 7th International Whey Conference. Rotterdam, Netherlands.
- Tayeh, N., Rungassamy, T., Albani, J.R., 2009. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *J. Pharm. Biomed. Anal. J. Pharm. Biomed.* 50, 107-116.
- Taylor, M.J., Richardson, T., 1980. Antioxidant Activity of Skim Milk: Effect of Heat and Resultant Sulfhydryl Groups. *J. Dairy Sci.* 63, 1783-1795.
- Timmons, J.S., Weiss, W.P., Palmquist, D.L., Harper, W.J., 2001. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. *J. Dairy Sci.* 84, 2440-9.
- Tran, H., Datta, N., Lewis, M.J., Deeth, H.C., 2008. Predictions of some product parameters based on the processing conditions of ultra-high-temperature milk plants. *Int. Dairy J.* 18, 939-944.
- Ulgen, N., Ozilgen, M., 1991. Kinetic compensation relations for ascorbic acid degradation and pectinesterase inactivation during orange juice pasteurization. *J. Sci. Food Agric.* 57, 93-100.
- UniProt Consortium, 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43, D204-12.
- Van Boekel, M. a J.S., 1998. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chem.* 62, 403-414.
- Van Boekel, M.A.J.S., 2008. Kinetic Modeling of Food Quality: A Critical Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 7, 144-158.
- Vargas, M., 2006. Utilización de leche concentrada descremada reconstituida para la elaboracion de leche UHT: efectos fisico quimicos y de estabilidad. Universidad Austral de Chile.
- Vasbinder, A.J., Alting, A.C., de Kruif, K.G., 2003. Quantification of heat-induced casein–whey protein interactions in milk and its relation to gelation kinetics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 31, 115-123.
- Veberg, A., Olsen, E., Nilsen, A.N., Wold, J.P., 2007. Front-face fluorescence measurement of photosensitizers and lipid oxidation products during the photooxidation of butter. *J. Dairy Sci.* 90, 2189-99.
- Veisseyre, R., 1988. *Lactología técnica*, Segunda Ed. ed. Paris.
- Vieira, M.C., Teixeira, A., Silva, C.L., 2000. Mathematical modeling of the thermal degradation kinetics of vitamin C in cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar. *J. Food Eng.* 43, 1-7.
- Vikram, V.B., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G., 2005. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *J. Food Eng.* 69, 31-40.
- Walstra, P., Jenness, R., 1984. *Dairy chemistry and physics*, Ilustrada. ed. WILEY-BLACKWELL, New York.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. *Dairy Science and Techonology*, Second Ed. ed. New York.

- Wang, Y., Ding, W., Kou, L., Li, L., Wang, C., Jurick II, W.M., 2015. A Non-destructive method to assess freshness of raw bovine milk using FT-NIR spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5305-5310.
- Wold, J.P., Jørgensen, K., Lundby, F., 2002. Nondestructive measurement of light-induced oxidation in dairy products by fluorescence spectroscopy and imaging. *J. Dairy Sci.* 85, 1693-704.
- Wold, J.P., Mielnik, M., 2000. Nondestructive Assessment of Lipid Oxidation in Minced Poultry Meat by Autofluorescence Spectroscopy. *J. Food Sci.* 65, 87-95.
- Wold, J.P., Skaret, J., Dalsgaard, T.K., 2015. Assessment of the action spectrum for photooxidation in full fat bovine milk. *Food Chem.* 179, 68-75.
- Wold, J.P., Veberg, A., Lundby, F., Nikolai Nilsen, A., Moan, J., 2006. Influence of storage time and color of light on photooxidation in cheese: A study based on sensory analysis and fluorescence spectroscopy. *Int. Dairy J.* 16, 1218-1226.
- Wold, J.P., Veberg, A., Nilsen, A., Iani, V., Juzenas, P., Moan, J., 2005. The role of naturally occurring chlorophyll and porphyrins in light-induced oxidation of dairy products. A study based on fluorescence spectroscopy and sensory analysis. *Int. Dairy J.* 15, 343-353.
- Wong, T.-T., 2015. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation. *PATTERN Recognit.* 48, 2839-2846.
- Yang, R., Liu, R., Dong, G., Xu, K., Yang, Y., Zhang, W., 2016. Two-dimensional hetero-spectral mid-infrared and near-infrared correlation spectroscopy for discrimination adulterated milk. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 157, 50-4.
- Yang, X., Jia, Z., Tan, Z., Xu, H., Luo, N., Liao, X., 2016. Determination of melamine in infant formulas by fluorescence quenching based on the functionalized Au nanoclusters. *Food Control* 70, 286-292.
- Yasmin, A., Huma, N., Butt, M.S., Zahoor, T., Yasin, M., 2012. Seasonal variation in milk vitamin contents available for processing in Punjab, Pakistan. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 11, 99-105.
- Yazdi, S.R., Corredig, M., 2012. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chem.* 132, 1143-1149.
- Zaïdi, F., Rouissi, H., Dridi, S., Kammoun, M., De Baerdemaeker, J., Karoui, R., 2008. Front-Face Fluorescence Spectroscopy as a Rapid and Non-Destructive Tool for Differentiating Between Sicilo–Sarde and Comisana Ewe’s Milk During Lactation Period: A Preliminary Study. *Food Bioprocess Technol.* 1, 143-151.
- Zand, N., Chowdhry, B.Z., Pullen, F.S., Snowden, M.J., Tetteh, J., 2012. Simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by UHPLC/LC-MS in UK commercial infant meal food products. *Food Chem.* 135, 2743-2749.
- Zandomenoghi, M., Carbonaro, L., Zandomenoghi, G., 2007. Biochemical fluorometric method for the determination of riboflavin in milk. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5990-5994.
- Zhong, J.Z., Liu, W., Liu, C.M., Wang, Q.H., Li, T., Tu, Z.C., Luo, S.J., Cai, X.F., Xu, Y.J., 2012. Aggregation and conformational changes of bovine β -lactoglobulin subjected to dynamic high-pressure microfluidization in relation to antigenicity. *J. Dairy Sci.* 95, 4237-4245.

Ziegler, J.A., Keevil, N.B., 1944. Photochemical destruction of riboflavin in milk and losses during processing. *J. Biol. Chem.* 155, 605-606.

Zuo, R., Zhou, S., Zuo, Y., Deng, Y., 2015. Determination of creatinine, uric and ascorbic acid in bovine milk and orange juice by hydrophilic interaction HPLC. *Food Chem.* 182, 242-245.