



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**Caracterización de leches mediante ATR
FT-IR combinado con técnicas
quimiométricas**

Autor:

Pérez García, Alba

Tutores:

Rodríguez Méndez, María Luz

Salvo Comino, Coral

Departamento de Química Física y Química Inorgánica

Valladolid, Julio 2021



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi tutora María Luz Rodríguez Méndez, por darme siempre su más sincero apoyo, por animarme a conseguir mis objetivos y por confiar en mi en todo momento.

Quiero agradecer también a Coral Salvo Comino, por todo tu trabajo conmigo, sacarme de apuros cuando no sabía por dónde tirar, tu alegría y tu manera de levantar el ánimo siempre a todo el mundo.

A todo el equipo del laboratorio, porque desde el primer día me han hecho sentir a gusto, como una más. Al equipo del laboratorio del edificio Lucía, por permitirme llevar a cabo varios experimentos de mi TFG y tratarme tan bien.

Por último y más importante, quiero agradecer a mis padres Susana y Luis, a mis hermanas Andrea y Amaya, y al resto de mi familia, porque gracias a ellos soy quien soy y he llegado a completare profesionalmente. Siempre me habéis apoyado en todo y por ello os estaré agradecida siempre, os quiero muchísimo.

Muchas gracias a todos.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Resumen

En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización de diferentes tipos de leche UHT comercial, concretamente, clásicas (entera, semidesnatada y desnatada), tres leches con calcio (entera, semidesnatada y desnatada) y tres sin lactosa (entera, semidesnatada y desnatada).

Para cada una de las nueve leches estudiadas se aislaron los componentes de lactosa, grasa, caseína y lactosa y albúmina, los cuales se caracterizaron mediante espectroscopía infrarroja (ATR FT-IR), con el objetivo de determinar su presencia en las leches estudiadas. Seguidamente, se realizó un análisis quimiométrico, que consistió en un análisis por componentes principales (PCA), de los datos obtenidos por espectroscopía infrarroja. Este método permite observar con claridad pequeñas diferencias existentes en los espectros obtenidos mediante la espectroscopía infrarroja.

Finalmente, con el finde evaluar los límites de detección del sistema, a las mismas nueve leches se les hicieron adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico, añadiéndolas un 150%, 100% y 50%, en concentración (mg/ml), estos porcentajes se hicieron respecto de los valores que contiene cada leche. Los análisis espectroscópicos con ATR FT-IR combinados con los quimiométricos mediante el análisis de componentes principales (PCA) permitió comprobar la eficiencia del sistema.

Palabras clave: leche, espectroscopía de infrarrojos, ATR FT-IR, análisis por componentes principales (PCA)



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Abstract

In this work, the characterization of different types of commercial UHT milk has been carried out, namely, classic (whole, semi-skimmed and skimmed), three milks with calcium (whole, semi-skimmed and skimmed) and three without lactose (whole, semi-skimmed and skimmed).

For each of the nine milks studied, lactose, fat, casein and lactose and albumin components were isolated and characterized by infrared spectroscopy (ATR FT-IR) to determine their presence in the milks studied. Next, a chemometric analysis was performed, which consisted of a principal component analysis (PCA) of the data obtained by infrared spectroscopy. This method makes it possible to clearly observe small differences in the spectra obtained by infrared spectroscopy.

Finally, in order to evaluate the detection limits of the system, additions of lactose, galactose and calcium phosphate were made to the same nine milks, adding 150%, 100% and 50%, in concentration (mg/ml), these percentages were made with respect to the values contained in each milk. The spectroscopic analysis with ATR FT-IR combined with the chemometric analysis by means of principal component analysis (PCA) allowed to verify the efficiency of the system.

Keywords: milk, infrared spectroscopy, FT-IR ATR, principal component analysis (PCA).



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Índice

1. Justificación y objetivos.....	25
1.1. Justificación	25
1.2. Objetivos	26
2. Fundamento teórico.....	33
2.1. Leche en la industria	33
2.1.1. Composición química de la leche y componentes estudiados ..	33
2.1.2. Clasificación de la leche	39
2.1.2.1. Por tratamiento térmico	40
2.1.2.2. Por su contenido nutricional.....	40
2.1.2.3. Por su forma física.....	41
2.2. Técnicas de análisis para el estudio de la leche y sus componentes.....	41
2.3. Lengua electrónica	42
2.3.1. Técnicas de análisis multivariante y discriminante (Quimiometría).....	44
2.3.1.1. Análisis de componentes principales (PCA)	44
2.3.2. Técnicas espectroscópicas en análisis de leches.....	47
2.3.2.1. Espectroscopía infrarroja (IR).....	47
3. Reactivos, materiales y equipos empleados	53
3.1. Reactivos	53
3.2. Materiales.....	53
3.3. Equipos	54
3.4. Preparación de disoluciones	54
3.4.1. Preparación de ácido acético 1M.....	54
3.4.2. Preparación de disoluciones madre de lactosa, galactosa y fosfato cálcico.....	54
3.4.3. Preparación de disoluciones de lactosa y galactosa	54
3.4.3.1. Preparación de disolución con un 150% m/v en lactosa y galactosa... ..	55
3.4.3.2. Preparación de disolución con un 100% m/v en lactosa y galactosa.. ..	56



3.4.3.3. Preparación de disolución con un 50% m/v en lactosa y galactosa.....	56
3.4.4. Preparación de disoluciones de fosfato cálcico.....	56
3.4.4.1. Preparación de disolución con un 150% m/v en fosfato cálcico.....	56
3.4.4.2. Preparación de disolución con un 100% m/v en fosfato cálcico.....	57
3.4.4.3. Preparación de disolución con un 50% m/v en fosfato cálcico.....	57
4. Metodología y desarrollo experimental.....	61
4.1. Aislamiento de los componentes de la leche.....	61
4.1.1. Aislamiento de la grasa.....	61
4.1.2. Aislamiento de la caseína.....	62
4.1.3. Aislamiento de lactosa y albúmina.....	62
4.1.3.1. Aislamiento de la albúmina.....	63
4.1.3.2. Aislamiento de la lactosa.....	63
4.2. Estudio de la leche con adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico.....	64
4.3. Análisis quimiométrico.....	64
5. Resultados y discusión.....	67
5.1. Estudio de los componentes de la leche mediante espectroscopía ATR FT-IR.....	68
5.2. Estudio de las influencias de las adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico en leche mediante espectroscopía ATR FT-IR.....	74
5.2.1. Estudio de la influencia de lactosa.....	74
5.2.2. Estudio de la influencia del fosfato cálcico.....	76
5.2.3. Estudio de la influencia de la galactosa.....	77
5.3. Análisis de componentes principales (PCA).....	78
5.3.1. Estudio de las PCA de las leches y sus componentes.....	78
5.3.1.1. Estudio de las nueve leches (clásicas, con calcio y sin lactosa) por componente.....	79
5.3.1.2. Estudio por tipos de leche y grasa.....	83



5.3.2. Estudio de las PCA de las nueve leches estudiadas con adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico.	85
6. Conclusiones	97
7. Bibliografía	101



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 DIFERENTES TIPOS DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE. OLEICO A). LINOLEICO B). LINOLÉNICO C).....	36
FIGURA 2 ESTRUCTURA DE LA LACTOSA	37
FIGURA 3 ESTRUCTURA DE LA GALACTOSA.....	37
FIGURA 5 TENSIÓN SIMÉTRICA DE ENLACE	48
FIGURA 6 FLEXIÓN SIMÉTRICA EN EL PLANO (TIJERAS) EN EL PLANO (ROCK).....	48
FIGURA 7 FLEXIÓN NO SIMÉTRICA	48
FIGURA 8 ESPECTRO DE LA GRASA DE LAS LECHE CLÁSICAS	69
FIGURA 9 ESPECTROS DE LAS GRASAS DE LAS LECHE ENTERA, SEMIDESNATADA Y DESNATADA SIN LACTOSA	70
FIGURA 10 ESPECTROS DE LOS 3 TIPOS DE LECHE ENTERA POR COMPONENTE. LECHE ENTERA CLÁSICA A). LECHE ENTERA CON CALCIO B). LECHE ENTERA SIN LACTOSA C).	71
FIGURA 11 ESPECTROS DE LOS 3 TIPOS DE LECHE DESNATADA POR COMPONENTE. LECHE DESNATADA CLÁSICA A). LECHE DESNATADA CON CALCIO B). LECHE DESNATADA SIN LACTOSA C).	73
FIGURA 12 ESPECTROS DE LECHE CON ADICIONES DE LACTOSA. ESPECTROS DE LA LECHE ENTERA SIN LACTOSA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE LACTOSA A). ESPECTROS DE LA LECHE SEMIDESNATADA SIN LACTOSA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE LACTOSA B). ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA SIN LACTOSA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE LACTOSA C).	75
FIGURA 13 ESPECTROS DE LECHE CON ADICIONES DE FOSFATO CÁLCICO. ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA SIN LACTOSA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE FOSFATO CÁLCICO A). ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA CON CALCIO SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE FOSFATO CÁLCICO B). ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA CLÁSICA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE FOSFATO CÁLCICO C).	76
FIGURA 14 ESPECTROS DE LECHE CON ADICIONES DE GALACTOSA. ESPECTROS DE LA LECHE SEMIDESNATADA CLÁSICA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE GALACTOSA A). ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA SIN LACTOSA SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE GALACTOSA B). ESPECTROS DE LA LECHE DESNATADA CON CALCIO SIN TRATAR, CON UN 150% M/V, 100% M/V Y 50% M/V DE GALACTOSA C)...	78
FIGURA 15 PCA EN 3D. PCA DE LOS NUEVE TIPOS DE LECHE SIN TRATAR A). PCA DE LAS NUEVE LECHE SIN GRASA B).....	79
FIGURA 16 PCA EN 3D. PCA DE LACTOSA Y ALBÚMINA EN LOS NUEVE TIPOS DE LECHE ESTUDIADOS A). PCA DE LA LACTOSA EN LOS NUEVE TIPOS DE LECHE ESTUDIADOS B). ...	81
FIGURA 17 PCA EN 3D DE LAS GRASAS DE LOS NUEVE TIPOS DE LECHE ESTUDIADOS OBTENIDAS MEDIANTE CENTRIFUGACIÓN.	82
FIGURA 18 PCA EN 2D DE TODAS LOS COMPONENTES DE LOS TRES TIPOS DE LECHE DESNATADAS.....	83
FIGURA 19 PCA EN 2D DE LOS COMPONENTES DE LOS TRES TIPOS DE LECHE ENTERAS.	84
FIGURA 20 PCA EN 3D CON ADICIONES DE GALACTOSA, LACTOSA Y FOSFATO CÁLCICO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LECHE. LECHE ENTERA A), LECHE SEMIDESNATADA B).	86



FIGURA 21 PCA EN 3D CON ADICIONES DE GALACTOSA, LACTOSA Y FOSFATO CÁLCICO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES EN LECHE. LECHE ENTERA ENRIQUECIDA CON CALCIO A), LECHE DESNATADA ENRIQUECIDA CON CALCIO B).	87
FIGURA 22 PCA EN 3D CON ADICIONES DE LACTOSA, GALACTOSA Y FOSFATO CÁLCICO. ADICIÓN DEL 100% M/V DE GALACTOSA A). ADICIÓN DEL 100% M/V DE LACTOSA B). ADICIÓN DEL 150% M/V DE FOSFATO CÁLCICO C).	89
FIGURA 23 PCA EN 2D DE LA ADICIÓN DEL 150% M/V DE LACTOSA EN LAS NUEVE LECHE ESTUDIADAS.	91



LISTA DE TABLAS

TABLA 1 CUADRO RESUMEN DE LOS PICOS CARACTERÍSTICOS QUE SE VAN A ESTUDAR [52].	50
TABLA 2 TABLA RESUMEN DE LOS VALORES OBTENIDOS EN LAS PCA ESTUDIADAS.....	93



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Abreviaturas y acrónimos

E – Leche entera

S – Leche semidesnatada

D – Leche desnatada

E calcio – Leche entera con calcio

S calcio – Leche semidesnatada con calcio

D calcio – Leche desnatada con calcio

E sin lact – Leche entera sin lactosa

S sin lact – Leche semidesnatada sin lactosa

D sin lact – Leche desnatada sin lactosa

Tsg E – Tratamiento sin grasa de leche entera

Tsg S – Tratamiento sin grasa de leche semidesnatada

Tsg D – Tratamiento sin grasa de leche desnatada

Tsg E calc – Tratamiento sin grasa de leche entera con calcio

Tsg S calc – Tratamiento sin grasa de leche semidesnatada con calcio

Tsg D calc – Tratamiento sin grasa de leche desnatada con calcio

Tsg E sl – Tratamiento sin grasa de leche entera sin lactosa

c E – caseína de leche entera

c S – caseína de leche semidesnatada

c D – caseína de leche desnatada

c E calcio – caseína de leche entera con calcio

c S calcio – caseína de leche semidesnatada con calcio

c D calcio – caseína de leche desnatada con calcio

c E sl – caseína de leche entera sin lactosa

c S sl – caseína de leche semidesnatada sin lactosa

c D sl – caseína de leche desnatada sin lactosa



lya E – Lactosa y albúmina de leche entera
lya S – Lactosa y albúmina de leche semidesnatada
lya D – Lactosa y albúmina de leche desnatada
lya E calc – Lactosa y albúmina de leche entera con calcio
lya S calc – Lactosa y albúmina de leche semidesnatada con calcio
lya D calc – Lactosa y albúmina de leche desnatada con calcio
lya E sl – Lactosa y albúmina de leche entera sin lactosa
lya S sl – Lactosa y albúmina de leche semidesnatada sin lactosa
lya D sl – Lactosa y albúmina de leche desnatada sin lactosa
I E – Lactosa de leche entera
I S – Lactosa de leche semidesnatada
I D – Lactosa de leche desnatada
I E calcio – Lactosa de leche entera con calcio
I S calcio – Lactosa de leche semidesnatada con calcio
I D calcio – Lactosa de leche desnatada con calcio
I E sl – Lactosa de leche entera sin lactosa
I S sl – Lactosa de leche semidesnatada sin lactosa
I D sl – Lactosa de leche desnatada sin lactosa
g E – Grasa de leche entera
g S – Grasa de leche semidesnatada
g E calcio – Grasa de leche entera con calcio
g S calcio – Grasa de leche semidesnatada con calcio
g E sl – Grasa de leche entera sin lactosa
g S sl – Grasa de leche semidesnatada sin lactosa
g D sl – Grasa de leche desnatada sin lactosa
L E 100% - Adición del 100% de lactosa en leche entera
L E 50% - Adición del 50% de lactosa en leche entera



L E 150% - Adición del 150% de lactosa en leche entera
G E 100% - Adición del 100% de galactosa en leche entera
G E 50% - Adición del 50% de galactosa en leche entera
G E 150% - Adición del 150% de galactosa en leche entera
C E 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche entera
C E 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche entera
C E 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche entera
L E c 100% - Adición del 100% de lactosa en leche entera con calcio
L E c 50% - Adición del 50% de lactosa en leche entera con calcio
L E c 150% - Adición del 150% de lactosa en leche entera con calcio
G E c 100% - Adición del 100% de galactosa en leche entera con calcio
G E c 50% - Adición del 50% de galactosa en leche entera con calcio
G E c 150% - Adición del 150% de galactosa en leche entera con calcio
C E c 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche entera con calcio
C E c 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche entera con calcio
C E c 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche entera con calcio
L E sl 100% - Adición del 100% de lactosa en leche entera sin lactosa
L E sl 50% - Adición del 50% de lactosa en leche entera sin lactosa
L E sl 150% - Adición del 150% de lactosa en leche entera sin lactosa
G E sl 100% - Adición del 100% de galactosa en leche entera sin lactosa
G E sl 50% - Adición del 50% de galactosa en leche entera sin lactosa
G E sl 150% - Adición del 150% de galactosa en leche entera sin lactosa
C E sl 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche entera sin lactosa
C E sl 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche entera sin lactosa
C E sl 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche entera sin lactosa
L S 100% - Adición del 100% de lactosa en leche semidesnatada
L S 50% - Adición del 50% de lactosa en leche semidesnatada



- L S 150% - Adición del 150% de lactosa en leche semidesnatada
- G S 100% - Adición del 100% de galactosa en leche semidesnatada
- G S 50% - Adición del 50% de galactosa en leche semidesnatada
- G S 150% - Adición del 150% de galactosa en leche semidesnatada
- C S 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche semidesnatada
- C S 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche semidesnatada
- C S 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche semidesnatada
- L S c 100% - Adición del 100% de lactosa en leche semidesnatada con calcio
- L S c 50% - Adición del 50% de lactosa en leche semidesnatada con calcio
- L S c 150% - Adición del 150% de lactosa en leche semidesnatada con calcio
- G S c 100% - Adición del 100% de galactosa en leche semidesnatada con calcio
- G S c 50% - Adición del 50% de galactosa en leche semidesnatada con calcio
- G S c 150% - Adición del 150% de galactosa en leche semidesnatada con calcio
- C S c 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche semidesnatada con calcio
- C S c 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche semidesnatada con calcio
- C S c 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche semidesnatada con calcio
- L S sl 100% - Adición del 100% de lactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- L S sl 50% - Adición del 50% de lactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- L S sl 150% - Adición del 150% de lactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- G S sl 100% - Adición del 100% de galactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- G S sl 50% - Adición del 50% de galactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- G S sl 150% - Adición del 150% de galactosa en leche semidesnatada sin lactosa
- C S sl 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche semidesnatada sin lactosa



C S sl 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche semidesnatada sin lactosa

C S sl 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche semidesnatada sin lactosa

L D 100% - Adición del 100% de lactosa en leche desnatada

L D 50% - Adición del 50% de lactosa en leche desnatada

L D 150% - Adición del 150% de lactosa en leche desnatada

G D 100% - Adición del 100% de galactosa en leche desnatada

G D 50% - Adición del 50% de galactosa en leche desnatada

G D 150% - Adición del 150% de galactosa en leche desnatada

C D 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche desnatada

C D 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche desnatada

C D 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche desnatada

L D c 100% - Adición del 100% de lactosa en leche desnatada con calcio

L D c 50% - Adición del 50% de lactosa en leche desnatada con calcio

L D c 150% - Adición del 150% de lactosa en leche desnatada con calcio

G D c 100% - Adición del 100% de galactosa en leche desnatada con calcio

G D c 50% - Adición del 50% de galactosa en leche desnatada con calcio

G D c 150% - Adición del 150% de galactosa en leche desnatada con calcio

C D c 100% - Adición del 100% de fosfato cálcico en leche desnatada con calcio

C D c 50% - Adición del 50% de fosfato cálcico en leche desnatada con calcio

C D c 150% - Adición del 150% de fosfato cálcico en leche desnatada con calcio

L D 100% sl - Adición del 100% de lactosa en leche desnatada sin lactosa

L D 50% sl - Adición del 50% de lactosa en leche desnatada sin lactosa

L D 150% sl - Adición del 150% de lactosa en leche desnatada sin lactosa

G D 100% sl - Adición del 100% de galactosa en leche desnatada sin lactosa

G D 50% sl - Adición del 50% de galactosa en leche desnatada sin lactosa

G D 150% sl - Adición del 150% de galactosa en leche desnatada sin lactosa



C D 100% sl – Adición del 100% de fosfato cálcico en leche desnatada sin lactosa

C D 50% sl – Adición del 50% de fosfato cálcico en leche desnatada sin lactosa

C D 150% sl – Adición del 150% de fosfato cálcico en leche desnatada sin lactosa



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



1. Justificación y objetivos

1.1. Justificación

La industria alimentaria es la principal industria manufacturera europea, procesa más del 70% de los alimentos que se producen y, además genera innumerables puestos de empleo, 4,1 millones de personas, de las cuales el 63% corresponden al sector agroalimentario [1].

Dentro de la Unión Europea, España se encuentra en el quinto puesto en valor de ventas, la encuesta realizada en 2011 mostró que España es la primera rama industrial en productos de alimentación y bebidas, representando el 19,66% de las ventas netas de producto. Del total de ventas netas, las industrias lácteas ocupan el segundo lugar (10%) [1].

En cuanto a Castilla y León, ocupa el segundo puesto en la producción de leche dentro de la industria alimentaria española, con más de 77.741 toneladas de leche por mes y, además, es la productora de leche de oveja más importante de España junto con Castilla la Mancha [1].

A lo largo de los años se han llevado a cabo diferentes métodos para evaluar tanto la calidad como la autenticidad de la leche y de los productos lácteos. La espectroscopía de infrarrojo cercano, entre otras técnicas de análisis, se ha utilizado en numerosas ocasiones para la determinación de ciertos componentes de la leche, debido a que es una técnica que no requiere prácticamente ningún tratamiento, es no destructiva y rápida.

Los espectros que se obtienen dan una gran cantidad de información estructural, y se consideran la huella característica del alimento a estudiar, lo que es útil para describir peculiaridades de los alimentos y su correspondiente calidad [2].

En productos lácteos, más concretamente en leche, se han llevado a cabo numerosos estudios mediante espectroscopía de infrarrojo medio, estos se han visto limitados por el agua, debido a sus fuertes absorciones. Normalmente se lleva a cabo mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier no mide el espectro estudiando cada longitud de onda individual como ocurre en los sistemas convencionales de espectroscopía infrarroja, sino que utiliza un interferómetro de Michelson, del cual se obtiene el interferograma que contiene la información espectral, a este se le aplica la transformada de Fourier obteniendo así el espectro en el dominio de las frecuencias [3].



En la escuela de Ingenierías Industriales se encuentra el equipo de investigación UvaSens, dirigido por la Profesora María Luz Rodríguez Méndez. Una de las líneas principales de investigación está centrada en el diseño de redes de sensores voltamperométricos (lenguas electrónicas), implementando análisis de componentes principales (PCA).

El presente trabajo se basa en el estudio de la caracterización de diferentes tipos de leche comercial mediante ART FT-IR, Enteras, Semidesnatadas y Desnatadas, dentro de la cuales se estudiarán las leches clásicas, sin lactosa y enriquecidas con calcio.

Se trata de una línea de estudio relativamente nueva, ya que se va a utilizar en primer lugar ATR FT-IR, actualmente hay diferentes estudios en la leche, pero la mayoría están llevados a cabo en espectroscopía NIR [4], como se ha mencionado anteriormente, y, en segundo lugar, se llevará a cabo un análisis estadístico mediante métodos quimiométricos.

1.2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es conseguir discriminar entre 9 tipos de leche comercial mediante el desarrollo de un método de análisis de leche utilizando una combinación de infrarrojo y técnicas quimiométricas a partir de datos espectroscópicos, haciendo diferentes adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico a la leche y en diferentes concentraciones, además, a la leche se le ha sometido a una serie de tratamientos para aislar los componentes de lactosa, grasa, caseína y lactosa y albúmina de la leche y poder compararlos. Para conseguir el objetivo principal se tienen que llevar a cabo los siguientes objetivos parciales:

- Optimizar el método de medida con ATR FT-IR, para ello se ajustan los parámetros de temperatura, tiempo transcurrido entre medidas, cantidad de muestra a medir y barridos de la muestra.
- Combinar ATR FT-IR con quimiometría, para ello seleccionar los datos relevantes de los espectros y combinarlos con el análisis de componentes principales (PCA).
- Adicionar lactosa, galactosa y fosfato cálcico en concentraciones crecientes a las muestras de leche para cerciorarse de la posición de las bandas de absorción características de los compuestos que se van a estudiar.



- Aclimatar las muestras de leche con diferentes tratamientos para aislar los componentes que contiene la leche, grasa, caseína, lactosa y albúmina y lactosa.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

DESARROLLO DEL TFG



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



FUNDAMENTO TEÓRICO



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



2. Fundamento teórico

2.1. Leche en la industria

La leche es un líquido de color blanco y opaco rico en nutrientes, tiene un sabor dulce, un pH muy próximo a la neutralidad y un olor característico. Es un alimento considerado básico para los humanos debido a la relación directa existente entre el contenido en nutrientes y el aporte energético de los mismos, gracias a los avances en su procesamiento industrial, la población tiene acceso al consumo de la leche [5].

La leche es una mezcla heterogénea y compleja, el término heterogénea se debe a que está compuesta por proteínas, grasas, glúcidos, sales minerales, vitaminas y, en menor proporción enzimas. Su complejidad es debida a la presencia de sustancias sin valor nutritivo que, deben ser eliminadas [6].

2.1.1. Composición química de la leche y componentes estudiados

La leche es una mezcla compleja de distintas sustancias, estas se pueden presentar en forma de emulsión o en suspensión, otras también pueden estar en forma de solución verdadera. Estas diferentes sustancias que la componen se dividen en dos grandes grupos, extracto seco o sólidos totales, donde los sólidos totales varían atendiendo a diferentes factores, como pueden ser la raza o el tipo de alimentación y el extracto seco, es lo que se conoce como el residuo obtenido tras someter a la leche a un proceso de desecación hasta obtener un peso constante [7].

La leche es un aporte de proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas del complejo B y liposolubles y minerales, entre los que destacan el calcio y el fósforo [8].

A continuación, se describen cada uno de los componentes más abundantes que constituyen la leche:

- **Agua:**

Desde el punto de vista cuantitativo, el agua es el principal componente de la leche, está presente en torno al 90% en la leche de vaca. Es la fase dispersante, en ella se encuentran en forma de emulsión o suspendidos, los glóbulos de



grasa, las proteínas en forma de micelas y, tanto los carbohidratos como las sales minerales se encuentran como solución verdadera [5].

- **Proteínas (caseínas / proteínas séricas):**

Las proteínas que contiene la leche son de fácil digestión y de un alto valor biológico, son un aporte fundamental de los aminoácidos esenciales que necesitan los seres humanos en su dieta diaria. Las proteínas que componen la leche son una mezcla de fracciones proteicas, se clasifican en dos grandes grupos:

- **Caseínas:**

La caseína es la proteína principal y más abundante de la leche, constituyendo un 80% del total, tienen una elevada tendencia a fusionarse entre sí, de esta manera forman estructuras de mayor orden, de varios tamaños y morfología. La más característica es la micela de caseína, siendo esta la responsable del color blanco de la leche[9].

Este tipo de proteína es característico, debido a que solo se puede encontrar en la leche, dentro de la caseína se distinguen tres tipos, dependiendo de sus cadenas de aminoácidos se encuentran la α -caseína y β -caseína, que constituyen el 70% del conjunto y, la k-caseína que constituye un 13% [7].

La caseína desempeña un papel fundamental en el transporte de sales minerales, más concretamente el calcio y el fósforo [8]. Es de gran importancia, debido a que tiene una elevada capacidad de favorecer la absorción del calcio en el tracto intestinal.

La caseína se desnaturaliza cuando se disminuye el pH hasta un valor de 4.6, esta disminución de pH provoca un desdoblamiento de la cadena peptídica haciendo que se vuelva más reactiva.

Existen ciertas enzimas proteolíticas, como la quimiocina, es la responsable de la coagulación de la caseína, lo que hace que la leche se cuaje y se elaboren los quesos [7].

- **Proteínas séricas:**

Estas proteínas están compuestas por globulinas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina), albúmina sérica y, además, enzimas propias de la leche. Las proteínas séricas son proteínas globulares y son más solubles en agua que la caseína. Constituyen un 20% del total [7].



La albúmina se encuentra en el segundo lugar, después de la caseína, en cuanto a cantidad se refiere. Las globulinas son las proteínas que tienen mayor peso molecular y, además, son las que más varían a lo largo del período de lactancia. Ambas se desnaturalizan al aumentar la temperatura, provocando así la pérdida de solubilidad y su actividad de manera irreversible [8].

- **Lípidos:**

Las grasas son los componentes que más varían en la leche, y son las principales determinantes de las propiedades físicas y organolépticas características de la leche.

La leche está compuesta en su mayoría por triglicéridos, el 70% son ácidos grasos saturados (AGS), y el restante son insaturados (AGI), encontrándose estos en forma de glóbulos de grasa suspendidos en el agua. Estos glóbulos de grasa se repelen entre sí, pero atraen el agua, debido a que están rodeados con una pequeña capa de fosfolípidos, esto permite la estabilización de la emulsión, protegiendo a los constituyentes de los enzimas lipolíticos y de oxidaciones [5].

El ácido oleico, linoleico y α -linolénico están presentes dentro de los AGI, junto con estos aparecen los ácidos grasos de cadena corta, que solamente aparecen en la leche de vaca [10].

La grasa constituye el 3% de la leche, esta se puede ver afectada por factores externos, como son la luz, el oxígeno y enzimas como las lipasas. Estos factores son los responsables de la *lipólisis*, también conocida como oxidación enzimática, se produce la descomposición de la grasa en otros compuestos como los monoglicéridos y los ácidos grasos libres esto hace que la vida útil de la leche se reduzca, provocándose deterioros en sus características, como, por ejemplo [7]:

- Alteraciones en el color y en la textura que presenta.
- Pérdida de vitaminas
- Alteraciones en el sabor, haciendo que sea sebáceo o rancio [7].

La prevención de la peroxidación de la leche y el mantenimiento de la calidad de la leche se debe principalmente a los antioxidantes que contiene la leche, estos se dividen en dos grandes grupos, en el primero se incluyen proteínas como la caseína y enzimas como la catalasa, en el segundo, están incluidos las vitaminas C y E [11].

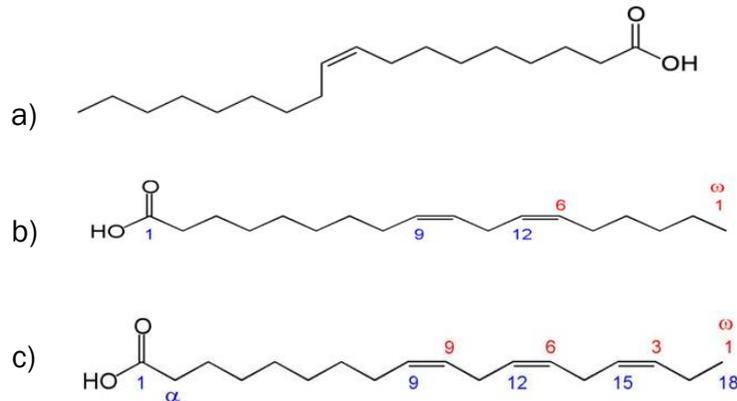


Figura 1 Diferentes tipos de ácidos grasos de la leche. Oleico a). Linoleico b). Linolénico c).

- **Glúcidos:**

El principal carbohidrato de la leche es la lactosa, se trata de uno de los disacáridos más importantes en la nutrición humana, está formado por la unión de una molécula de glucosa y una molécula de galactosa. Atiende a la fórmula química $C_{12}H_{22}O_{11}$ [12].

La lactosa es comúnmente conocida como el azúcar de la leche, es muy importante para un buen desarrollo neurológico temprano y, además, participa en la formación de estructuras de la membrana celular [5]. Dentro del cuerpo humano, la lactosa es sintetizada por los enterocitos (células que revisten el intestino), es necesaria una enzima par poder llevar a cabo la hidrólisis, esta se llama lactasa, cuya función es convertir la lactosa en sus azúcares sencillos, glucosa y galactosa [5].

Algunas personas desarrollan intolerancia a la lactosa, y esto se debe a que se tiene una deficiencia de lactasa o que su actividad se ha visto reducida, por este motivo surgió la necesidad de comercializar la leche sin lactosa. Se llama leche sin lactosa a aquella a la cual se la ha adicionado lactasa comercial a la leche y posteriormente se ha incubado durante varias horas [13].

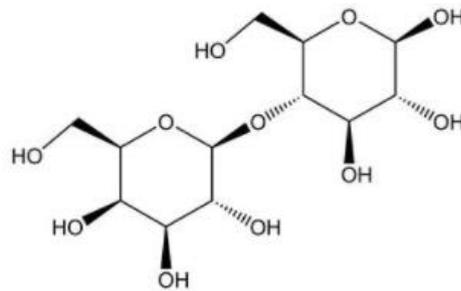


Figura 2 Estructura de la lactosa

Otro de los carbohidratos importantes que porta la leche es la galactosa, la fuente principal de galactosa que necesita el ser humano en la dieta se obtiene de la leche comercial [5]. Atiende a la fórmula $C_6H_{12}O_6$ [14].

La galactosa es una gran fuente de energía para nuestro metabolismo, la mayor parte de lo que se ingiere se retiene en el hígado, donde se convierte en energía [15].

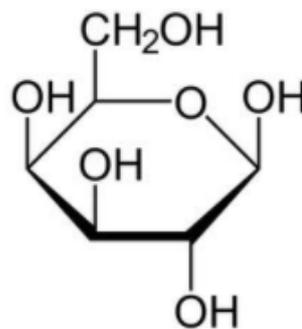


Figura 3 Estructura de la galactosa

- **Vitaminas:**

La leche de vaca está compuesta por gran cantidad de vitaminas, de las cuales destacan las vitaminas hidrosolubles (tiamina (B1), riboflavina (B), y en menor cantidad ácido fólico) y las liposolubles (la vitamina A o retinol es la que se encuentra en mayor concentración). Las liposolubles solo aparecen en la leche entera y en la semidesnatada, debido a que aparecen ligadas a los glóbulos de grasa, y las hidrosolubles, por lo general, permanecen constantes [5].

Las vitaminas son fundamentales para el correcto funcionamiento del organismo, sin embargo, este no es capaz de sintetizarlas, por lo tanto se deben consumir alimentos que contengan vitaminas, como por ejemplo la



leche, que está provista de ciertas vitaminas, como la B₁₂, los humanos que no consumen alimentos que provienen de los animales, como en este caso, leche y queso, presentan una deficiencia de esta vitamina [16].

La cantidad de vitaminas que contiene la leche comercial es significativamente menor que la leche del calostro, además, también influye la alimentación que tenga la vaca, la época del año, etc. La alimentación influye de manera directa en la cantidad de vitamina A presente en la leche, aumentando cuando la base del alimento es el forraje [7].

- **Enzimas:**

Las enzimas que componen la leche provienen o bien del torrente sanguíneo y de las células corporales o bien se han desarrollado en la propia leche como consecuencia de la acción de determinados gérmenes.

En la leche las enzimas que se encuentran pueden estar en forma de proteínas simples o como apoproteínas. Están presentes junto con los glóbulos de grasa, en forma de suspensión coloidal o asociadas a las micelas de caseína [17].

Existen dos grandes grupos de enzimas:

- **Hidrolasas:**

A este grupo de enzimas pertenecen las proteasas y las esterasas, dentro del grupo de las esterasas destaca la lipasa, es la causante del sabor rancio que se produce en la leche cuando no se refrigera. Las enzimas son termolábiles, por lo que una vez se ha tratado la leche, pasteurización, estas enzimas están inactivas [7].

- **Oxido-reductasas:**

Las más importantes son las catalasas y las peroxidasas. La lactoperoxidasa tiene como fuente industrial la leche bovina y sirve como indicador de la calidad microbiológica de la leche [7].

- **Sales minerales:**

En la leche también se encuentran sales minerales (alrededor del 1%) tanto en su forma orgánica como inorgánica, de esta manera se consigue mantener el equilibrio iónico del medio interno [5].



En la leche de vaca predominan el calcio, fosforo, potasio, magnesio y sodio, una parte de estos metales se encuentran en la leche en forma de iones en solución. El calcio en cambio, se encuentra ligado a las micelas de caseína [17].

El calcio es fundamental para el crecimiento y el desarrollo normal de los huesos de los niños, además de cumplir funciones básicas en el organismo, como el funcionamiento normal de los músculos, participa además en otros procesos, como es la coagulación sanguínea y la división y diferenciación celular [14].

En el presente trabajo se va a prestar especial interés en algunos de los componentes que se han mencionado en este apartado, en primer lugar, se van a estudiar las proteínas, más concretamente la caseína, debido a que está linealmente relacionada con la cantidad de glóbulos de grasa presentes en la leche [18].

En segundo lugar, se va a estudiar la grasa, ya que actualmente es el constituyente que recibe mayor atención, debido a que es la grasa más compleja que se puede obtener a través de la dieta [19].

En tercer lugar, se van a estudiar los carbohidratos característicos presentes en la leche, por medio de adiciones crecientes de lactosa y de galactosa, se han escogido estos carbohidratos ya que dentro de los tipos de leche que se van a estudiar, la galactosa se encuentra de manera libre en su forma molecular o, se encuentra ligada con una molécula de glucosa formando la lactosa.

En cuarto lugar, se van a estudiar los minerales que contiene la leche, más concretamente el calcio, ya que es el más significativo desde el punto de vista nutricional. El calcio está ligado en su mayoría con las micelas de caseína, por lo tanto, adiciones de concentración creciente de dicho mineral, en este caso se va a adicionar fosfato cálcico, mostrará bandas de absorción características en la región de las proteínas y en la región del calcio.

2.1.2. Clasificación de la leche

La leche se puede clasificar de acuerdo con diferentes aspectos, por tratamiento térmico, su contenido nutricional y su forma física.



2.1.2.1. Por tratamiento térmico

- Leche **esterilizada**: es aquella que asegura la destrucción de los gérmenes. Se puede envasar la leche antes de esterilizar, perdiendo muchas vitaminas, o después, obteniendo leche UHT o uperizada, la diferencia entre estas 2 últimas radica en la temperatura a la que se lleva a cabo y el tiempo que dura el tratamiento [20].
- Leche **pasteurizada**: normalmente conocida como leche fresca. Ésta difiere de la leche esterilizada en la temperatura y la duración del tratamiento. En este tratamiento se eliminan microorganismos patógenos, tiene el gran inconveniente de una vida comercial relativamente corta y debe conservarse a baja temperatura. La ventaja que tiene este tipo de leche es su elevado contenido en vitaminas, más que la leche esterilizada, y no contiene aditivos [20].

2.1.2.2. Por su contenido nutricional

- Leche **entera**: es aquella que contiene todos los nutrientes.
- Leche **semidesnatada**: tiene menos cantidad de grasa que la leche entera y menos cantidad de ciertas vitaminas liposolubles, como la A, D y E.
- Leche **desnatada**: a este tipo de leche se le ha quitado toda la grasa y todas las vitaminas liposolubles mencionadas en la leche semidesnatada, no obstante se las puede añadir de manera artificial.
- Leches que han sido **modificadas lipídicamente**: leche a la cual se le ha eliminado la grasa y en su lugar se le han añadido aceites vegetales, lo que hace que se convierta en leche rica en omega-3, contribuyendo así a una mejor calidad lipídica de la dieta.
- Leches **enriquecidas**: leche a la cual se le han añadido ciertos nutrientes, como por ejemplo vitaminas A y D, y calcio[20].
- Leches **sin lactosa**: son aquellas a las que se les ha adicionado la enzima lactasa, responsable de romper la lactosa en sus dos azúcares simples, glucosa y galactosa. Presenta un sabor más dulce que la leche clásica. Esta leche surge debido a la intolerancia que presentan algunos seres humanos a la lactosa [20].



2.1.2.3. Por su forma física

- **Leche líquida**
- Leche **evaporada**: se obtiene mediante un proceso de pasteurización-homogeneización (para evitar la formación de nata)-evaporación a vacío. Después de este proceso se envasa, se cierra y se esteriliza en autoclave.
- Leche **condensada**: es leche a la cuál se le ha añadido sacarosa, obteniendo así leche concentrada en azúcar, el proceso que sigue es la adición de sacarosa, ésta se disuelve, posteriormente se lleva a cabo una evaporación a vacío y por último un enfriamiento rápido.
- Leche **en polvo**: es leche que ha sido deshidratada, conteniendo una cantidad de agua menor al 5%. Este tipo de leche cuenta con un bajo contenido en vitaminas y en aminoácidos. El proceso que sigue para su obtención es la evaporación de la leche, seguido de una deshidratación de la leche concentrada y por último la granulación [21].

2.2. Técnicas de análisis para el estudio de la leche y sus componentes

En las industrias lecheras se llevan a cabo métodos de análisis para determinadas propiedades de la leche, como, por ejemplo, la densidad, viscosidad, conductividad térmica, etc. Por la cantidad de ensayos que se realizan se necesitan métodos y equipos que no sean caros, esto ha llevado a la necesidad de desarrollar métodos rápidos [22].

Para el análisis de las proteínas de la leche se han utilizado diversas técnicas, como son la filtración por membrana, la precipitación química y la extracción líquido-líquido, sin embargo, el método más utilizado es la cromatografía líquida de alto rendimiento [22].

La **cromatografía líquida de alto rendimiento** es una de las técnicas principales que se utilizan en las industrias lecheras para la separación y análisis de componentes, ya que tiene un elevado poder de resolución, un corto tiempo de análisis, una elevada versatilidad, el tiempo de separación es corto y es una técnica no destructiva [23].

Su funcionamiento se basa en una fase estacionaria y una fase móvil que se mueve a través de la fase estacionaria, permitiendo así que se separen los



componentes de la mezcla por las correspondientes fuerzas químicas y físicas que haya presentes [24].

La **potenciometría** se ha utilizado en numerosas ocasiones para la detección de minerales en la leche, en concreto, el calcio y el magnesio, para ello se utilizan electrodos indicadores de cobre. El calcio que está presente en la leche se encuentra de forma ligada, por lo que la adición de un ácido en solución alcalina provoca la reacción de los iones de calcio, de esta manera se puede determinar el contenido del mismo en la leche [25].

También se encuentran estudios acerca de métodos voltamperométricos de barrido (conocidos como **polarografía**) en leche de vaca, estos métodos se basan en la utilización de tres electrodos, el electrodo de referencia, el de trabajo y el contraelectrodo, siendo el electrodo de trabajo de gota de mercurio. El potencial del electrodo se ve alterado, mostrando una respuesta que determina el transporte de masa bien por convección o difusión[26].

La leche tiene una composición muy compleja, por lo que para el análisis de la misma y sus componentes se necesitan técnicas que no sean caras y que puedan detectar más de un compuesto a la vez. Las técnicas mencionadas hasta ahora no son capaces de distinguir varios componentes, por lo que se generó la necesidad de utilizar técnicas multivariantes.

Son muchos los análisis que requieren aparatos caros y tiempo de análisis. En lenguas electrónicas se tratan los datos de los sensores y se combinan con tratamiento de daos, en este caso, nosotros proponemos usar esta aproximación para combinar los datos de un espectro ATR FT-IR con un tratamiento de datos.

2.3. Lengua electrónica

La industria alimentaria se encuentra en crecimiento constante, por lo que el control de calidad requiere el desarrollo de nuevos sistemas de análisis, primero se introducen los sensores y biosensores, estos deben ser multiparamétricos y de análisis rápido. Para solventar estas necesidades se han desarrollaron las redes de sensores, lo que se denominan lenguas electrónicas, que son capaces de clasificar las muestras atendiendo a su composición química, su calidad o la presencia de adulteraciones[27].



Las lenguas electrónicas tienen ese nombre debido a su parecido funcionamiento con las lenguas humanas. La lengua electrónica está compuesta por redes de sensores que imitan las terminaciones nerviosas de las papilas gustativas de las lenguas humanas [28]. La red de sensores obtiene la información de la muestra, realiza el tratamiento de datos y, por último, procesa los datos mediante el uso de métodos estadísticos multivariantes y redes neuronales artificiales.

Estos sensores pueden ser de diferentes tipos, en la industria alimentaria los más usados son los electroquímicos, que comprenden los amperométricos y potenciométricos [29].

Las lenguas electrónicas que esta hechas con sensores potenciométricos son las menos utilizadas en alimentación debido a que necesitan un elevado volumen de muestra para medir, recalibraciones de manera frecuente y, un precalentamiento antes de su uso[30].

Las lenguas electrónicas basadas en los métodos amperométricos se basan en las propiedades redox de las diferentes especies químicas. Dentro de las técnicas amperométricas destaca la voltamperometría cíclica para obtener la información de las muestras, a estas se les aplica un potencial, dando lugar a los voltamperogramas, las curvas que aparecen en los voltamperogramas son características de las propiedades químicas de la muestra a la que se le aplica la técnica y del material del que esté compuesto el sensor[31].

Dentro del voltamperograma, los parámetros que resultan de interés son la intensidad el potencial de pico catódico y el de pico anódico[31].

Al igual que los datos obtenidos con el ATR FT-IR, los datos que se obtienen con la lengua también tienen que ser tratados mediante métodos quimiométricos para conseguir el objetivo, que es discriminar las muestras.

Las ventajas que presenta el uso de lenguas electrónicas son:

- Reducido coste de los análisis, debido al uso de sensores tanto inespecíficos como específicos.
- Los análisis se realizan de manera rápida y sencilla[32].
- Necesitan menos mantenimiento y son de fácil limpieza, debido a que tienen una elevada resistencia química, son capaces de soportar elevadas temperaturas y los procesos se realizan en autoclave.
- Tiene una elevada especificidad, no depende de un parámetro en concreto, por lo que responde a cualquier anomalía[33].



- Se obtienen medidas en tiempo real, las medidas se llevan a cabo en continuo.
- Los procesos son automatizables, ya que se tratan de sistemas ligeros y resistentes, con funcionamiento autónomo y envío de datos[33].

Debido a sus ventajas, las lenguas electrónicas son ampliamente reconocidas para el uso en controles de calidad de alimentos, materias primas, controles de quesos, vinos, etc [34]. Por ello es interesante correlacionar sus resultados con otras técnicas, como espectroscópicas, para obtener mayor capacidad de discriminación.

2.3.1. Técnicas de análisis multivariante y discriminante (Quimiometría)

Los métodos de análisis multivariante son métodos descriptivos y a la vez multidimensionales. Permiten conocer las variables predictivas, las variables respuesta y las relaciones que existen entre ellas. Permiten distinguir muestras parecidas y además permiten obtener datos e información de muchos componentes al mismo tiempo [35].

Existen gran cantidad de métodos multivariantes para el tratamiento de datos, atendiendo a los objetivos científicos se debe seleccionar el mas adecuado, para el tratamiento de datos que contienen mucha información redundante o que sea excesiva se debe utilizar el método multivariante de reducción de dimensión (análisis de componentes principales, escalamiento óptimo, etc.), combinan muchas variables observadas y obtienen las variables ficticias que las representan. También, existen los métodos de clasificación, que tratan de analizar las relaciones entre las variables separando por agrupaciones [35].

2.3.1.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica multivariante, se utiliza cuando se tiene una matriz de datos con un elevado número de variables con el objetivo de reducir la matriz de datos y transformar las variables en otras variables, siendo estas últimas las denominadas componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales. Donde se recoge la mayor parte de la información relevante contenida en los datos.



Pertenece al grupo de técnicas no supervisadas, lo que significa que se aplica a un bloque de datos (cualquier conjunto de variables) con el objetivo de reducir la complejidad de una manera robusta, produciendo representaciones gráficas de fácil interpretación.[35].

Los dos objetivos fundamentales del análisis de componentes principales son la reducción de los datos originales de estudio y la interpretación de los mismos [36].

Cuando se tiene una gran cantidad de datos con muchas variables, el objetivo es, mediante la utilización de combinaciones lineales de las variables originales representar lo mejor posible la variabilidad presente en los datos, reducir las variables perdiendo la menor información posible. La cantidad de información que contiene cada componente viene determinada por la varianza, cuanto mayor sea la varianza, más información posee dicha componente [35].

Como hemos dicho anteriormente, en las componentes principales hay casi tanta información como en las variables originales, y están definidas de la siguiente manera[37]:

$$v = a'X$$

Ecuación 1 Ecuación de componentes principales

Siendo:

v = matriz de componentes principales.

a = es una matriz de vectores ortonormales.

X = es la matriz de observación (las columnas representan las observaciones que caracterizan un objeto frente a las variables aleatorias).

Los nuevos ejes de la matriz representan las direcciones de máxima variabilidad y una descripción más simple de la estructura de covarianza. La matriz de covarianza es una matriz cuadrada que contiene el grado de variación de dos variables aleatorias respecto a sus medias, la covarianza se utiliza para

determinar la dependencia existente entre ambas variables. Los componentes principales van a depender únicamente de la matriz de covarianza [36]. Dentro de las componentes principales, la PC1, es la combinación lineal con la máxima varianza, es decir, maximiza:

$$\text{Var}(v_1) = a'_1 \Sigma a_1$$

Ecuación 2 Ecuación de la varianza



Siendo:

$$v_1 = a'_{11}X = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + \dots + a_{1p}X_p$$

$$v_2 = a'_{21}X = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + \dots + a_{2p}X_p$$

$$v_p = a'_{p1}X = a_{p1}X_1 + a_{p2}X_2 + \dots + a_{pp}X_p$$

Ecuación 3 Combinaciones lineales de la matriz de componentes principales

Por lo tanto, se define:

PC1 = combinación lineal $a'_{11}X$ que maximiza $\text{Var}(a'_{11})$ sujeto a $a'_{11}a_1 = 1$. La primera componente es la que posee mayor porcentaje de varianza del conjunto de datos.

PC2 = combinación lineal $a'_{21}X$ que maximiza $\text{Var}(a'_{21})$ sujeto a $a'_{21}a_1 = 1$ y $\text{COV}(a'_{21}X a'_{11}X) = 0$. La segunda componente posee el siguiente mayor porcentaje de varianza, y así sucesivamente para el resto de componentes principales [38].

Cabe destacar que la suma de las varianzas de las componentes principales es igual a la suma de las varianzas de las variables originales. Cuanto más correlacionadas estén las variables originales, con muy pocas componentes se puede explicar la mayor parte de la variabilidad [35].

Una vez se ha realizado la reducción de la observación de espacio, se puede obtener que variables iniciales tienen la mayor participación en la varianza de determinados componentes principales, mediante el uso de coeficientes de determinación establecidos entre los componentes principales y las variables iniciales [39].

Para la detección de formalina en leche se ha utilizado espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR FT-IR) junto con quimiometría, en concreto análisis de componentes principales (PCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componente principal (PCR) [40].

También se ha llevado a cabo para la detección de parámetros nutricionales en leches comerciales considerando leches enteras, semidesnatadas y enriquecidas o no con calcio, vitaminas o modificadas por alteración de la composición de lípidos o azúcares [41]. En concreto se ha estudiado la determinación de grasa, proteínas y lactosa mediante FT-IR y métodos convencionales Röse-Gottlieb y Kjeldahl, quedando constancia de que el



método de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es más adecuado para su análisis [42].

Para el análisis de leches en polvo infantil, hay estudios en los cuales se ha llevado a cabo espectroscopía infrarroja para la discriminación de la misma atendiendo a parámetros como son los lípidos, las proteínas y los carbohidratos [43].

2.3.2. Técnicas espectroscópicas en análisis de leches

La aplicación de métodos espectroscópicos en la alimentación como, UV-VIS o la espectroscopía vibracional (radiación infrarroja) muestran una elevada eficacia y eficiencia frente a los métodos de análisis convencionales, ya que tienen altas velocidades de respuesta. La utilización de técnicas espectroscópicas necesita ser combinado con técnicas multivariantes para obtener información útil acerca de los espectros si se lleva a cabo en alimentos como la leche, debido a que sus matrices son complejas [44].

2.3.2.1. Espectroscopía infrarroja (IR)

Es una técnica de espectroscópica vibracional, su fundamento se basa en las interacciones entre la muestra a medir y el haz de luz [45].

En los últimos años, se ha aumentado mucho la demanda por parte de los consumidores acerca de la calidad de la leche y los parámetros que la constituyen que tienen relación con la salud humana, por lo que se han desarrollado nuevos enfoques [47].

La región del infrarrojo abarca el espectro que está comprendido entre la luz visible y la radiación microondas. Podemos diferenciar 3 regiones diferentes:

Infrarrojo cercano: Está comprendido entre los 750-2500 nm, resulta de mayor interés en análisis cuantitativo que en cualitativo, debido a que presenta muy pocas bandas de absorción características.

Infrarrojo medio: Está comprendido entre los 2500-25000 nm, esta región es ampliamente utilizada en la determinación de moléculas orgánicas, a diferencia del infrarrojo cercano, esta región sí que presenta bandas de absorción características de cada compuesto. En el presente trabajo se ha trabajado con esta región del infrarrojo.

Infrarrojo lejano: Está comprendido entre los 25000-1000000 nm, esta región es especialmente útil en los estudios inorgánicos, ya que es a bajas frecuencia cuando se produce la absorción como consecuencia de las vibraciones de extensión y flexión de los enlaces [48].

Un equipo FT-IR está compuesto por una fuente que emite radiación infrarroja, esta radiación llega a un haz de luz divisor, una parte de la radiación se refleja, mientras que otra parte pasa a través del haz de luz divisor. La radiación que ha sido reflejada llega hasta un espejo fijo, donde se refleja y vuelve al haz de luz divisor, de la misma manera la radiación transmitida llega a un espejo móvil y vuelve al haz de luz divisor, puesto que el espejo móvil no se encuentra siempre en la misma posición, al recombinarse las mitades del haz de luz, la longitud recorrida no es la misma, originándose así una interferencia, que puede ser constructiva o destructiva [3].

Existen diferentes modos de vibración de las moléculas:

- **Tensión:** se produce un alargamiento - acortamiento de los enlaces. (Figuras 4 y 5)
- **Flexión:** se produce una variación rítmica de los ángulos de enlace. (Figuras 6 y 7)

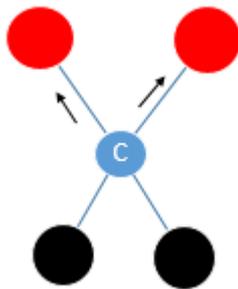


Figura 4 Tensión simétrica de enlace

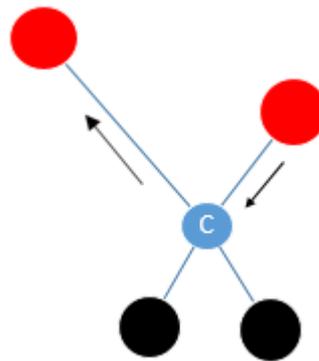


Figura 5 Tensión asimétrica de enlace

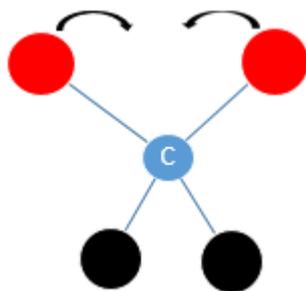


Figura 5 Flexión simétrica en el plano (tijeras)

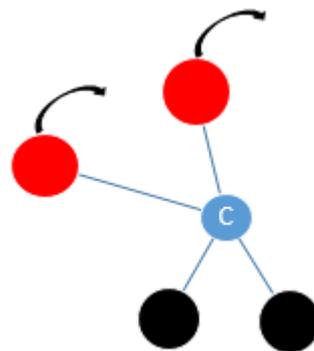


Figura 6 Flexión no simétrica en el plano (rock)



La mayoría de las moléculas absorben luz en la región infrarroja, el FT-IR puede identificar una gran cantidad de grupos y compuestos orgánicos, por esta razón está ampliamente utilizada en la industria alimentaria, algunas de las bandas características que absorbe figuran en la Tabla 1 [3].

Esta técnica se ha utilizado en ocasiones en el control de calidad de la leche y en los productos lácteos, ya que es una técnica no destructiva que permite la identificación de grupos funcionales. A pesar de los estudios en cuanto a la leche cruda, no hay apenas precedentes sobre espectroscopía en leche comercializable [41].

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier es una técnica de análisis cuantitativo y cualitativo que junto con enfoques quimiométricos es una técnica poderosa para la clasificación y autenticidad de la leche [40].

En ocasiones, como la que nos ocupa, es beneficioso realizar los espectros en modo de reflexión, utilizando ATR.

El ATR está compuesto por un cristal de diamante con un elevado índice de refracción, sobre el cristal se coloca la muestra, una parte de la radiación infrarroja incide sobre el cristal. La muestra absorbe de manera selectiva una parte de esta radiación, siendo la restante enviada al detector del espectrofotómetro. El correcto funcionamiento del ATR se puede ver afectado por diversos factores, como son las características del cristal y la calidad de contacto entre la muestra y el cristal [49].

Algunas de las ventajas de la utilización del ATR para el análisis espectroscópico son las siguientes: las muestras pueden ser medidas en cualquiera que sea su forma física, no presenta problemas de dispersión ya que el infrarrojo penetra en la muestra de manera tenue y con múltiples variaciones internas [49].

Se han llevado a cabo varios estudios en leche, como por ejemplo la caracterización y cuantificación de formalina en leche de vaca y, detección rápida de melanina [50]. También se han estudiado diferentes tipos de leches comerciales con el objetivo de determinar sus parámetros nutricionales [41].

Algunos estudios en la leche de coco han demostrado que este método es una poderosa técnica analítica para clasificar y estudiar la garantía de autenticidad de la leche, en ellos se han estudiado los sólidos totales y la grasa [18] [51].



Moléculas	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Tipo de enlace	Tipo de vibración
Proteínas	3300	N-H (Amida A)	Tensión del enlace
	3100-3030	N-H (Amida B)	Tensión del enlace
	1660	C=O (Amida I)	Tensión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
		N-H	Flexión del enlace
	1630	C=O (Amida I)	Tensión del enlace
	1545	N-H (Amida II)	Flexión del enlace
		C-N	Tensión del enlace
	1315	C-H	Vibraciones del esqueleto proteico
1140	C-N	Tensión del enlace	
Lípidos	2960	CH ₃ Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2930	CH ₂ Asimétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2870	CH ₃ Simétrico	Tensión asimétrica del enlace
	2850	CH ₂ Simétrico	Tensión simétrica del enlace
	1750-1720	C=O	Tensión del enlace
	1460	CH ₃ Asimétrico	Flexión asimétrica del enlace
	1440	CH ₃ Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1380	CH ₃ Simétrico	Flexión simétrica del enlace
	1170	C-O-C	Flexión asimétrica del enlace
	1060	C=O	Tensión del enlace
	1035	C-H	Tensión del enlace
Carbohidratos	1170	C-O-C	Flexión asimétrica del enlace
	1155	C-O	Tensión y flexión del enlace

Tabla 1 Cuadro resumen de los picos característicos que se van a estudiar [52].



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



3. Reactivos, materiales y equipos empleados

3.1. Reactivos

- Fosfato cálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pureza mínima 96.0%, CAS: 7758-87-4, Sigma-Aldrich)
- Lactosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, CAS: 63-42-3, Sigma-Aldrich)
- D (+) Galactosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, pureza >99%, CAS: 59-23-4, Amresco)
- Ácido acético glacial para análisis (CH_3COOH , pureza >99%, Panreac)
- Carbonato cálcico (CaCO_3 , Panreac)
- Carbón activo en polvo (C, Panreac)
- Etanol absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, CAS: 64-17-5, Scharlau)
- Agua destillada
- Muestras de nueve leches comerciales compradas en supermercado, de la misma marca con distinto contenido nutricional y grasa.
 - Leches clásicas: entera, semidesnatada y desnatada.
 - Leches enriquecidas con calcio: entera, semidesnatada y desnatada.
 - Leches sin lactosa: entera, semidesnatada y desnatada.

3.2. Materiales

- Vidrios de reloj
- Pipetas y micropipetas
- Vasos de precipitado
- Büchner, kitasato
- Papel de filtro
- Balanza analítica
- Placa calefactora
- Matraces
- Tubos de centrífuga



3.3. Equipos

- Espectrofotómetro modelo FT/IR 6600 (Jasco Corporation)
- Accesorio de control de temperatura (cristal de diamante, temperatura máxima 300°C, JASCO PS-4000, PIKE TECHNOLOGIES)
- Centrífuga Thermo Scientific Sorvall X4R Pro, 220V/240V con el rotor A.FIJO FIBERLITE F146X250LE.
- Estufa, 220V, 50/60Hz, 1400W, 220°C (Mettler, Schwabach GERMANY)

3.4. Preparación de disoluciones

3.4.1. Preparación de ácido acético 1M

Se prepararon 50ml de ácido acético a una concentración 1M, para ello se utilizó ácido acético glaciar con una pureza del 99% y un peso molecular de 60,05g/mol, para ello se pesaron 3g de ácido acético, se llevó a un matraz de 50ml y se enrasó con agua destilada.

3.4.2. Preparación de disoluciones madre de lactosa, galactosa y fosfato cálcico

Para preparar las disoluciones madre, se pesaron 10mg de lactosa, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con agua destilada. Para la galactosa y para el fosfato cálcico se siguió el mismo procedimiento, 10mg de cada reactivo se llevan a unos matraces de 10ml y se enrasan con agua destilada.

3.4.3. Preparación de disoluciones de lactosa y galactosa

En las adiciones que se hicieron a la leche, se aumentó la concentración de carbohidratos contenida en los diferentes tipos de leche comerciales. Dentro del grupo de los carbohidratos de la leche se encuentran la galactosa y la lactosa, por lo que la cantidad de reactivo a añadir a la leche, es la misma.



3.4.3.1. Preparación de disolución con un 150% m/v en lactosa y galactosa

- **Leche entera:** la leche entera contiene 4,8g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,2ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche semidesnatada:** la leche semidesnatada contiene 4,9g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,2ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche desnatada:** la leche desnatada contiene 5g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,25ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche entera calcio:** la leche entera con calcio contiene 5,7g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,425ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche semidesnatada calcio:** la leche semidesnatada con calcio contiene 5,7g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,425ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche desnatada calcio:** la leche desnatada con calcio contiene 5,6g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,4ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche entera sin lactosa:** la leche entera sin lactosa contiene 4,8g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,2ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.
- **Leche semidesnatada sin lactosa:** la leche semidesnatada sin lactosa contiene 4,9g de carbohidratos por cada 100ml de leche.



A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,2ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.

- **Leche desnatada sin lactosa:** la leche desnatada sin lactosa contiene 5g de carbohidratos por cada 100ml de leche.
A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 1,25ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.

3.4.3.2. Preparación de disolución con un 100% m/v en lactosa y galactosa

- **Para los 3 tipos de leche clásica, los 3 de leche sin lactosa y los 3 tipos de leche con calcio (enteras, semidesnatadas y desnatadas):** se partió de la leche con un 150% m/v, se tomaron 8ml con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un matraz de 10ml donde se enrasó con leche.

3.4.3.3. Preparación de disolución con un 50% m/v en lactosa y galactosa

- **Para los 3 tipos de leche clásica, los 3 de leche sin lactosa y los 3 tipos de leche con calcio (enteras, semidesnatadas y desnatadas):** se partió de la leche con un 100% m/v, se tomaron 7,5ml con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un matraz de 10ml donde se enrasó con leche.

3.4.4. Preparación de disoluciones de fosfato cálcico

3.4.4.1. Preparación de disolución con un 150% m/v en fosfato cálcico

- **Para los 3 tipos de leche clásica y los 3 tipos de leche sin lactosa (enteras, semidesnatadas y desnatadas):** contienen 0.11g de calcio por cada 100ml de leche.



A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 2,75ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.

- **Para los 3 tipos de leche con calcio (entera, semidesnatada y desnatada):** contienen 0.16g de calcio por cada 100ml de leche.
- A partir de la disolución madre, se preparó la de 150% m/v, para ello, con ayuda de una micropipeta se tomaron 4ml, se llevaron a un matraz de 10ml y se enrasó con leche.

3.4.4.2. Preparación de disolución con un 100% m/v en fosfato cálcico

- **Para los 3 tipos de leche clásica, los 3 de leche sin lactosa y los 3 tipos de leche con calcio (enteras, semidesnatadas y desnatadas):** se partió de la leche con un 150% m/v, se tomaron 8ml con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un matraz de 10ml donde se enrasó con leche.

3.4.4.3. Preparación de disolución con un 50% m/v en fosfato cálcico

- **Para los 3 tipos de leche clásica, los 3 tipos de leche sin lactosa y los 3 tipos de leche con calcio (enteras, semidesnatadas y desnatadas):** se partió de la leche con un 100% m/v, se tomaron 7,5ml con la ayuda de una micropipeta y se llevaron a un matraz de 10ml donde se enrasó con leche.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES

METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



4. Metodología y desarrollo experimental

Para todas las muestras medidas en el ATR FT-IR se ha utilizado la misma metodología, primero se ha elevado y estabilizado la temperatura hasta alcanzar los 80°C, posteriormente se ha realizado una medida de referencia para eliminar el espectro del aire (background), y, por último, se han añadido 10 gotas de muestra y se ha dejado reposar 30 segundos antes de comenzar la medida.

A todas las muestras se las han hecho 1000 barridos y en el infrarrojo medio (400-4000cm⁻¹).

4.1. Aislamiento de los componentes de la leche

4.1.1. Aislamiento de la grasa

La técnica de separación de glóbulos de grasa de la leche mediante gravedad es un método muy ineficiente, ya que conlleva un largo periodo de tiempo y no se consigue toda la separación deseada, debido a ello, se decidió llevar a cabo la separación de la grasa mediante centrifugación. En las industrias lácteas se utilizan centrífugas desnatadoras [53].

Dentro de la centrífuga se colocan los botes con la leche, cuando se somete a la leche a la fuerza centrípeta, la fase acuosa que contiene glóbulos dispersos se separa de los glóbulos de grasa debido al proceso físico que se basa en la diferencia de densidades [53]. Se tomaron muestras de 300ml de los 9 tipos de leche estudiados:

- Leches clásicas: entera, semidesnatada y desnatada.
- Leches enriquecidas con calcio: entera, semidesnatada y desnatada.
- Leches sin lactosa: entera, semidesnatada y desnatada.

Las muestras se centrifugaron a 10000G, a una temperatura de 4°C y durante un tiempo de 45min. Observándose por un lado la grasa en forma de capa sólida y por otro lado la fase acuosa.

Se probaron varias técnicas para la separación de la grasa, como la utilización de etanol y n-heptano, para ello se tomó una muestra de leche de 10ml, a continuación, se la adicionaron 14ml de etanol y se agitó durante 30 segundos,



después se le adicionaron 10ml de n-heptano, se agitó de nuevo y por último se metió en la centrifuga durante 15min a 2500G, una vez centrifugado se dejó reposa un tiempo de 1h50min [54].

El resultado que se obtuvo fue un sólido de grasa con textura gelatinosa en la parte superior, que se separó de la fase acuosa mediante filtración. Ésta no resultó efectiva, debido a que era un proceso que requería mucho tiempo y además la muestra de leche contenía los reactivos usados. El n-heptano hacía que se coagulara la grasa que contenía la leche y, por lo tanto, al sacar el espectro en el ATR FT-IR, éste correspondía al n-heptano, opacando la grasa, que era el objetivo de estudio.

4.1.2. Aislamiento de la caseína

Para la obtención de la fracción principal de proteínas de la leche se llevó a cabo un tratamiento que combina la temperatura y el pH.

Para llevar a cabo este proceso se puede usar cualquier ácido que disminuya el pH a 4,6 [55].

Se calentó ligeramente la leche una vez retirada la grasa hasta 40°C y se le adicionaron 10 gotas de ácido acético de concentración 1M, preparado con anterioridad, mientras se agitaba constantemente con una varilla de vidrio. La caseína es del tipo de fosfoproteínas, lo que quiere decir que son proteínas que están unidas químicamente a ácidos fosfóricos [55].

La adición del ácido acético a la leche provoca que los grupos ácidos se protonen y las micelas dejen de repelerse debido a que el fosfato y el calcio que se encuentran formando las micelas de caseína se disuelven, lo que provoca el deterioro de la estructura micelar y, así la precipitación de la caseína en forma de una masa de color blanco. Por último, se filtra para separar el precipitado (caseína) de la fase acuosa [56].

4.1.3. Aislamiento de lactosa y albúmina

La lactosa y albúmina se encuentran en el sobrenadante que resulta de separar la caseína de la leche desgrasada.



4.1.3.1. Aislamiento de la albúmina

Una vez se ha retirado la caseína de la leche, el lactosuero se compone de lactosa y albúmina, para aislar la albúmina se añadieron 2,5g de carbonato de calcio y se llevó a ebullición suave durante 10min, una vez transcurrido ese tiempo se filtró a vacío la mezcla caliente para separar las albúminas y el carbonato cálcico residual presente en el suero que contiene la lactosa.

Para desnaturalizar la albúmina es necesario eliminar el ión calcio que contiene, ya que este es imprescindible en el mantenimiento de la estructura y su actividad [57].

El método más utilizado dentro de la industria láctea para la obtención de estas proteínas séricas del lactosuero es la aplicación de campos eléctricos pulsantes de alta intensidad. Para ello se utilizan electrodos de acero inoxidable induciendo corrientes a la leche en diferentes amperajes y voltajes, controlando en todo momento la temperatura y el pH. Una vez realizado, se separa la fase sólida de la fase acuosa mediante filtración con papel transmembrana [58].

En el laboratorio no se llegó a conseguir aislar las albúminas, esto se puede deber a que, en el proceso de aislamiento de la caseína, la leche tuviera un pH excesivamente ácido, y en vez de aislar solamente la caseína, también precipitaran las albúminas.

4.1.3.2. Aislamiento de la lactosa

Una vez retirada la albúmina se obtiene el suero, que contiene la lactosa.

Para conseguir aislar la lactosa se partió de 50ml de suero, este se evaporó para concentrarle y obtener unos 20ml aproximadamente, seguidamente se añadieron 40ml de etanol y 0,2g de carbón activo, posteriormente se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea. Una vez que la mezcla está homogénea, ésta se filtró a vacío para conseguir un filtrado que contenga la lactosa.

El etanol y el carbón activo se utilizan para que se produzca la deshidratación y la desestabilización de las micelas residuales (impurezas) que existan en el suero y dejar aislada la lactosa [59].



4.2. Estudio de la leche con adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico

A los 9 tipos de leche iniciales se les hicieron adiciones crecientes de lactosa, la galactosa y fosfato cálcico. De cada tipo de componente se hicieron 3 adiciones de 3 concentraciones diferentes, explicadas en el apartado 3.4 Disoluciones.

4.3. Análisis quimiométrico

El análisis quimiométrico utilizado en el presente trabajo estuvo basado en la técnica de análisis de componentes principales (PCA), para llevarlo a cabo se usó el programa Matlab.

La matriz de muestras se tiene que escalar (normalizar), para obtener así las propiedades específicas buscadas.

Existen diferentes tipos de normalizado, como la normalización de área, de vectores unitarios, de la media, máxima, de rangos y de picos. A lo largo del trabajo se trabajará con los normalizados máximo, de rango y de pico [60].

El máximo normalizado se basa en dividir cada fila por su valor absoluto, la normalización del rango está basada en la división de cada fila por el rango (valor máximo menos valor mínimo) y la normalización de picos se basa en la elección del punto espectral, con esta elección se corrigen los espectros [60].

Para hacer el normalizado, se seleccionaron tres rangos de trabajo:

1. **Rango de trabajo:** está comprendido entre 750-1800, 2700-3700 cm^{-1} .
2. **Rango sin agua:** en este rango se ha retirado la zona del espectro que contiene el agua, está comprendido entre 750-1800, 2700-3000 cm^{-1} .
3. **Rango grasa:** está comprendido entre 600-1800, 2700-3000 cm^{-1} , en estos rangos se encuentran las absorbancias características de los lípidos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Universidad de Valladolid

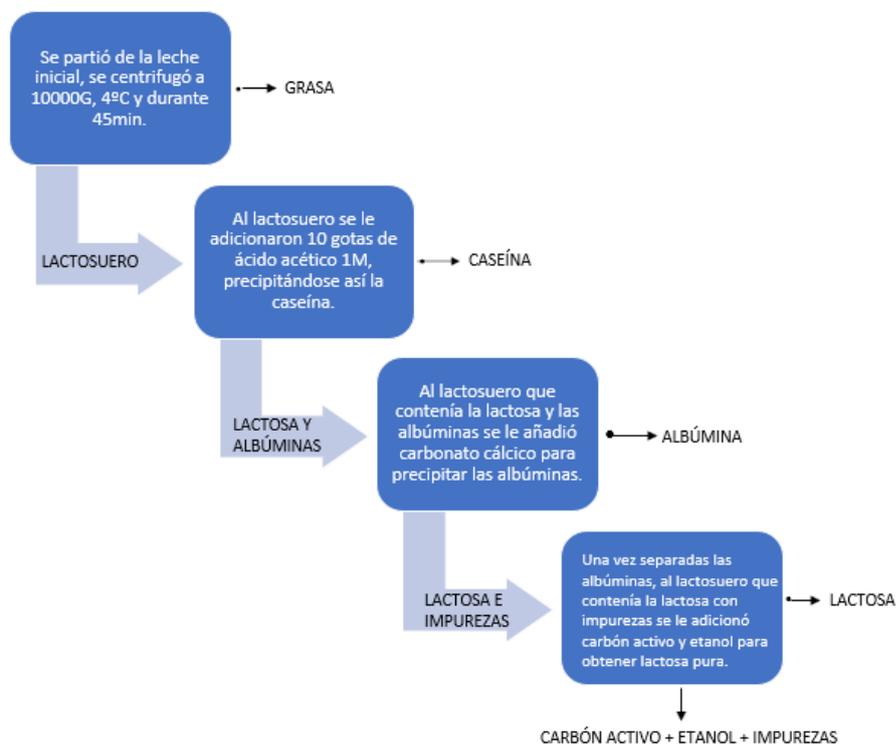


**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

5. Resultados y discusión

Nuestro objetivo es desarrollar ATR FT-IR más PCA, para ello se analizan 9 leches con distinto contenido nutricional.

- Se realizaron los espectros con ATR FT-IR en las leches iniciales a temperatura ambiente (30°C), pero no se apreciaban con claridad las bandas de absorción, por lo que se llevaron a cabo las medidas a una temperatura de 80°C, estos espectros salían similares entre sí, por lo que se optó por combinarlos con análisis de datos, en concreto, análisis de componentes principales (PCA).
- Se hicieron adiciones a la leche de diferentes componentes, lactosa, galactosa y fosfato cálcico en concentraciones crecientes, para cerciorarnos de donde se encontraban las bandas de absorción características de las zonas importantes de estudio.
- Se seleccionaron las zonas de estudio de los espectros para llevar a cabo el análisis de datos, puesto que el espectro entero tenía zonas irrelevantes para nuestro estudio.
- Una vez puesto a punto se prosiguió a aislar los diferentes componentes que tiene leche, grasa, caseína, lactosa y albúmina y lactosa.





Cada uno de estos componentes, una vez retirados de la leche, se midieron con ATR FT-IR y se analizaron los datos en las zonas de estudio seleccionadas mediante técnicas quimiométricas.

Las leches que se han estudiado son:

- Leches clásicas: entera, semidesnatada y desnatada.
- Leches enriquecidas con calcio: entera, semidesnatada y desnatada.
- Leches sin lactosa: entera, semidesnatada y desnatada.

5.1. Estudio de los componentes de la leche mediante espectroscopía ATR FT-IR.

A lo largo de todo el estudio se han establecido las mismas condiciones. Se ha trabajado a una temperatura de 80°C, en una primera aproximación se analizaron directamente las muestras de grasa retiradas de la leche sin tratar, pero se observó que entre los 3000-3750cm⁻¹, se encontraba la banda de absorción característica del agua (Figura 8). El agua no es de nuestro interés en este estudio, por lo que se optó por deshidratar las muestras de grasa, para ello se introdujeron en la estufa a 30°C durante 3h, con el objetivo de retirar el agua y obtener la muestra deshidratada (Figura 9).

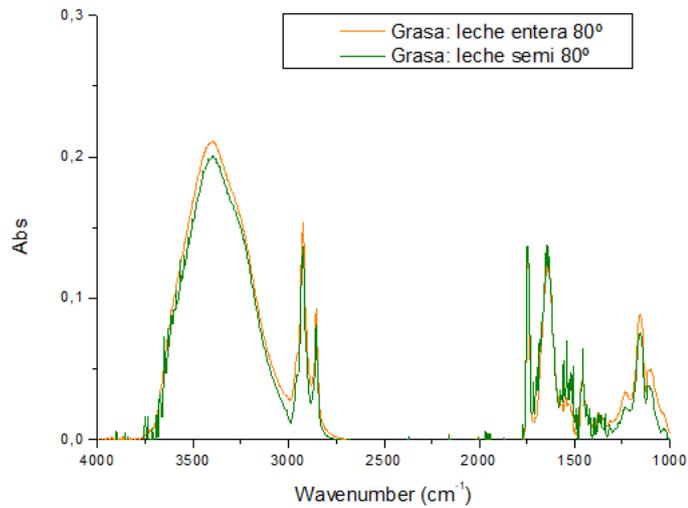


Figura 7 Espectro de la grasa de las leches clásicas

En la Figura 8 se han representado los espectros de la fracción grasa retirada de las leches, con el objetivo de comprarlas. No se consiguió obtener el espectro de la grasa de la leche desnatada, debido a que una vez centrifugada, la cantidad de grasa que se separó fue ínfima, por lo que al someterla a la misma temperatura que al resto de grasas en la estufa (entera y semidesnatada), no se obtuvo suficiente cantidad de muestra para poder analizarlo mediante espectroscopía infrarroja. Como se puede observar, ambas grasas (leche entera y semidesnatada) son semejantes, la diferencia se observa en los rangos comprendidos entre 1000-1800 y 2750-3000 cm^{-1} , las bandas de absorción son más intensas para la leche entera, ya que tiene más enlaces del tipo CH_3 por tener más contenido graso que la leche semidesnatada [52].

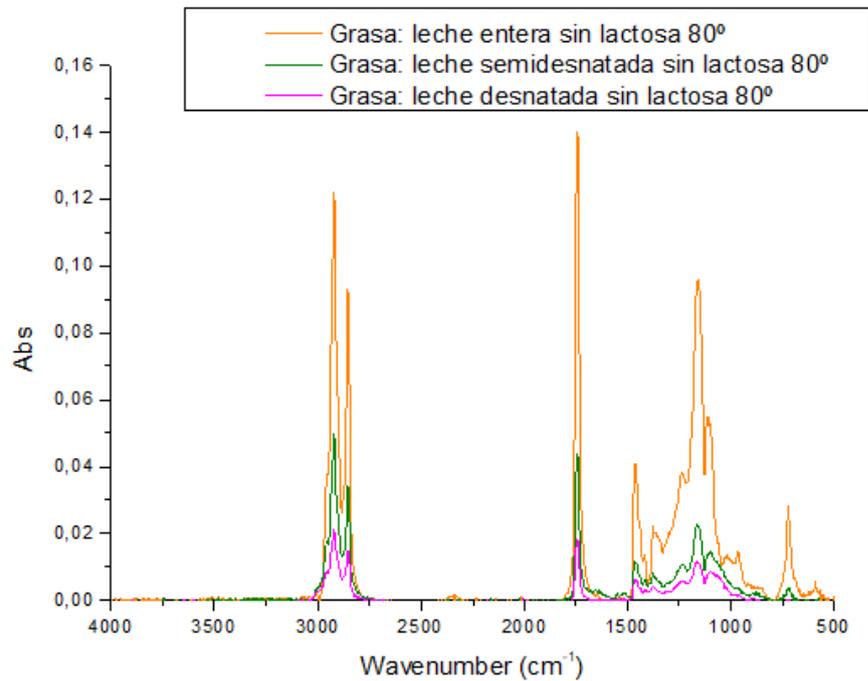


Figura 8 Espectros de las grasas de las leches entera, semidesnatada y desnatada sin lactosa

En la Figura 9 se han comparado las grasas que contienen las leches sin lactosa (entera, semidesnatada y desnatada). La grasa de la leche entera, representada de color naranja muestra las bandas de absorción más intentas que las grasas de la leche semidesnatada y desnatada representadas por los colores verde y rosa respectivamente, esto se debe a que la leche entera contiene mayor contenido graso y, por lo tanto, la cantidad de enlaces entre las moléculas de grasa también aumenta.

Las bandas de absorción que se encuentran en el rango $1630-1680\text{cm}^{-1}$ están asociados a estiramientos $\text{C}=\text{O}$ [52], también se encuentran asociadas la vibración de flexión de las proteínas, ya que estas están asociadas a los glóbulos de grasa, uno de los rangos característicos de los lípidos es el comprendido entre los $2700-3000\text{cm}^{-1}$, en esta región se encuentran las tensiones simétricas y asimétricas de los grupos CH_2 y CH_3 , aportados por las grasas [61]. En los tres espectros representados se observa que, en el rango descrito, la grasa de la leche entera, representado en color naranja muestra las dos bandas de absorción más elevadas que el de las otras dos leches.

Se realizaron estudios similares en las fracciones de caseína, lactosa y albúmina y lactosa. Los resultados se recogen en las siguientes figuras.

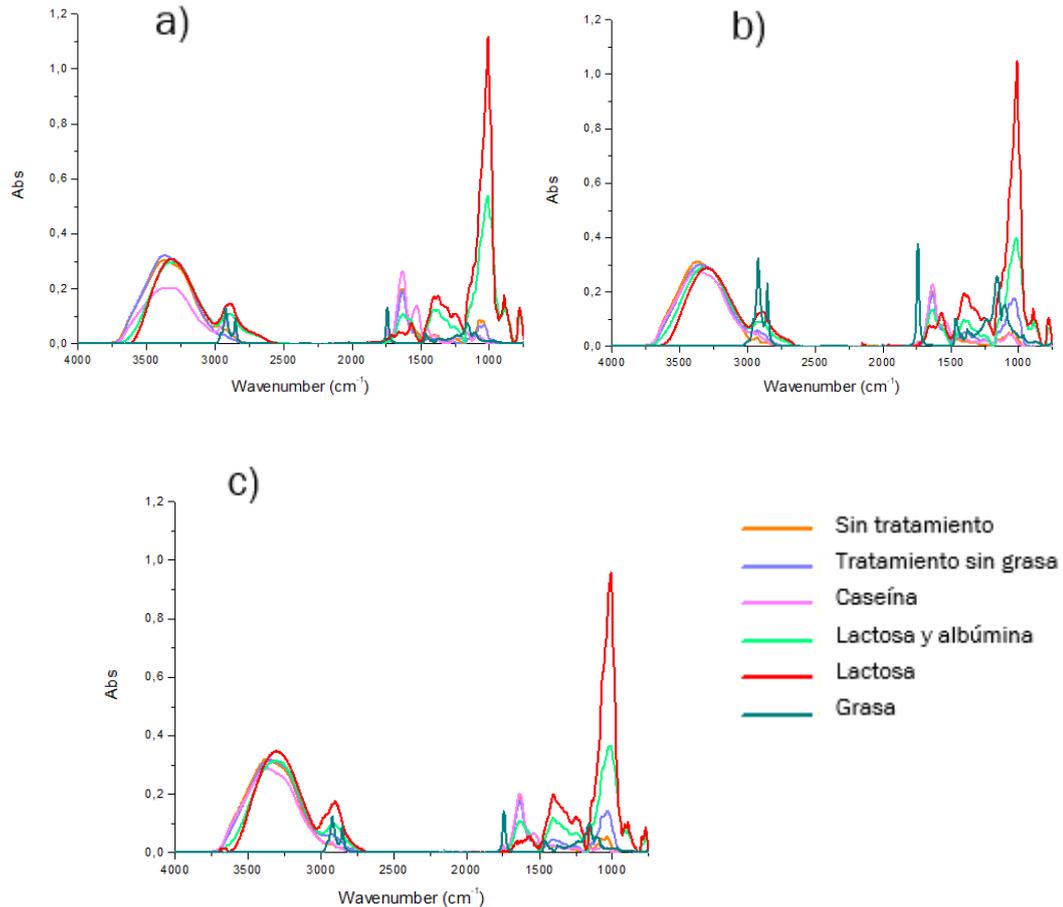


Figura 9 Espectros de los 3 tipos de leche entera por componente. Leche entera clásica a). Leche entera con calcio b). Leche entera sin lactosa c).

En la Figura 10 se pueden observar los espectros de las distintas fracciones de la leche entera, clásica, con calcio y sin lactosa. El espectro de color azul corresponde a la fracción de la leche que resulta de retirar la grasa.

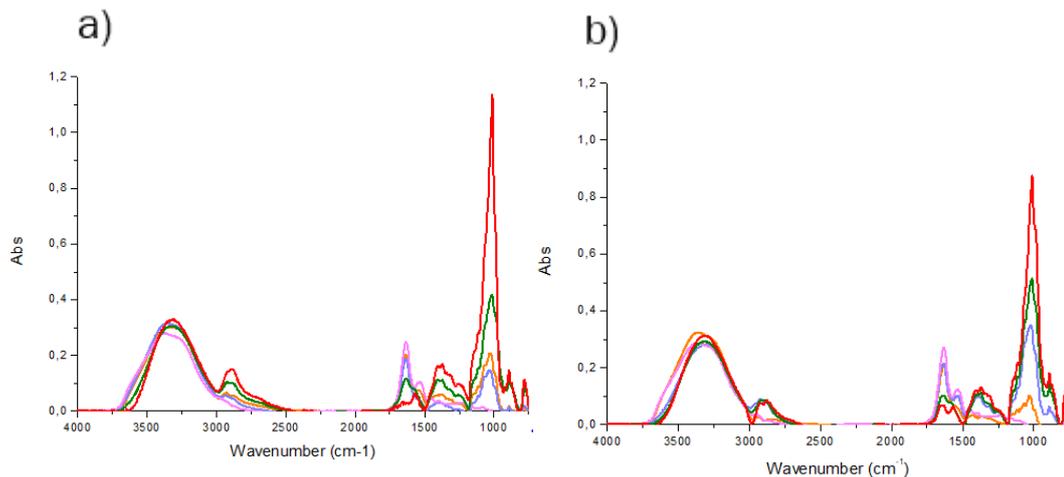
El espectro de color azul se corresponde con la grasa que se ha retirado de la leche, este presenta las bandas de absorción más intensas en la leche enriquecida con calcio que en las otras dos, esto se debe a que la presencia de calcio afecta la absorción de la grasa, debido a que éste precipita con los ácidos grasos que se encuentran de manera libre en la leche [62].

Como se observa en las señales, el espectro de color naranja es el que corresponde a las leches sin ningún tratamiento, se observa que las bandas de

absorción prácticamente no se aprecian si los comparamos con el resto de los espectros de los componentes por separado, esto se puede deber a que la leche sin tratar contiene la grasa, y el resto de los componentes ya no la tienen, además, unos componentes podrían opacar los espectros de otros y hacer que no se distingan de manera correcta.

La leche entera clásica presenta las bandas de absorción más intensas en el rango en el que se encuentran las proteínas ($3300, 1660\text{cm}^{-1}$) y los carbohidratos ($1170, 1155\text{cm}^{-1}$), la banda de absorción que representa los enlaces característicos de la lactosa es similar en las tres leches, por lo que se ha llegado a la conclusión de que la cantidad de albúminas es mayor en la leche entera clásica y, por esa razón, el espectro de color verde presenta la banda de absorción más intensa en el rango comprendido entre $1066-1250\text{cm}^{-1}$ [52].

En la Figura 10 a) se observa que el espectro de color rosa, correspondiente a las caseínas que se han retirado de la leche, presenta un pico característico entre los $1500-1550\text{cm}^{-1}$, en este rango se presentan los estiramientos N-O, que son característicos de los compuestos de nitrógeno. La caseína presenta un elevado contenido de nitrógeno amínico, es por esta razón que la intensidad de las bandas de absorción en el rango citado anteriormente y en 1660cm^{-1} , que se corresponde a las tensiones de enlace del tipo N-H, C-N y C=O, es elevada [63].



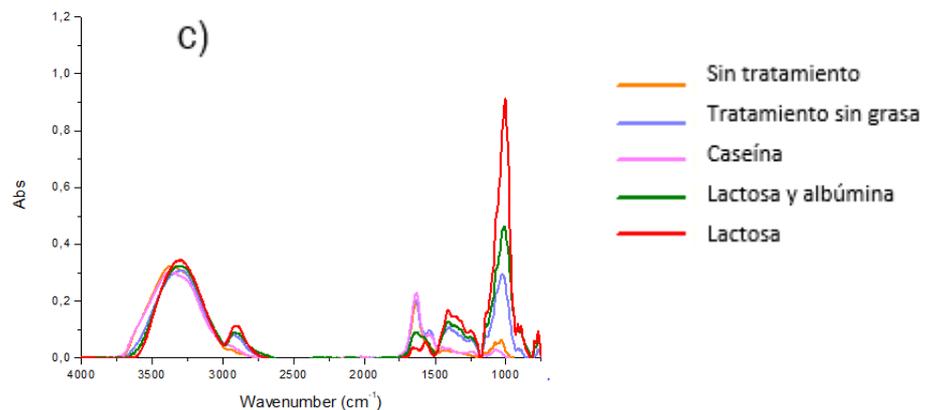


Figura 10 Espectros de los 3 tipos de leche desnatada por componente. Leche desnatada clásica a). Leche desnatada con calcio b). Leche desnatada sin lactosa c).

En la Figura 11 se muestran los espectros de los tres tipos de leche desnatada, clásicas, con calcio y sin lactosa con los diferentes componentes que tiene la leche, separados previamente.

Como se ha explicado anteriormente, en el caso de las leches desnatadas, solo se ha estudiado la grasa de la muestra desnatada sin lactosa mediante ATR FT-IR, por lo que no se pudo utilizar para hacer la comparativa.

Los espectros que corresponden a los colores rojos de las tres gráficas muestran la presencia de lactosa contenida en las leches, los tres tipos de leche desnatada contienen el mismo valor nutritivo en cuanto a carbohidratos se refiere, por lo que se puede observar en los espectros que la intensidad de las bandas de absorción es la misma.

La lactosa cuyas bandas características de absorción se encuentran en 2982, 2885 y 1086 cm^{-1} , las bandas de absorción en dichas longitudes de onda son más intensas una vez retirada la grasa a la leche, debido a que la presencia de glóbulos y micelas de caseína en suspensión hacen que la luz se disperse, no dejando que se observen los enlaces característicos del resto de componentes de la leche, en este caso de los carbohidratos y, más concretamente, la lactosa [64][65].

Los estiramientos simétricos y asimétricos se encuentran en 3000 cm^{-1} , están asociados a los enlaces C-H de los ácidos carboxílicos, como se ha explicado anteriormente, las bandas de absorción se hacen más intensas cuando a las leches se les retira la grasa que contienen [65].

También se observan picos en la longitud de onda entre $1250\text{-}1500\text{cm}^{-1}$, en ese rango aparecen los tipos de enlace C-H que están asociados a las vibraciones del esqueleto proteico [66].

Los espectros de color azul corresponden a la leche una vez se la ha retirado la grasa, como es de esperar, la leche desnatada en el rango entre los $1000\text{-}1250\text{cm}^{-1}$ no presenta los picos que aparecen en las Figuras 11 b) y 11 c), puesto que de esta no se consiguió separar la grasa con la centrifuga.

5.2. Estudio de las influencias de las adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico en leche mediante espectroscopía ATR FT-IR

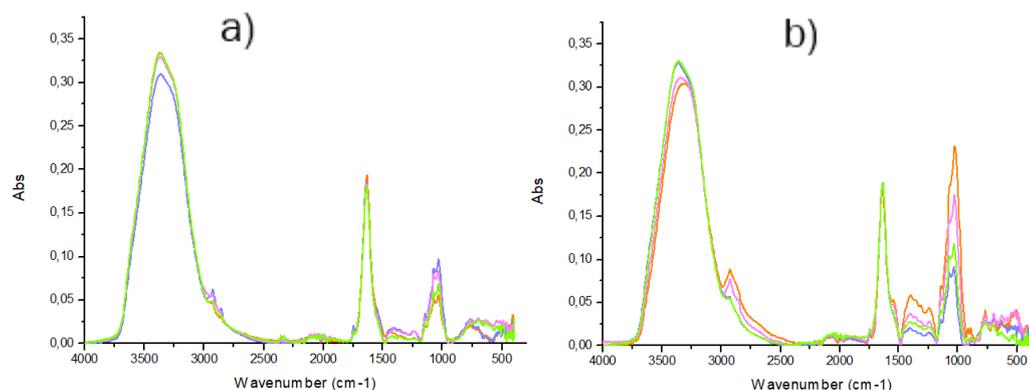
En esta parte del trabajo, se han realizado adiciones de carbohidratos y sales minerales en diferentes concentraciones a los nueve tipos de leche estudiados, para ello, se han utilizado concentraciones diferentes de lactosa, galactosa y fosfato cálcico.

La lactosa y galactosa son los carbohidratos característicos de la leche, por ello se ha querido estudiar la respuesta de la leche ante una adición del 150% m/v, otra del 100% m/ y, por último, del 50% m/v.

El fosfato cálcico no está presente en la leche en forma de esta sal, sin embargo, la leche está compuesta por sales minerales, como es el calcio, y el fósforo, por ello se adicionó fosfato cálcico con el objetivo de diferenciar las leches estudiadas.

5.2.1. Estudio de la influencia de lactosa

A los tres tipos de leches clásicas se les han hecho adiciones de lactosa en diferentes concentraciones con el objetivo de observar discriminación entre los diferentes espectros en la banda espectral correspondiente a los carbohidratos.



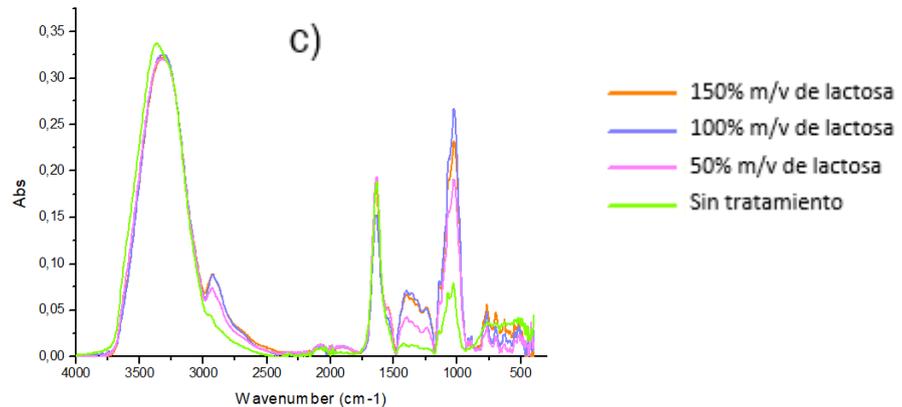


Figura 11 Espectros de leche con adiciones de lactosa. Espectros de la leche Entera sin lactosa sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de lactosa a). Espectros de la leche Semidesnatada sin lactosa sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de lactosa b). Espectros de la leche Desnatada sin lactosa sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de lactosa c).

En la Figura 12 se puede observar que el agua muestra dos bandas características en el rango $3000-3500\text{cm}^{-1}$ correspondientes al estiramiento O-H, y en 1635cm^{-1} , correspondiente a la flexión O-H-O. También el rango de las proteínas, comprendido entre los $1545-1660\text{cm}^{-1}$ permanece más o menos constante en los tres tipos de leche sin lactosa. Es lo esperado, debido a que lo único que estamos modificando es la cantidad los carbohidratos[67].

En la Figura 12 a) se puede observar que con la adición del 150% m/v de lactosa, la banda de absorción de los carbohidratos es menor que en la leche sin tratar, esto puede deberse a que se ha sobresaturado y por lo tanto se ha producido la cristalización de la lactosa[68].

Aunque las leches están desgrasadas, es posible que no se haya eliminado toda la cantidad de grasa contenida, debido a que en el proceso que se sigue en las industrias lácteas, es la centrífuga la que separa por un lado la leche sin grasa y por el otro la grasa, mientras que en el laboratorio se ha seguido un protocolo aproximado y adaptado al laboratorio, perdiendo precisión. Esto puede afectar a los espectros, haciendo que en las Figuras 12 a) y 12 b) en la banda de absorción de los carbohidratos los picos sean menos intensos, mientras que en la Figura 12 c), la intensidad del pico en el que se encuentran los carbohidratos es significativamente mayor.

5.2.2. Estudio de la influencia del fosfato cálcico

La sal fosfato cálcico no está presente en la leche, sino que se encuentra en sus formas minerales, calcio y fósforo. La adición de fosfato cálcico se realizó con el objetivo de observar diferencias en la región de las proteínas y en las regiones características de las vibraciones producidas por dicha sal.

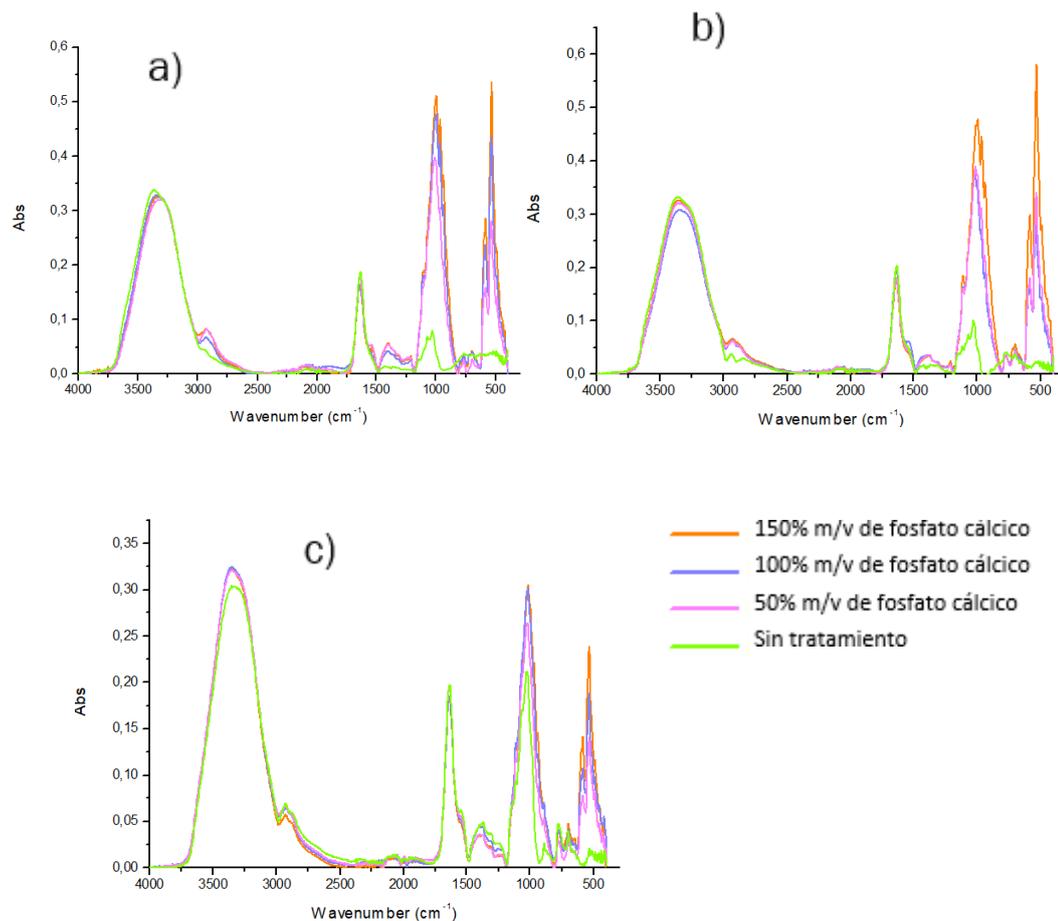


Figura 12 Espectros de leche con adiciones de fosfato cálcico. Espectros de la leche Desnatada sin lactosa sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de fosfato cálcico a). Espectros de la leche Desnatada con calcio sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de fosfato cálcico b). Espectros de la leche Desnatada clásica sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de fosfato cálcico c).

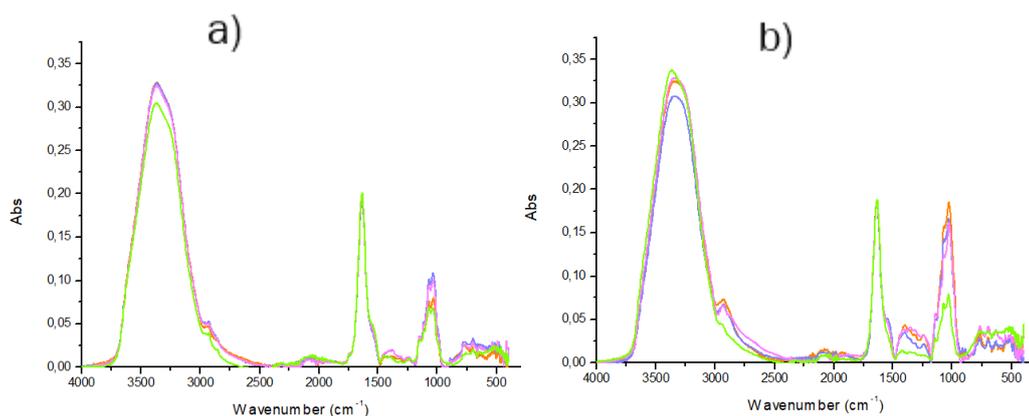
En la Figura 13 se observa que el fosfato cálcico presenta bandas de absorción características que no aparecen en el resto de adiciones, los iones PO_4^{3-} del fosfato cálcico presenta las bandas de absorbancia en 460, 550-600, 960, 1020-1100 cm^{-1} [69].

Las bandas de absorción del calcio presentan mayor intensidad a medida que aumenta la concentración de fosfato cálcico. Se puede observar que tanto en la leche desnatada clásica como en la desnatada sin lactosa las bandas de absorción son de mayor intensidad que en la desnatada enriquecida con calcio. Esto se debe a que la leche desnatada enriquecida con calcio posee una cantidad inicial de 1,6mg/ml mientras que, en las otras dos muestras de leche, la cantidad de calcio es menor, 1,1mg/ml. Al adicionar fosfato cálcico se produce una sobresaturación, que provoca un aumento en la velocidad de nucleación de las partículas de calcio contenidas en la leche y, por tanto, una menor intensidad en las bandas de absorción [70].

5.2.3. Estudio de la influencia de la galactosa

La galactosa forma parte de la leche, bien unida a una molécula de glucosa formando la lactosa o bien en su forma molecular en la leche sin lactosa. Un aumento de galactosa supone un aumento en la intensidad de las bandas de absorción en la región en la que se absorben los carbohidratos.

La galactosa muestra diferentes bandas de absorción características, en el rango $1500-1200\text{cm}^{-1}$ se muestran las bandas de absorción debidas a la deformación vibracional de los grupos C-H característicos de los azúcares [71].



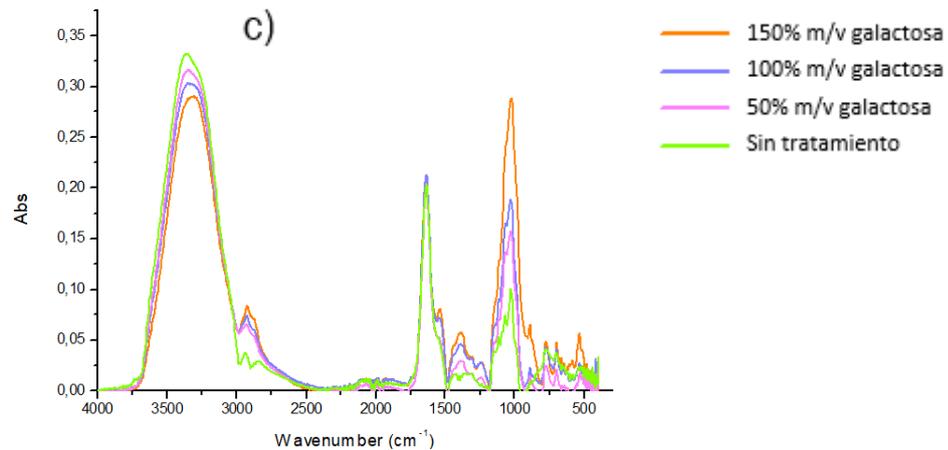


Figura 13 Espectros de leche con adiciones de galactosa. Espectros de la leche Semidesnatada clásica sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de galactosa a). Espectros de la leche Desnatada sin lactosa sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de galactosa b). Espectros de la leche Desnatada con calcio sin tratar, con un 150% m/v, 100% m/v y 50% m/v de galactosa c).

En la Figura 14 b) y c) se puede observar cómo aumentan las bandas de absorción que se encuentran en el rango de los carbohidratos, en las leches desnatadas sin lactosa y enriquecidas con calcio.

Las bandas de absorción más intensas corresponden a la adición de 150% m/v en galactosa, la siguiente la de 100% m/v en galactosa y así con el resto, siendo la menos intensa la correspondiente con la leche sin tratar.

En la Figura 14 a), la banda de absorción más intensa no es la que tiene mayor concentración, esto se debe a que cuando se aumenta la cantidad de estos azúcares se favorece la hidrólisis de la lactosa, lo que hace que se produzca una disminución de los mismos. Por esto, la adición del 150% m/v de galactosa en el espectro aparece con menor intensidad que en las adiciones de 100% m/v de galactosa y 50% m/v de galactosa [72].

5.3. Análisis de componentes principales (PCA)

5.3.1. Estudio de las PCA de las leches y sus componentes

Como se ha explicado anteriormente en el fundamento teórico, el análisis de componentes principales tiene como objetivo representar la información aportada por las variables y las observaciones obtenidas con un menor número

de variables, estas nuevas variables se obtienen mediante combinaciones lineales de las variables originales y, además, son independientes entre sí.

El análisis de componentes principales se lleva a cabo mediante varias etapas, primero se realiza un análisis de la matriz de correlaciones, en la segunda etapa se lleva a cabo una selección de factores (componentes principales), en esta selección de componentes principales, la primera componente es la que recoge la mayor variabilidad posible de los datos originales, la segunda recoge la siguiente mayor variabilidad y, así sucesivamente para el resto de componentes principales. La tercera etapa consiste en representar la matriz factorial, en la que las columnas representan las componentes principales y las filas las variables. En cuarto lugar, se interpretan los factores siguiendo una serie de características, los coeficientes factoriales no deben ser similares y próximos a la unidad. Por último, se tienen que calcular las puntuaciones factoriales, lo que permitirá la representación gráfica [73].

5.3.1.1. Estudio de las nueve leches (clásicas, con calcio y sin lactosa) por componente

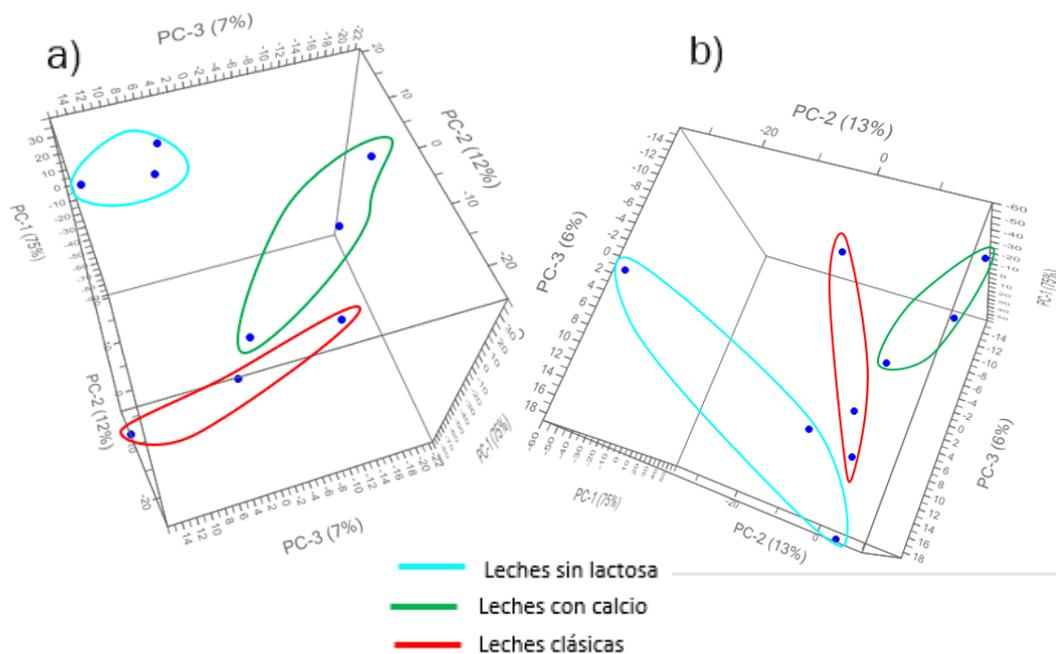


Figura 14 PCA en 3D. PCA de los nueve tipos de leche sin tratar a). PCA de las nueve leches sin grasa b).



Las Figura 15 a) y b) corresponden a las nueve leches sin tratar y a las leches sin la grasa respectivamente, de la PCA se puede obtener gran información, debido a que como se observa, la PC1 tiene un 75% de la variabilidad original. De la suma de las tres componentes principales se obtiene un valor de 94% de la información de los datos de las nueve leches originales.

Cuanto mayor sea el porcentaje que presentan cada una de las componentes principales implica que mayor es la cantidad de información que contiene y menor es la cantidad de información redundante [74].

En ambas PCAs se llevó a cabo un normalizado usando en este caso el rango de trabajo que se ha explicado con anterioridad, comprendido entre 750-1800 y 2700-3700 cm^{-1} .

Para obtener la Figura 15 a), se ha sometido a la matriz de datos a un normalizado máximo, que como se ha explicado anteriormente, se basa en dividir cada fila por su valor absoluto. En este caso la PC1 explica el 75% de la varianza observada de datos, la PC2 el 12% y la PC3 7%, la suma de las tres componentes principales recoge el 94%, con lo que se concluye que la PCA consigue explicar casi por completo la varianza observada. Es capaz de discriminar entre las leches clásicas y enriquecidas con calcio de las leches sin lactosa.

Para obtener la Figura 15 b), se llevó a cabo la normalización por picos, siendo el punto espectral 1791 cm^{-1} , se tomó este punto espectral para que se corrijan los espectros perdiendo la menor información posible de los datos. En este caso se han comparado los nueve tipos de leche sin grasa y también se ha obtenido una suma de las componentes principales del 94%. Se ha conseguido discriminar entre los diferentes tipos de leche estudiados, enriquecidas con calcio por un lado, las clásicas por otro y por otro lado las leches sin lactosa.

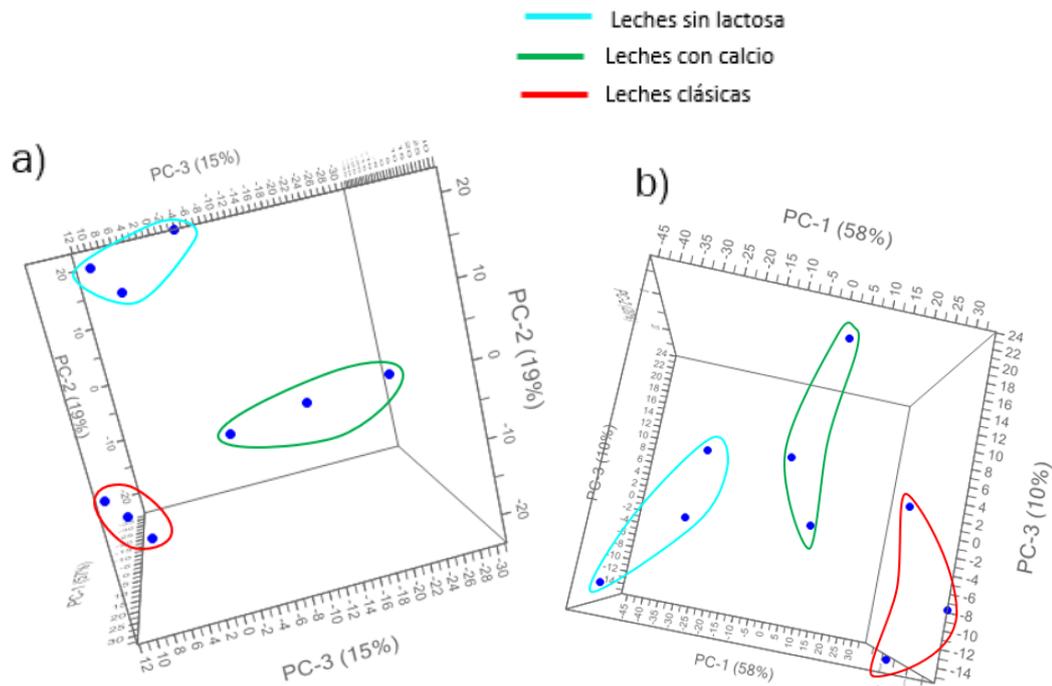


Figura 15 PCA en 3D. PCA de lactosa y albúmina en los nueve tipos de leche estudiados a). PCA de la lactosa en los nueve tipos de leches estudiados b).

Las Figuras 16 a) y b) muestran las PCAs de la lactosa y albúmina de las nueve leches y la lactosa de las mismas nueve leches. En estos casos la PC1 tiene una variabilidad original de 57% y 58% respectivamente, la suma de las tres componentes principales nos da un valor mayor del 80%, que para efectos descriptivos es el porcentaje mínimo necesario [75].

En este caso el rango en el que se trabajó fue el “rango sin agua”, que comprende las longitudes de onda 750-1800, 2700-3000 cm^{-1} . La elección de este rango se debe a que el rango de espectro en el que el agua se absorbe no proporciona ninguna información relevante, de esta manera, acotando el espectro, se consigue discriminar mejor los componentes estudiados.

En la Figura 16 a), se llevó a cabo el pico normalizado, explicado anteriormente, el punto espectral que se tomó fue en 1402 cm^{-1} , la primera componente PC1 aporta el 57%, la PC2 el 19% y la PC3 el 15%, entre las tres componentes principales se recoge un 91% de la información de los datos originales. La lactosa y albúmina de las tres leches sin lactosa estudiadas, señalada en azul, se separan de las leches enriquecidas con calcio y de las leches clásicas, esto se puede deber a que en las leches sin lactosa, los azúcares que la componen se encuentran en sus formas moleculares libres, por un lado galactosa y por otro glucosa, mientras que en las otras dos gamas de leche, estos azúcares se encuentran unidos formando la lactosa [76].

En la Figura 16 b), también se llevó a cabo el pico normalizado, en este caso el punto espectral que se escogió fue en 1200 cm^{-1} , la primera componente aporta el 58%, la PC2 el 20% y la PC3 el 10%, entre las tres se recoge un 88% de la información de los datos originales, es mayor del 80%, por lo que es suficiente para el análisis descriptivo. La PCA es capaz de discriminar las nueve leches por clásicas, con calcio y sin lactosa atendiendo a la cantidad de lactosa que presentan as leches.

- Grasas de las leches enteras y semidesnatadas, clásicas, con calcio y sin lactosa
- Grasa de la leche desnatada sin lactosa

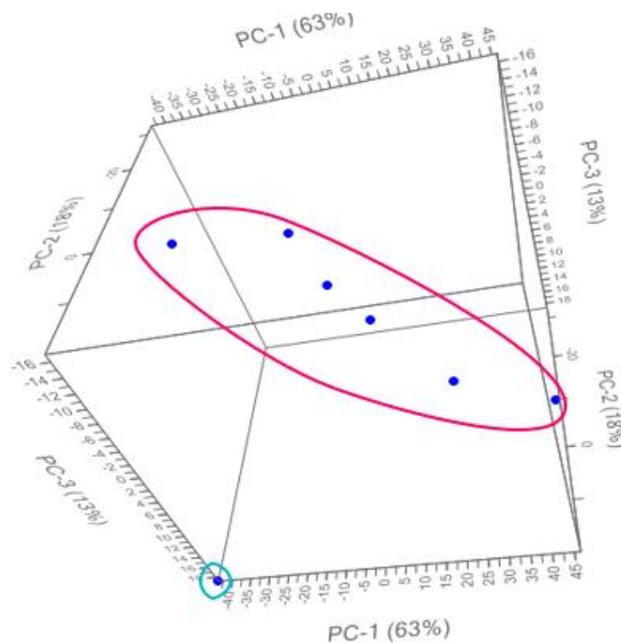


Figura 16 PCA en 3D de las grasas de los nueve tipos de leche estudiados obtenidas mediante centrifugación.

Como se ha explicado anteriormente, no se pudo hacer la comparativa de las grasas de las nueve leches estudiadas.

Para llevar a cabo la PCA de las grasas contenidas en la leche se ha escogido el “rango grasa” comprendido entre $600\text{--}1800$, $2700\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, debido a que es en este rango en el que los lípidos de la leche se absorben. El normalizado que se ha seguido para la matriz de datos es, en este caso, el pico normalizado en el punto espectral 820 cm^{-1} .

La figura 17 muestra una PC1 del 63% de la variabilidad original, la PC2 el 18% y la PC3 el 13%, entre las tres recogen un 94% de la información original del conjunto de datos originales. Cuanto mayor es el porcentaje que presentan las

componentes principales, mayor es la varianza y, por lo tanto, mayor es la cantidad de información que se tiene del conjunto de variables originales.

Se puede observar que las grasas de las leches enteras y semidesnatadas se agrupan, mientras que la grasa de la leche desnatada sin lactosa se separa. No se han encontrado evidencias científicas acerca de que sean diferentes grasas, lo que sí que se sabe es que la leche entera y la semidesnatada poseen mayor cantidad de grasas insaturadas, mientras que la leche desnatada posee más cantidad de grasas saturadas. A ello puede deberse que en la PCA salga tan distanciada de las demás [77].

Además, la grasa es la que tiene el aporte fundamental de vitaminas liposolubles como la A, K, D y E, por lo tanto, la leche desnatada es la que menos vitaminas presenta, esto puede explicar que la leche desnatada se separe del resto de las leches estudiadas [76].

5.3.1.2. Estudio por tipos de leche y grasa

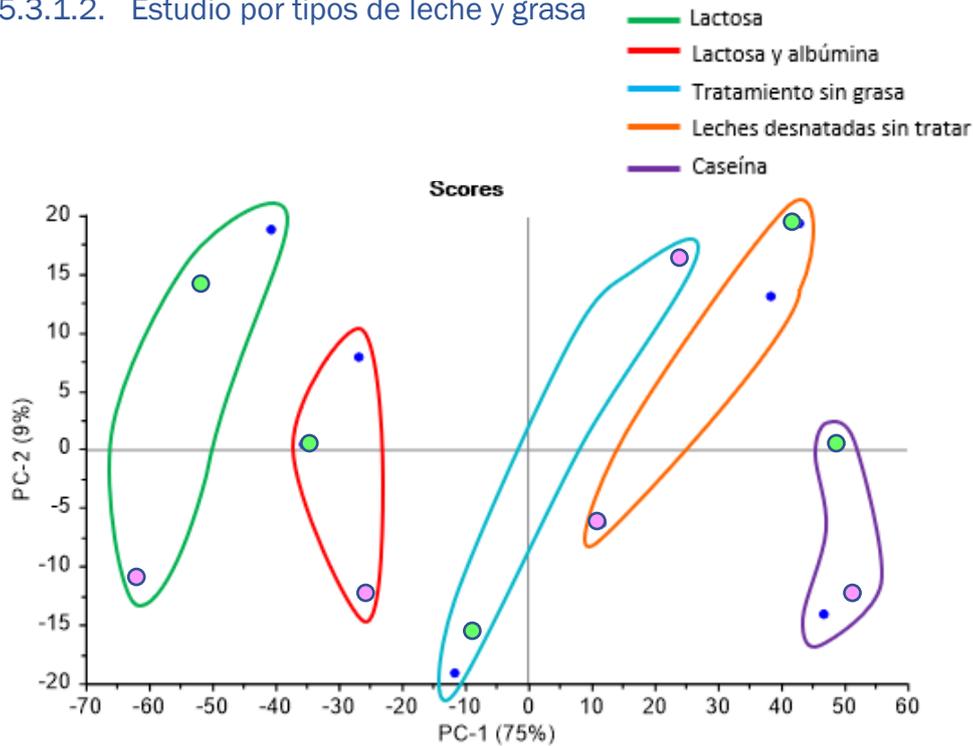


Figura 17 PCA en 2D de todas los componentes de los tres tipos de leches desnatadas.

Una vez se han estudiado los componentes de la leche por separado, se ha querido comprobar si la PCA discriminaba el conjunto de todos los componentes de la leche estudiados.

En la Figura 18 se muestra el gráfico de la PCA en 2D, se ha decidido trabajar en el “rango de trabajo” que se ha descrito anteriormente, para normalizar la matriz de datos originales, se ha usado el pico normalizado, tomando como punto espectral 1500cm^{-1} , la PC1 recoge el 75% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 9% y la PC3 recoge el 6%, entre las tres se recoge un 90% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

Se consiguió discriminar las leches desnatadas por los diferentes componentes estudiados, en los cuadrantes positivo y negativo de la PC2 y negativo de la PC1 se encuentran las muestras que contienen tanto la lactosa como la lactosa y la albúmina, para estos dos componentes, en el segundo cuadrante ($\text{PC2}>0/\text{PC1}<0$) se encuentran las leches con calcio y sin lactosa, mientras que las leches clásicas aparecen en el tercer cuadrante ($\text{PC2}<0/\text{PC1}<0$).

También se puede observar que, en todas los componentes, salvo en la caseína, la leche desnatada clásica (representada por círculos rosa) se separa de la leche enriquecida con calcio (representada por círculos azules) y la sin lactosa (representada por círculos verdes). Esto probablemente se deba a que en la leche desnatada clásica no se consiguió eliminar la grasa, como se ha mencionado con anterioridad, por esta razón el espectro sale más opacado y difiere de las otras leches.

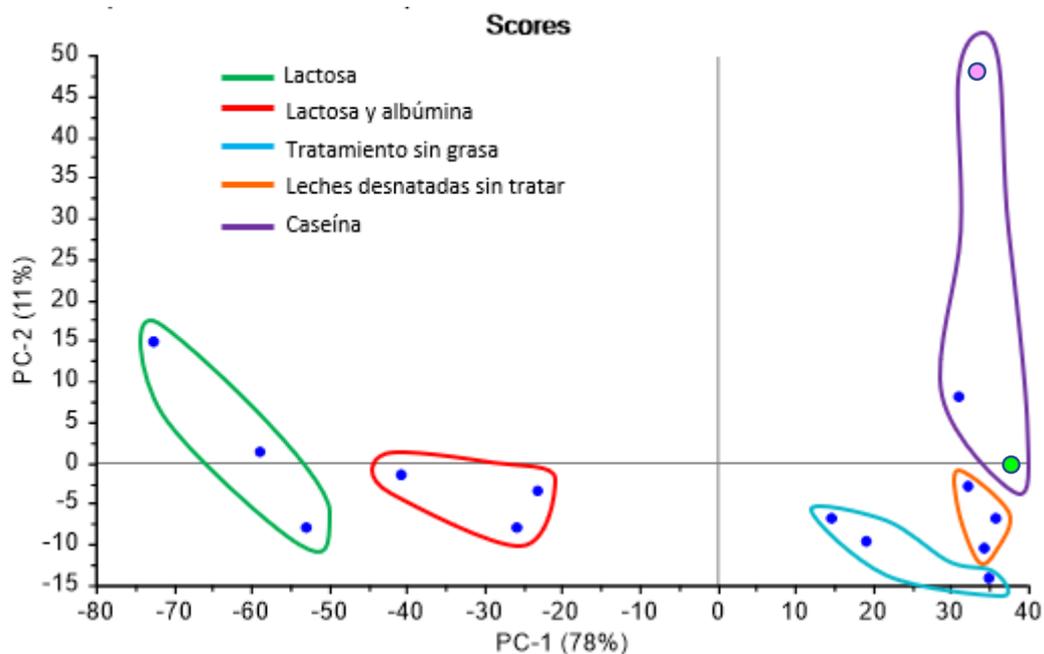


Figura 18 PCA en 2D de los componentes de los tres tipos de leches enteras.



En la Figura 19 se muestra la PCA en 2D de los componentes que se han estudiado en los tres tipos de leche entera (clásicas, sin lactosa y con calcio), para el estudio se utilizó el “rango de trabajo” comprendido entre los 750-1800, 2700-3700 cm^{-1} . Con los datos comprendidos en dicho rango, se ha llevado a cabo el normalizado de la matriz, en este caso se ha hecho el rango normalizado, basado en la división de cada fila por el rango (valor máximo menos valor mínimo).

La PC1 recoge el 78% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 11% y la PC3 recoge el 5%, entre las tres se recoge un 94% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

Al igual que con las leches desnatadas y con las semidesnatadas, los componentes en los que se estudia la lactosa se encuentra en la parte negativa tanto de la PC1 como de la PC2 y, la lactosa y la albumina se encuentra PC1<0, PC2>0 y <0, muy separadas en este caso del resto de componentes. Se puede concluir que la espectroscopía ATR FT-IR es más sensible a la detección de las absorbancias de los carbohidratos que contienen las diferentes leches estudiadas.

En la Figura 19 se puede observar que la caseína de la leche entera clásica (representada por un círculo rosa) está más separada de la caseína de la leche enriquecida con calcio (representada por un círculo azul) y la sin lactosa (representada por un círculo verde), esto se puede deber a que la leche entera es la que menos cantidad contiene, 3g de proteínas, según el fabricante.

Durante el proceso de obtención de la caseína se utilizó el ácido acético para que precipitase, siempre se adicionó la misma cantidad en todas las leches y posteriormente se lavó bien con agua destilada, por lo tanto, que se separe tanto la leche entera del resto puede deberse a algún error experimental durante el lavado.

5.3.2. Estudio de las PCA de las nueve leches estudiadas con adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico.

Con el análisis de componentes principales de las adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico en la leche se busca la máxima discriminación entre las leches, o bien por tipo de grasa o bien por tipo de leche.

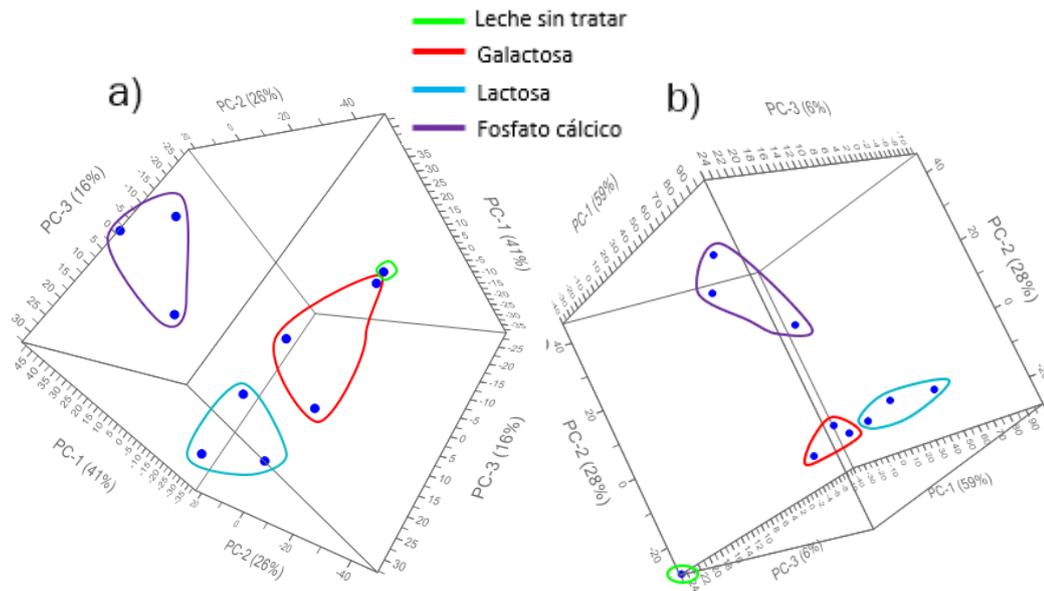


Figura 19 PCA en 3D con adiciones de galactosa, lactosa y fosfato cálcico en diferentes concentraciones en leche. Leche entera a), leche semidesnatada b).

En la Figura 20 a) se observan las adiciones de lactosa, galactosa y de fosfato de calcio en la leche entera clásica. La PCA se realizó en el “rango de trabajo” que se ha estado utilizando en el resto de los análisis y, dentro de este, la matriz de datos se ha normalizado tomándose un máximo, que corresponde al pico que corresponde al agua.

La PC1 recoge el 41% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 26% y la PC3 recoge el 16%, entre las tres se recoge un 83% de la información original del conjunto de muestras de la leche. Se ha obtenido un valor alto de varianza en los datos, por lo que se tiene gran cantidad de información de los datos originales, en este caso no se ha llegado a alcanzar un valor en torno al 90%, esto se puede deber a que los datos originales estaban menos correlacionados y por tanto los componentes principales coinciden en mayor medida con los datos originales.

A la vista de los resultados, se puede observar que somos capaces de discriminar por el tipo de adición que se realizó, la leche entera clásica está muy próxima a la leche con una adición de galactosa, en los espectros obtenidos en el infrarrojo también salían muy próximos, como se ha mencionado anteriormente, cuando se aumenta la galactosa a una cierta concentración, esta favorece la hidrólisis de la lactosa, salen los espectros más juntos y por lo tanto también en la PCA [78].

En la Figura 20 b) se observan adiciones de lactosa, galactosa y de fosfato de calcio, en este caso es en leche semidesnatada clásica. La PCA se realizó en el “rango de trabajo” que se ha estado utilizando en el resto de los análisis y, dentro de este, se ha normalizado la matriz de datos en el punto espectral 1984cm^{-1} .

La PC1 recoge el 59% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 28% y la PC3 recoge el 6%, entre las tres se recoge un 93% de la información original del conjunto de muestras de la leche. Con 3 componentes principales, la PCA es capaz de obtener un elevado valor de varianza entre las variables, cuantas menos componentes hagan falta, mejores son los resultados obtenidos.

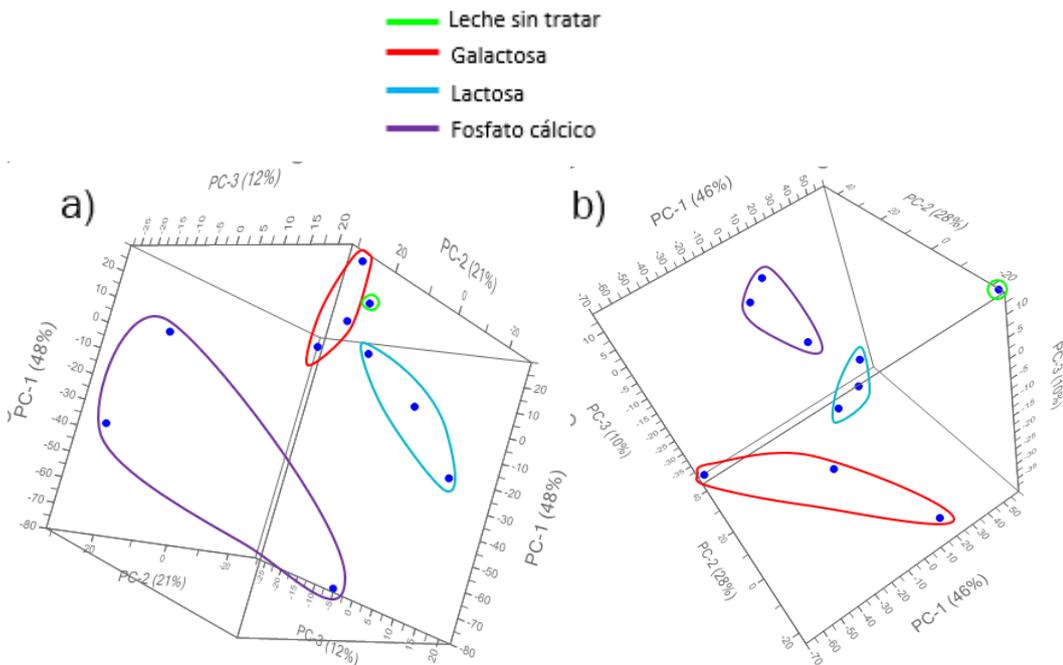


Figura 20 PCA en 3D con adiciones de galactosa, lactosa y fosfato cálcico en diferentes concentraciones en leche. Leche entera enriquecida con calcio a), leche desnatada enriquecida con calcio b).

En la Figura 21 a) también se estudian las adiciones de lactosa, galactosa y de fosfato de calcio, en la leche entera con calcio. La PCA se realizó en el “rango de trabajo” que se ha estado utilizando en el resto de los análisis y, dentro de este, para normalizar la matriz de datos, se ha tomado el máximo normalizado, que se encuentra en la banda de absorción característica del agua al igual que en la leche entera clásica.

Se puede observar que la leche entera enriquecida con calcio con adiciones de los diferentes carbohidratos, galactosa y lactosa, se encuentran separados de las adiciones de fosfato de calcio, debido a que las adiciones de lactosa y



glucosa hacen que se produzca la hidrólisis de la lactosa, los puntos de las mismas en la PCA aparecen junto a la leche enriquecida con calcio que no ha sido tratada.

La PC1 recoge el 48% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 21% y la PC3 recoge el 12%, entre las tres se recoge un 81% de la información original del conjunto de muestras de la leche. De las PCA hechas, es la que menos información nos da, pero aun así nos da la suficiente para conseguir discriminar las leches.

En la Figura 21 b) se representaron las adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico en la leche desnatada enriquecida con calcio. Se ha hecho también en el rango de trabajo y el pico normalizado en el punto espectral 1888cm^{-1} .

La PC1 recoge el 46% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 26% y la PC3 recoge el 10%, entre las tres se recoge un 82% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

En este caso la leche desnatada enriquecida con calcio se separa de la leche dentada enriquecida con calcio que contiene las adiciones de lactosa, galactosa y fosfato de calcio en las diferentes concentraciones. Se puede concluir de esta forma, que la cantidad de grasa contenida en la leche influye a la hora de hacer las adiciones de carbohidratos, de manera que cuando hay grasa presente en la leche, los espectros se discriminan peor que cuando se tiene la leche desgrasada.

Se estudió la posibilidad de discriminar por tipo de leche y por grasa dependiendo de la concentración de la adición.

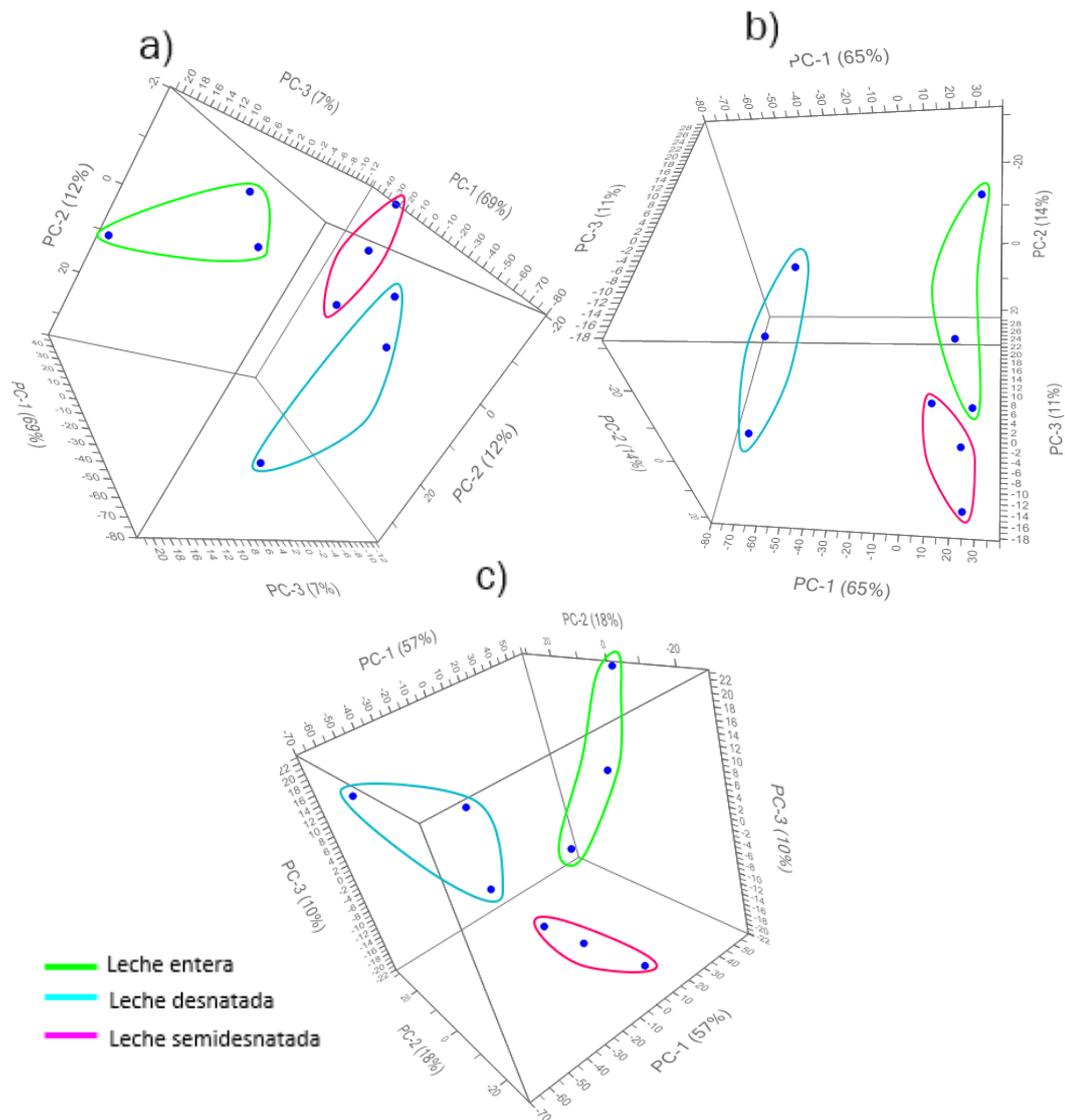


Figura 21 PCA en 3D con adiciones de lactosa, galactosa y fosfato cálcico. Adición del 100% m/v de galactosa a). Adición del 100% m/v de lactosa b). Adición del 150% m/v de fosfato cálcico c).

La figura 22 muestra que no solo se ha sido capaz de discriminar por tipo de adición, sino que también se han discriminado las leches por el contenido graso. En la Figura 22 a) se observa la adición de un 100% m/v de galactosa en los nueve tipos de leche estudiados, se ha llevado a cabo el análisis en el “rango de trabajo” que se viene utilizando hasta ahora y, dentro de este se ha usado el máximo normalizado, que coincide con la banda de absorción característica del agua.

La PC1 recoge el 69% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 12% y la PC3 recoge el 7%, entre las tres se recoge un 88% de la información original del conjunto de muestras de la leche. Se observa que las leches desnatadas con adición de lactosa en diferentes concentraciones se separan de las leches



enteras y semidesnatadas, al igual que ocurría en PCAs anteriores, esto se debe a que la lactosa no llega a sobresaturarse cuando la leche contiene poca cantidad de grasa, y por ello se discrimina mejor.

En la Figura 22 b) se observa la adición de un 100% m/v de lactosa en los nueve tipos de leche estudiados, se ha usado también el “rango de trabajo” y el máximo normalizado en el pico del agua.

La PC1 recoge el 65% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 14% y la PC3 recoge el 11%, entre las tres se recoge un 90% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

En la Figura 22 c) se observa la adición de un 100% m/v de fosfato cálcico en los nueve tipos de leche estudiados, al igual que en a) y b), se ha utilizado el rango de trabajo, dentro de este, esta vez se ha normalizado el pico en el punto espectral 1886cm^{-1} .

La PC1 recoge el 57% de la variabilidad original, la PC2 recoge el 18% y la PC3 recoge el 10%, entre las tres se recoge un 85% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

En los apartados a) y b) se ha querido comprobar que añadiendo diferentes compuestos de carbohidratos, como son la lactosa y la galactosa con un 100%, se observa que cuando se le añade lactosa, los tres tipos de leche desnatada se separan de las semidesnatadas y de las enteras. Las leches con menor contenido en grasa tienen ligeramente un mayor contenido en hidratos de carbono.

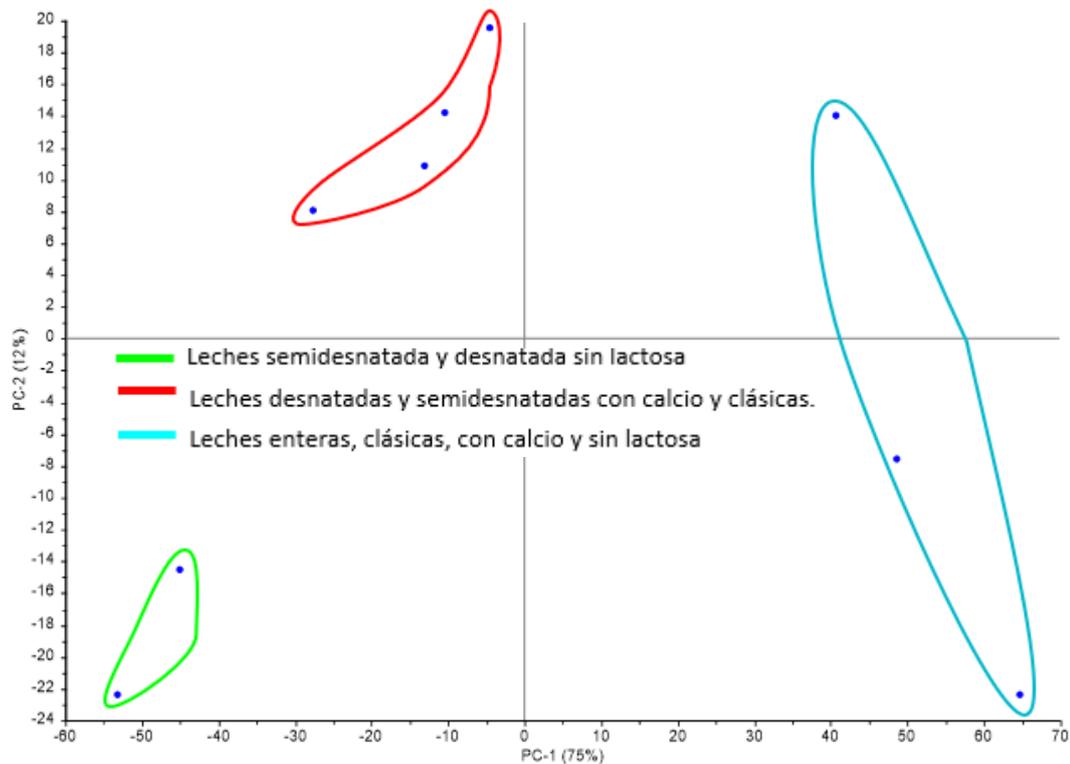


Figura 22 PCA en 2D de la adición del 150% m/v de lactosa en las nueve leches estudiadas.

La Figura 23 muestra la PCA realizada a la adición de 150% m/v de lactosa a las nueve leches que se han estado estudiando a lo largo del trabajo, también se ha normalizado en el rango de trabajo y, con el máximo normalizado, correspondiente al pico del agua.

Esta PCA aporta una gran cantidad de información, la PC1 recoge el 75% de la variabilidad, la PC2 el 12% y la PC3 el 5%, entre las tres componentes principales se recoge un 93% de la información original del conjunto de muestras de la leche.

Se puede observar que se ha conseguido separar las tres leches enteras, clásica, con calcio y sin lactosa de las leches semidesnatadas y las desnatadas. Las leches enteras se encuentran en los cuadrantes de superior e inferior derechos ($PC1 > 0$ y $PC2 < / > 0$), mientras que las leches semidesnatadas y con calcio se encuentran repartidos en los cuadrantes restantes.

Se agrupan por un lado las leches sin lactosa (verde) en el cuadrante inferior $PC1 < 0$ y $PC2 < 0$, de las que sí que tienen lactosa (rosa), cuadrante superior izquierda $PC1 < 0$ y $PC2 > 0$. Esto es algo que se podría esperar, porque en las leches sin lactosa, los azúcares que la componen están disgregados, por un



lado, se encuentra la galactosa y por otro la glucosa, con la adición, estos azúcares les añadimos como un solo conjunto.

En estos dos grupos de leches la PCA no es capaz de conseguir una clara discriminación por grasa.



	PC1	PC1	PC3	TOTAL
Sin tratar	75%	12%	7%	94%
sin grasa	75%	13%	6%	94%
lactosa y abúmina	57%	19%	15%	91%
lactosa	58%	20%	10%	88%
grasa	51%	24%	13%	88%
leches desnatadas	75%	9%	6%	90%
leches semidesnatadas	66%	22%	4%	92%
leches enteras	78%	11%	5%	94%
lact., galact. y f.cálcico en leche entera	41%	26%	16%	83%
lact., galact. y f.cálcico en leche semidesnatada	59%	28%	6%	93%
lact., galact. y f.cálcico en leche entera con calcio	48%	21%	12%	81%
lact., galact. y f.cálcico en leche semidesnatada con calcio	46%	26%	10%	82%
adición de un 100% de lactosa	65%	14%	11%	90%
adición de un 50% de galactosa	59%	16%	12%	87%
adición de un 100% de galactosa	69%	12%	7%	88%
adición de un 150% de f.cálcico	57%	18%	10%	85%
adición de un 150% de lactosa	75%	12%	5%	93%

Tabla 2 Tabla resumen de los valores obtenidos en las PCA estudiadas.



Siendo:

Lact. – lactosa

Galact. – galactosa

f.cálcico – fosfato cálcico



CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



6. Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- Se ha establecido un método para el análisis de la calidad de la leche basado en la combinación de ATR FT-IR y análisis de componentes principales (PCA), para ello:
 - Se han optimizado parámetros para dicha caracterización, como son la temperatura, el número de barridos, el tiempo entre medidas, seleccionando una temperatura óptima de 80°C, el número de barridos 1000 y el tiempo entre medidas de 30 segundos.
 - Se han estudiado distintos métodos de tratamiento de muestra para separar los distintos componentes de las leches.
 - Se han realizado adiciones en concentraciones crecientes de lactosa, galactosa y fosfato cálcico a las leches con el objetivo de discriminar las leches atendiendo a los componentes adicionados. En los espectros realizados en la leche con adiciones se vio que en las leches que tienen mayor cantidad de grasa, como son las leches enteras, las adiciones de carbohidratos, lactosa/galactosa producen una sobresaturación, haciendo así que se produzca la hidrólisis de la lactosa, por esta razón las bandas de absorción obtenidas en los espectros salen con menor intensidad de lo que deberían tener debido a la cantidad de adición que se le ha proporcionado a la leche.
 - Se seleccionaron las zonas del espectro (ATR FT-IR) de interés para llevar a cabo el estudio.
- Se han establecido correlaciones de los espectros obtenidos con técnicas quimiométricas para llevar a cabo un estudio estadístico por PCA, donde se ha demostrado que con los tratamientos seleccionados se consiguen valores superiores al 90% en la suma de las tres componentes principales.

Esto significa que obtenemos gran cantidad de información acerca de los datos que se han obtenido mediante la espectroscopia ATR FT-IR, lo cual nos permite discriminar las leches, ya bien sea por el tipo de adición, por la cantidad de grasa que presentan y por los diferentes componentes de la leche que se han estudiado.

Los valores de las PCA realizadas se muestran en la Tabla 2.
- El método propuesto permite discriminar leches con diferente contenido nutricional, asimismo, el método es capaz de discriminar leches con diferente contenido de diversos componentes añadidos como aditivos.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



BIBLIOGRAFÍA



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**



7. Bibliografía

- [1] M. de Agricultura and A. Medio Ambiente, “L) INDUSTRIA AGROALIMENTARIA 1. ELABORACIÓN DE NORMATIVA ALIMENTARIA DE CALIDAD COMERCIAL.” Accessed: Jun. 25, 2021. [Online]. Available: <http://www.magrama.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-comercial/legislacion-alimentaria/boletin->
- [2] O. S. Blanco, V. Cortés López, P. Talens, and O. Etsiamn, “USO DE ESPECTROSCOPIA VISIBLE E INFRARROJO CERCANO PARA LA DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN DE LECHE POR AGUADO MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS.”
- [3] F. R. van de Voort, “Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis,” *Food Res. Int.*, vol. 25, no. 5, pp. 397–403, Jan. 1992, doi: 10.1016/0963-9969(92)90115-L.
- [4] J. L. Ares, E. de Vera, A. Garrido, and J. M. Serradilla, “La Espectroscopia de infrarrojo cercano aplicada al análisis del contenido de Proteína y Caseína total de la Leche de Cabra,” no. January, p. 104, 2004, Accessed: Jul. 10, 2021. [Online]. Available: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337165056La_Espectroscopia_de_infrarrojo_cercano_aplicada_al_analisis_del_contenido_de_proteina_y_casexna_.pdf.
- [5] E. Fernández Fernández *et al.*, “Documento de Consenso: importancia nutricional y metabólica de la leche,” *Nutr Hosp*, vol. 31, no. 1, pp. 92–101, 2015, doi: 10.3305/nh.2015.31.1.8253.
- [6] Ch.ALAIS, *Science du lait et principe des techniques laitières*, 4ª Edición. 1984.
- [7] A. Colombia, A. ; Gómez, and O. Bedoya Mejía, “Revista Lasallista de Investigación,” *Rev. Lasallista Investig.*, vol. 2, no. 1, pp. 38–42, 2005, Accessed: Jun. 25, 2021. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>.
- [8] A. Haug, A. T. Høstmark, and O. M. Harstad, “Bovine milk in human nutrition - A review,” *Lipids in Health and Disease*, vol. 6. BioMed Central, p. 25, 2007, doi: 10.1186/1476-511X-6-25.
- [9] V. N. Uversky and Y. Lyubchenko, *Bio-nanoimaging: Protein Misfolding and Aggregation*. Elsevier Inc., 2013.
- [10] A. M. O'Donnell, K. P. Spatny, J. L. Vicini, and D. E. Bauman, “Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices,” *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 5, pp. 1918–1925, May 2010, doi: 10.3168/jds.2009-2799.
- [11] C. Castillo, V. Pereira, Á. Abuelo, and J. Hernández, “Effect of



- supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production,” *The Scientific World Journal*, vol. 2013. Hindawi Publishing Corporation, 2013, doi: 10.1155/2013/616098.
- [12] J. R. Godínez and A. D. R. Gutiérrez, “Importancia de los carbohidratos en la industria alimentaria,” *Pädi Boletín Científico Ciencias Básicas e Ing. del ICBI*, vol. 4, no. 8, Jan. 2017, doi: 10.29057/ICBI.V5I8.2048.
- [13] E. E. Sterchi *et al.*, “Biogenesis of intestinal lactase-phlorizin hydrolase in adults with lactose intolerance: Evidence for reduced biosynthesis and slowed-down maturation in enterocytes,” *J. Clin. Invest.*, vol. 86, no. 4, pp. 1329–1337, 1990, doi: 10.1172/JCI114842.
- [14] “Dietary Reference Values for nutrients Summary report,” *EFSA Support. Publ.*, vol. 14, no. 12, Dec. 2017, doi: 10.2903/sp.efsa.2017.e15121.
- [15] F. Conte, N. van Buuringen, N. C. Voermans, and D. J. Lefeber, “Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: Time for a closer look,” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1865, no. 8. Elsevier B.V., p. 129898, Aug. 01, 2021, doi: 10.1016/j.bbagen.2021.129898.
- [16] L. Mariela, F. Barrios, L. I. Gómis Hernández, D. H. Gautier, and D. Gómez, “VITAMINA B 12: METABOLISMO Y ASPECTOS CLÍNICOS DE SU DEFICIENCIA,” 1999.
- [17] P. Zela S/ and J. María, “ASPECTOS NUTRICIONALES Y TECNOLÓGICOS DE LA LECHE.”
- [18] N. Lakshanasomya, A. Danudol, and T. Ningnoi, “Method performance study for total solids and total fat in coconut milk and products,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 24, no. 4–5, pp. 650–655, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.jfca.2010.10.002.
- [19] H. Lindmark Månsson, “Fatty acids in bovine milk fat,” *Food Nutr. Res.*, vol. 52, 2008, doi: 10.3402/fnr.v52i0.1821.
- [20] C. Alais, *Ciencia de la leche: principios de técnica lechera*. Editorial Reverté.
- [21] “Tipos de leche, composición y nutrientes.” <https://www.naturalcastello.com/es/tipos-leche-composicion-nutrientes/> (accessed May 15, 2021).
- [22] L. Artica Mallqui, “Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos LUIS ARTICA MALLQUI 2ª Edición: Año 2014 Editorial @ Libros y editoriales, TEIA.”
- [23] D. F. Elgar, C. S. Norris, J. S. Ayers, M. Pritchard, D. E. Otter, and K. P. Palmano, “Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropeptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene,” *J. Chromatogr. A*, vol. 878, no. 2, pp. 183–196, May 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00288-0.



- [24] D. Suarez Ospina and Y. Morales Hernández, “PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES,” *América Rev. Semilleros Form. Investig.*, vol. 4, 2018.
- [25] C. C. Titration and Metrohm International Headquarters, “Potentiometric titration of calcium and magnesium in dairy products.”
- [26] M. Hernández, C. A. Galán, G. A. Álvarez, and M. E. Páez, “Desarrollo de un biosensor amperométrico en configuración plana para la cuantificación de colesterol,” *Inf. Tecnol.*, vol. 22, no. 6, pp. 25–32, 2011, doi: 10.4067/S0718-07642011000600004.
- [27] E. M. Fuentes Pérez, “Aplicación de la lengua electrónica voltamétrica a alimentos líquidos,” *Universitat Politècnica de València*, 2017.
- [28] Y. Tahara and K. Toko, “Electronic tongues-a review,” *IEEE Sensors Journal*, vol. 13, no. 8, pp. 3001–3011, 2013, doi: 10.1109/JSEN.2013.2263125.
- [29] Á. A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. De Saja, “Voltametric electronic tongue application to wines classification and correlation study with the chemical and sensory characterization,” *Quim. Nova*, vol. 33, no. 4, pp. 787–793, 2010, doi: 10.1590/s0100-40422010000400004.
- [30] L. Lvova *et al.*, “All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 468, no. 2, pp. 303–314, Accessed: Jul. 04, 2021. [Online]. Available: https://www.academia.edu/20497108/All_solid_state_electronic_tongue_and_its_application_for_beverage_analysis.
- [31] Á. Arrieta Almarino and O. Fuentes Amín, “Lengua electrónica portátil para el análisis de leche cruda basada en tecnología PSoC (Programmable System on Chip) y Android Portable electronic tongue for the analysis of raw milk based on PSoC (Programmable System on Chip) and Android technology,” 2016.
- [32] G. Rojo, M. Tutor, R. Méndez, and M. Luz García Hernández, “Empleo de una lengua electrónica potenciométrica para la detección de adulteraciones en leche.”
- [33] Á. Á. Arrieta, J. A. Díaz, and Ó. C. Fuentes, “ELABORACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UNA RED DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA UNA LENGUA ELECTRÓNICA ORIENTADA AL ANÁLISIS DE LECHE OPTIMIZATION OF THE SYNTHESIS OF POLYPYRROLE FOR THE ELABORATION OF A NETWORK OF SENSORS ELECTROCHEMICAL (ELECTRONIC TONGUE).”
- [34] Á. Arrieta A. and R. L. Tarazona C., “Sistema multicanal con instrumentación virtual para una lengua electrónica,” *Ingeniare*, vol. 22, no. 3, pp. 338–350, 2014, doi: 10.4067/S0718-



33052014000300005.

- [35] C. Pérez López, *Técnicas de Análisis Multivariante de Datos Aplicaciones con SPSS* ®. 2008.
- [36] R. A. Johnson and D. W. Wichern, "SIXTH EDITION Applied Multivariate Statistical Analysis," 2007.
- [37] D. D. Rutstein et al., "Measuring the Quality of Medical Care," *N. Engl. J. Med.*, vol. 294, no. 11, pp. 582–588, Mar. 1976, doi: 10.1056/nejm197603112941104.
- [38] "QUIMIOMETRIA APLICADA A LA DIFERENCIACION POR ORIGEN DE PRODUCTOS DE LAS ABEJAS | Zuluaga | Alimentos Hoy." <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/15/15> (accessed Jun. 07, 2021).
- [39] A. Mańkiewicz and W. Ratajczak, "PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)*," 1993.
- [40] B. Balan et al., "Application of Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy coupled with chemometrics for detection and quantification of formalin in cow milk," *Vib. Spectrosc.*, vol. 107, p. 103033, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.vibspec.2020.103033.
- [41] F. A. Iñón, S. Garrigues, and M. De La Guardia, "Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques," *Anal. Chim. Acta*, vol. 513, no. 2, pp. 401–412, Jun. 2004, doi: 10.1016/j.aca.2004.03.014.
- [42] H. J. Luinge, E. Hop, E. T. G. Lutz, J. A. Van Hemert, and E. A. M. De Jong, "Determination of the fat, protein and lactose content of milk using Fourier transform infrared spectrometry," 1993.
- [43] Y. E. Deng, Q. Zhou, and S. Q. Sun, "Analysis and discrimination of infant powdered milk via FTIR spectroscopy," *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi/Spectroscopy Spectr. Anal.*, vol. 26, no. 4, pp. 636–639, Apr. 2006, Accessed: Jul. 04, 2021. [Online]. Available: <https://europemc.org/article/med/16836127>.
- [44] G. Jéssica Trentanni Hansen Bahía Blanca Argentina, "DETERMINACIÓN DE LA ADULTERACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE LA IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE," 2018.
- [45] M. Blanco and I. Villarroya, "NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 4, pp. 240–250, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00404-1.
- [46] A. C. A. Ozaki Yukihiro, McClure W.Fred, *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology - Google Libros*. 2007.
- [47] N. Núñez-Sánchez et al., "Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats," *Food Chem.*, vol.



- 190, pp. 244–252, May 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.083.
- [48] A. R. F. Rouessac, “Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas,” McGraw-Hill, Ed. 2003.
- [49] P. Mondragón Cortez, “Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas,” in *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas*, 2020, pp. 51–64.
- [50] S. Jawaid, F. N. Talpur, S. T. H. Sherazi, S. M. Nizamani, and A. A. Khaskheli, “Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR-Fourier transform infrared spectroscopy,” *Food Chem.*, vol. 141, no. 3, pp. 3066–3071, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.106.
- [51] M. Bassbasi, S. Platikanov, R. Tauler, and A. Oussama, “FTIR-ATR determination of solid non fat (SNF) in raw milk using PLS and SVM chemometric methods,” *Food Chem.*, vol. 146, pp. 250–254, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.044.
- [52] G. Barraza-Garza, L. A. De La Rosa, A. Martínez-Martínez, H. Castillo-Michel, M. Cotte, and E. Alvarez-Parrilla, “La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos,” *Rev. Latinoam. Quim.*, vol. 41, no. 3, pp. 125–148, 2013.
- [53] R. R. Souza, M. L. Gimenes, S. C. Costa, and C. M. O. Müller, “Eliminación de Grasas del Suero de Queso para Obtener Proteínas y Lactosa Fat Removal from Whey to Obtain Proteins and Lactose,” 2008.
- [54] S. Xiong, B. Adhikari, X. D. Chen, and L. Che, “Determination of ultra-low milk fat content using dual-wavelength ultraviolet spectroscopy,” *J. Dairy Sci.*, vol. 99, no. 12, pp. 9652–9658, 2016, doi: 10.3168/jds.2016-11640.
- [55] F. de Ciencias and F. Isabel Bravo Vázquez, “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE LECHE Y FÓRMULAS INFANTILES SOMETIDAS A ALTAS PRESIONES,” 2012.
- [56] “OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS ESPAÑA,” Jul. 2002.
- [57] “PROTEINAS DEL LACTOSUERO.” <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/lactosuero.html> (accessed Jun. 12, 2021).
- [58] D. F. Tirado, D. Acevedo, and P. M. Montero, “Goat Milk Whey Protein Extraction by Applying Pulsed Electric Fields of High Intensity (PEF),” *Inf. Tecnológica*, vol. 26, no. 5, pp. 71–80, 2015, doi: 10.4067/S0718-07642015000500010.
- [59] E. N. Fase, L. Ida, J. José, and P. Ruíz, “ADSORCION SELECTIVA DE MEZCLAS ETANOL-BUTANOL-ACETONA L2iVÁM4r~ Cl,” 1993.
- [60] “The Unscrambler User Manual Camo Software AS The Unscrambler Methods By CAMO Software AS,” 1996. Accessed: Jun. 27, 2021.



[Online]. Available: www.camo.com.

- [61] M. K. Grewal, J. Chandrapala, O. Donkor, V. Apostolopoulos, L. Stojanovska, and T. Vasiljevic, "Fourier transform infrared spectroscopy analysis of physicochemical changes in UHT milk during accelerated storage."
- [62] J. Salas-Salvadó, N. Babio, M. Juárez-Iglesias, C. Picó, E. Ros, and L. A. M. Aznar, "The importance of dairy products for cardiovascular health: Whole or low fat?," *Nutr. Hosp.*, vol. 35, no. 6, pp. 1479–1490, Nov. 2018, doi: 10.20960/nh.2353.
- [63] D. Rosa, V. Oramas, I. ; Raisa, Z. li, and C. Rodríguez, "Caracterización de un hidrolizado ácido de caseína Characterization of a casein acid hydrolysate."
- [64] J. K. F. Torres et al., "Technological aspects of lactose-hydrolyzed milk powder," *Food Res. Int.*, vol. 101, pp. 45–53, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.043.
- [65] J. D. S. Goulden, "676. Diffuse reflexion spectra of dairy products in the near infra-red region," *J. Dairy Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 242–251, 1957, doi: 10.1017/S0022029900008785.
- [66] G. Barraza-Garza, L. A. De La Rosa A , Alejandro Martínez-Martínez, H. Castillo-Michel, M. Cotte, and E. Alvarez-Parrilla, "SISTEMAS BIOLÓGICOS." Accessed: Jun. 17, 2021. [Online]. Available: www.relaquim.com.
- [67] B. L. Mojet, S. D. Ebbesen, and L. Lefferts, "Light at the interface: The potential of attenuated total reflection infrared spectroscopy for understanding heterogeneous catalysis in water," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 12, pp. 4643–4655, Nov. 2010, doi: 10.1039/c0cs00014k.
- [68] "La Lactosa: el azúcar de la leche | El blog de Quesos Caseros." <https://www.capraispana.com/la-lactosa-el-azucar-de-la-leche/> (accessed Jun. 13, 2021).
- [69] K. Salma, N. Borodajenko, A. Plata, L. Berzina-Cimdina, and A. Stunda, "Fourier transform infrared spectra of technologically modified calcium phosphates," in *IFMBE Proceedings*, 2008, vol. 20 IFMBE, pp. 68–71, doi: 10.1007/978-3-540-69367-3_19.
- [70] F. J. Holler and S. R. Crouch, *QUÍMICA QUÍMICA ANALÍTICA Novena edición Novena edición*. .
- [71] M. V. Korolevich, V. V. Sivchik, R. G. Zhibankov, G. N. Marchenko, and L. V. Zabelin, "Interpretation of the IR spectrum of α -D-galactose on the basis of a coordinated calculation of the vibrational spectra and intensities of the absorption bands," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 56, no. 3, pp. 217–223, Mar. 1992, doi: 10.1007/BF00659098.
- [72] Y. Paola, A. Cetina, S. Yannick, and T. Guevara, "Modelación de la síntesis de Galacto-oligosacáridos (GOS) en la elaboración de una bebida láctea



- fermentada simbiótica utilizando β -galactosidasa.” Accessed: Jun. 29, 2021. [Online]. Available: https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/394.
- [73] Manuel Terrádez Gurrea, “Análisis de componentes principales,” 2000.
- [74] U. N. Caracterizan *et al.*, “MODELIZACIÓN DE LOS FACTORES MÁS IMPORTANTES QUE.”
- [75] “Interpretar todos los estadísticos y gráficas para Análisis de componentes principales.”
- [76] L. F. Uscanga-Domínguez *et al.*, “Technical position on milk and its derivatives in adult health and disease from the Asociación Mexicana de Gastroenterología and the Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatría,” *Rev. Gastroenterol. Mex.*, vol. 84, no. 3, pp. 357–371, Jul. 2019, doi: 10.1016/j.rgmx.2019.03.002.
- [77] G. Fuentes-Coto, R. A. Ruiz-Romero, J. I. Sánchez-Gómez, D. N. Ávila-Ramírez, and J. Escutia-Sánchez, “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LECHE DE ORIGEN ORGÁNICO: ATRIBUTOS DESEABLES PARA SU TRANSFORMACIÓN MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF ORGANIC MILK : DESIRABLE ATTRIBUTES FOR ITS TRANSFORMATION.”
- [78] V. Capdevila, M. E. Vales, C. Gely, and A. Pagano, “ANÁLISIS DE LA ETAPA DE HIDRÓLISIS DE LA LACTOSA DEL SUERO LÁCTEO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL ANALYSIS OF THE LACTOSE HYDROLYSIS STAGE OF MILK WHEY TO OBTAIN BIOETHANOL.” Accessed: Jul. 06, 2021. [Online]. Available: <http://www.executivebs.org/publishing.cl/1>.



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**