

**EVALUACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA LECHE DE
DIFERENTES ESPECIES DE MAMÍFEROS EN LA GRANJA
EXPERIMENTAL VILLA MARINA**

JEFERSÒN LOPEZ ROMERO



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA
2021**

**EVALUACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA LECHE DE
DIFERENTES ESPECIES DE MAMÍFEROS EN LA GRANJA
EXPERIMENTAL VILLA MARINA**

JEFERSÒN LÒPEZ ROMERO

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de
Químico**

Tutores

AMANDA LUCÍACHAPARRO GARCÍA

Química, M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

JOHN JAIRO BUSTAMANTE CANO

Medicina y Cirugía Animal, Ph.D.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2021

DEDICATORIA

Dedico estas páginas a la memoria de Esaú López Romero, quien fue hermano, padre y amigo, enseñándome a ser una persona responsable y honesta, gracias por haber estado en mi vida.

También a mi madre por enseñarme a librar mis batallas, que con sus consejos y oraciones no permitió que desistiera de esta meta que por momentos se vio lejana, acompañándome en las tristezas y alegrías.

Además, quiero dedicar este esfuerzo a mis hermanos Paola, Jennifer, Luis Alberto y Julia, quienes fueron mi apoyo en toda mi vida universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, porque sin su ayuda la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

También quiero agradecer a mi directora, la doctora Amanda Lucía Chaparro García por sus consejos y su permanente acompañamiento que me fue guiando hasta alcanzar la meta de ser un gran profesional.

Agradezco al decano de la facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Pamplona, el doctor John Jairo Bustamante Cano, por todo el apoyo brindado durante este proceso.

Agradezco a la finca Villa Marina de la Universidad de Pamplona porque sin obstáculo alguno nos suministraron las muestras para hacer realidad este trabajo.

Al laboratorio de Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona y en especial a la Dra. Alexandra Torres, por su apoyo en la toma de los espectros infrarrojos, indispensables para la elaboración de este trabajo.

Por último, quiero agradecer a todos esos buenos profesores que a lo largo de este camino aportaron sus enseñanzas para mi formación como profesional, y desde luego a la Universidad de Pamplona por abrirme sus puertas para formarme como un ser integral y honesto dispuesto a aportar un granito de arena para construir una mejor sociedad.

CONTENIDO

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCION.....	15
1. MARCO REFERENCIAL.....	17
1.1 LA LECHE Y SU CONTENIDO	17
1.1.1 Proteínas en la leche	18
1.1.2 Lípidos en la leche	19
1.2 CONTENIDO DE GRASAS Y PROTEÍNAS DE LA LECHE NO BOVINA	19
1.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER.....	21
1.3.1 Antecedentes del uso de la espectroscopia FTIR en la determinación de lípidos y proteínas en alimentos.....	23
1.3.2 Análisis de carbohidratos, lípidos y proteínas por FTIR-ATR	30
1.4 MÉTODOS PARA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE	34
1.5 LIOFILIZACIÓN.....	36
1.5.1 Secado primario.....	37
1.5.2 Antecedentes del uso de la liofilización.....	38
1.6 QUIMIOMETRÍA.....	39
1.6.1 Espectroscopia de derivada	39
1.6.2 Corrección de línea base	40
1.6.3 Línea base entre dos puntos.....	40
1.6.4 Suavizado espectral (Smooth)	40
1.6.5 Factores que afectan la calidad de los espectros.....	41
1.6.6 Análisis en componentes principales (PCA).....	43
1.7 METALES PESADOS	44
1.7.1 Antecedentes de estudio de metales pesados en Colombia (En fuentes hídricas y en hatos lecheros)	46
1.7.2 Metales pesados en leche	47
2. OBJETIVOS.....	48

2.1 Objetivo general.....	48
2.2 Objetivos específicos	48
3. METODOLOGÍA.....	49
3.1 Muestreo	49
3.2 Secado de la muestra.....	49
3.3 Toma y análisis de espectros FTIR	50
3.4 Determinación del porcentaje relativo de proteínas, grasas y carbohidratos.	50
3.5 Análisis quimiométrico.....	55
3.6 Análisis de metales pesados por absorción atómica	55
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	56
4.1 Determinación del perfil bioquímico en leche de diferentes especies	56
4.2 Determinación del porcentaje relativo de proteínas, lípidos y carbohidratos.....	58
4.3 Análisis multivariado.....	60
4.4 Metales pesados (As, Pb, Cu, Cd, Zn Y Hg) en leche de búfala cabra, oveja y vaca	70
5 CONCLUSIONES.....	77
6 RECOMENDACIONES	78
7 BIBLIOGRAFÍA.....	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación en la composición de la leche.....	17
Tabla 2. Diversidad en la composición de la leche no bovina, datos presentados en g/L.....	17
Tabla 3. Área bajo la curva de regiones específicas de los espectros de las muestras mostradas en la gráfica 14.....	24
Tabla 4. Asignación de picos en espectros de FTIR de varios estándares de azúcares.....	26
Tabla 5. Principales bandas reportados en muestras biológicas y alimentos.....	28
Tabla 6. velocidad de congelamiento en los alimentos en el proceso de liofilización.....	36
Tabla 7. Parámetros para análisis de metales pesados.....	44
Tabla 8. Determinación de metales pesados por absorción atómica.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectros de diferentes muestras de leches adulteradas con leche de soja.....	25
Figura 2. Espectro FTIR de la gelatina de pescado, gelatina bovina y gelatina porcina.....	26
Figura 3. Dendrograma de un análisis de conglomerados (algoritmo de Ward) de espectros FTIR de un total de 45 muestras estándar diferentes de gelatinas de bovino, porcinos y pescado.....	27
Figura 4. Mapa de análisis de PCA dimensional de espectros FT-IR de un total de 45 muestras estándar diferentes de gelatinas bovinas, porcinas y de pescado.....	27
Figura 5. Espectros infrarrojos FTIR de muestras de WPC adulteradas con MWP.....	27
Figura 6. Espectro FTIR de muestras de diferentes azúcares presentes en los alimentos.....	29
Figura 7. Espectro FTIR de una muestra de aceite comercial aceite extra virgen.....	31
Figura 8. Espectro FTIR de una muestra de proteína de soja.....	30
Figura 9. Espectro de absorción normal, orden cero, (2) primera derivada, segunda derivada.....	32
Figura 10. Suavizado de espectro FTIR, (a) espectro original, (b) espectro suavizado.....	34
Figura 11. Espectros de FTIR de muestras de sacarosa, (a) en forma de polvo fino y (b) en solución acuosa.....	34
Figura 12. Eliminación de bandas de interferencias en un espectro FTIR.....	35

Figura 13. Efecto del ajuste en un espectro original (a) de FTIR utilizando el método de la primera derivada (b) y el de la segunda derivada (c).....	35
Figura 14. Diagrama de fase mostrando el punto triple para el agua.....	39
Figura 15. Imagen de la zona de influencia de la finca Villa Marina.....	4
Figura 16. Muestras de leche de vaca, búfala, cabra y oveja para ser liofilizadas.....	44
Figura 17. Espectros obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna.....	48
Figura 18. Espectros de primera derivad obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna en la región espectral de los 4000-400 cm^{-1}	48
Figura 19. Espectros de segunda derivada obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna en la región espectral de los 4000-400 cm^{-1}	49
Figura 20. Integración de bandas correspondientes a proteínas en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala.....	50
Figura 21. Integración de bandas correspondientes a grasas en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala.....	50
Figura 22. Integración de bandas correspondientes a carbohidratos en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala.....	51
Figura 23. Espectro obtenidos por FTI-ATR de leche búfalo, cabra, oveja y vaca en la región espectral de 4000 a 400 cm^{-1}	52
Figura 24. Representación de los modos vibratorios de las bandas Amida I y II.....	54
Figura 25. Porcentaje relativo producto de la integración de bandas de lípidos proteínas y carbohidratos en datos espectrales FTIR.....	56
Figura 26. Matriz de datos espectrales FTIR-ATR de orden cero de la leche de diferentes especies elaborada en software Minitab 2020.....	57

Figura 27. Matriz de datos espectrales FTIR-ATR de primera derivada de la leche de diferentes especies elaborada en software Minitab 2020.....	57
Figura 28. Matriz de datos espectrales FTIR-ATR de segunda derivada de la leche de diferentes especies elaborada en software Minitab 2020.....	58
Figura 29. PCA de datos espectrales FTIR de orden cero de muestras de leche de cabra, búfala, oveja y vaca.....	59
Figura 30. Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de orden cero.....	60
Figura 31. PCA de datos espectrales FTIR de primera derivada de muestras de leche de cabra, búfalo, oveja y vaca.....	61
Figura 32. Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de primera derivada.....	63
Figura 33. PCA de datos espectrales FTIR de segunda derivada de muestras de leche de cabra, búfala, oveja y vaca.....	63
Figura 34 Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de segunda derivada.....	64
Figura 35. Biomarcadores de los datos FTIR obtenidos por el análisis de componentes principales.....	63
Figura 36. Dendrograma de un análisis de conglomerados de espectros FT-IR (región de huella dactilar datos de orden cero) de muestras de leche de búfala, cabra, oveja y vaca.....	64
Figura 37. Concentración de plomo en leche de diferentes especies.....	65
Figura 38. Concentración de cadmio en leche de diferentes especies.....	67
Figura 39. Concentración de cobre en la leche de diferentes especies.....	68

Figura 40.Concentración de zinc en la leche de diferentes especies.....69

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
ATR	Reflectancia total atenuada
PCA	Análisis de Componentes Principales
PC	Componente Principal
OMS	organización mundial de la salud
HCA	Análisis de Conglomerados
LDA	Análisis lineal discriminante

RESUMEN

Hoy en día, la leche de una variedad de animales (burros, caballos, ovejas, cabras, búfalos y vacas) se utiliza, no solo para la alimentación infantil, sino también como una importante fuente de nutrición general. En Colombia el consumo de leche no bovina es muy bajo incluso para muchas regiones no se encuentran datos estadísticos que reflejen el consumo de estas leches. Adicionalmente, la autenticidad de la leche y los productos lácteos es importante en muchas regiones del mundo y tiene repercusiones sanitarias, culturales y financieras extendidas. Por lo anterior, la determinación de los principales componentes de la leche es importante en la industria de alimentos lácteos, para establecer el valor de la leche, para información de los consumidores y para el control de calidad. Por lo tanto, se requiere realizar una serie de análisis de rutina, pero los métodos analíticos actuales para el control de calidad de la leche son lentos, laboriosos y, por lo tanto, poco prácticos para su uso en el análisis rutinario de este producto por parte de la industria láctea. La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) es una excelente alternativa, por ser una técnica rápida, no destructiva y que se puede utilizar para el análisis cuantitativo de los componentes principales y obtener detalles de composición reduciendo significativamente el período de análisis de muestras y está siendo utilizada actualmente en la industria lechera para predecir el contenido de grasas y de proteínas. En este trabajo se realizó una evaluación espectroscópica de la leche de vaca producida en la finca Villa Marina y se comparó con la leche producida por diferentes especies de mamíferos (cabra, oveja y búfala), utilizando ATR-FTIR acompañada con métodos de análisis multivariado (PCA y HCA). Adicionalmente, se utilizó la técnica de espectroscopia de absorción atómica, con horno de grafito y generación de hidruros, para determinar la presencia de metales pesados en las muestras, previa digestión asistida por microondas. Se obtuvieron 12 bandas en la región espectral entre $4000-600\text{ cm}^{-1}$ a través del FTIR, correspondientes a los grupos funcionales presentes en los lípidos, proteínas y carbohidratos, estas bandas fueron integradas para la determinación del porcentaje de área relativo de cada uno de estos componentes. Se encontró que en la leche de oveja se halla el mayor porcentaje de área relativo de proteínas, lípidos y carbohidratos. El PCA discrimino correctamente la leche de diferentes especies, mostrados la correlación entre la leche de bufalina, caprina y bovina, lo cual corrobora el HCA, describiendo el agrupamiento de estas muestras de leche y rectificando las diferencias con la leche ovina. Por último en el análisis de metales pesados por absorción atómica se encontró la presencia de metales pesados (Cu, Pb, Zn, Cd) en la leche de cabra, oveja y vaca en bajas concentraciones incluso por debajo de las normas establecidas por autoridades internacionales como el codex alimentarius y normatividad de Rumanía.

Palabras Claves: Espectroscopia FTIR, Análisis de componentes principales, Análisis de conglomerados jerárquico, Espectroscopia de absorción atómica.

ABSTRACT

Today, the milk of a variety of animals (donkeys, horses, sheep, goats, buffalo and cows) is used, not only for infant feeding, but also as an important source of general nutrition. In Colombia the consumption of non-bovine milk is very low, even for many regions there are no statistical data that reflect the consumption of these milks. Additionally, the authenticity of milk and dairy products is important in many regions of the world and has widespread health, cultural and financial implications. Therefore, the determination of the main components of milk is important in the dairy food industry, to establish the value of milk, for consumer information and for quality control. Therefore, a number of routine analyzes are required to be performed, but current analytical methods for milk quality control are time consuming, laborious and therefore impractical to use in the routine analysis of this product for part of the dairy industry. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is an excellent alternative, as it is a fast, non-destructive technique that can be used for the quantitative analysis of the main components (biochemical profile) and obtain compositional details, significantly reducing the period sample analysis and is currently being used in the dairy industry to predict fat and protein content. In this work, a spectroscopic evaluation of the cow's milk produced in the Villa Marina farm was carried out and compared with the milk produced by different species of mammals (goat, sheep and buffalo), comparing their biochemical profiles using ATR-FTIR accompanied with methods of multivariate analysis (PCA and HCA). Additionally, the atomic absorption spectroscopy technique, with a graphite furnace and hydride generation, was used to determine the presence of heavy metals in the samples, after microwave-assisted digestion. Twelve bands were obtained in the spectral region between $4000-400\text{ cm}^{-1}$ through the FTIR, corresponding to functional groups of fats, proteins and lactose, whose absorbance's were integrated to determine the relative percentage of each of these components. It was found that sheep's milk contains the highest relative percentage of proteins, fats and carbohydrates. The PCA correctly discriminated the milk of different species, showing the correlation between buffalo, goat and bovine milk, which corroborated the HCA, describing the grouping of these milk samples and rectifying the differences with sheep milk. Finally, in the analysis of heavy metals by absorption, the presence of heavy metals (Cu, Pb, Zn, Cd) was found in goat,

sheep and cow milk in low concentrations even below the standards established by international authorities such as codex Alimentarius and Romanian regulations.

Keywords: FTIR spectroscopy, Principal component analysis, Hierarchical cluster analysis, Atomic absorption spectroscopy.

INTRODUCCION

La leche es la secreción de color blanco oscuro producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, se estima que en Colombia 5,7% de las personas consumen leche semanalmente. Para Norte de Santander se calcula que se consume 11.400 litros por semana de leche (Ministerio de salud y protección social, 2010). La fuente primaria de leche es la familia de mamíferos bovinos (vaca), estos se caracterizan por un alto consumo de alimento, por tal razón en países como Francia, Italia, Irlanda y en gran parte del continente africano se consume una gran cantidad de leche de cabra, se estima que el 7,6% de la leche consumida en estos lugares es de estas especies. A nivel mundial en el 2019 se produjeron 118,7 millones de toneladas de leche no bovina; entre las especies productoras se encuentra el búfalo, la cabra, la oveja, el burro y el camello (Faye & Konuspaveva, 2019). La industria de la leche de cabra se encuentra en auge produciendo 218 millones de dólares a nivel mundial, este crecimiento es debido al aumento de población de cabras lecheras, datos recientes tasan que 50% de estos mamíferos están en África, 24% en Europa, 6% en América latina, 3% en América del Norte y el resto en el continente asiático (Ocampo et al., 2016). En Colombia el consumo de leche NO bovina es muy bajo incluso para muchas regiones no se encuentran datos estadísticos que reflejen el consumo de estas leches. Adicionalmente, la autenticidad de la leche y los productos lácteos es importante ya que tiene repercusiones sanitarias, culturales y financieras.

La cantidad de leche producida debe ir ligada con la calidad, la alimentación de los hatos lecheros y las variables climáticas establecen un factor determinante en la producción de este alimento, debido a esto es necesario un monitoreo permanente cualitativo y cuantitativo de la composición de la leche (Andrade et al., 2019). Actualmente la industria láctea utiliza métodos basados en cromatografía (Ahmad et al., 2017), electroforesis (Aidawarti et al., 2019), inmunoquímica (Berzins et al.,

2020), espectrometría de masas (Botelho et al., 2016) y técnicas volumétricas clásicas. Si bien estos métodos brindan resultados de alta sensibilidad y selectividad, son costosos, exigen mucho tiempo, algunos demandan el uso de reactivos químicos tóxicos, instrumentación compleja y personal capacitado (Barlowska et al., 2016). Por lo necesario es bueno tener métodos analíticos alternos que sean limpios, eficientes y rápidos, que garanticen el correcto monitoreo de los componentes principales de este producto, como la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier acompañada con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).

En ATR-FTIR se estudia la interacción entre la radiación electromagnética con la materia, con lo cual se generan espectros que representan la “huella digital” de una muestra, para determinar grupos funcionales mediante la variación de la energía vibratoria de átomos y moléculas. Se considera una tecnología prometedora para la industria alimentaria, que permite mediciones rápidas y no destructivas. Los avances en el análisis de datos con la aplicación de métodos quimiométricos, hacen que esta tecnología sea adecuada para un análisis rápido de grandes volúmenes de muestras e ideal para monitorear la leche (Chávez et al., 2018).

La quimiometría es una poderosa herramienta que transforma datos analíticos complejos en información útil, y técnicas como el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Conglomerados (HCA) (Cirak et al., 2018). El PCA es una herramienta cualificada que, reduciendo la dimensionalidad de los datos originales, tiene como objetivo desarrollar modelos gráficos capaces de separar muestras de interés en diferentes grupos, según similitudes. El HCA es ampliamente reconocido como una herramienta muy poderosa para obtener mejor información sobre las relaciones dentro del conjunto de datos (Layane et al., 2018).

El presente estudio evaluó espectroscópicamente la leche de diferentes mamíferos criados en la Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona y se compararon con la leche de vaca, utilizando ATR-FTIR y las herramientas quimiométricas PCA y HCA. Adicionalmente, se utilizó la técnica de espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito y generación de hidruros, para determinar la presencia de metales pesados en la leche, con el fin de buscar alternativas de consumo a la leche bovina.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 LA LECHE Y SU CONTENIDO

La leche es la secreción de color blanco oscuro producida por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, una de sus principales funciones es nutrir las crías hasta que se encuentre en condiciones de digerir los alimentos (Andrade et al., 2019). Además, protege el tracto intestinal de las crías de toxinas y de posibles inflamaciones, cuando se habla de leche simple se refiere genéricamente a la de vaca, en los otros casos se especifica el mamífero de la cual proviene, en el caso de los humanos se denomina leche materna. La leche se compone de un 87% de agua y un 13% de materia seca, de este pequeño porcentaje de materia seca las proteínas son las de mayor presencia, proteínas como la caseína, lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina, inmunoglobulinas y lactoferrina, otra parte de este pequeño porcentaje son los hidratos de carbono, como las glucoproteínas y oligosacáridos (Villares et al., 2012). Estos últimos son combinaciones de varios monosacáridos los cuales son de especial interés por su papel como probióticos en la alimentación humana, en la tabla 1 se compara el contenido de la leche de tres mamíferos con la humana.

Tabla 1

Comparación de la composición de varios tipos de leche

Contenido(%)	Mujer	Vaca	Cabra	Oveja
Agua	87	87	87	87
Proteína	1	3.2	2.9	5.3
Grasa	3.8	3.7	4.5	7.4
Lactosa	7	4.8	4.1	4.8
Sales minerales	0.2	0.9	0.8	1

Nota. Reproducido de “ Introducción a la química de los alimentos”. Owen R, F., & Tannenbaum R, S. (2017). Carolina del Norte: Instituto de Tecnología de Massachusetts.

1.1.1 Proteínas en la leche

Las proteínas de la leche se han dividido en dos grandes grupos, por su estado de dispersión, estos grupos son las caseínas que constituyen el 80%, el 20% restante son las seroproteínas. La separación de estas dos grandes familias de proteínas se da por la alteración del pH o por cambios en la temperatura, la separación por métodos químicos se realiza con sustancias como la urea, una vez separada estas dos familias se pueden seguir fragmentando en sus respectivos constituyentes. Se utilizan técnicas como la electroforesis para realizar dicha separación (Badui, 2016).

Caseínas:

Las fosfogluco proteínas que precipitan de la leche descremada se denominan caseínas, estas proteínas contienen tanto hidratos de carbono como residuos fosfatos, debido a su fuerte carga eléctrica se considera muy estable en el seno de la leche, el contenido de nitrógeno en esta proteína varía dependiendo de la fracción de esta, en la mayor parte el contenido es de 15,6%. Las moléculas de caseína se encuentran en dos estados físicos en la leche, en su mayor proporción se encuentran asociadas entre si formando micelas, una pequeña cantidad está en solución (Badui, 2016). Los fragmentos de la caseína se pueden identificar por su movilidad electroforética se han identificado cuatro partes principales como lo son α S, β , k, Y, dentro de estas cuatro las α y Y tiene subdivisiones (α S1, α S2, α S3, α S4 y Y1, Y2, Y3, Y4), las propiedades de la caseína se pueden considerar comunes, algunas de estas son: siempre mantienen una carga negativa que es estabilizada gracias a la repulsión que se genera entre ellas, estas cargas aparecen gracias a un alto contenido de ácido glutámico y aspártico, otra importante cualidad se encuentra en su estructura primaria que se localizan en zonas con características apolares. Esto se puede deber a la mayor presencia de aminoácidos hidrófobos que hidrófilos, otra propiedad importante es la facilidad para unirse electroestáticamente esto es consecuencia de la gran cantidad de regiones cargadas, por último otra de las principales propiedades de la caseína es su fácil interacción con el calcio, la cual se manifiesta por la presencia de regiones fosforiladas. Todas las características anteriores son las que determinan su estabilidad y solubilidad (Badui, 2016).

Proteínas del suero:

El peso molecular de las proteínas del suero se han calculado entre 14.000 y 1.000.000 dalton, encontrando que estas proteínas son compactas, globulares, estos dos factores las diferencian de las caseínas, se puede decir que las seroproteínas son solubles en amplios rangos de pH, a pesar de su alta solubilidad no se mezclan con las caseínas, al menos que haya sido tratado térmicamente. Al igual que las caseínas estas proteínas se encuentran dividida en 8 fragmentos entre las principales podemos encontrar: la β lactoglobulina, la α -lactalbúmina, las imoglobulinas y la albúmina bovina, al exponer estas proteínas a cambios térmicos son las primeras en desnaturalizarse, este fenómeno se produce por la hidratación de estas, al originar la desnaturalización le da paso a reacciones de oxidación-reducción que se presenta por la liberación de grupos sulfhidrilo. El valor nutritivo de estas proteínas se considera superior debido a la mayor presencia de aminoácidos y a la distribución balanceada de estos comparadas con las caseínas (Owen & Tannenbaum , 2017).

1.1.2 Lípidos en la leche

Los lípidos en la leche se encuentran compuestos en su mayor parte por los triacilglicéridos, estos representan un 96% a 98% del total de este fragmento de la leche, el resto del porcentaje se divide en fosfolípidos, ácidos grasos libres, colesterol, hidrocarburos y ésteres de esteroides. Los triacilglicéridos se caracterizan por tener más de 400 ácidos grasos, si comparamos el contenido de ácidos grasos de algunos aceites como el de soya que solo contiene de 8-10 ácidos grasos, esto convierte a los triacilglicéridos en una fracción lipídica bastante compleja, algunas de las razones por la que se da esta grasa tan compleja es a la alta actividad de la microflora del rumen y a la síntesis celular. En estas grasas podemos encontrar diversidad de ácidos grasos como saturados, monoinsaturados, poliinsaturados, de cadena corta, mediana y larga, hidroxilados, ramificados, geométricos trans, entre otros. El estado físico de la leche está sujeto a la relación de los aminoácidos anteriormente nombrados, las reacciones químicas que afectan el sabor de la leche se ven afectada por estas interacciones, como la que se da de ácidos grasos saturados a insaturados, las cuales aumentan directamente su sensibilidad a la oxidación (Faye & Konuspayeva, 2019).

1.2 CONTENIDO DE GRASAS Y PROTEÍNAS DE LA LECHE NO BOVINA

El búfalo es el animal lechero de trópicos húmedos como la India, Pakistán entre otros, en comparación con la leche de vaca, la de este mamífero tiene un mayor contenido de proteínas (en la tabla 2 se pueden apreciar el contenido de proteínas y grasas de esta especie lechera), minerales y grasas. Entre los minerales se destaca la alta concentración del calcio, en el caso de los lípidos se encuentra mayor

concentración de ácido butírico, un último factor que se puede comparar es la cantidad de leche que se requiere para preparar 1 kg de mantequilla, en el caso de la vaca se requieren 14 kg de leche de vaca mientras que de búfalo se necesitarían 10 kg de leche (Faye & Konuspayeva, 2019).

En algunos países de África como Sudán y Etiopía consideran a la cabra como la vaca de los pobres, la producción de leche de cabra representa un 40% del total de la leche consumida en estos territorios. Si comparamos las micelas de proteína de la leche de vaca contiene micelas pequeñas en relación con la cabra, en la parte lipídica se encuentra mayor presencia de ácidos grasos de cadena corta y media, por ejemplo, el ácido caprílico y cáprico están dos veces más concentrados en la leche de cabra que en la de vaca, este tipo de características son relevantes al utilizar esta leche para la elaboración de queso (Faye & Konuspayeva, 2019).

En la cuenca del mediterráneo más exactamente en Oriente Medio se concentra la mayor cantidad de ovejas lecheras, la leche de esta especie comparte una gran semejanza con la de búfalo. El contenido de proteínas, calcio, fosfato y magnesio se encuentran en mayor proporción en relación con la leche de vaca, el contenido de ácidos grasos de cadena media se considera superior al de todas las especies lecheras, al igual que la leche de cabra tiene un alto rendimiento en la producción de queso (Gaucheron, 2013).

En la zona de fauna estéril de Asia, que comprende territorios de Mongolia y Rusia central, se consume en diferentes productos la leche equina, se puede afirmar que esta leche es la más diferente a la de vaca. Por el contrario su parecido con la leche materna es tal que se utiliza para el desarrollo de fórmulas médicas para los recién nacidos que no pueden recibir la leche de su progenitora, el contenido de proteínas en especial caseínas es bastante bajo, se encuentra 10 g/L frente 25 g/L presente en la leche de vaca (ver tabla 6), el contenido de lípidos es el más bajo de todas las especies lecheras anteriormente mencionadas; comparando la leche equina con la bovina el contenido de triglicéridos es del 80% y 98% respectivamente (Gaucheron, 2013). Los ácidos grasos poliinsaturados como el linoleico le dan a la leche equina su semejanza con la leche materna, en cuanto a los minerales esta leche presenta bajo contenido en calcio con respecto a la leche bovina.

Castillo (2017) evaluó el perfil bioquímico de la leche por métodos instrumentales y las propiedades organolépticas, estudiando el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, sales y minerales, en esta investigación se realizó una evaluación espectroscópica de los lípidos, proteínas y carbohidratos presentes en la leche de diferentes especies, el resultado de esta evaluación es lo que denominamos perfil bioquímico.

Tabla 2

Diversidad en la composición de la leche no bovina, datos presentados en g/L

Leche	Lípidos	Proteínas	Minerales	Materia seca
Vaca	35-40	30-35	7-9	110-130
Búfalo	60-80	45-60	9-11	180-200
Cabra	35-45	35-40	7-9	110-130
Oveja	50-80	45-60	8-10	160-200
Yegua	10-15	20-22	3-5	90-100
Asnal	3-18	15-18	3-5	88-95

Nota. Reproducido de “Composición de proteínas y grasas de la leche de yegua: misma nutrición”. Malacarne, M., Martuzzi, F., & Summer, A. (2002) Revista láctea internacional, 869-877.

1.3 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER

En análisis cualitativo de compuestos orgánicos, como los que contienen los alimentos es muy común utilizar la espectroscopia FTIR. El espectro vibracional de infrarrojo de una molécula se considera su huella digital, este es único para cada molécula (Rubison & Rubison, 2019). La absorción en el infrarrojo se manifiesta debido a los diferentes cambios energéticos producidos por transiciones vibracionales y rotacionales. Como consecuencia de las rotaciones y vibraciones las moléculas sufren un cambio en el momento dipolar, el momento dipolar está dado por la diferencia de carga y por la distancia que se presenta sobre sus centros de carga. Producto de cambio en el momento dipolar se origina un campo que interactúa con el campo eléctrico de la radiación, si la frecuencia de vibración de la molécula coincide con la frecuencia de la radiación se promueve la absorción de la radiación como consecuencia de un cambio en la amplitud de la vibración molecular (Skoog & Timoth, 2019).

En una molécula los átomos pueden tener distintas posiciones, estas se caracterizan por sus constantes movimientos que son producto de un gran número de vibraciones y rotaciones alrededor de la molécula, dependiendo de la cantidad de átomos presente en la molécula es posible identificar el número y tipos de vibraciones. Se pueden distinguir dos clases de vibraciones, las de tensión y reflexión, las vibraciones de tensión están relacionadas con un cambio continuo en

la distancia a lo largo del eje de enlace entre los átomos. Las de reflexión se caracterizan por un cambio en el ángulo de enlace entre dos átomos. Se pueden distinguir cuatro vibraciones de reflexión las cuales son: de tijereo, balanceo, aleteo y torsión (Skoog & Timoth, 2019).

El espectrofotómetro infrarrojo trabaja con una pequeña cantidad de muestra esta es colocada en una celda infrarroja, donde es sometida a una fuente de luz infrarroja, la cual hace un barrido desde las longitudes de onda de 4000cm^{-1} hasta 400cm^{-1} (Ashraf et al.,2007).Para realizar estos procedimientos existen dos tipos de equipos espectrofotómetros dispersivos de red y equipos multiplex que emplean la transformada de Fourier, que resultan adecuados para las medidas infrarrojas cualitativa y cuantitativas, este último funciona con base en el principio de interferómetro de Michelson, el cual plantea que un divisor es golpeado por la radiación y este enciende un haz de luz en dos partes iguales como si fueran espejos semirreflejantes, estos dos haces interfieren con el divisor después de su viaje de vuelta cuando son reflejados sobre otros dos espejos, uno colocado sobre la trayectoria del haz original y el otro perpendicularmente, posteriormente al estar la muestra sobre la trayectoria pasa a través de ella para llegar al detector FTIR. La superposición de los haces es medida como función de fases del espejo móvil en su desplazamiento respecto la posición intermedia, la gráfica resultante se denomina interferograma, la curva obtenida es tratada con el modelo matemático de la transformada de Fourier, esta se constituye por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación (Rubison & Rubison, 2019).

Por el espectrofotómetro infrarrojo se pueden pasar diferentes tipos de muestra en distintos tipos de estados como gaseoso, líquido, sólido en muchos casos se le adapta al equipo infrarrojo un accesorio de reflexión atenuada, su nombre lo recibe por el principio al cual obedece su funcionamiento, la técnica de reflexión total atenuada, más conocida por sus siglas en inglés como ATR, su articulación se basa en la interacción del haz infrarrojo de forma atenuada en la muestra(Rubison & Rubison, 2019).

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier es utilizada para las pruebas de autenticidad de los alimentos y distintas matrices biológicas. Tiene la ventaja de ser una técnica rápida y no destructiva (Silva et al., 2019) Es capaz de ofrecer resultados incluso con una cantidad mínima de muestra, además no requiere sustancias o productos químicos adicionales. La técnica ofrece ventajas en comparación con otros métodos en términos de ahorro de tiempo y precios. FTIR es uno de los métodos utilizados para identificar composiciones químicas y adquirir información sobre sus propiedades. Al combinar los datos obtenidos por FTIR con métodos quimiométricos, como el análisis de componentes principales (PCA), se convierte en una robusta técnica analítica, para ser empleadas en estudio de clasificación y autenticación de gran cantidad de productos alimenticios y matrices biológicas(Botelho et al.,2016).

1.3.1 Antecedentes del uso de la espectroscopia FTIR en la determinación de lípidos y proteínas en alimentos

Actualmente, las industrias de alimentos ponen importante énfasis en el control de los ingredientes que componen sus productos finales, desde las materias primas utilizadas, como la información de cada una de las etapas de proceso con relación a las transformaciones químicas o fisicoquímicas que tienen lugar en los diferentes ingredientes que participan en la elaboración del producto final obtenido. Los componentes mayoritarios presentes en los alimentos, tales como el agua, los carbohidratos, las proteínas o los lípidos son medidos para establecer intervalos de control. Pero se hace importante la rapidez en la obtención de información para la toma de decisiones óptimas y confiables. Por lo anterior, la técnica de FTIR-ATR proporciona una buena alternativa para la detección de los componentes mayoritarios en un producto, de manera rápida, confiable y efectiva, adicionalmente, acoplada a quimiometría permite la determinación de adulteraciones e impurezas que puedan estar presentes.

La adulteración de alimentos se ha convertido en una práctica muy común, la leche y los productos lácteos frecuentemente son alterados añadiendo proteínas de origen vegetal y grasas de distintos animales. En países desarrollados como la India el consumo de leche ha aumentado debido al mejoramiento en el nivel de vida de su población, en este país para el año 2019, se espera que produzca 175.000 millones de litros de leche, casi el doble de lo que se espera que produzca Estados Unidos, la segunda nación productora de leche más grande” tomado de <https://www.agronewscastillayleon.com/la-india-el-principal-productor-mundial-de-leche>. Existen épocas como el verano en la cual la producción de leche disminuye, la alta demanda del producto en esta nación, provoca que algunos proveedores inescrupulosos agreguen productos con características semejantes, como la leche de soja. En cuanto a proteínas y grasas, esta leche es muy parecida, algunas diferencias claramente marcadas es su sabor característico a frijol (Gabara & Konar, 2018). La soja es considerada uno de los principales alimentos alergénicos, en los infantes produce problemas digestivos debido a la baja tolerancia de la proteína de este alimento.

Las autoridades encargadas de la regulación e inocuidad de los alimentos, han planteado diversas técnicas para establecer la presencia de agentes adulterantes en los productos lácteos, entre estas se encuentra la cromatografía de gases (Gutiérrez et al., 2016), esta técnica se caracteriza por ser muy costosa, se necesita un tratamiento sofisticado de la muestra, un operador profesional con salario

elevado y el equipo requerido para esta técnica solo se encuentra en laboratorios analíticos de alto costo. Una solución alternativa a esta problemática es planteada por Jaiwas et al. (2018) en su investigación, en la cual proponen la espectroscopia infrarroja como una técnica rápida, simple, sensible y económica (no requiere tratamiento de la muestra y no necesita reactivos) con la que se puede obtener huellas dactilares bioquímicas.

En el estudio de Jaiwas et al. (2018) se tomaron 10 muestras de leche bovina y bufalina en la granja GADVASU, campus PAU, Ludhiana, estas se mezclaron para obtener muestras de alto contenido de proteínas, posteriormente se adulteraron con concentraciones conocidas de leche de soja (2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 20%, 30% y 40%). En la figura 1 se muestran los espectros obtenidos en este estudio, los cuales se tomaron en un espectrómetro FTIR con celda de cristal de diamante ATR (longitud de trayectoria: 1,66 lm; Bruker, ModelAlpha, Alemania), los espectros fueron estudiados en rango de longitud de onda de los 4000-500 cm^{-1} . Estos investigadores reportaron claras diferencias en la absorción en las bandas correspondientes a los diferentes grupos amida, las muestras de leche adulteradas mostraron depresión en las bandas amida III, la cual corresponde a las vibraciones de flexión N-H y al estiramiento N-C (1472-1239 cm^{-1}). Otras bandas las cuales mostraron menos absorbancia fueron las bandas Amida II y I, estas se consideran producto de la flexión en el plano del N-H y al estiramiento del grupo carbonilo C=O respectivamente (1.560-1.553 cm^{-1} , 1.680-1.631 cm^{-1}), como se puede visualizar en la figura 1. Para la cuantificación del porcentaje de adulterante, se utilizó el modelo de regresión con mínimos cuadrados (PLS, por sus siglas en inglés), conjunto con modelos de matemática descriptiva, encontrando el coeficiente de determinación cuantitativa 0,99 y 0,92 para la calibración y validación respectivamente.

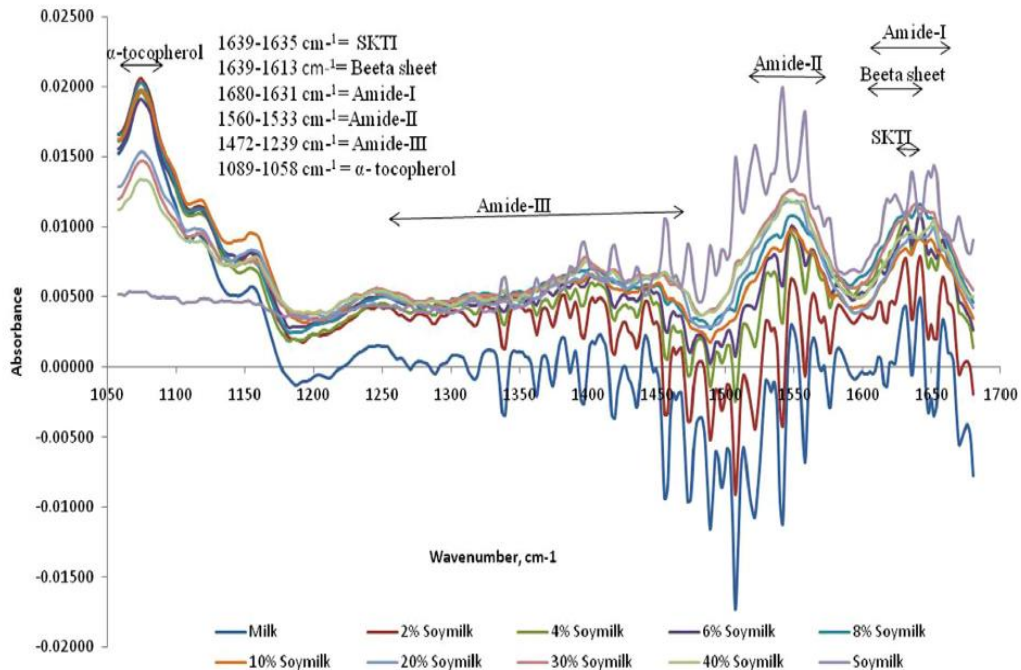


Figura 1. Espectros de diferentes muestras de leches adulteradas con leche de soja (Jaiwas et al., 2018).

Los estudios espectroscópicos complementados con métodos quimiométricos (Análisis de componentes principales PCA y regresión de mínimos cuadrados PLS), se convirtieron en una herramienta poderosa para la clasificación y evaluación de la calidad de los alimentos (Krzysztof et al., 2020). A continuación se describirán dos estudios donde se utiliza esta técnica para la evaluación de la fuente proteica (porcino, bovino y pescado) de la gelatina y la evaluación de un suplemento lácteo proteico.

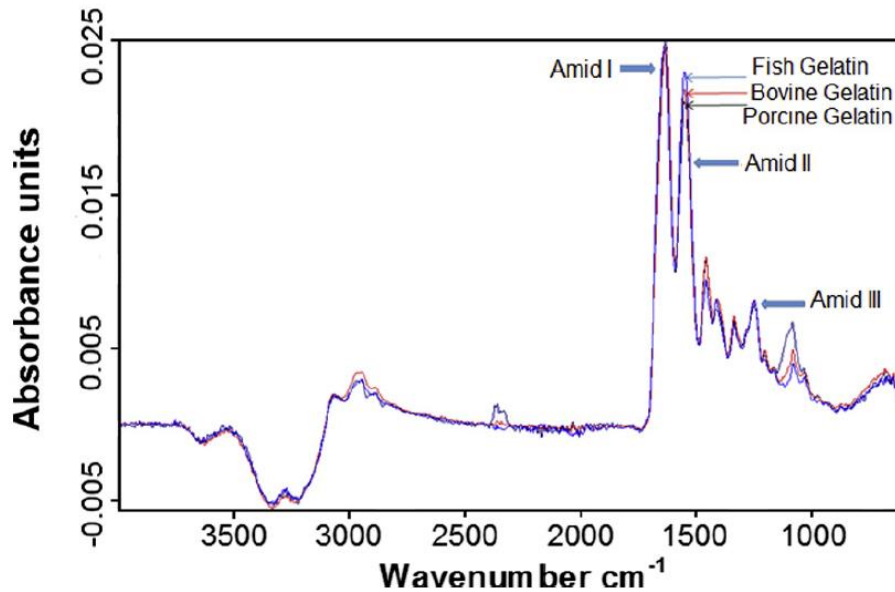


Figura 2. Espectro FTIR de la gelatina de pescado, gelatina bovina y gelatina porcina (Cebi et al., 2016).

La investigación realizada por Cebi et al. (2016) tuvo como objetivo plantear una técnica espectroscópica FTIR, para la autenticación y diferenciación de la fuente de la cual proviene la gelatina, debido a que las técnicas cromatografías y gravimétricas actualmente existentes tiene un costo elevado y requieren un tiempo considerable para su ejecución. Para su realización prepararon 45 muestras de gelatina a diferentes concentraciones (4%, 6%, 8% p/v). Los espectros FTIR los obtuvieron con una resolución 4cm⁻¹ con una acumulación de 16 barridos, para estudiar la variabilidad espectral de las muestras realizaron el análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados (software OPUS Versión 7.2). Dentro de los resultados obtenidos muestran el perfil bioquímico de la gelatina, exponiendo bandas con intensidades idénticas en la región correspondiente a las proteínas y carbohidratos, las bandas que resaltan de interés son las bandas amida I, II y III como se puede observar en la figura 2. El análisis jerárquico realizado por medio de un dendrograma donde se elucidan dos grandes conglomerados, en uno de estos se identifica las muestras de gelatina pesquera, el otro grupo tiene subdivisiones donde encontraron la gelatina bovina y porcina agrupadas de forma distinta entre sí (figura 3), esto indica que la gelatina de pescado tiene claras diferencias de las otras dos.

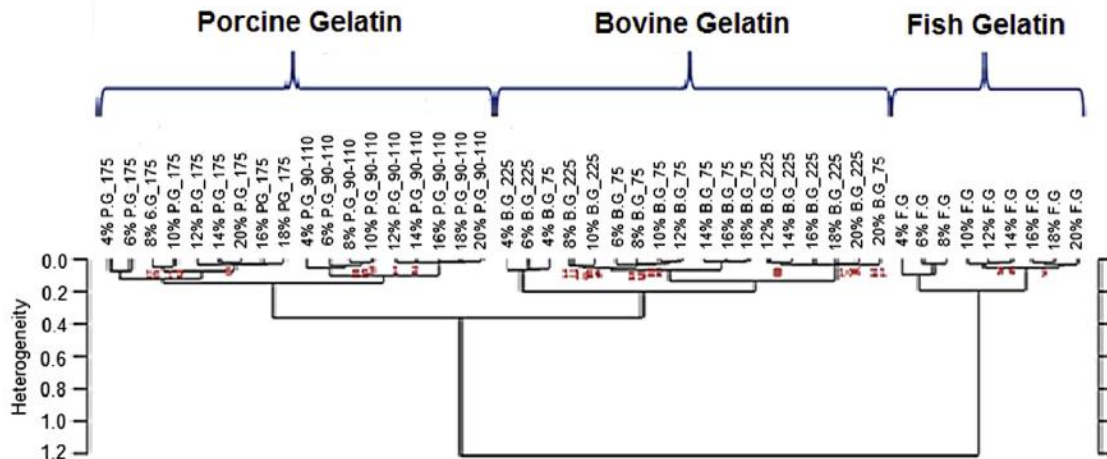


Figura 3. Dendrograma de un análisis de conglomerados (algoritmo de Ward) de espectros FTIR de un total de 45 muestras estándar diferentes de gelatinas de bovino, porcinos y pescado (Cebi et al., 2016).

En el PCA encontraron una mejor discriminación de las gelatinas como se puede observar en la figura 4, las muestras de los tres tipos de gelatina las agruparon y clasificaron según su fuente.

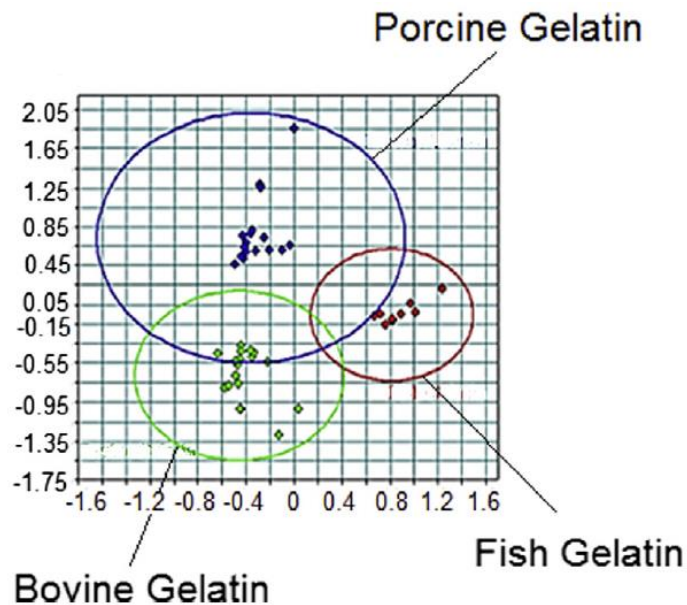


Figura 4. Mapa de análisis de PCA dimensional de espectros FT-IR de un total de 45 muestras estándar diferentes de gelatinas bovinas, porcinas y de pescado (Cebi et al., 2016).

El concentrado de proteína de suero (WPC) y el aislado de proteína (WPI) son suplementos alimenticios, los cuales son enriquecidos con un 65% y 90% de proteína en base seca, estos alimentos son consumidos por personas con patologías especiales o deportistas de alto rendimiento, dado que en los últimos años su consumo y popularidad ha aumentado, algunos fabricantes adulteran el producto sustituyendo con proteínas de menor valor biológico o con sueros de leche en polvo.

En la investigación de Andrade et al. (2019) al igual que en los estudios anteriormente nombrados buscan una técnica alternativa, la cual remplace la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de intercambio iónico. El objetivo de su estudio fue utilizar la espectroscopia FTIR, junto con métodos quimiométricos como PCA y PLS como una técnica la cual permita la caracterización rápida y de bajo costo de muestras de WPC adulteradas con suero de leche en polvo (MWP). La metodología llevada a cabo por los autores consistió en el análisis de 38 muestras de WPC con diferentes porcentajes MWP. Los polvos los mezclaron y agitaron con vórtex, seguidamente pesaron una pequeña porción, las cuales compactaron con una prensa hidráulica para la toma de espectros FTIR. Los espectros infrarrojos que obtuvieron se encuentra entre los $4000-400\text{ cm}^{-1}$, antes del análisis de los espectros se les realizó un suavizado y normalizado (0,1), los Softwares en los cuales hicieron los análisis y tratamiento de datos fueron OriginPro 8.0, Minitab 16.1.1 y MS-Excel. Los resultados que mostraron en este estudio correspondiente al análisis de espectros infrarrojos, delimitan dos zonas de interés, $3000-2800\text{cm}^{-1}$ la denominaron la zona de los lípidos y $1800-900\text{ cm}^{-1}$ donde se encuentran las bandas de las proteínas y carbohidratos.

En la figura 5 se muestra las bandas identificadas para cada una de las regiones anteriormente nombradas entre estas destacaron las bandas Amida I, II, II y las bandas del estiramiento C-H, C-H (CH₂) de las cadenas alifáticas de las grasas, estas son las mismas identificada por el estudio de Jaiwas et al. (2018). Lo diferente en este contexto es la discriminación de la pureza del WPC. Esto lo llevaron a cabo por medio de la medición del porcentaje de área relativa bajo la curva de las bandas anteriormente nombradas en los espectros, como se evidencia en la tabla 3, junto con la figura 5 demuestran como el área bajo la curva de las banda disminuye a medida que se aumenta el porcentaje de adulteración MWP.

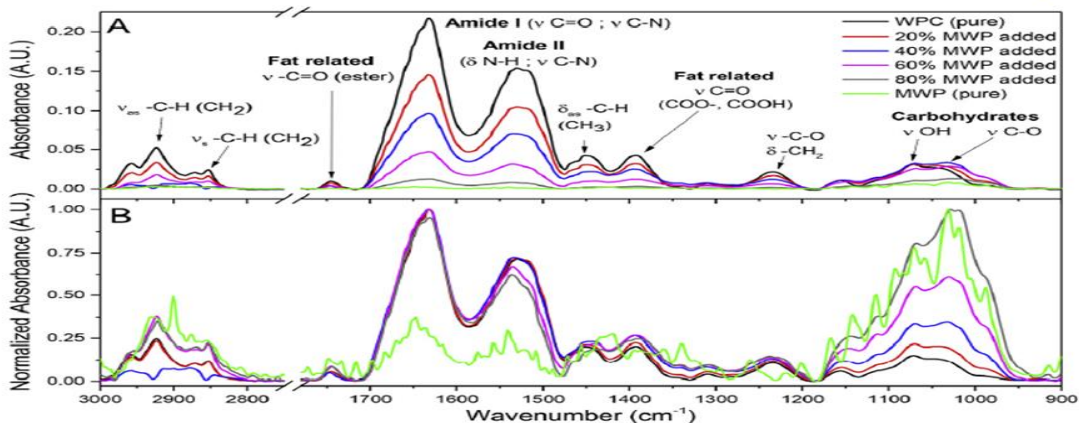


Figura 5. Espectros infrarrojos FTIR de muestras de WPC adulteradas con MWP (Andrade et al., 2019).

Respecto al PLS tomado por estos investigadores utilizaron un equipo Sprint para la obtención de los estándares con los cuales se realizó el modelo de mínimos cuadrados. Para todos los casos obtuvieron coeficientes de determinación superior a los 0,99. Como conclusión los autores afirman que “FTIR-ATR asociado a herramientas quimiométricas se puede utilizar con precisión en determinaciones del contenido de proteínas y cantidad en gramos WPC” (Andrade et al., 2019).

Tabla 3

Área bajo la curva de regiones específicas de los espectros de las muestras de WPC adulteradas con MWP, visibles en la figura 5

Muestra	Área integrada (A.U)		
	Carbohidratos (1135 cm ⁻¹)	Amida I(1712-1555 cm ⁻¹)	Amida II(1585-1475 cm ⁻¹)
WPC(0%MWP)	2,65 ± 0,03	14,7 ± 0,3	11,7 ± 0,2
20% de MWP	3,3 ± 0,3	9,9 ± 0,3	8,0 ± 0,3
40% de MWP	3,8 ± 0,2	6,9 ± 0,2	5,4 ± 0,1
60% de MWP	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1
80% de MWP	1,6 ± 0,4	0,99 ± 0,3	0,6 ± 0,2
100% MWP	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,01	0,11 ± 0,01

Nota. Reproducido de “Determinación FTIR-ATR del contenido de proteína para evaluar la adulteración del concentrado de proteína de suero ”.,Andrade et al.(2016), Ciencia y Tecnología de los Alimentos ,99

1.3.2 Análisis de carbohidratos, lípidos y proteínas por FTIR-ATR

Carbohidratos

Los carbohidratos son uno de los componentes con mayor presencia en los alimentos, dentro de su estructura se encuentran principalmente átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, estos se clasifican como pectinas, almidones, azúcares y celulosas, siendo estos dos últimos los más utilizados en la industria de los alimentos. El espectro infrarrojo presenta sus bandas características en la zona espectral de los 1200 y 900 cm^{-1} , en esta técnica se pueden analizar muestras diluidas en agua y polvos finos, en la figura 6 se puede apreciar los espectros de los principales azúcares presentes en los alimentos. Estas fueron diluidas en agua y posteriormente a las gráficas espectrales le restaron el espectro del solvente (Mondragón, 2020). Numerosos autores como Kher et al. (2017), Rutten et al. (2018) y Kaur et al. (2017) han recopilado distintas bandas características de los principales azúcares presentes en los alimentos; en la tabla 4 se encuentra un resumen de las diferentes frecuencias y número de onda en cual se asignan estas bandas.

Tabla 4

Asignación de picos en espectros de FTIR de varios estándares de azúcares

Azúcar	Numero de onda (cm^{-1})	Asignación de banda
Glucosa	1143	C-H y O-H, flexión ^a
	1105	O-H, flexión ^a
	1073	C-O y C-C estiramiento, C-O-H, flexión ^b
	916	C-C estiramiento ^b
Maltosa	1362	O-H, estiramiento ^b
	1146	C-O, estiramiento ^c
	1024	C-O y C-C, estiramiento ^c
Fructosa	1343	O-H, flexión ^c
	1152	C-O, estiramiento ^c
	1080	C-O y C-C, estiramiento ^a

1054	C-O, flexión, C-O-H, estiramiento ^b
981	C-C-H, flexión ^b
920	C-C, estiramiento en la piranosa ^a
821	C-C, estiramiento ^a

Nota a: Investigación FTIR de polvos concentrados de proteína de leche deshidratada por aspersión Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., Naughton, D., & Augustin, M. (2017). Espectroscopia vibratoria 44, 375-378.

b: Predicción de la composición de proteínas de la leche bovina basada en espectros infrarrojos por transformada de Fourier. Rutten, M., Bovenhuis, H., Heck, J., & Arendonk, M. (2018). Asociación Estadounidense de Ciencias Lácteas 7, 5683-5690.

c: Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de los cambios fisicoquímicos en la leche UHT durante el almacenamiento acelerado. Kaur, M., Chandrapala, J., Donkor, O., & Apostolopoulos. Revista láctea internacional, 126-138.

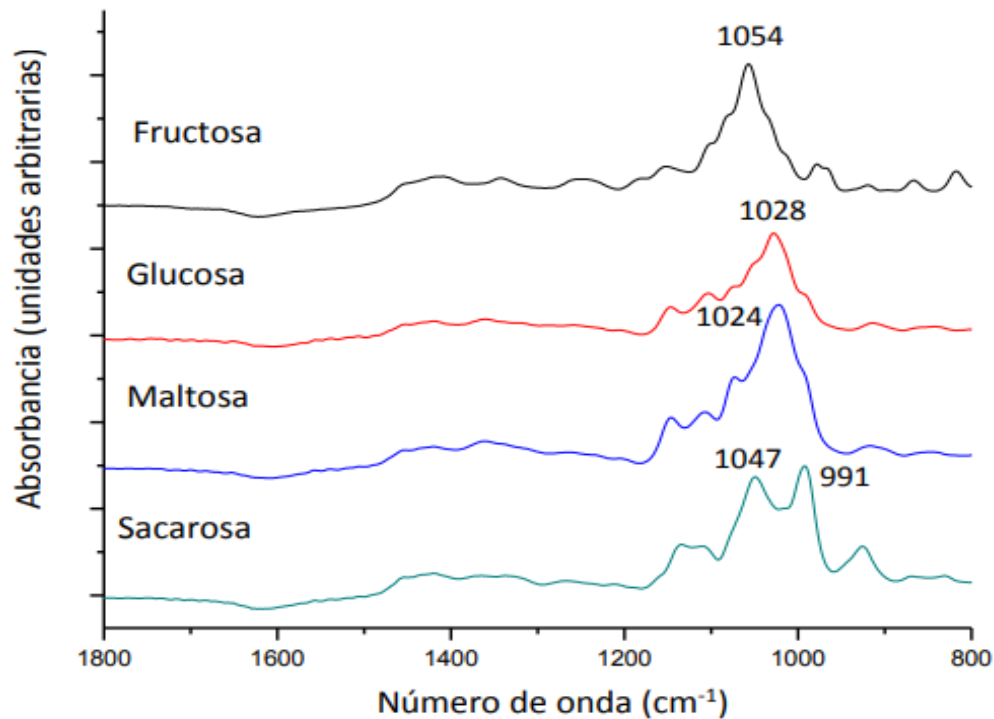


Figura 6. Espectro FTIR de muestras de diferentes azúcares presentes en los alimentos (Mondragón, 2020)

Lípidos

Los lípidos se encuentran en las grasas y aceites estos se utilizan comúnmente en la industria alimentaria, en su estructura química se encuentran átomos de carbono e hidrogeno, en algunos casos azufre, nitrógeno y fósforo (Badui, 2016). Los aceites se componen de ácidos grasos mono y poliinsaturados, a temperatura ambiente son

líquidos, con respecto a las grasas son sólidas a temperatura ambiente, estas se encuentran formadas de ácidos grasos saturados. Los espectros FTIR-ATR de los lípidos presentan bandas muy intensas que los hacen particulares y distinguibles en el análisis de alimentos, las zonas donde se presentan estas bandas son de 2950-2800 cm^{-1} , las cuales están relacionadas con el estiramiento C-H, otra banda distintiva se encuentra en los 1740 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo C=O (Mondragón, 2020). En el estudio realizado por Rohman y Man (2016), analizaron el espectro infrarrojo de un aceite de oliva extra virgen de marca comercial, obteniendo su perfil bioquímico (figura 7).

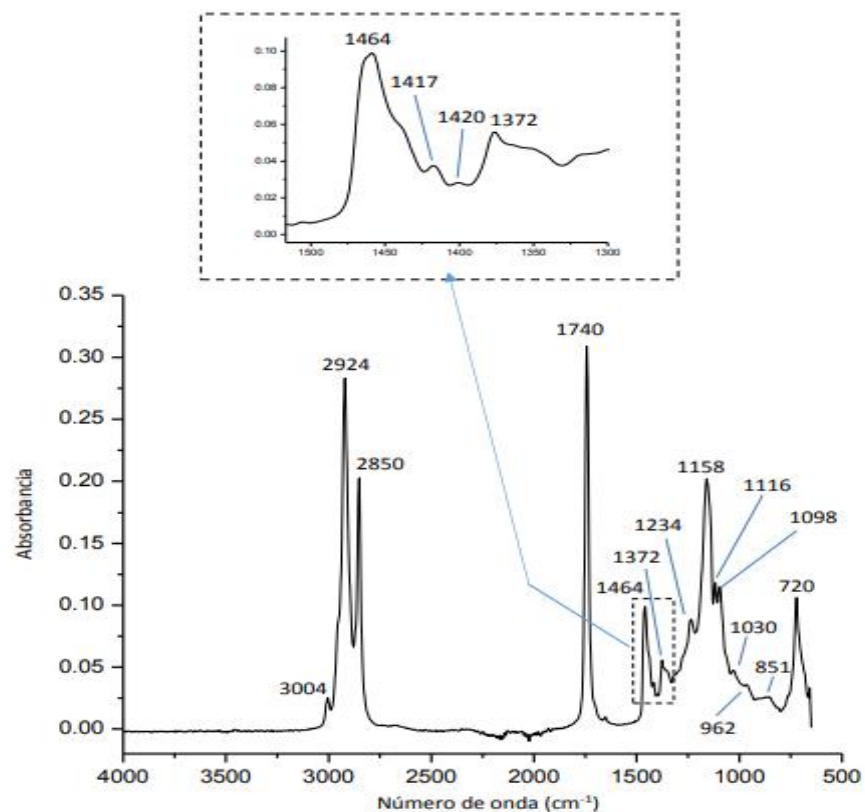


Figura 7. Espectro FTIR de una muestra de aceite comercial aceite extra virgen (Rohman & Man, 2016)

Proteínas

Las proteínas son macromoléculas formadas principalmente por α aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, su estructura química está compuesta de carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y en algunos casos fósforo. Las bandas más significativas en los espectros de alimentos ricos en proteínas son la Amida I (N-H estiramiento), esta tiene una alta intensidad alrededor de los 1653 cm^{-1} , seguida con la misma intensidad en los 1567 cm^{-1} la Amida II (N-H balanceo) y con una

intensidad más deprimida la Amida III (C-N, C=O estiramiento) en los 1364 cm^{-1} . En la figura 8 se puede observar el espectro de una muestra de proteína de soja en esta se reflejan claramente las bandas anteriormente nombradas (Mondragón, 2020). Muchos autores como Kohler et al. (2010) han reportado los diferentes modos de vibración correspondiente a lípidos, proteínas y lactosa en espectro de diferentes alimentos y muestras biológicas como se puede observar en la tabla 5.

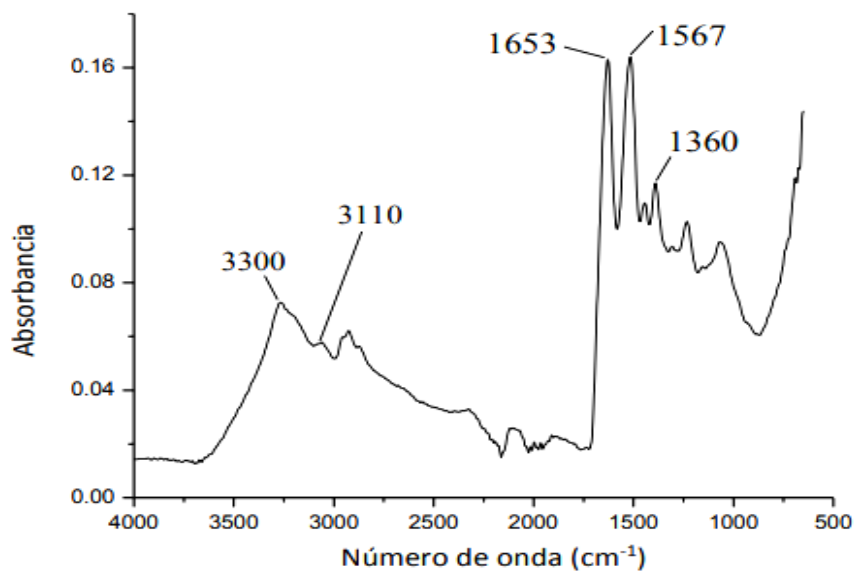


Figura 8. Espectro FTIR de una muestra de proteína de soja (Mondragón, 2020).

Tabla 5

Principales bandas reportados en muestras biológicas y alimentos

Frecuencia (cm^{-1})	Intensidad		
3008	W	=CH Estiramiento	lípidos
2959	M	CH ₃ Estiramiento asimétrico	Lípidos
2923	S	CH ₂ Estiramiento asimétrico	
2895	M	CH Parte de grupos metino	Mezcla
2873	M	CH ₃ Estiramiento simétrico	Mezcla
2852	S	CH ₂ Estiramiento simétrico	Lípidos y proteínas

1745	S	C=O Estiramiento	Lípidos y proteínas
1693-1627	s-w	Amida I	Proteínas interacción con lípidos
1467	M	OH de/ CH ₂ Tijera	Lactosa y lípidos
1440	W	CH Deformación	Proteínas
1415	M	CH Balanceo	Lípidos y lactosa
1400	W	CH Deformación	Proteínas
1379	M	CCH Balanceo	Lípidos
1342	W	CC y CO vibración del enlace	Lactosa
1319	W	CH ₂ Estiramiento fuera del plano	Proteínas
1304	W	OH Deformación	Lactosa
1240	M	Amida III/OPO Estiramiento asimétrico/CO	Mezcla
1225	W	PO ₂ Estiramiento asimétrico	Lípidos
1172	M	CO Estiramiento	Lípidos
1161-1096	M	CO Estiramiento	Mezcla
1074-1045	s-m	CO Estiramiento simétrico	Lactosa
966	W	Trans=CH Estiramiento	Lípidos
894	M	CH Deformación	Lactosa
786	M	Vibración	Lactosa
721	M	CH ₂ Tijera	Lípidos

Nota. Reproducido de “ Análisis de calidad de espectroscopia de leche. Manual de vibraciones”.I Kohler, A., Kristian, N., Jørgensen, K., Randby, A., & Martens, H. (2010). Espectroscopia 60, 6-10.

1.4 MÉTODOS PARA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE LA LECHE

Los humanos a lo largo del tiempo para satisfacer sus necesidades alimentarias han domesticado animales como las ovejas, burros, camellos, cabras, búfalos y vacas, utilizando la leche de estos animales como un alimento indispensable para su dieta. Existen una gran cantidad de productos derivados de la leche, queso, mantequilla, yogur, leche entera, leche desnatada entre otros, los cuales representan un sector

de alto poder económico. El consumo y producción de lácteos van de la mano con el nivel y calidad de vida de un país (Kohler et al., 2010). La cantidad de leche producida es determinada por algunos factores, entre estos se encuentra la alimentación de los hatos lecheros y las variables climáticas, las cuales condicionan la producción de este alimento, debido a esto es necesario un monitoreo permanente cualitativo y cuantitativo de la composición de la leche. (Andrade et al., 2019).

Los métodos gravimétricos, volumétricos y colorimétricos se caracterizan por utilizar diferentes cantidades de sustancias inorgánicas, solventes orgánicos y ácidos fuertes y además requieren un tiempo considerable para la determinación de proteínas y grasas en alimentos. El método de Kjeldahl se basa en la determinación de la cantidad de nitrógeno orgánico contenido en los alimentos, se puede resumir su metodología en dos pasos, el primero la descomposición de materia orgánica añadiendo ácido sulfúrico y temperatura, el segundo el registro de la cantidad de amoníaco en la muestra con ayuda de sulfato sódico, sulfato de cobre y ácido bórico (Acevedo & López, 2017). Otro método que se utiliza comúnmente en la determinación de proteínas es el de Biuret, se requiere sulfato de cobre, hidróxido de sodio y alcohol etílico en su metodología. Para determinar grasas el método de Giber utiliza ácido sulfúrico y centrifugación para la separación de la grasa y su posterior cuantificación, los métodos instrumentales como los cromatógrafos utilizan solventes orgánicos y equipos de alto costo (Ramírez, Vega et al., 2019). Debido a la gran cantidad de reactivos y tiempo como se mencionó anteriormente desde los años cincuenta y sesenta la espectroscopia FTIR se ha posicionado como una herramienta rápida, de bajo costo y que no utiliza reactivos para la caracterización de los componentes de la leche, incluso los productores de leche en colaboración con la AOAC desde 1980 desarrollaron la segunda generación de analizadores infrarrojos portátiles MilkoScan, el cual es utilizado para la determinación cualitativa y cuantitativa de grasas, proteínas y lactosa en leche (Vandervoort, 1980).

Además de la determinación de los componentes principales de la leche, esta técnica permite la caracterización de componentes minoritarios como la urea, glicoproteínas (lactoferrina) y microorganismos (Rosch et al., 2013). Actualmente la espectroscopia FTIR se considera una técnica que brinda una gran cantidad de información, la cual también es multicanal, dentro de muchas de sus ventajas permite el análisis intacto de la muestra (Nicolaou & Goodacre, 2018). Otra cualidad que hace esta técnica importante es su clasificación como técnica analítica verde, amigable con el medio ambiente, como se ha mencionado en múltiples ocasiones no consume solventes químicos agresivos (Mondragón, 2020).

1.5 LIOFILIZACIÓN

La historia de esta técnica comenzó hace muchos años atrás en la antigua civilización Inca, al ubicarse a 4.000 metros sobre el nivel del mar estaban en permanente contacto con las bajas temperaturas, a las cuales congelaban algunos de sus alimentos, una de las comidas favoritas de esta tribu era el chuño, esta es una patata que dejaban en la tierra y durante la noche se congelaba, en el día el hielo se evaporaba sin pasar por el estado líquido (Clau et al.,2020). Esta técnica ha sido utilizada para la conservación de microorganismos como células, virus, enzimas, vacunas, levaduras y consiste en la eliminación de solventes (agua) por medio de sublimación, el calentamiento de las muestras se da en vacío, la muestra es congelada y posteriormente sublimada, en el caso de los alimentos preserva su vida útil, sus propiedades organolépticas, mantiene la estructura fisicoquímica y no necesita cadena de refrigeración para su distribución (Ramírez, 2006). La industrialización de esta técnica surgió por la necesidad que se dio durante la segunda guerra mundial de conservar el plasma sanguíneo y algunos antibióticos (Grauer et al. 2015).

Termodinámicamente las sustancias pueden cambiar de estado por medio de la liberación o absorción de calor a temperatura constante, el punto triple en un diagrama de fases establece las condiciones de temperatura y presión a la cual se produce la sublimación, cuando el solvente de interés a retirar es el agua el punto triple establece que la presión es de 4,58 Torr y temperatura 0,008°C (Kupletskaya & Netrusov, 2011). Las etapas de la liofilización se pueden dividir en tres grandes pasos: congelado, secado primario en cual tiene lugar la sublimación, secado secundario en cual se lleva a cabo la desorción, el paso de congelación se puede describir en varias etapas, en primer lugar, son generados los núcleos de cristalización, estos son productos de subenfriamiento que se da al bajar la temperatura, posteriormente la temperatura aumenta hasta alcanzar el equilibrio. El último paso es el desprendimiento de los cristales de hielo puro, este desprendimiento se da a una temperatura que se denomina eutéctica, por debajo de esta temperatura existe el equilibrio entre el hielo y el soluto puro, en la tabla 6 se puede apreciar como sucede el proceso de congelación en los alimentos, seguidamente se describirán los pasos finales del proceso, la desecación primaria y desecación secundaria (Grauer et al., 2015).

Tabla 6

velocidad de congelamiento en los alimentos en el proceso de liofilización

Congelación rápida

Congelación lenta

La temperatura de los alimentos desciende aproximadamente unos 20°C en 30 minutos.	La temperatura deseada se alcanza en 3 a 72 horas (aparatos domésticos de congelación).
Cristales pequeños.	Cristales grandes. En su formación causan ruptura de la membrana o pared celular y estructuras internas.
Al rehidratarse conservan textura y sabor original.	Al hidratarse presentan textura y sabor diferente al original.
Apariencia clara del producto seco.	Apariencia oscura del producto seco.
Se aplica en alimentos sólidos, ya que evita la ruptura de la membrana o pared celular y estructuras internas.	Se aplica en líquidos, ya que la formación de cristales grandes favorece la presencia de canales para el movimiento del vapor de agua.

Nota. Reproducido de "Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos Grauer, A., Grunberg , K., & Zardo, S. (2015). Ciencia Universidad ORT Uruguay 22.

1.5.1 Secado primario

Como se había mencionado anteriormente, en el punto triple los tres estados del agua coexisten (líquido, vapor y sólido), en este punto se puede evidenciar que a presiones por debajo de la atmosférica el hielo puede pasar a vapor sin pasar por líquido (punto triple figura 14). En el secado primario el agua abandona la muestra en las condiciones anteriormente nombradas de presión las cuales son inferiores a la presión de vapor del agua. Es importante durante el secado primario el control de la temperatura que establece el equipo, dicha temperatura debe ser alta, hasta el punto donde no vaya a pasar al punto de fundición de la muestra, esto evita la pérdida de estructura de esta (Ramírez, 2006).

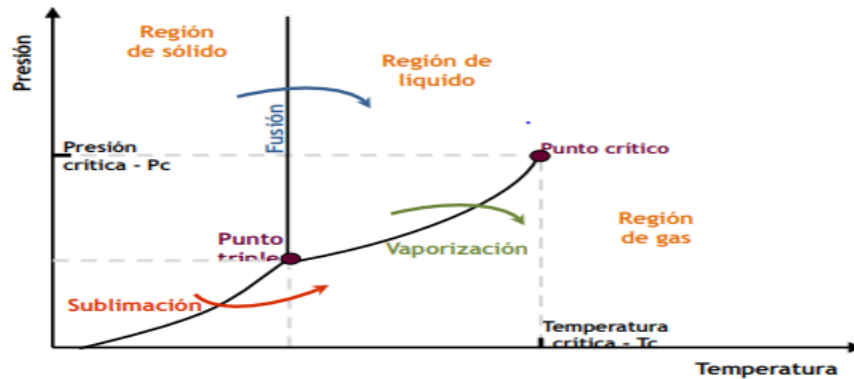


Figura 14. Diagrama de fase mostrando el punto triple para el agua (Ramírez, 2006).

1.5.2 Antecedentes del uso de la liofilización

Salcedo et al. (2016) compararon la liofilización con la congelación a -80°C , buscando identificar cual es la mejor técnica para el correcto almacenamiento de la leche materna en los bancos de este alimento. Las mujeres donan su leche para los infantes que por diferentes razones no la pueden recibir de su madre, en este estudio evaluaron el contenido nutricional (grasas, proteínas y lactosa) y la actividad bacteriana en 125 muestras de leche obtenidas de mujeres sanas (Banco de Leche Humana de La Fe, Valencia España). El procedimiento analítico lo ejecutaron con un equipo Miris, Sweden, con su respectivo protocolo, como conclusión describen la liofilización como la mejor técnica para el almacenamiento de la leche materna, esta no disminuye el contenido nutricional ni la actividad bacteriana, además no aumenta el contenido microbiano nocivo. Por otra parte en el estudio de Ibrahim y Khalifa (2015), analizaron los efectos de la liofilización sobre las propiedades nutricionales de la leche de camello comparando con leche fresca de esta misma especie. Los autores liofilizaron 25 muestras y determinaron proteínas, ácidos grasos y azúcares por cromatografía de gases, siguiendo el protocolo establecido por la AOAC 969.33, tanto para la leche seca como para la leche recién extraída, dentro de los resultados estos investigadores encontraron que el contenido nutricional de la leche no disminuyó por el contrario se encontró mayor contenido de proteínas y grasas en la leche liofilizada que el reportado por la leche líquida. Las investigaciones anteriormente nombradas ponen en evidencia que el congelado y calentamiento suave, realizado durante la liofilización no desnaturalizan las proteínas, ni afecta los ácidos grasos presentes en la leche por lo tanto se puede considerar una técnica inocua para el secado de este alimento.

1.6 QUIMIOMETRÍA

1.6.1 Espectroscopia de derivada

El solapamiento de bandas espectrales es muy común en la espectroscopía infrarroja, además de dificultar, imposibilita la identificación de grupos funcionales, esta problemática se puede resolver modelando la señal experimental a través de funciones teóricas, las primeras ideas sobre esto surgieron en 1953, cuando algunos investigadores acuñaron la derivada de los espectros como una técnica que le permitía determinar los cambios de los espectros y magnificar la estructuras de las curvas (Moros Portolés , 2007).

La derivada tiene el gran beneficio de poder encontrar la pendiente de una curva determinada en cualquier punto de esta, se presenta como una constante cuando no hay cambios en la curva, la derivada es pequeña cuando la curva es plana, cuando se tiene un cambio acelerado la derivada es grande. Dependiendo si este cambio es creciente o decreciente la derivada puede ser positiva o negativa. La derivada como operación matemática calcula los cambios que sufre una variable cuando otra variable relacionada es sometida a diferentes cambios. En la espectroscopia de derivadas se mide la razón de cambio del espectro, que es la misma pendiente de la absorbancia con una longitud de onda (Amazon et al., 2016).

En un espectro de absorción como el que se muestra en la figura 9, existen máximos de absorción, al aplicar la derivada a cada punto de esta gráfica podemos calcular el cambio de absorción en cada uno de ellos (ΔA) en pequeños intervalos de longitud de onda (λ), al representar en una gráfica la relación de diferencial de cambio de la absorbancia con el diferencial de cambio de la longitud de onda ($\Delta A/\Delta \lambda$) frente a la longitud de onda se obtiene el gráfico de la primera derivada, al realizarle el proceso anteriormente nombrado a la gráfica de la primera derivada, al tomar el diferencial de absorbancia de la derivada $\Delta (\Delta A/\Delta \lambda)/\Delta \lambda$ se obtiene la segunda derivada de la curva ($\Delta^2 A/\Delta \lambda^2$) (Amazon et al., 2016).

Al observar la gráfica se pueden establecer las principales características como: el punto máximo de absorción que está presente en la curva representa en cada una de las derivadas un diferencial distinto, en la primera derivada corresponde a un punto de anulación, en la segunda derivada corresponde a un punto máximo, al establecer los máximos y los mínimos de las gráficas se puede recordar que estos corresponden a puntos de inflexión donde la derivada puede cambiar de positiva a negativa, al analizar las gráficas también se pueden detallar algunos tramos donde la absorción es constante, estos puntos se conocen como meseta, en estas mesetas la derivada es cero tanto en la de orden primero como en la de segundo orden, otra característica que se da de la espectroscopia de derivada está asociada a la ley de Beer, partiendo del hipotético que esta se cumple, la relación entre concentración absorción también se cumple en la derivada (Castano, 1991).

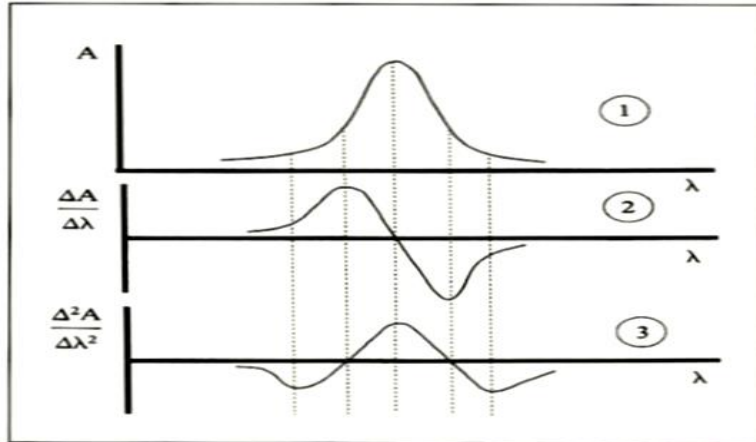


Figura 9: (1) Espectro de absorción normal, orden cero, (2) primera derivada, segunda derivada (3) (Castano, 1991).

1.6.2 Corrección de línea base

Existen fuentes de variabilidad de alta y de baja frecuencia en una señal medida, dentro de las de alta frecuencia se puede encontrar el ruido. En las de baja frecuencia están las variaciones de línea base estas no tienen ninguna relación con las propiedades de interés (Macho, 2012). Los factores que afectan las variaciones de líneas base los cuales pueden ir desde la forma en que se preparó la muestra, el tipo de accesorio utilizado hasta la estabilidad térmica de la muestra, todos estos factores son los culpables que la línea base se desplace y se incline. Las herramientas con la cual se disponen para corregir la línea base son amplias, todas ellas se caracterizan por utilizar un método matemático distinto a continuación se describe las más utilizadas (Moros, 2007).

1.6.3 Línea base entre dos puntos

Como su nombre lo indica en este tipo de corrección se traza una línea entre dos puntos, al igual que el método anterior, el software resta la contribución de la señal del espectro según la línea base establecida, de este modo se establece la medida corregida (Moros, 2007).

1.6.4 Suavizado espectral (Smooth)

El ruido que se presenta en las gráficas espectrales es muy molesto para la interpretación e identificación de bandas, este puede ser reducido utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay, esta reducción del ruido se designa como suavizado, al aplicarlo este tiene un efecto de maquillaje en los espectros además de reducir el

ruido puede distorsionar la intensidad de las señales, en la figura 10 se puede apreciar un ejemplo de este procedimiento (Macho, 2012).

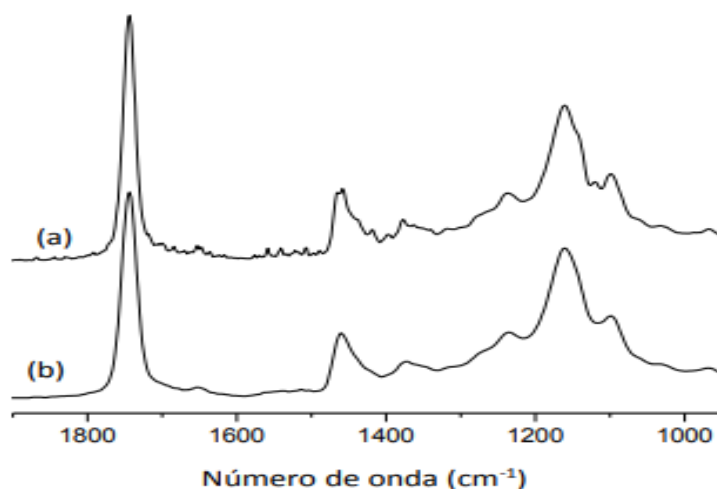


Figura 10. Suavizado de espectro FTIR, (a) espectro original, (b) espectro suavizado (Macho, 2012).

1.6.5 Factores que afectan la calidad de los espectros

El agua representa una de las principales interferencias en la identificación de grupos funcionales y bandas características en un espectro FTIR, este solvente provoca el solapamiento de bandas, la distorsión en la forma y la baja intensidad de estas. En la figura 11 se muestra dos espectros de la sacarosa en polvo fino (b) y en solución acuosa (a), en el espectro de la muestra sólida se pueden visualizar mayor cantidad de bandas características de las sacarosa y además con mayor intensidad en la región de huella dactilar, en el caso de la matriz líquida se pueden observar las bandas asociadas con la interacción de puentes de hidrógeno provenientes del agua, en contraste con la muestra sólida en la región de huella dactilar el número y la intensidad de bandas disminuye por la presencia del agua (Bureau et al., 2019).

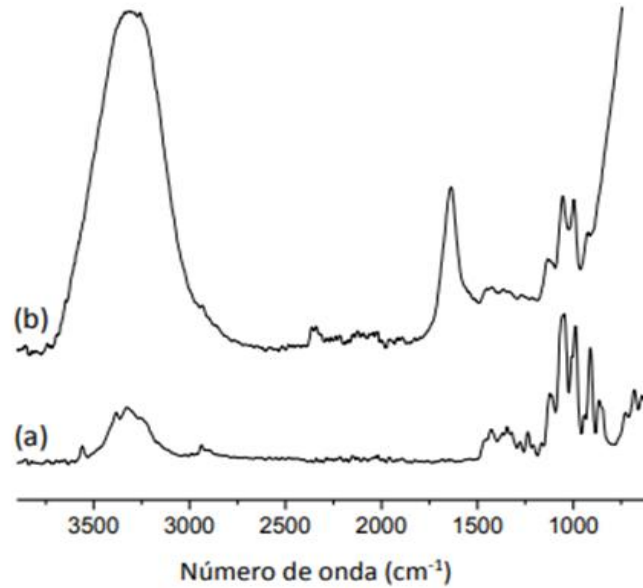


Figura 11. Espectros de FTIR de muestras de sacarosa, (a) en forma de polvo fino y (b) en solución acuosa (Bureau et al., 2019).

El problema de interferencia de bandas del solvente o algún componente indeseado en el espectro, es solucionado mediante la técnica de sustracción de espectros. El método se basa en la extracción de la señal que provoca la interferencia del espectro original, el resultado de es un espectro FTIR con la señal sustraída como se puede apreciar en la figura 12 (Mondragón, 2020).

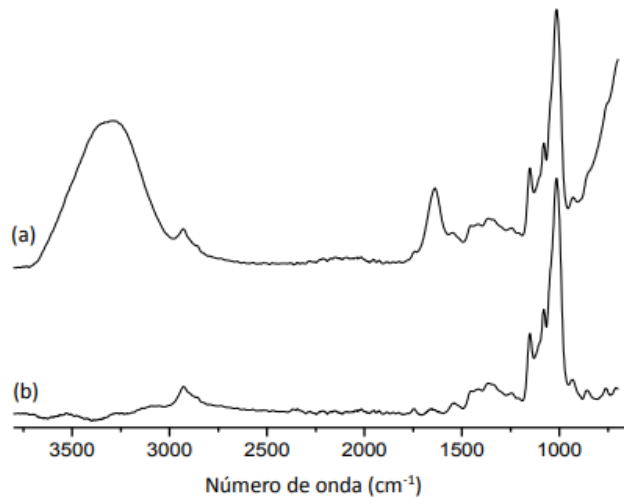


Figura 12. Eliminación de bandas de interferencias en un espectro FTIR (Mondragón, 2020).

La resolución y diferenciación de bandas al comparar dos espectros infrarrojos es importante en la identificación de una matriz. El método utilizado para mejorar la resolución de un espectro FTIR, es la utilización de la primera y segunda derivada,

la primera derivada provoca un incremento en cada una de las bandas del espectro como se muestra en la figura 13, la segunda derivada genera para cada punto de inflexión del espectro una banda negativa (figura 13 c), de esta manera se pueden visualizar mejor los espectros complejos, mejoran su diferenciación e identificación cualitativa y cuantitativa (Mondragón, 2020).

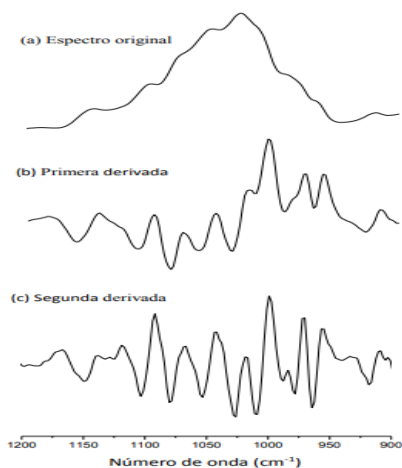


Figura 13. Efecto del ajuste en un espectro original (a) de FTIR utilizando el método de la primera derivada (b) y el de la segunda derivada (c). (Mondragón, 2020)

1.6.6 Análisis en componentes principales (PCA)

Dentro de las ventajas que tienen las técnicas espectroscópicas es brindar una gran cantidad de datos en un intervalo de tiempo y espacio corto, la problemática de esta ventaja se presenta cuando gran parte de esta información no es de interés para los investigadores (Moros, 2007). A lo largo del tiempo la quimiometría ha buscado mediante el desarrollo de métodos matemáticos reducir la cantidad de datos generados por las técnicas espectroscópicas, de esta manera la información se concentrará en las variables de interés, uno de los métodos más utilizados para llevar a cabo el procedimiento anterior es Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual está definido como un método estadístico que busca reducir la extensión de variables perdiendo la menor cantidad de datos posibles (Macho, 2012).

Debido a su capacidad para comprimir datos, el análisis de componentes principales (PCA) es uno de los métodos más comunes utilizados en el análisis de la información. Cuando se aplica la reducción de variables a datos espectrales infrarrojos, el conjunto original de estas variables se reemplaza por un nuevo conjunto de variables llamadas Componentes Principales (CP) (Castano, 1991). Este nuevo conjunto tiene como característica principal la ortogonalidad, sin

embargo se reconstruye fácilmente a partir de la combinación lineal de las variables originales (espectros). Por lo anterior el nuevo conjunto de variables (PC) suele concentrar la mayor parte de la información (varianza) en unas pocas variables, disminuyendo así la dimensionalidad de los datos, sin pérdida significativa de información química. Para obtener los CP se utiliza la técnica de descomposición en un valor singular, el primer componente principal (CP1) se define en dirección de mayor varianza del conjunto de datos originales. Los demás componentes principales se definen de forma descendente en cuanto a variación, pero estos siempre serán ortogonales a CP1 y entre sí. Por ejemplo, un sistema que se reduce a 3 CP (CP1, CP2 y CP3) es similar al sistema de coordenadas cartesianas, en el que todos los ejes son linealmente independientes, es decir, ortogonales entre sí (Moros, 2007).

El poder de la espectroscopia FTIR en combinación con métodos estadísticos multivariados se ha demostrado en la literatura, por ejemplo, FTIR y el análisis de componentes principales (PCA) son adecuados para discriminación de especies de plantas (Abdulrahman et al., 2018), para determinar adulterantes en productos lácteos (Silva et al., 2020) y en la determinación de la adulteración de aceite de oliva con aceites de menor costo como el de palma (Rohman y Man, 2016). Nicolaou et al. (2010) utilizó la espectroscopia FTIR con análisis de componentes principales (PCA) para la detección y cuantificación de leche de diferentes especies.

1.7 METALES PESADOS

Las actividades antropogénicas producto del desarrollo industrial, son las responsables del aumento de los metales en el medio ambiente, la acumulación de metales se ha estimado de 100 a 1000 veces más alta con relación a la que se encuentra en la corteza terrestre (Moscoso, 2003). La contaminación ambiental es una de las problemáticas de mayor interés en el siglo XXI, las mayores afectaciones se ven en recursos indispensables para el ser humano, algunos ejemplos son la pérdida de la calidad del aire, el quebranto de recursos hídricos y suelos disponibles para actividades agrícolas, en el caso de estos últimos los contaminantes que son de mayor interés son los metales pesados debido al riesgo que representan para la salud de animales y humanos (Reyes et al., 2016). Un metal pesado se define como “elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones incluso muy bajas” (Prieto et al., 2009), lo que convierte a estos elementos en peligrosos es que no pueden ser degradados por ningún proceso biológico, al contrario de degradarse estos tienden a acumularse en sistemas vivos, se ha identificado un grupo principal de metales pesados que son los causantes de los mayores problemas ambientales, los cuales

son: el plomo (Pb), el cadmio (Cd) y el talio (Tl), así como el cobre (Cu), arsénico (As) y cromo (Cr).

Algunos metales se encuentran en el cuerpo humano realizando diversas funciones, estos también son catalogados como minerales, los metales pueden ser clasificados en dos categorías, en esenciales para la dieta humana y no esenciales, dentro de los esenciales encontramos el cobre, zinc, sodio y manganeso (Lastre et al., 2019). El cobre participa en la síntesis de proteínas que son esenciales para el cerebro, en el sistema inmunológico ayuda la cicatrización a nivel dérmico además actúa como agente anti inflamatorio (Castro et al., 2018), en el caso del zinc es uno de los elementos con mayor proporción en el cuerpo humano, la cantidad máxima en el organismo de un adulto es de 2,5 g, este elemento cumple múltiples funciones fisiológicas dentro de las que encontramos, crecimiento celular, maduración sexual, fertilidad, mantenimiento de función ocular entre otros. Entre los alimentos más ricos en cobre y zinc se hallan el pescado de mar, carnes rojas, la leche y sus diferentes productos lácteos derivados. Para la leche el Codex Alimentarius establece que los niveles máximos permitidos de cobre y zinc son 0,5 y 5mg/Kg respectivamente (Rodríguez et al., 2017).

Los metales no esenciales suelen denominarse microminerales, entre estos se encuentran el mercurio, cadmio y plomo. El plomo es un metal pesado, tiene la capacidad de magnificarse a lo largo de la cadena alimenticia, debido a su facilidad de bioacumulación en plantas y animales, la industria demanda altamente el plomo para la elaboración de diversidad de productos, como lo son fabricación de pigmentos, pilas eléctricas, recubrimientos, cobertura de cables, soldadura, elaboración de cerámicas, las empresas están obligadas a cumplir con las normas que establece el límite de exposición laboral $0.15\text{mg}/\text{m}^3$, la diversidad de formas que puede llegar el plomo a los alimentos se da por los usos anteriormente nombrados, pero se han identificado dos fuentes principales, la primera es debido a la cercanía de las zonas agrícolas con las grandes autopistas o zonas industriales, la segunda se debe a la facilidad del plomo de disolverse en solventes orgánicos (Rubio et al., 2016). La Unión Europea fue la primera en establecer las condiciones técnico sanitarias para muchos alimentos estableciendo los niveles de plomo permitidos, para el caso de la leche este se encuentra en 0,2 mg/kg (González, 2019).

El mercurio es un metal que en muchos casos se encuentra en forma de sales inorgánicas, su presencia en el medio ambiente se puede dar debido a las manifestaciones naturales o por actividades industriales como la minería, la ingesta elevada de este metal en la alimentación ocasiona daños en el hígado, en los riñones y en cerebro que son donde más se acumula, el pescado es una de las principales fuente de mercurio en la dieta humana, debido a esto muchos estudios realizados a comunidades que basan su dieta en pescados han encontrados niveles altos de este metal que pueden sobrepasar lo recomendados (Mata et al., 2016). La FAO y el Codex Alimentarius establecen para la leche que el nivel máximo de

mercurio es de 0,50 mg/Kg (González, 2019), por su parte el cadmio es un metal pesado que está distribuido principalmente por actividades mineras de otros elementos, esto se da debido a que se encuentra asociado a otros elementos, al igual que los metales anteriormente nombrados este también puede ser acumulado por los seres vivos, la intoxicación con este elemento causó una grave tragedia en una comunidad japonesa en el año 1960, un cultivo de arroz cercano a una mina fue contaminado, la población durante años consumió este alimento contaminado, esto causó múltiples daños en la salud de esta población, unos de los más graves fue el deterioro de la función renal y osteomalacia (Pernía et al.2015), para este metal los niveles permitidos en leche son 0,01 mg/Kg (González, 2019).

1.7.1 Antecedentes de estudio de metales pesados en Colombia (En fuentes hídricas y en hatos lecheros)

En Colombia los estudios relacionados con la presencia y contaminación de metales pesados en alimentos y fuentes hídricas son muy poco, Reyes et al, (2016) exponen los estudios realizados alrededor de la cuenca del río Bogotá, por su amplitud alrededor de la sabana de Bogotá este río se divide en tres grandes zonas: la cuenca alta, que delimita el páramo de Guacheneque y termina en el municipio de Chía, en este mismo municipio comienza la cuenca media hasta Sibatè, para finalizar la cuenca baja la cual llega a su fin en la desembocadura del río Magdalena. Alrededor de estas cuencas se realizan distintas actividades agropecuarias las cuales aportan contaminación por metales pesados. A continuación, se describe los datos encontrados en cada una de estas limitaciones.

Cuenca alta

En los municipios aledaños a esta zona se practican actividades mineras de manera ilícita en zonas consideradas como humedales, la extracción de oro y otros minerales producen aguas residuales, las cuales son depositadas sin ningún tratamiento a esta zona del río Bogotá, mediciones realizadas en esta parte de la fuente hídrica han evidenciado altas cantidades Hg (0,067mg/L), Cd (0,1m/L) y Pb (0,35mg/L) (Reyes et al., 2016).

Cuenca media

En la altura del corredor Villapinzón-Chocontá, se encuentran ubicadas fabricas dedicadas al tratamiento de las pieles de animales para convertirlas en cuero, para esta industria se requieren insumos como sulfato de sodio, cal, sulfato de amonio, ácido fórmico, cromo en polvo, ácido sulfúrico entre otros. Estudios de salud pública han determinado la concentración de arsénico en distintas zonas cercanas. En el Humedal Jaboque, Parque la Florida y Cota se registraron niveles de concentración de: 0,66, 0,43, 0,42 µg/L de As respectivamente. En esto estudios se manifiesta

como la población se encuentra expuesta a la contaminación de los alimentos que son distribuidos en distintas plazas de mercado de la ciudad. Lo anterior se da porque los campesinos utilizan el agua del río Bogotá para el riego de cultivos de hortalizas como repollo, lechuga y Brócoli (Reyes et al., 2016).

Cuenca baja

Las condiciones climáticas de este sector de la sabana de Bogotá favorecen el crecimiento del cultivo de cebolla junca, incluso tiene la ventaja de obtenerse varias cosechas al año en este territorio. Estas siembras se encuentran ubicadas en municipios aledaños a esta zona como Mosquera, la problemática alrededor de estos son los usos excesivo de plaguicidas y abonos orgánicos. Se han encontrado en el suelo y en fuentes hídricas que se unen con el río Bogotá la presencia de metales pesados en altas concentraciones: Hg (3µg/L) y Pb (9µg/L) (Reyes et al., 2016).

1.7.2 Metales pesados en leche

En el departamento de Antioquia se produce el 70% de la leche del país, con una producción de 3,5 millones de litro/día, esta gran producción posiciona a este territorio como la cuenca lechera más importante de la nación (González et al. 2019). Debido a esta gran industria, los productores buscan mejorar la calidad de sus productos y acogerse a las normas del Codex Alimentarius, mediante estudios que evalúan la adecuada inocuidad y trazabilidad de la leche, como el realizado por Londoño (2012) donde se analizaron la presencia de metales pesados en muestras de leches de diferentes fincas ubicadas en los municipios de San Pedro y Entreríos, en esta investigación recolectaron 50 muestras de leche cruda recién ordeñadas en 10 fincas, en los meses de abril y marzo del 2010, el análisis de muestras lo realizaron por espectrometría de absorción atómica, para el análisis estadístico utilizaron estadística descriptiva y correcciones de Spearman con un nivel de significancia $p < 0,05$, entre los resultados encontraron altos niveles de: As, Pb, Cu y Hg incluso por encima de los recomendados por el Codex Alimentarius 2,922ppm, 0,85ppm, 0,513ppm, 0,164ppm respectivamente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar espectroscópicamente la leche de diferentes especies de mamíferos proveniente de la granja experimental villa marina de la universidad de pamplona.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer el perfil bioquímico de las muestras de leche provenientes de ovino, caprino, bufalino y compararlos con el de bovino, utilizando espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.
- Determinar la presencia de metales pesados (Arsénico, plomo, cadmio, cobre y mercurio) en muestras de leche de distintas especies mediante espectroscopia de absorción atómica.
- Evaluar si existe correlación entre las leches provenientes de diferentes especies, mediante el análisis de componentes principales PCA.

3. METODOLOGÍA

3.1 Muestreo

Para el procedimiento de muestreo se siguió la metodología de Londoño (2012), se recogieron dos muestras de leches de cuatro especies diferentes en la granja experimental Villa marina (figura 15), ubicada en fracción de la vereda Matagira, jurisdicción del municipio de Pamplonita (kilómetro 49 sobre la vía Pamplona-Cúcuta), estas muestras corresponden a mamíferos de las siguientes especies: bovino (raza Girolando, 2 muestras), ovino (raza Dorper, 2 muestras), caprino (raza saanen, 2 muestras) y bufalino (raza Murrah, 2 muestras). Se tomaron 50 ml de leche de cada especie, las muestras fueron almacenadas en recipientes plásticos previamente rotulados, posteriormente se depositaron en una nevera portátil, por último, se trasladaron al laboratorio de Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona

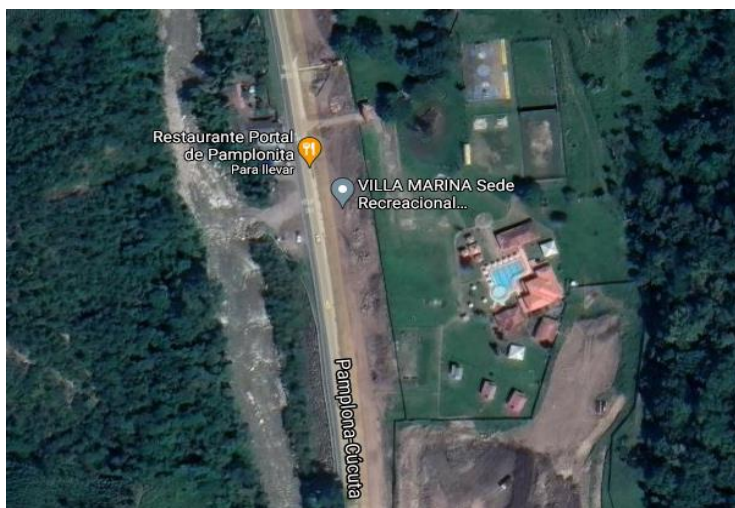


Figura 15. Imagen de la zona de influencia de la finca Villa Marina. (Cortesía de Google Maps).

3.2 Secado de la muestra

El secado de la muestra comenzó pesando 2ml de leche de cada tipo en un envase de polipropileno, este proceso se llevó a cabo por duplicado para cada una de las leches de cada especie como se visualiza en la figura 16. Posteriormente se trasladaron las muestras al equipo de liofilización, este proceso se realizó en un liofilizador LABCONO modelo 74000 series, el cual se encuentra en el laboratorio de maestría en ciencia y tecnología de alimentos de la Universidad de Pamplona. Las muestras se ubicaron en la parte central del equipo, los parámetros del proceso

incluyeron una primera rampa de enfriamiento a -30°C durante cuatro horas, seguido por una segunda rampa a -20°C durante cuatro horas más y una tercera rampa a -10°C por el mismo tiempo, finalmente la temperatura se llevó a 0°C , posteriormente se procedió a retirar las muestras del equipo. Por último, se registró el peso de las muestras secas.



Figura 16. Muestras de leche de vaca, búfala, cabra y oveja para ser liofilizadas (fuente el autor).

3.3 Toma y análisis de espectros FTIR

Los espectros de las leches se realizaron en el Laboratorio de Biocalorimetría de la Universidad de Pamplona, aplicando la técnica de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) acoplada con reflectancia total atenuada (ATR).

Las mediciones por espectroscopia ATR-FTIR se realizó en un espectrofotómetro FTIR marca SHIMADZU modelo IR Prestige-21, provisto de un detector DLATGS (Deuterated L-Alanine Doped Triglycene Sulphate) y equipado con un accesorio ATR modelo MIRacle, marca Pike Technologies, con cristal de diamante. Los espectros se obtuvieron en la región del infrarrojo medio, con un barrido de 4000 cm^{-1} hasta 600 cm^{-1} , a una resolución de 4 cm^{-1} y 48 scans. El espectro de cada leche se analizó por duplicado de manera independiente. La adquisición de los datos se desarrolló utilizando el software del equipo, IR Solution 2002. El análisis de los espectros se llevó a cabo utilizando el programa OriginPro 2018, donde se efectuó un pretratamiento de los datos, primero se aplicó un suavizado de 5 puntos, seguidamente se le administró corrección de línea base (La corrección de línea base se realizó por el menor valor) y por último un normalizado, además se obtuvieron los espectros de primera y segunda derivada.

3.4 Determinación del porcentaje relativo de proteínas, grasas y carbohidratos.

Para la obtención del porcentaje relativo de estas biomoléculas, primero se obtuvieron las gráficas de los espectros FTIR superpuestos de orden cero como se

muestra en la figura 17, posteriormente se identificaron las bandas relacionadas con las proteína, grasas y carbohidratos, seguidamente se obtuvieron los espectros de primera y segunda derivada con fin de reconocer las diferencias en intensidad en cada pico (figura 18 y 19). Se tomó como referencia las regiones integradas por las Nicolaou et al. (2010) cuando trabajaban en la detección y cuantificación de los componentes de la leche de diferentes especies por FTIR. En el caso de las proteínas se integró la región espectral $1708-1593\text{ cm}^{-1}$, para las grasa la zona espectral integrada fue la de $2945-2897\text{ cm}^{-1}$. Por último, se integró de $1122-926\text{ cm}^{-1}$ para los carbohidratos. Lo anteriormente descrito se efectuó con el propósito de realizar una comparación entre los porcentajes de áreas relativos de las bandas características de biomoléculas (proteínas, carbohidratos y lípidos), tomando como referencias los porcentajes de áreas relativos encontrados para la leche vacuna y contrastándolos con el de las otras especies estudiadas.

En la figura 20,21 y 22 se encuentra cada una de estas bandas integradas para la leche de búfala. Para el método de integración se trazo una línea recta entre dos puntos seleccionados (comienzo y final de la banda seleccionada), con lo cual se garantiza que solo se integra el are de interés.

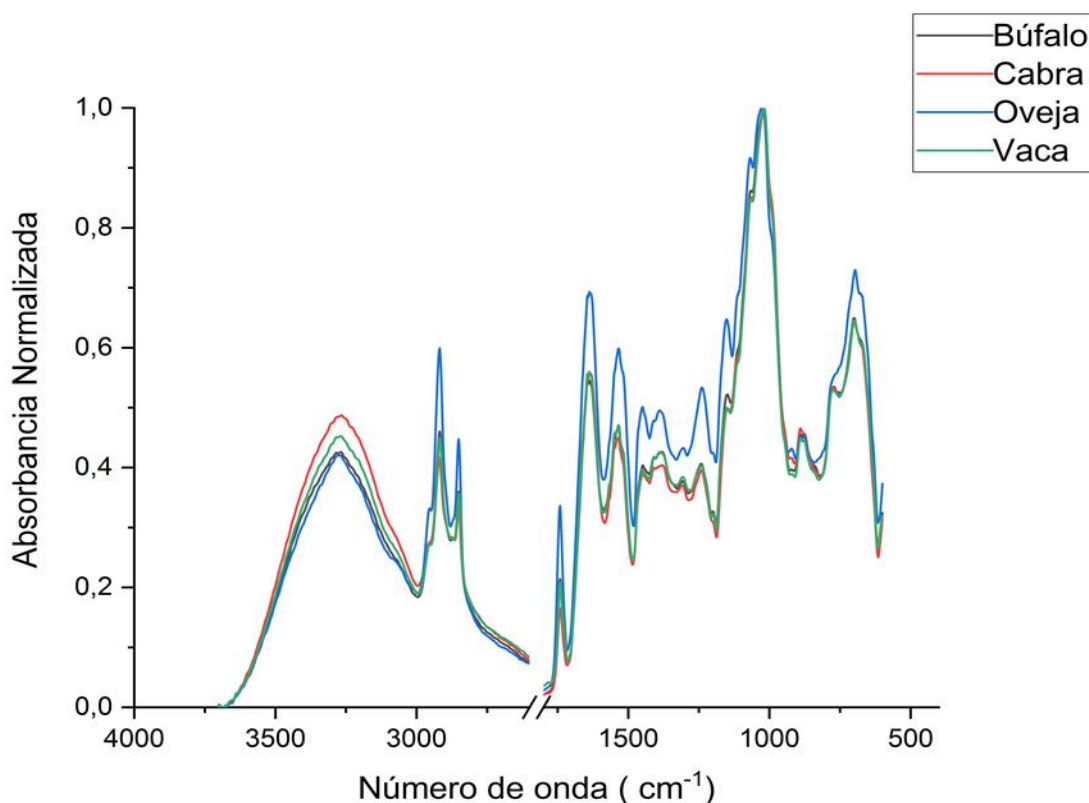


Figura 17. Espectros obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna (fuente el autor).

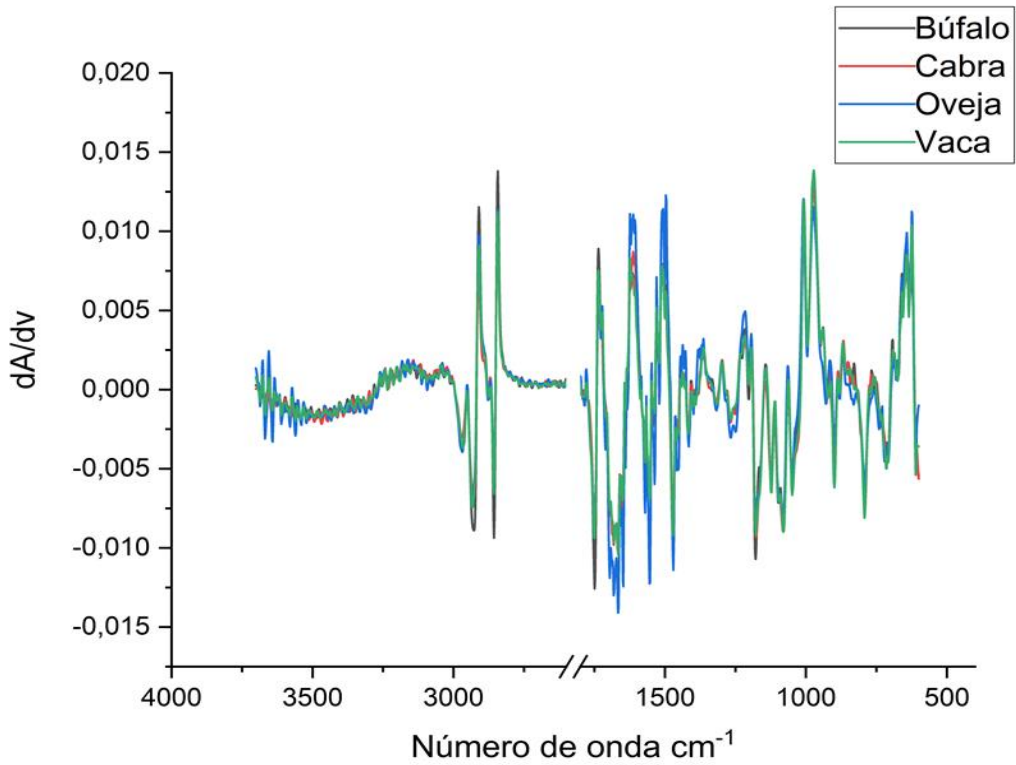


Figura 18. Espectros de primera derivada obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna en la región espectral de los 4000-400 cm^{-1} (fuente el autor).

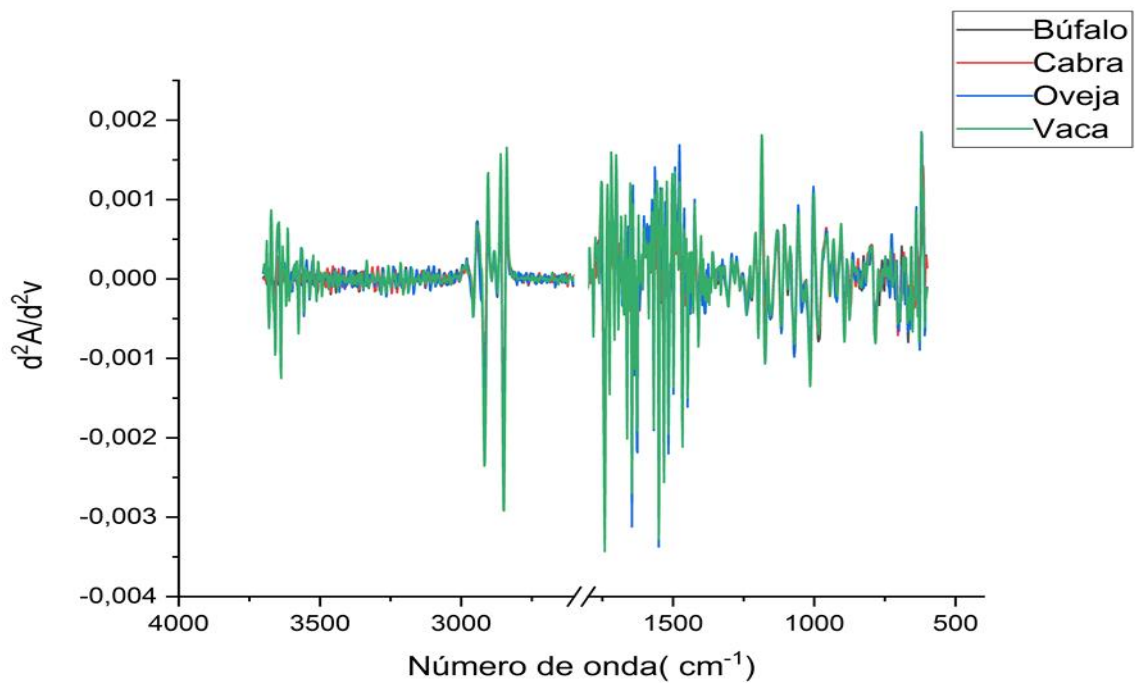


Figura 19. Espectros de segunda derivada obtenidos por FTIR-ATR de leche bufalina, caprina, ovina y vacuna en la región espectral de los 4000-400 cm^{-1} (fuente el autor).

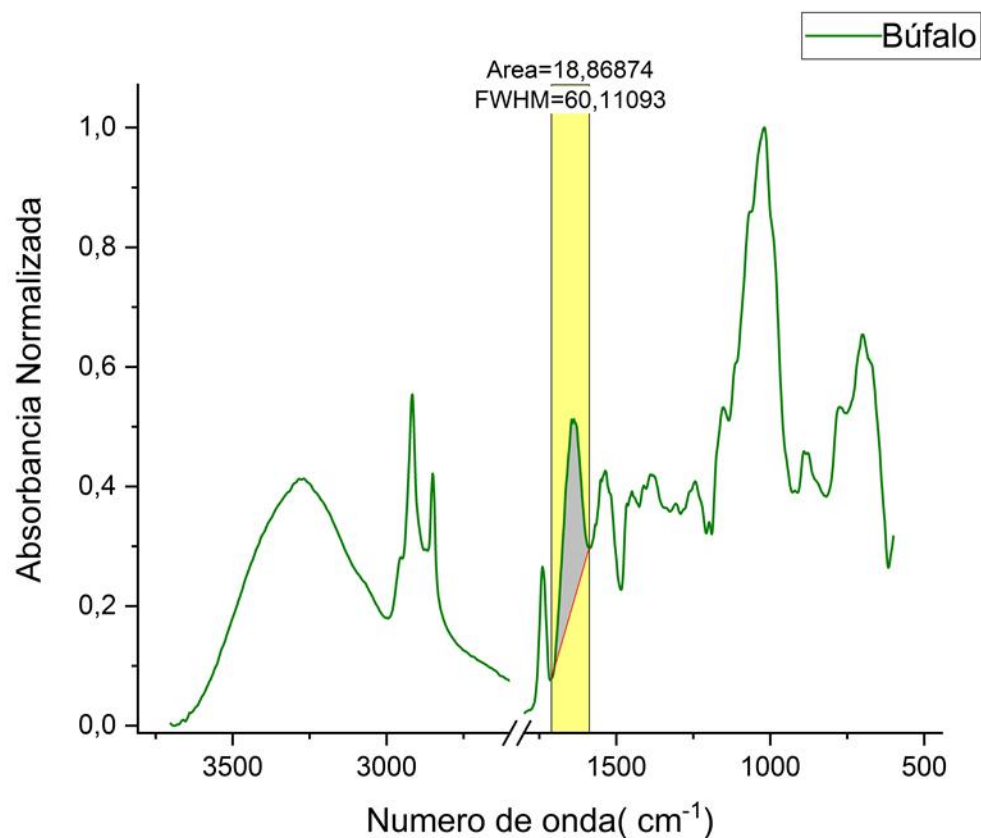


Figura 20. Integración de bandas para determinar el porcentaje de área relativo de proteínas en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala. (Fuente el autor).

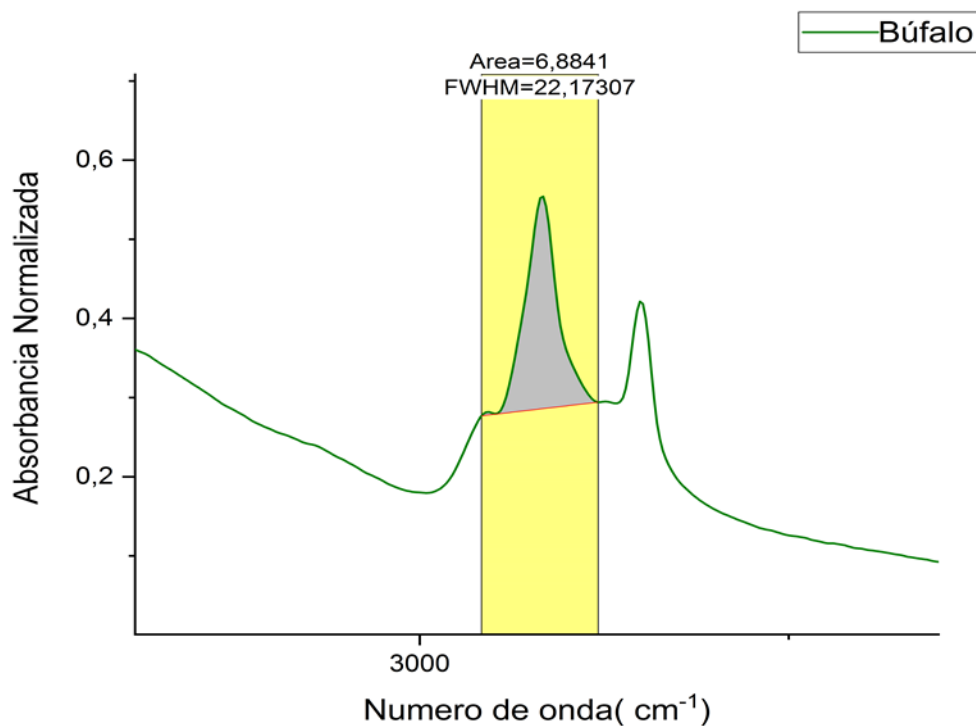


Figura 21. Integración de bandas para determinar el porcentaje de área relativo de lípidos en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala (fuente el autor).

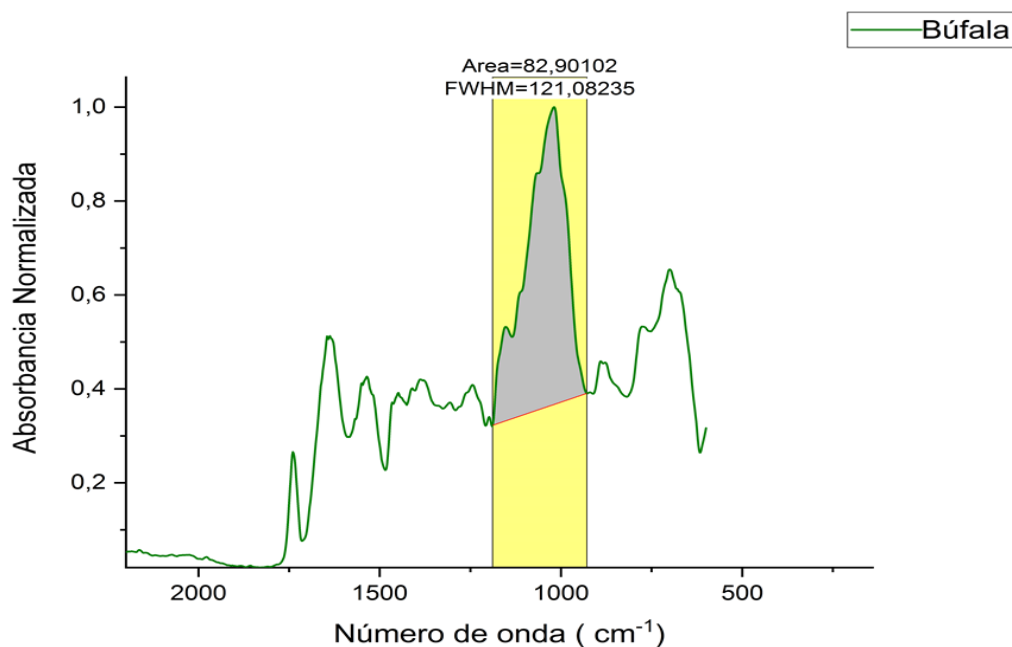


Figura 22. Integración de bandas para determinar el porcentaje de área relativo de carbohidratos en el espectro FTIR-ATR de la leche de búfala (fuente el autor).

3.5 Análisis quimiométrico

Los datos de los espectros obtenidos por FTIR, en la región de huella dactilar se utilizaron para la construcción de las matrices de datos de orden cero, primera y segunda derivada, seguidamente se combinaron estas matrices con métodos multivariados adecuados, como el análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados. El análisis de componentes principales se realizó utilizando el software Biovinci 2020, con el fin de buscar relaciones entre la composición y las leches provenientes de diferentes especies de mamíferos. Para finalizar el análisis de conglomerados se ejecutó en el programa minitab 2020.

3.6 Análisis de metales pesados por absorción atómica

Preparación de la muestra.

Se tomó 1 gramo de leche seca (lío-filizada), posteriormente se mezcló con 50mL de la mezcla (65% de HNO₃ y 35% de H₂O₂ concentradas), posteriormente se sometió a tratamiento térmico en un microondas a 750watts por 10 minutos en una trampa de Dean Stark, logrando la total disolución de la muestra, luego se realizó un ajuste de pH a 4 con hidróxido de amonio. De la solución inicial se emplearon 10mL y se aforaron a 50mL.

Para la generación de hidruros en las muestras para los metales As y Hg se partió de 1 gramo de la muestra la cual se sometió a digestión con 50mL de la mezcla 70% de HCl concentrado y 30% H₂O₂ concentrado, a la mezcla se le realizó una digestión por microondas a 750watt por 10min en una trampa Dean Stark, luego a la solución obtenida se le ajustó el pH a 3,5 con NH₃ y se aforó a 100mL. Después con muestras de 10mL se trataron con una solución de Borohidruro de sodio al 4%p/p disuelto en NaOH 0,1M hasta ajustar 15mL, la trampa de generación empleada fue sistema de generación de cubeta media.

Equipo

Espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER PinAAcle 900Z, evaporando las muestras a 90°C, con horno de grafito (1600 a 2300°C para la atomización), lámpara de cátodo hueco con filamento de wolframio. En la tabla 7 se muestran las longitudes de ondas utilizadas en el análisis.

Tabla 7
Parámetros para análisis de metales pesados

Condiciones del Equipo de Absorción Atómica						
Condición de medida	Plomo	Cadmio	Cobre	Zinc	As	Hg

Longitud de onda	217,3nm	229,0nm	325,0nm	214,0nm	190,0nm	230,0nm
------------------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

Nota. Fuente elaboración propia.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Determinación del perfil bioquímico en leche de diferentes especies

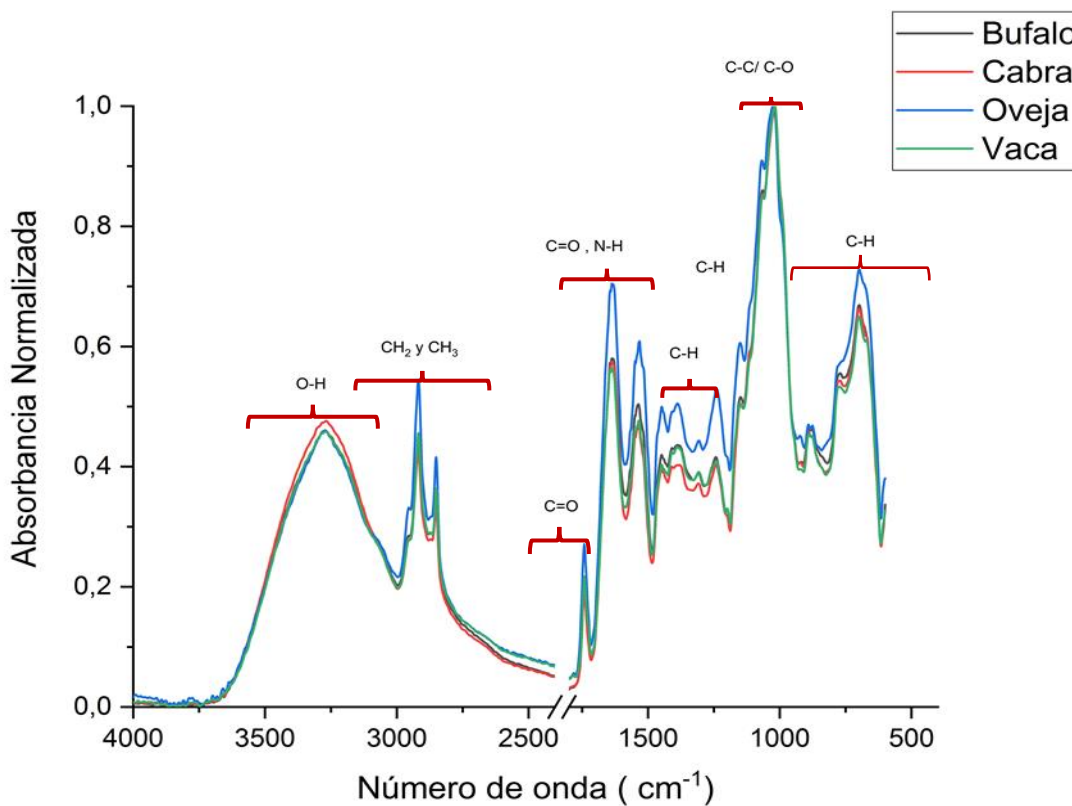


Figura 23. Espectro obtenidos por ATR-FTIR de leche búfalo, cabra, oveja y vaca en la región espectral de 4000 a 600 cm^{-1} (fuente el autor).

La espectroscopia FTIR es utilizada para la identificación rápida de moléculas, en la industria lechera y permite la medición del contenido de grasa y proteínas, con lo cual se identifica el producto con mejores propiedades para la elaboración del queso y de diferentes productos lácteos (silva et al., 2019; Tarapoulouzi et al., 2020). La leche por su alto contenido de aminoácidos y grasas es considerada una mezcla de alto valor biológico. La figura 23 muestra los espectros FTIR de las leches de origen

bovino, caprino, ovino y bufalino, en los cuales se identificaron 12 bandas de absorción importantes en la región de los 4000 a 600 cm^{-1} , sus absorbancias y vibraciones corresponden a los grupos funcionales presentes en la leche (Botelho et al.,2016). Para la identificación de estos picos se tomó como referencia a Brakel y Hewavitatharana (2016), los cuales describen dos zonas de interés, la primera 3400-2800 cm^{-1} y 1800-800 cm^{-1} , donde se localizan las principales bandas correspondientes a grasas, proteínas y carbohidratos. En la región espectral entre 1800 y 2500 cm^{-1} no se observó una banda específica, debido a esto fue removida, además no proporciona información química relacionada sobre las muestras de leche. Estos hallazgos concuerdan con los encontrados por Aidawaiti et al. (2019). A continuación se dará una descripción detallada de cada uno de los picos de la figura 23.

Identificación de bandas de proteínas

Se identificaron 3 bandas correspondientes a proteínas en la parte derecha de los espectros, dos bandas intensas en 1636(Amida I) cm^{-1} , 1526 (Amida II) cm^{-1} y uno pico con menor intensidad 1247 cm^{-1} (Amida III). Se encontraron bandas espectrales similares en la investigación realizada por Jaiwas et al. (2018). La absorción de la amida I es producto de las vibraciones del estiramiento C=O del grupo amida y con una contribución menor de la vibración de estiramiento C-N, en el caso de la amida II surge de las vibraciones de flexión N-H y de estiramiento C-N (Berzins et al.,2020). Algunos autores han señalado que la absorción de amida I la cual se debe casi en su totalidad a las vibraciones de estiramiento C=O de los enlaces peptídicos, es más importante en la determinación de la estructura secundaria de las proteínas (Rohman y Man, 2016). La amida III corresponde a una mezcla de desplazamiento del enlace C-N, acopladas generalmente a las vibraciones de flexión interna N-H, con contribuciones débiles del estiramiento C=C (Mondragón, 2020). En la figura 24 se puede visualizar la representación de las vibraciones en los enlaces de la Amida I y II.

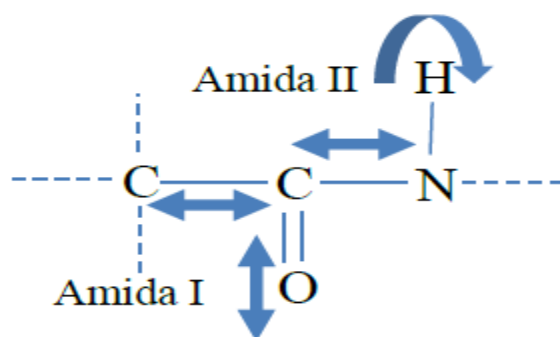


Figura 24. Representación de los modos vibratorios de las bandas Amida I y II (Mondragón, 2020).

Identificación de bandas de lípidos

La mayoría de las bandas espectrales encontradas (figura 23) son manifestadas por las vibraciones de los enlaces de las grasas. El pico más amplio de todo el espectro en los 3260 cm^{-1} , se refiere al estiramiento de los O-H en los grupos hidroxilos de los lípidos, con contribuciones de los que se encuentran en la estructura de proteínas y carbohidratos (Layane et al., 2019). Los picos en los 2846 y 2922 cm^{-1} marcan las vibraciones de los estiramientos de los grupos CH_2 y CH_3 de los ácidos grasos presentes en la leche (Andrade et al., 2019). Otras bandas relacionadas con la grasa se localizan en la región de huella dactilar, en los 1750 cm^{-1} se presentó el pico relacionado con estiramiento C=O del grupo éster o ácido carboxílico, en algunos estudios como el de Cebi et al. (2016) han relacionado como grasa la banda en 1397 cm^{-1} que está asociada con la flexión C-H de esteres y las cadenas alifáticas. Al trabajar en la detección rápida de la adulteración de leche de diferentes especies Cirak et al. (2018) reportó todas las bandas anteriormente descritas para los ácidos grasos de la leche.

Identificación de bandas de carbohidratos

El número de bandas relacionado con carbohidratos aparecen en menor proporción (figura 23), el pico más intenso de todo el espectro en los 1024 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de los carbohidratos mayoritarios, que para el caso de la leche es la lactosa (Mondragón, 2020). La última banda alrededor de 810 cm^{-1} proviene de una combinación de flexión del C=O y flexión de la unión C-H (Gabara y Konar, 2018).

4.2 Determinación del porcentaje relativo de proteínas, lípidos y carbohidratos

La figura 25 muestra la comparación de los porcentajes de áreas relativos de los principales componentes de la leche, se tomó como referencia a la leche de vaca y se le asignó el 100% a sus áreas. Las barras de error pertenecen al porcentaje de desviación estándar encontrado en los datos. Los porcentajes de áreas relativos de proteínas fueron mayor para la leche de oveja ($138,4\pm 4,1\%$), seguido por la leche de cabra ($109,6\pm 3,3\%$) y por último la leche bufalina ($99,4\pm 3,1\%$). En relación a las grasas el mayor porcentaje de área relativo se encontró en la leche de oveja ($134,6\pm 7,1\%$), en segundo lugar la leche de búfala ($127,9\pm 2,07\%$) y por último la leche de cabra ($94,6\pm 3,5\%$). Para los carbohidratos el orden se distribuyó de la siguiente manera: oveja ($109,8\pm 1,9\%$) > búfala ($100,8\pm 1,10\%$) > cabra ($97,6\pm 0,58\%$). El mayor porcentaje de área relativo de proteínas, grasas y carbohidratos se hallan en la leche ovina.

En la figura 23 se visualizan los espectros superpuestos de la leche de cabra, búfala, oveja y vaca. En general a nivel cualitativo, los espectros son similares, las diferencias se encuentran en la intensidad de los picos, en el caso de la leche de

cabra, búfala y vaca de forma visual no es posible establecer diferencias, lo contrario sucede con la leche de oveja en la cual todas sus bandas presentan altos niveles de absorbancia. Según Grewal et al. (2017), el grado de absorción de los picos se correlaciona con la cantidad del componente presente en cada tipo de leche, ácidos grasos, proteínas (amidas I y II) y carbohidratos (lactosa). Por lo anterior, en la figura 25 se muestran los porcentajes de áreas relativos de los componentes principales de la leche anteriormente nombrados, estos se identificaron con el propósito de establecer diferencias entre la leche de cada especie. Los porcentajes de áreas relativos de la leche vacuna se tomaron como referencia (100%), debido a su alta comercialización, en el caso de las proteínas, las leches caprina y ovina presentaron mayor porcentaje de área relativo que el de la referencia con 9,6% y 38,4% respectivamente, la leche bufalina aunque no sobrepasó en porcentaje de área relativo a la leche vacuna, si registró un comportamiento similar con 99,40%. Este comportamiento mostrado en el grado de absorción de proteínas por los espectros son similares a los reportados por Tarapoulouzi et al. (2020). Para las grasas en la leche bufalina y ovina se determinó 28,8% y 33,8 % de porcentaje de área relativo, por encima de la leche vacuna, la leche caprina mostró 2,83% menos de porcentaje de área relativo. Para finalizar el porcentaje de área relativo de carbohidratos fue mayor que el de referencia para todas las leches, el valor más alto se encontró en la leche de oveja reportando 10% por encima que el de la leche vacuna. Con los datos anteriores se confirma lo que la literatura aborda en cuanto a la relación entre el grado de absorción y el contenido de componentes de cada tipo de leche (Silva et al., 2020).

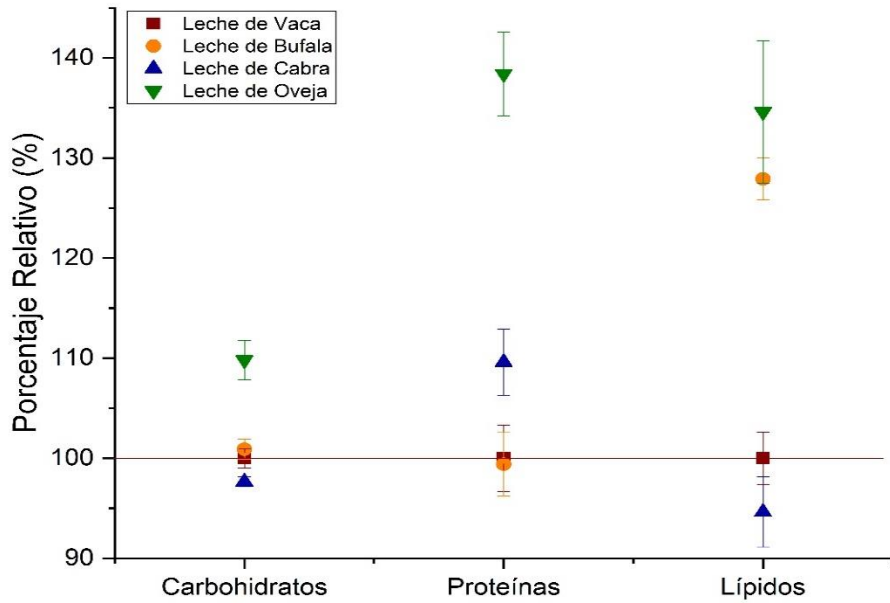


Figura 25. Porcentaje de área relativo producto de la integración de bandas de lípidos proteínas y carbohidratos en datos espectrales FTIR (fuente el autor).

4.3 Análisis multivariado

Antes de realizar el análisis multivariado se hizo la construcción de la matriz de datos de orden cero, primera, y segunda derivada como se muestra en la figura 26, 27 y 28 respectivamente, cada una de estas matrices contaba con más de 15000 datos espectrales.

	C609	C610	C611	C612	C613	C614	C615	C616	C617	C618	C619	C620	C621	C622	C623	C624	C625
1	1770.653088	1772.581904	1774.510722	1776.439536	1778.368352	1780.297168	1782.225984	1784.1548	1786.083616	1788.012432	1789.941248	1791.870064	1793.798888	1795.727696	1797.656512	1799.585328	1801.514144
2	0.0389829	0.0367826	0.0346722	0.0326292	0.0319820	0.0309346	0.0302843	0.0296519	0.0294374	0.0293015	0.0292884	0.0291329	0.0286032	0.0278654	0.0268500	0.0260171	0.0253842
3	0.0337262	0.0321259	0.0301140	0.0285094	0.0271345	0.0260642	0.0255727	0.0253184	0.0252075	0.0252828	0.0253201	0.0251847	0.0246280	0.0239493	0.0231464	0.0225091	0.0220285
4	0.0317812	0.0300089	0.0281976	0.0270601	0.0262448	0.0260165	0.0262430	0.0259536	0.0254273	0.0249637	0.0243317	0.0237152	0.0228579	0.0220362	0.0211304	0.0211535	0.0211502
5	0.0299343	0.0317305	0.0298823	0.0288979	0.0283990	0.0284276	0.0286203	0.0282437	0.0277535	0.0273396	0.0268295	0.0261915	0.0251902	0.0241669	0.0231674	0.0227025	0.0226603
6	0.0299661	0.0288140	0.0275395	0.0269328	0.0267172	0.0267367	0.0268076	0.0264344	0.0259089	0.0255913	0.0252563	0.0247448	0.0239951	0.0233596	0.0228485	0.0226640	0.0224778
7	0.0287733	0.0294198	0.0280702	0.0274037	0.0268922	0.0265832	0.0264112	0.0259950	0.0254449	0.0251268	0.0246939	0.0247372	0.0243778	0.0239270	0.0233285	0.0229953	0.0227005
8	0.0278773	0.0262448	0.0252916	0.0249232	0.0247684	0.0248693	0.0247970	0.0244111	0.0241114	0.0238812	0.0234010	0.0229452	0.0224567	0.0220508	0.0218625	0.0219619	0.0217728
9	0.0274089	0.0262448	0.0252916	0.0249232	0.0247684	0.0248693	0.0247970	0.0244111	0.0241114	0.0238812	0.0234010	0.0229452	0.0224567	0.0220508	0.0218625	0.0219619	0.0217728
10	0.0314388	0.0302645	0.0290556	0.0283631	0.0280003	0.0280360	0.0279458	0.0273285	0.0266200	0.0262103	0.0256961	0.0250629	0.0245048	0.0240410	0.0236305	0.0235111	0.0232909
11	0.0332480	0.0318297	0.0304056	0.0294714	0.0289443	0.0289386	0.0289224	0.0288052	0.0287712	0.0286956	0.0283785	0.0278251	0.0271879	0.0267499	0.0263828	0.0262679	0.0261032
12	0.0329881	0.0316756	0.0303398	0.0294512	0.0289017	0.0287767	0.0287240	0.0286393	0.0280801	0.0278762	0.0274628	0.0271221	0.0267784	0.0261944	0.0253980	0.0247586	0.0240344
13	0.0450486	0.0429027	0.0414193	0.0411703	0.0427421	0.0443276	0.0451499	0.0438990	0.0417230	0.0401370	0.0391591	0.0380743	0.0371586	0.0366603	0.0365768	0.0374052	0.0381059
14	0.0569700	0.0536984	0.0515036	0.0516510	0.0529105	0.0550542	0.0561990	0.0543619	0.0515994	0.0494888	0.0478909	0.0463088	0.0450869	0.0447576	0.0454523	0.0474302	0.0491666
15	0.0432921	0.0412339	0.0399752	0.0405572	0.0419709	0.0439936	0.0449739	0.0434836	0.0413050	0.0397734	0.0387860	0.0377387	0.0368036	0.0365383	0.0371002	0.0388074	0.0404052
16	0.0453777	0.0433253	0.0423947	0.0436336	0.0457891	0.0485932	0.0501823	0.0486074	0.0463001	0.0447346	0.0436679	0.0424229	0.0413254	0.0409119	0.0413497	0.0431325	0.0446122
17	0.0430998	0.0401220	0.0374547	0.0359251	0.0350705	0.0347638	0.0344165	0.0336302	0.0326105	0.0320898	0.0316565	0.0308131	0.0298533	0.0292538	0.0289528	0.0289076	0.0286615
18	0.0444140	0.0421033	0.0403430	0.0395961	0.0391216	0.0391372	0.0385675	0.0372102	0.0358337	0.0349426	0.0340867	0.0333098	0.0327543	0.0323770	0.0330366	0.0335564	0.0336934
19	0.0419366	0.0404994	0.0393503	0.0393407	0.0400355	0.0412018	0.0420595	0.0417332	0.0408151	0.0401308	0.0393386	0.0382301	0.0368886	0.0362522	0.0363115	0.0370604	0.0378185
20	0.0420991	0.0405658	0.0401003	0.0417911	0.0444237	0.0474749	0.0487483	0.0470624	0.0447381	0.0430749	0.0418046	0.0400493	0.0384951	0.0379936	0.0387742	0.0409036	0.0427529
21	0.0437495	0.0418109	0.0413856	0.0434886	0.0468252	0.0508406	0.0525799	0.0503043	0.0475044	0.0457131	0.0442695	0.0421961	0.0405769	0.0400862	0.0411074	0.0438306	0.0460203
22	0.0498967	0.0487226	0.0498587	0.0528511	0.0566345	0.0599162	0.0617484	0.0616463	0.0597184	0.0566618	0.0534910	0.0510458	0.0497881	0.0498567	0.0511528	0.0531515	0.0552410
23	0.0517376	0.0507610	0.0521633	0.0556590	0.0598168	0.0638314	0.0651734	0.0649355	0.0628877	0.0596357	0.0563712	0.0539647	0.0527324	0.0529784	0.0543672	0.0564367	0.0585988
24	0.0368522	0.0349417	0.0332045	0.0324401	0.0322399	0.0326373	0.0328450	0.0322018	0.0315742	0.0312816	0.0309496	0.0306110	0.0302732	0.0299926	0.0298110	0.0301542	0.0303788

Figura 26. Matriz de datos espectrales ATR-FTIR de orden cero de la leche de diferentes especies elaborada en software Minitab 2020(fuente el autor).

	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26
1	-0.00406	-0.00419	-0.0017100	0.0010800	0.0033800	0.00537	0.00691	0.00845	0.00958	0.00895	0.00706	0.00592	0.00625	0.00697	0.00761	0.00813	0.00841	0.00846	0.00788	0.00687
2	-0.00406	-0.00408	-0.0019200	0.0003633	0.0024500	0.00462	0.00595	0.00636	0.00700	0.00760	0.00717	0.00637	0.00594	0.00654	0.00782	0.00847	0.00834	0.00786	0.00739	
3	-0.00418	-0.00493	-0.0035500	-0.0006080	0.0019000	0.00428	0.00674	0.00843	0.00971	0.00973	0.00823	0.00691	0.00670	0.00683	0.00705	0.00794	0.00870	0.00877	0.00831	0.00717
4	-0.00402	-0.00441	-0.0028300	-0.0000637	0.0025300	0.00516	0.00745	0.00867	0.00919	0.00886	0.00717	0.00512	0.00463	0.00611	0.00793	0.00902	0.00980	0.01014	0.00959	0.00819
5	-0.00310	-0.00453	-0.0041800	-0.0024300	0.0000534	0.00296	0.00571	0.00785	0.00902	0.00867	0.00759	0.00637	0.00568	0.00623	0.00730	0.00811	0.00842	0.00827	0.00754	0.00696
6	-0.00350	-0.00376	-0.0028300	-0.0011100	0.0013400	0.00414	0.00651	0.00824	0.00903	0.00842	0.00720	0.00624	0.00608	0.00658	0.00730	0.00792	0.00833	0.00872	0.00814	0.00673
7	-0.00468	-0.00477	-0.0026700	-0.0002423	0.0019000	0.00491	0.00774	0.00906	0.00864	0.00710	0.00594	0.00587	0.00651	0.00734	0.00829	0.00923	0.00944	0.00887	0.00762	0.00648
8	-0.00391	-0.00358	-0.0017300	0.0002437	0.0021800	0.00431	0.00639	0.00845	0.00934	0.00878	0.00795	0.00704	0.00622	0.00579	0.00594	0.00670	0.00781	0.00880	0.00881	0.00819
9	-0.00504	-0.00600	-0.0040600	-0.0009583	0.0025600	0.00591	0.00807	0.00922	0.01016	0.00954	0.00740	0.00557	0.00489	0.00536	0.00656	0.00780	0.00871	0.00937	0.00951	0.00867
10	-0.00401	-0.00413	-0.0023800	-0.0004754	0.0010200	0.00337	0.00639	0.00849	0.00906	0.00842	0.00747	0.00682	0.00677	0.00704	0.00719	0.00762	0.00856	0.00946	0.00868	0.00676
11	-0.00433	-0.00463	-0.0026700	-0.0002971	0.0028300	0.00508	0.00733	0.00857	0.00877	0.00845	0.00776	0.00662	0.00611	0.00669	0.00746	0.00807	0.00840	0.00830	0.00756	0.00690
12	-0.00309	-0.00311	-0.0014100	-0.0001628	0.0011900	0.00320	0.00571	0.00774	0.00887	0.00838	0.00731	0.00680	0.00686	0.00674	0.00690	0.00798	0.00888	0.00915	0.00814	0.00659
13	-0.00384	-0.00392	-0.0023400	-0.0002393	0.0018100	0.00410	0.00684	0.00865	0.00884	0.00766	0.00632	0.00567	0.00540	0.00578	0.00662	0.00776	0.00919	0.00975	0.00887	0.00768
14	-0.00404	-0.00432	-0.0023700	-0.0002267	0.0024600	0.00446	0.00655	0.00821	0.00894	0.00817	0.00700	0.00666	0.00675	0.00700	0.00767	0.00867	0.00909	0.00884	0.00781	0.00639
15	-0.00403	-0.00442	-0.0035500	-0.0013700	0.0022300	0.00600	0.00876	0.00981	0.00950	0.00856	0.00726	0.00598	0.00549	0.00567	0.00643	0.00778	0.00872	0.00896	0.00844	0.00733
16	-0.00479	-0.00495	-0.0030300	-0.0004616	0.0026300	0.00565	0.00831	0.01026	0.01027	0.00874	0.00759	0.00698	0.00607	0.00559	0.00629	0.00766	0.00894	0.00950	0.00887	0.00745
17	-0.00649	-0.00683	-0.0063800	-0.0002750	0.0018900	0.00595	0.00894	0.01114	0.01163	0.01054	0.00905	0.00791	0.00691	0.00648	0.00701	0.00775	0.00848	0.00912	0.00932	0.00908
18	-0.00521	-0.00641	-0.0046400	-0.0023730	0.0017900	0.00593	0.00889	0.01133	0.01228	0.01075	0.00869	0.00773	0.00628	0.00507	0.00585	0.00771	0.00916	0.00941	0.00932	0.00913
19	-0.00413	-0.00555	-0.0041100	-0.0009309	0.0026200	0.00421	0.00525	0.00820	0.01025	0.00977	0.00902	0.00896	0.00843	0.00825	0.00884	0.00973	0.00854	0.00917	0.00959	0.00922
20	-0.00609	-0.00720	-0.0052500	-0.0026400	0.0014700	0.00634	0.01055	0.01371	0.01354	0.01022	0.00734	0.00601	0.00492	0.00455	0.00626	0.00867	0.01062	0.01171	0.01095	0.00898
21	-0.00449	-0.00518	-0.0030300	-0.0011800	0.0009795	0.00391	0.00794	0.01106	0.01125	0.00948	0.00780	0.00732	0.00674	0.00583	0.00575	0.00715	0.00926	0.00991	0.00944	0.00904
22	-0.00491	-0.00407	-0.0017400	-0.0001643	0.0024100	0.00578	0.00926	0.01117	0.01083	0.00907	0.00754	0.00656	0.00562	0.00542	0.00661	0.00855	0.01043	0.01130	0.01079	0.00956
23	-0.00325	-0.00239	-0.0014700	-0.0003204	0.0020800	0.00550	0.00866	0.01015	0.01004	0.00968	0.00911	0.00755	0.00571	0.00525	0.00624	0.00788	0.00973	0.01043	0.01034	0.01014
24	-0.00416	-0.00349	-0.0007237	-0.0001240	0.0026600	0.00478	0.00781	0.01013	0.01001	0.00825	0.00756	0.00766	0.00714	0.00659	0.00675	0.00805	0.00954	0.00987	0.00970	0.00932
25	-0.00467	-0.00513	-0.0034700	-0.0011500	0.0008794	0.00363	0.00695	0.01025	0.01175	0.01077	0.00879	0.00755	0.00671	0.00571	0.00530	0.00617	0.00760	0.00886	0.00921	0.00804

Figura 27. Matriz de datos espectrales ATR-FTIR de primera derivada de la leche de diferentes especies elaborada en software Minitab 2020(fuente el autor).

	C36	C37	C38	C39	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47	C48	C49	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C
6	-2.78E-04	-6.38E-04	-7.56E-04	-5.22E-04	-8.80E-05	2.64E-04	-4.11E-05	-2.42E-04	3.12E-04	6.11E-04	2.73E-04	-6.57E-05	-5.82E-05	8.40E-05	-1.80E-06	-3.46E-04	-5.35E-04	-4.20E-04	-4.60E-04	-6.97E-04	-6.1E
7	-6.17E-04	-6.59E-04	-5.90E-04	-3.92E-04	4.95E-06	2.95E-04	1.46E-04	9.72E-06	2.49E-04	3.17E-04	1.63E-04	1.17E-04	5.14E-05	-8.03E-05	-2.06E-04	-3.39E-04	-4.64E-04	-5.21E-04	-5.45E-04	-6.18E-04	-5.07
8	-6.05E-04	-8.27E-04	-5.70E-04	-1.95E-04	1.94E-04	4.29E-04	4.62E-05	-2.07E-04	1.68E-04	2.72E-04	1.90E-05	-3.35E-05	3.03E-05	2.02E-05	-4.94E-05	-2.31E-04	-3.92E-04	-3.94E-04	-5.11E-04	-6.97E-04	-4.8E
9	-7.04E-04	-6.97E-04	-5.04E-04	-2.37E-04	2.80E-04	6.34E-04	1.44E-04	-2.32E-04	9.20E-05	1.08E-04	-1.31E-04	-7.33E-05	3.92E-05	6.25E-05	4.78E-06	-2.41E-04	-4.39E-04	-3.49E-04	-4.20E-04	-7.55E-04	-7.4E
10	-4.21E-04	-4.59E-04	-4.35E-04	-3.37E-04	-8.30E-05	2.33E-04	4.23E-06	-2.73E-04	1.20E-05	2.48E-04	1.99E-04	1.27E-04	8.21E-05	3.54E-05	5.68E-05	-6.34E-05	-3.65E-04	-4.78E-04	-5.86E-04	-7.99E-04	-7.7E
11	-1.75E-04	-4.71E-04	-6.44E-04	-5.05E-04	-1.09E-04	2.03E-04	1.39E-05	-1.74E-04	1.12E-04	3.32E-04	1.93E-04	-7.71E-05	-1.99E-04	-3.79E-05	1.45E-04	-4.35E-05	-3.89E-04	-4.28E-04	-4.01E-04	-5.94E-04	-7.0E
12	-6.08E-04	-7.60E-04	-4.89E-04	-1.40E-04	2.30E-05	3.68E-04	3.30E-04	-2.08E-04	-1.61E-04	2.08E-04	1.90E-04	8.59E-05	1.27E-04	8.79E-05	-1.42E-04	-3.19E-04	-4.07E-04	-5.50E-04	-6.66E-04	-6.49E-04	-5.2E
13	-3.85E-04	-7.63E-04	-9.13E-04	-5.74E-04	4.22E-05	5.53E-04	3.59E-04	-9.72E-05	6.00E-05	3.27E-04	1.25E-04	-2.88E-04	-3.99E-04	-5.93E-05	1.82E-04	-1.48E-05	-2.83E-04	-4.18E-04	-5.62E-04	-6.37E-04	-6.4E
14	-3.00E-04	-3.35E-04	-4.84E-04	-5.01E-04	-2.36E-04	2.11E-04	2.51E-04	-1.55E-05	-4.14E-05	1.01E-04	1.92E-04	1.58E-04	9.65E-05	2.13E-06	-1.79E-04	-3.10E-04	-3.71E-04	-4.36E-04	-5.92E-04	-7.38E-04	-6.0E
15	-1.34E-04	-2.75E-04	-3.44E-04	-3.12E-04	-1.63E-04	6.43E-05	-4.71E-05	-2.09E-04	2.21E-05	1.16E-04	2.19E-05	1.07E-04	1.34E-04	3.55E-05	1.67E-05	-8.36E-05	-2.83E-04	-4.21E-04	-5.91E-04	-7.53E-04	-7.0E
16	-6.27E-04	-7.51E-04	-5.46E-04	-2.96E-04	-1.30E-04	4.38E-05	3.50E-05	-1.33E-05	2.10E-04	3.44E-04	1.74E-05	-1.74E-05	5.51E-06	3.55E-05	-1.29E-04	-2.76E-04	-2.95E-04	-3.65E-04	-5.66E-04	-7.33E-04	-7.4E
17	-1.06E-04	-6.47E-05	-2.65E-04	-4.71E-04	-2.79E-04	7.48E-05	-1.12E-04	-3.35E-04	2.27E-05	2.92E-04	2.21E-04	6.92E-05	-1.60E-05	3.09E-07	-1.86E-05	-1.31E-04	-3.52E-04	-5.53E-04	-6.19E-04	-6.02E-04	-4.6E
18	-3.07E-04	-5.00E-04	-5.40E-04	-4.37E-04	4.72E-04	1.24E-04	-2.56E-04	1.03E-04	4.03E-04	1.40E-04	-1.71E-04	-2.13E-04	-1.56E-04	-9.55E-05	2.72E-05	-5.32E-05	-4.08E-04	-7.01E-04	-8.16E-04	-6.4E	
19	-5.03E-04	-3.86E-04	-3.30E-04	-2.47E-04	2.27E-04	5.34E-04	-9.66E-05	-6.40E-04	-1.81E-04	3.49E-04	3.09E-04	1.15E-05	-1.63E-04	-2.41E-04	-2.94E-04	-2.47E-04	-2.94E-04	-3.95E-04	-3.38E-04	-2.89E-04	-3.0E
20	-7.87E-04	-7.08E-04	-5.90E-04	-3.74E-04	3.90E-05	3.33E-04	5.42E-05	-2.80E-04	4.03E-05	4.58E-04	4.77E-04	2.76E-04	7.27E-05	-1.13E-04	-3.67E-04	-4.48E-04	-3.00E-04	-2.98E-04	-4.90E-04	-6.05E-04	-5.2E

Los datos espectrales recopilados de las muestras de las leches de Búfala, Cabra, Oveja y Vaca, se procesaron mediante análisis multivariado, utilizando técnicas como el análisis de componentes principales (PCA) y análisis jerárquico (HCA). El PCA es una valiosa herramienta de análisis de datos (Abdulrahman et al., 2018), destacada por una variedad de estudios diferentes, resaltando su eficiencia en la discriminación de muestras biológicas, incluyendo los que investigan la leche y los productos lácteos (Andrade et al., 2019). Este método quimiométrico permite reducir el número de variables sin pérdida de información, los resultados son representados por puntaje y varianza. De acuerdo con Silva et al. (2019) “cada punto se simplifica a un solo punto en un espacio bidimensional de componentes principales (PC), las muestras con puntuaciones de PC similares tienen características espectrales relacionadas”.

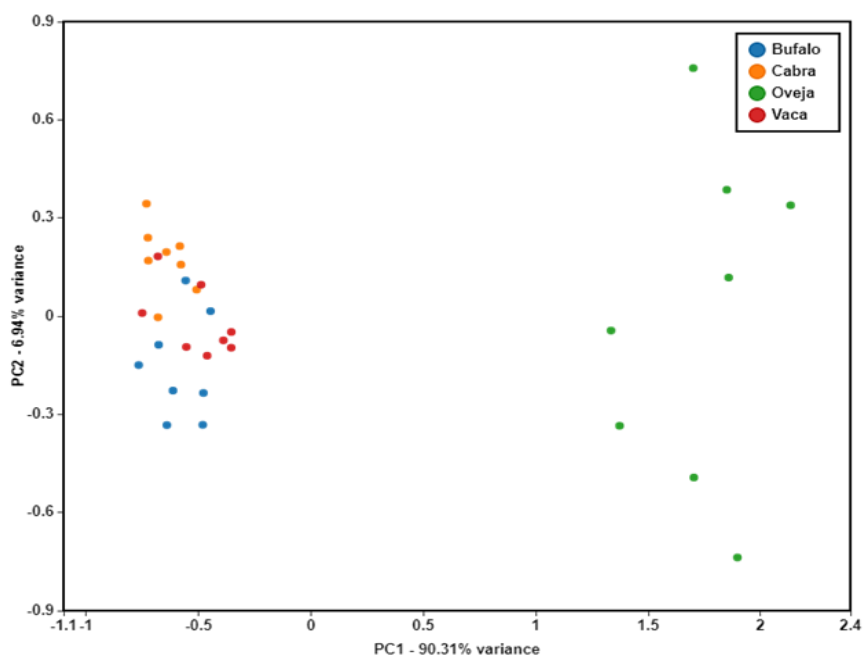


Figura 29. PCA de datos espectrales FTIR de orden cero de muestras de leche de cabra, búfalo, oveja y vaca (fuente el autor).

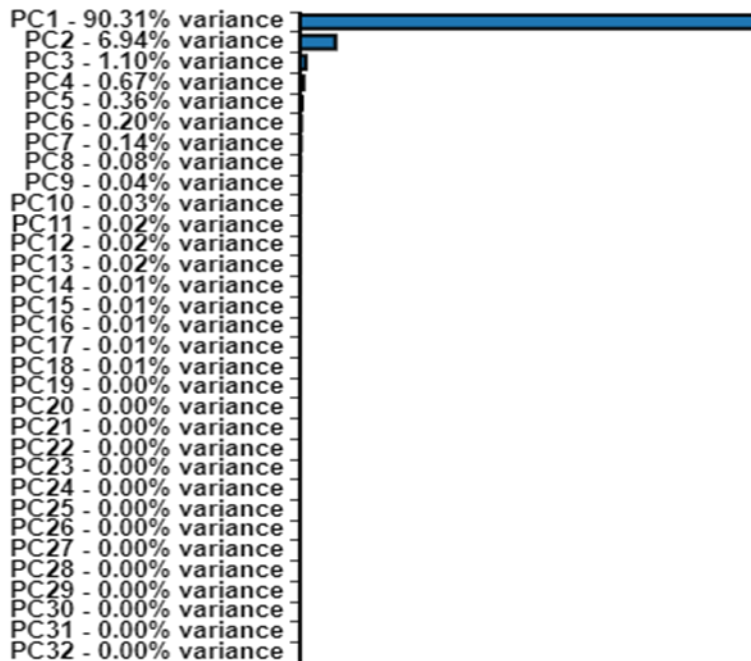


Figura 30. Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de orden cero (fuente el autor).

En esta investigación se tomó la región espectral de huella dactilar y se realizó el PCA para la matriz de datos de orden cero, primera y segunda derivada. El análisis de componentes principales obtenido de la matriz de datos de orden cero como se puede observar en la figura 29 y 30, sus dos primeras funciones discriminantes explican casi por completo el 100% de la varianza total con 90,31% PC1 y 6,94% PC2. En el caso de primera y segunda derivada el PCA no mostraron una clara discriminación entre los tipos de leche (mamífero de origen), las dos primeras componentes solo mostraron 43,37% y 22,56% de la varianza para la primera derivada (figura 31 y 32), en la segunda derivada se encontró una varianza de 34,50 %PC1 y 18,99% PC2 como se puede observar en la figura 33 y 34. El mejor tratamiento obtenido para la discriminación de las leches es el de orden cero, como se mencionó anteriormente sus dos primeras componentes explican casi el 100% de la varianza. En este caso en el componente principal 2 se agruparon verticalmente la leche de búfala, cabra y vaca, como se puede evidenciar estos tres tipos de leche muestran un alto grado de correlación, para el caso de la leche de oveja se distribuyó verticalmente por el PC1, esta leche no relaciona con ninguna de las otras especies, además existen una amplia distancia horizontal entre los dos grupos que se formaron en el PCA. Estos resultados no están de acuerdo con los de Nicolau et al. (2010) donde determinaron que los mejores datos para la discriminación de leche de cabra, oveja y vaca son los datos espectrales de segunda derivada en la región de huella dactilar, esta discrepancia se puede deber a que las muestras

en este estudio fueron obtenidos de punto de ventas en la ciudad de Manchester-Reino Unido, por lo anterior son leches con distinto contenido nutricional.

El no agrupamiento de la leche ovina en el PCA, se puede deber a que se tomaron las muestras de ovejas en distinto estado de lactación. En la finca Villa marina (lugar donde se realizó el muestreo) se le retira la cría a algunas ovejas. Lo anterior provoca un cambio en el estado de lactancia comparada con ovejas que están amantado a sus crías, posiblemente hay un cambio en las propiedades químicas de la leche dependiendo del estado de lactación.

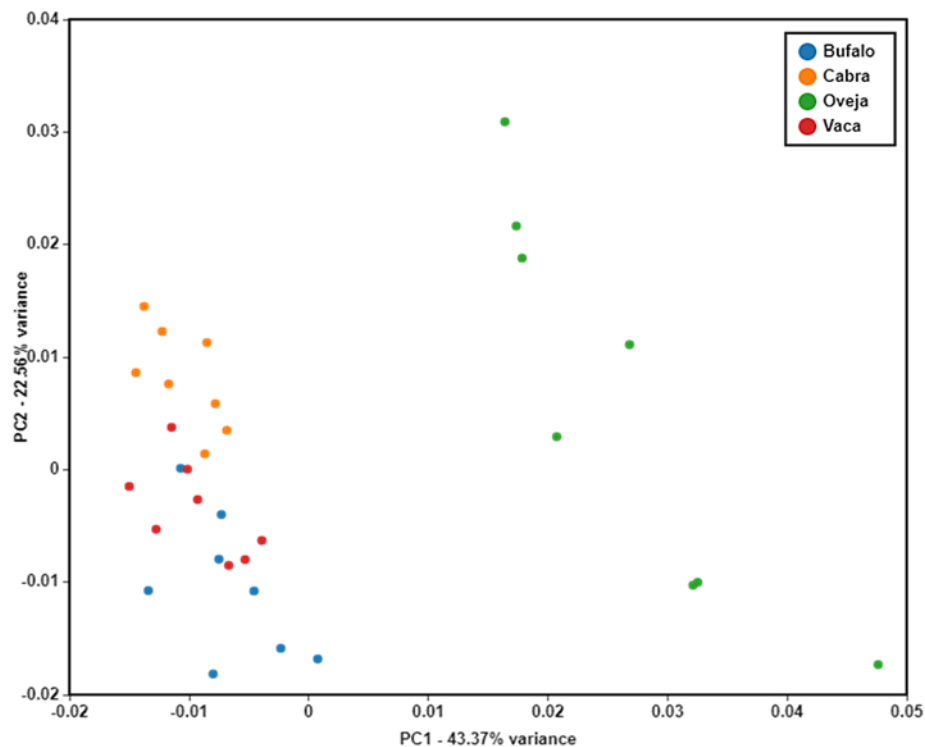


Figura 31. PCA de datos espectrales FTIR de primera derivada de muestras de leche de cabra, búfalo, oveja y vaca (fuente el autor).

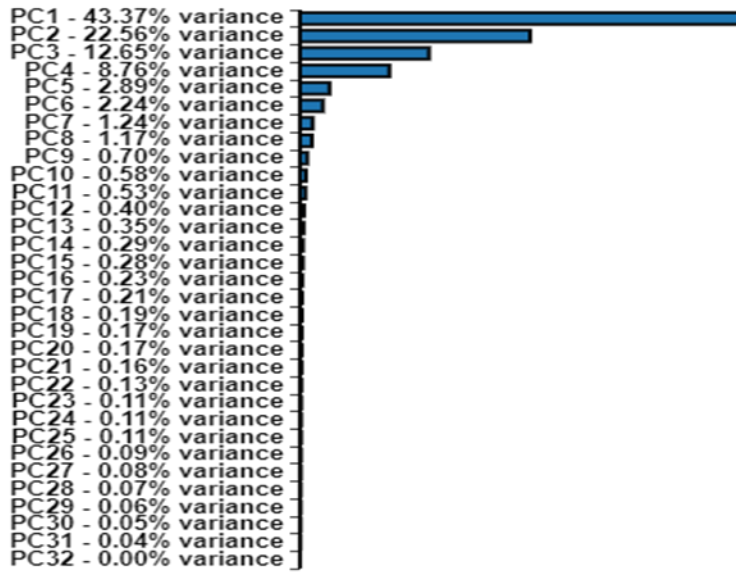


Figura 32. Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de primera derivada (fuente el autor).

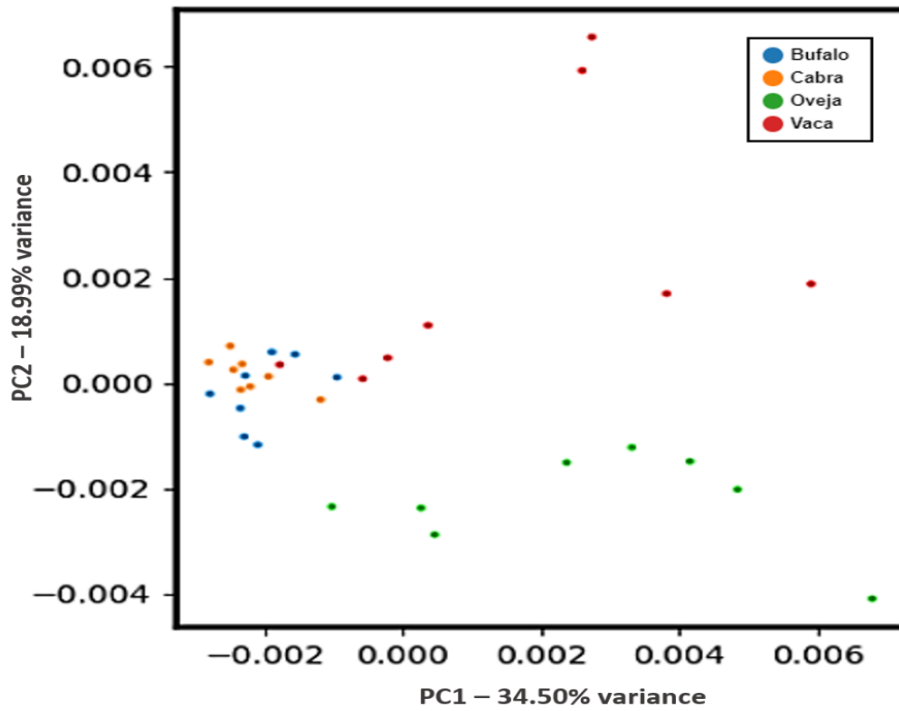


Figura 33. PCA de datos espectrales FTIR de segunda derivada de muestras de leche de cabra, búfala, oveja y vaca (fuente el autor).

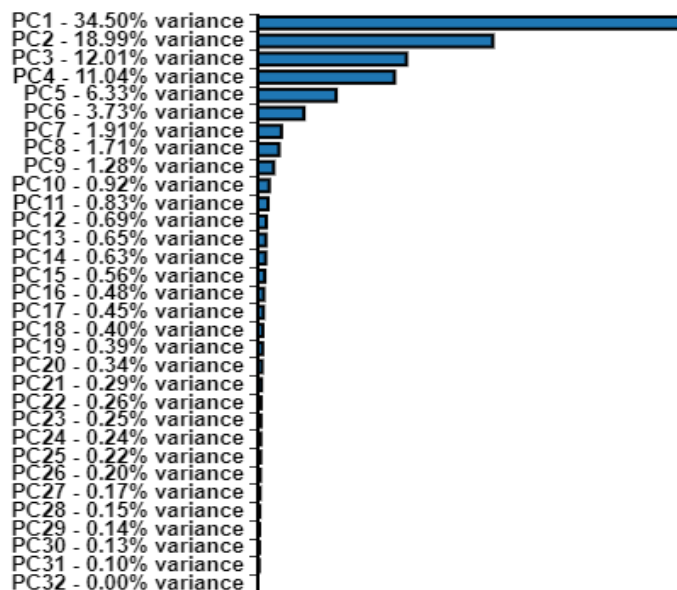


Figura 34 Porcentaje de varianza obtenido del análisis de componentes principales realizado con los datos espectrales de segunda derivada (fuente el autor).

Con el PCA también se pudo obtener 3 biomarcadores por FTIR. Estos son regiones espectrales en las cuales es posible establecer diferencias entre la leche de las especies estudiadas. La banda de 1496 cm^{-1} permitió determinar la diferencia en la leche de oveja de las otras especies. El pico alrededor de los 1392 cm^{-1} discriminó la leche de cabra de la leche de búfala y bovina. La banda que se encuentra en los 630 cm^{-1} diferenció la leche búfala de la vacuna. En la figura 35 se pueden apreciar los biomarcadores anteriormente descritos. Las distinciones halladas respaldan la determinación de porcentaje de área relativo, en la cual se encontró mayor porcentaje de área relativo de proteínas en la leche de oveja (138,4%), en caso de la leche caprina se encontró menor porcentaje de área relativo para los lípidos (94,62%) en comparación con la leche de búfala y de vaca, por último en caso de los carbohidratos la discriminación que diferencia la leche de búfala la cual presentó mayor porcentaje de área relativo (100,8%) que la leche de vaca.

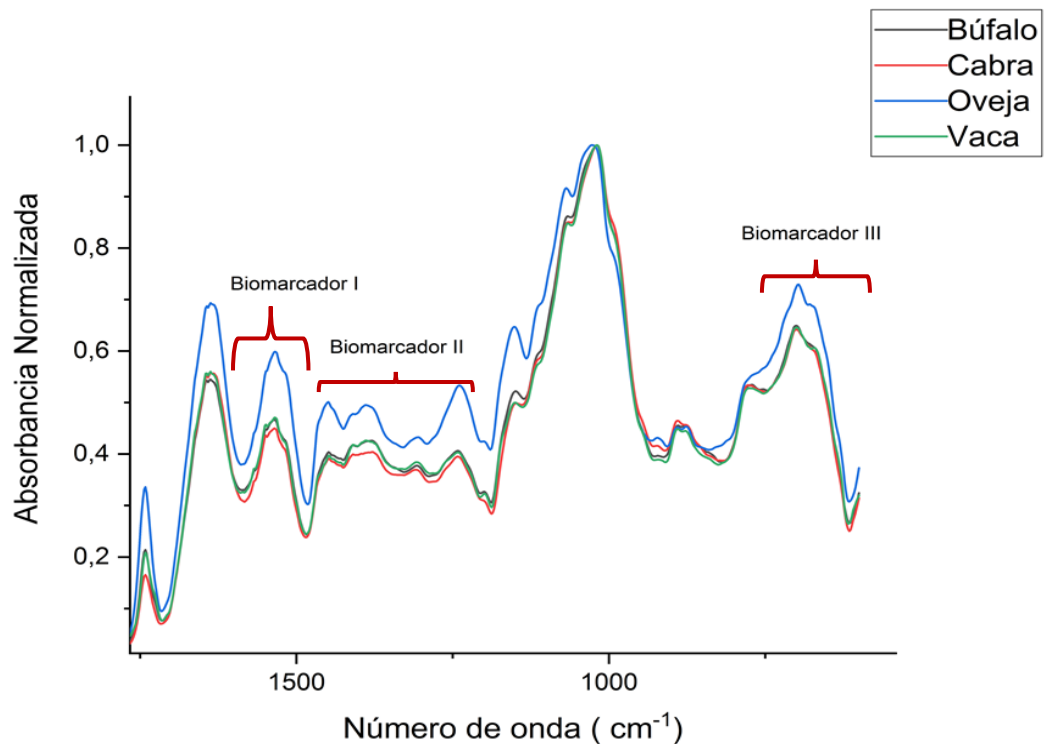


Figura 35. Biomarcadores de los datos FTIR obtenidos por el análisis de componentes principales (fuente el autor).

Para confirmar aún más sus relaciones y diferencias entre la leche de Búfala, cabra, oveja y vaca, se utilizó el conjunto de datos espectrales FTIR de la matriz de orden cero en la región de huella dactilar, para construir el Análisis de conglomerados jerárquicos (HCA) el cual se puede observar en la figura 36. Desacuerdo con los resultados del dendrograma se identificaron dos conglomerados principales. Mientras en el clado principal contenía solo leche de oveja, el segundo clado principal se dividió en dos subclados, en el primer subgrupo se encontraban mezcladas la leche de vaca con la leche de búfala, en el segundo subclado también se encontraba la leche de vaca pero esta vez mezclada con la leche de cabra. Resultados similares fueron encontrados por Cirak et al. (2018) Cuando trabajaban en la búsqueda de un método rápido para la detección de adulterantes en leche de diferentes especies. El HCA de las leches respalda aún más el resultado del PCA donde la leche de búfala, cabra y vaca mostraban un alto grado de agrupamiento y además resaltó más la diferencia de la leche de oveja con las otras especies.

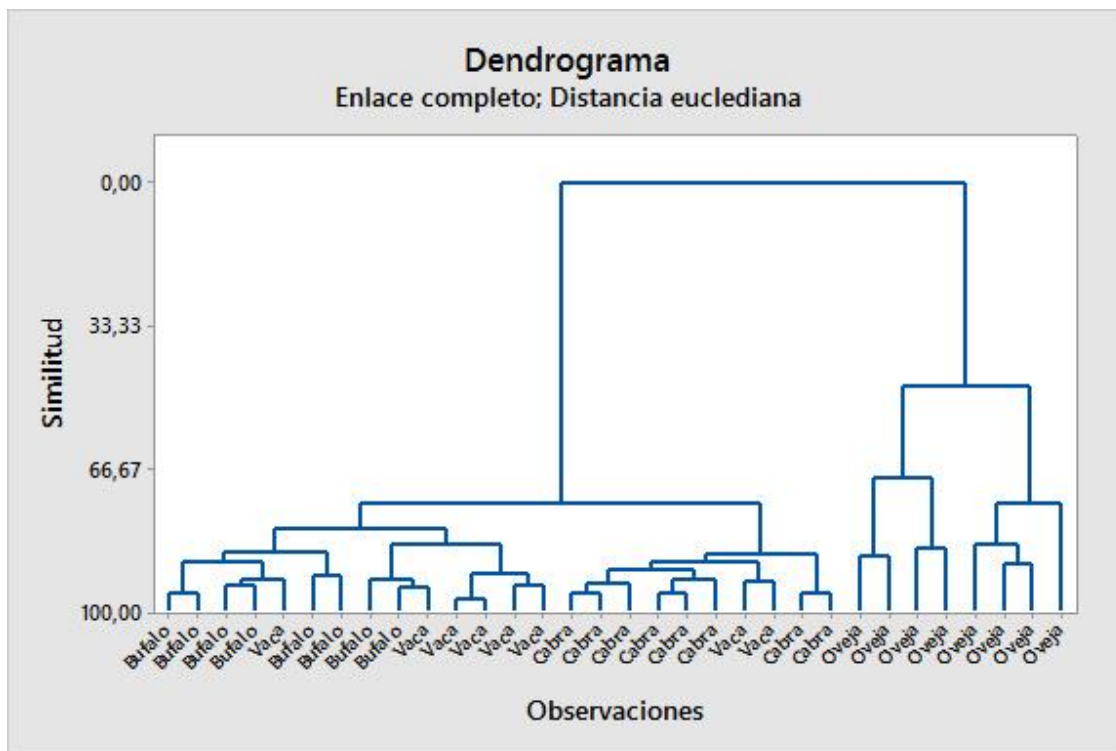


Figura 36. Dendrograma de un análisis de conglomerados de espectros FT-IR (región de huella dactilar datos de orden cero) de muestras de leche de búfala, cabra, oveja y vaca (fuente el autor).

La literatura reporta que los componentes principales de la leche de diferentes mamíferos en términos generales son los mismos. Pero pueden presentar diferencias importantes en su composición porcentual y tener como consecuencia algunas propiedades diferentes, por ejemplo mayor o menor grado de digestibilidad (Numpaque et al., 2019). Dentro de especie las diferencias pueden estar influenciadas por factores como la raza, genética, alimentación y el medio ambiente en el que se cría el animal. La composición nutricional puede variar inclusive, entre individuos pertenecientes a una misma raza (Gantner et al., 2016).

Ocampo et al. (2016) en su investigación compararon los componentes nutricionales de la leche bufalina, caprina y bovina. Utilizando un equipo MILKOSCAN para la determinación de proteínas y métodos cromatográficos en la determinación de grasa y lactosa. Para las proteínas el mayor porcentaje lo establecieron en la leche de búfala 4,1%, seguido de las leches de cabra (3,02%) y vaca (3,01%). En el caso de los lípidos encontraron 7,25% para la leche bufalina, 4,44% y 3,60% para las leches caprina y vacuna respectivamente. En cuanto a los contenidos de lactosa encontraron valores muy parecidos entre la búfala, la cabra y la vaca (5,1%, 4,2% y 3,6 % respectivamente). Y en el análisis de la composición de minerales, la leche bufalina fue superior en comparación con las otras dos

especies. Ahora bien, para establecer la comparación en los contenidos nutricionales de la leche de estas especies con la leche de oveja, se puede tomar como referencia el estudio realizado por Sanz et al. (2003) el cual reporta un 19,3 % de sólidos totales, 7 % de grasa, 5,4 % de lactosa, 6 % de proteína y 5 % de minerales. Según los estudios de Ocampo et al. (2016) y de Sanz et al. (2003) puede destacarse entonces que la leche Ovina es la que mayor porcentaje de sólidos totales presenta, representados en un mayor contenido de proteína, de lactosa y de minerales (especialmente calcio), mientras que para los lípidos fue mayor el contenido (7,25%) en leche bufalina seguida por la leche ovina (7%).

Los resultados anteriormente descritos muestran algunas coincidencias con los encontrados en nuestra investigación, aclarando que en nuestro caso reportamos porcentaje de área relativo en los componentes principales de la leche. Para la leche oveja estamos de acuerdo en su mayor contenido en proteínas, grasas y carbohidratos respecto a las otras especies (figura 25). El mayor contenido de proteínas en la leche de oveja es debido a la presencia más abundante α_2 -caseínas y K- caseínas (Yang et al., 2020). Según Barłowska et al. (2016) una característica de la leche de oveja es una mayor concentración de ácido butírico (C4) y ácido linoleico conjugado (CLA) que la leche de vaca y cabra. Las diferencias en el contenido de grasas y proteínas hacen que el tiempo de coagulación del cuajo para la leche de oveja sea más corto y la cuajada más firme, lo cual aumenta su valor nutricional e idoneidad tecnológica para la elaboración del queso.

En el caso de la leche de búfala mostramos discrepancias con la investigación Ocampo et al. (2016) en contenido de proteínas (99,4%) que en nuestro estudio estuvo similar al de la leche de vaca (100%), como se visualiza en la figura 25. Con respecto a la grasa coincidimos con el mayor contenido (127,9%) respecto a la leche de vaca y de cabra. Algunos estudios como el de Patiño (2016) reportan que la leche de búfalo contiene casi 3 veces más ácido C14 (mirístico) y 2 veces menos ácido C16 (palmítico) que la leche de vaca y cabra. Este tipo de ácidos grasos encontrados en mayor proporción en la leche de búfala no afectan el nivel de colesterol en los humanos, por lo anterior son una ventaja para la salud (Zeini, 2016). El contenido proteínas y grasas presente en la leche bufalina, apunta a esta especie como una alternativa promisoría en la transformación de productos lácteos por su rendimiento en conversión, incluso por encima de la leche de oveja por su mayor capacidad de producción (Granados et al., 2015).

Para la leche de cabra en nuestra investigación registramos mayor porcentaje de área relativo de proteínas (109,6%), en relación con la leche vacuna (100%), esto concuerda con el estudio de Barłowska et al. (2016) y con el estudio de Ocampo et al. (2016), en los cuales también registra mayor contenido de proteínas en esta leche pero en porcentaje (resultados encontrados por métodos cromatográficos),

comparada con la leche de vaca con 4,1 y 3,6% respectivamente. El mayor contenido proteínas en la leche caprina se atribuye a la abundancia de γ -caseínas (Leche de cabra 18% y vaca 6%) y β -caseína (Leche de cabra 63% y vaca 42%) (Yang et al., 2020). Las investigaciones anteriormente nombrada reporta mayor porcentaje de grasas en la leche caprina (leche de cabra 4,6% y vaca 3,6%), nuestro estudio no estuvo de acuerdo, reportando porcentaje de área relativo muy similar (94%) al de la leche vacuna (100%), como se mencionó anteriormente existen muchos factores que afecta los valores nutricionales de la leche, como la alimentación disponible para el mamífero, el clima, el periodo de lactancia entre otros. Se ha informado algunas ventajas digestivas de la leche de cabra, la grasa de esta leche es más digerible que la de la leche de vaca porque los glóbulos de grasa de la leche de cabra son más pequeños y tienen una mayor superficie, y las lipasas en el intestino aparentemente pueden atacar los lípidos más rápidamente (Fernández, 2017). Otros beneficios asociados al consumo de leche de cabra es su utilidad con problemas como acidez, eccema, asma, migraña, colitis, úlcera de estómago, trastornos digestivos, enfermedades del hígado y de la vesícula biliar y síntomas relacionados con el estrés como insomnio (Chaves et al., 2018).

4.4 Metales pesados (As, Pb, Cu, Cd, Zn Y Hg) en leche de búfala cabra, oveja y vaca

La leche es uno de los productos agropecuarios de mayor consumo por los seres humanos y en especial por los infantes. Por ello es ineludible contar con una adecuada inocuidad y trazabilidad de este producto (Londoño, 2012). Por lo anterior en esta investigación se determinó la presencia de metales pesados en la leche de diferentes especies, los resultados se pueden visualizar en la tabla 8.

Tabla 8

Determinación de metales pesados por absorción atómica(Se determinó en 2 muestra de cada especie, ensayos individuales por duplicado)

Tipo de leche	Plomo (ppm)	Cadmio (ppm)	Cobre (ppm)	Zinc (ppm)	As (ppb)	Hg (ppb)
Búfala	0,032	0,0039	0,50	5,041	0,063	0,0001
Cabra	0,023	0,0028	0,457	3,663	0,073	0,001
Oveja	0,021	0,003	0,352	2,416	0,066	0,0013
Vaca	0,027	0,002	0,4	4,682	0,063	0,001
Desviación estandar	0,004	±0,0002	±0,001	±0,003	±0,001	±0,009
Codex alimentarius	0,02	-----	-----	-----	50	500

nivel
 permitido
 Normatividad
 de Rumania

nivel permitido	----	0,01	0,5	5	----	----
Límite de detección	0,009	0,002	0,001	0,009	0,008	0,001

Nota. Para el cadmio, cobre y zinc el codex alimentarius no establece niveles máximos permitidos
 Fuente: Elaboración propia.

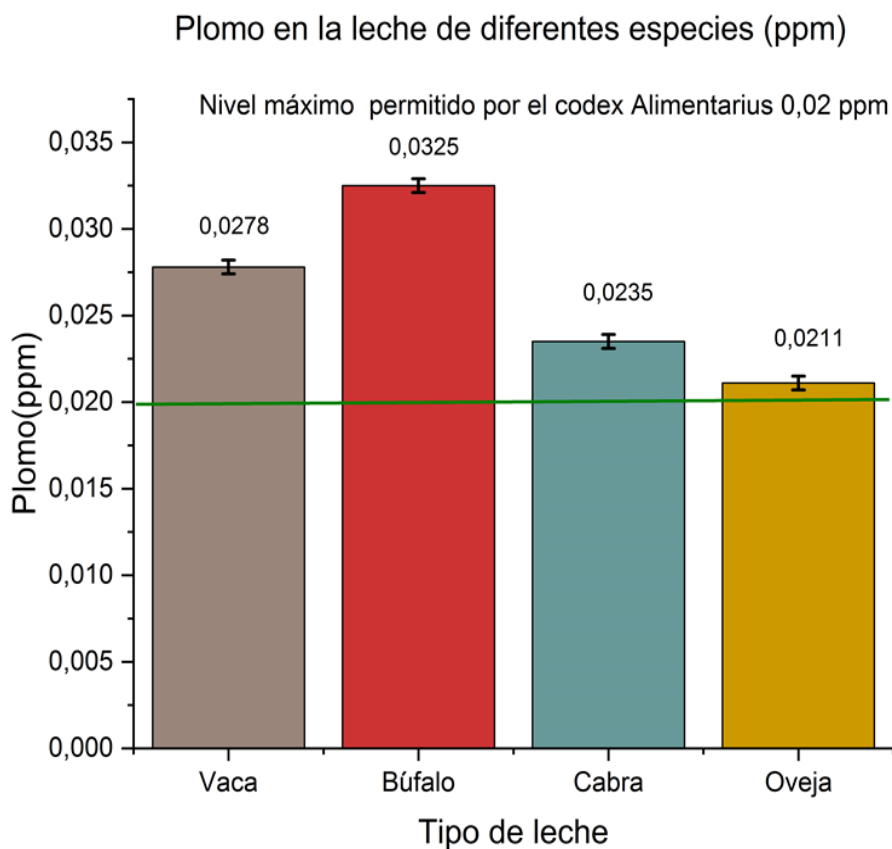


Figura 37. Concentración de plomo en leche de diferentes especies (fuente el autor).

Niveles de plomo

La concentración de plomo en la leche de diferentes animales se muestra en la figura 37. El valor más alto de plomo se encontró en la leche de búfalo (0,0325 mg/kg) y el valor más bajo en la leche de oveja 0,023 mg/kg, según la tabla 8 y según la figura 37, en el caso de la leche de vaca mostró concentración similar al de la leche de búfalo, por último la leche de cabra se encontró un contenido

parecido al de la leche de oveja. El codex alimentarius establece que el nivel máximo de Pb permisible en la leche es de 0,02 mg/kg (Gonzales, 2019). Por lo anterior todas las muestras de leches estuvieron por encima del valor permitido. Una de las principales razones por las cuales se detectaron niveles más altos de plomo en leche de búfala y de vaca, acorde con los límites establecidos por el codex alimentarius, es la cercanía de la fuente alimenticia principal de estos rumiantes de la granja villa marina con la vía principal que conduce de Pamplona a Cúcuta, pues los mejores potreros, con la mayor calidad y densidad forrajera para el pastoreo de estas especies se encuentran justo a la orilla de dicha vía, que tiene un alto flujo vehicular de día y de noche. Además, el establo de ordeño, también está relativamente cercano a dicha vía. Concuere esta apreciación con lo reportado en la investigación de Londoño (2012). Al compararlo con otras investigaciones Rahimi (2015) en su estudio determinó Pb y Cd en leche de oveja, cabra, búfalo y vaca en 5 ciudades de Irán, reportó valores menores de 0,01 para todas las especies. Así mismo nuestros valores son mayores a los hallados por Muhib et al. (2016) en su investigación en leche de búfalo y cabra en Bangladesh, donde obtuvieron concentraciones en un rango 0,017 a 0,021 mg/kg. Londoño (2012) en el municipio de San Pedro Antioquia-Colombia en hatos lecheros encontró valores para Pb 0,150 mg/kg, el cual está por encima de lo reportado en nuestra investigación.

Niveles de cadmio

La concentración de Cd en leche de diferentes especies (vaca, búfalo, cabra, oveja), se muestra en la figura 38. Los niveles de cd en la leche de ganado fue del orden de búfalo>oveja>cabra>vaca. Para este metal ni en el Codex Alimentarius ni en las normas colombianas existe un límite máximo. Sin embargo, las Normas de Rumania si consideran un valor máximo para Cd en leche de 0,01 ppm (Pernía et al., 2015). Esto implica que los valores encontrados en nuestra investigación están 5 veces por debajo del límite permitido. En Pakistán Ahmad et al. (2018) reportaron valores menores a los que nosotros encontramos de 0,002, 0,0021 ppm para la leche de búfalo y cabra respectivamente. De igual forma nuestros valores son mayores, a los mencionados en los estudios realizados por Reyes (2015) en leche de búfalo y vaca comercializada en Bogotá- Colombia donde hallaron niveles de Cd por debajo del límite de sensibilidad del equipo (menores a 0,2 ppb) También en fincas de la India Rashnnika et al. (2018) no detecto Cd en ninguna muestra de leche provenientes de búfalos, ovejas y cabras.

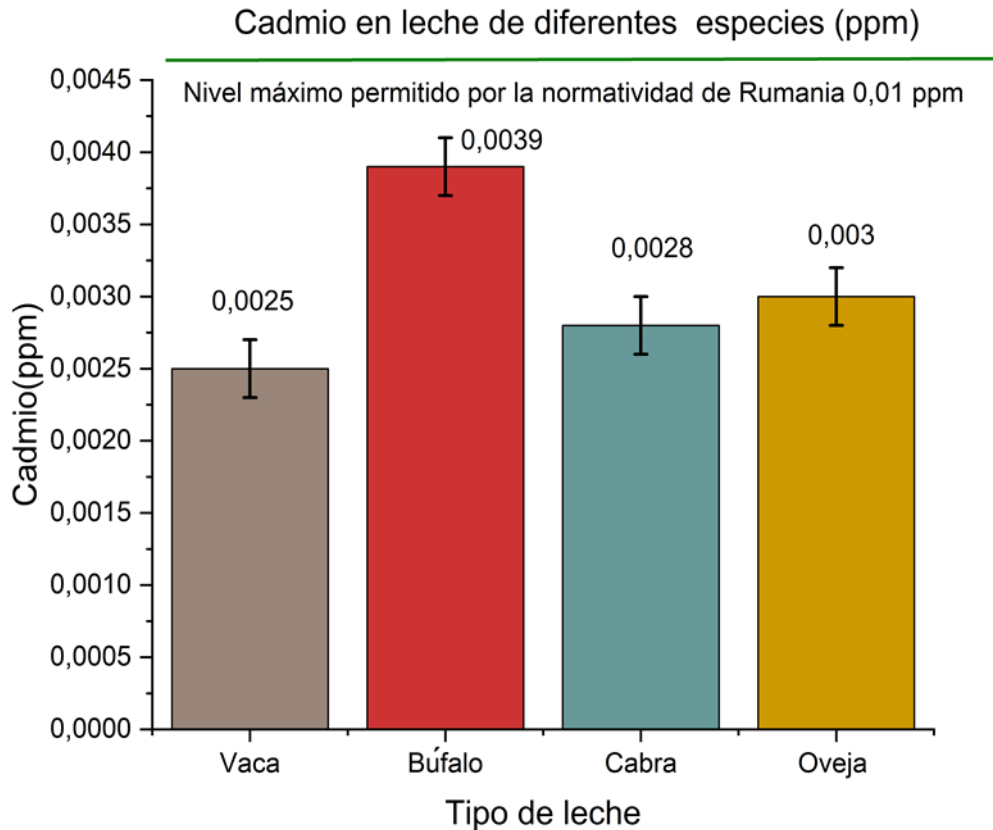


Figura 38. Concentración de cadmio en leche de diferentes especies (fuente el autor).

Niveles de cobre

En la figura 39 se puede visualizar la concentración de Cu en las muestras de leche. La mayor concentración se determinó en la leche de búfalo (0,507 ppm) y la menor concentración en la de oveja (0,352 ppm). Al igual que el Cd no se dispone de concentraciones máximas permitas por parte del codex alimentarius, ni por parte de las normas colombianas. La única referencia internacional es la normatividad de Rumanía que fija los niveles máximos permitidos de Cu en 0,05ppm en este alimento (Rodríguez et al.2017). La leche que estuvo por encima de los niveles máximos permitidos fue la leche de búfalo. Algunos investigadores han reportado valores mayores a los que nosotros hemos encontrado. Así en México Rojas et al. (2019) determinaron concentraciones de 0,67 ppm de cobre en vacas y búfalos alimentados con alfalfa producidas en sueros irrigados con aguas residuales. En otros estudios mencionan contenido menores por ejemplo en San Pedro Antioquia-Colombia Londoño (2012) reporto niveles de 0,19 ppm para ato lecheros.

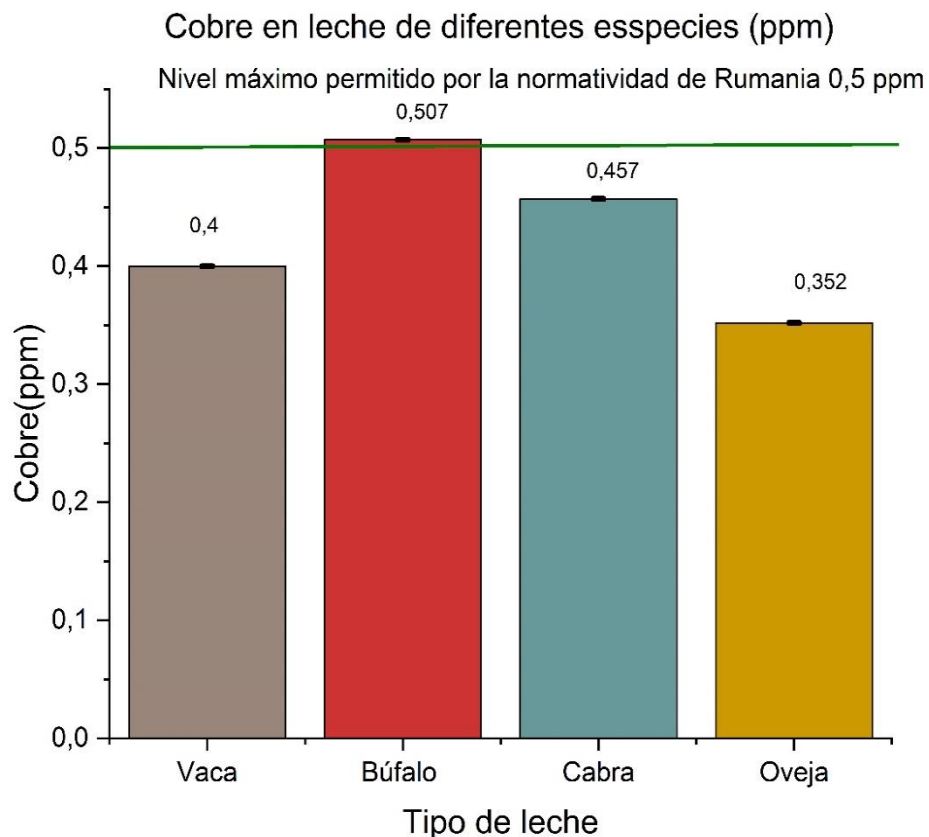


Figura 39. Concentración de cobre en la leche de diferentes especies (fuente el autor).

Niveles de zinc

La concentración de zinc metálico en todas las muestras de estudio se han dado en la figura 40. La concentración más alta de zinc (0,507 ppm) se encontró en la leche de búfalo y el nivel más bajo (2,410 ppm) en la leche de oveja. Todos los valores de estudio excepto el de la leche de búfalo estuvieron por debajo de la normatividad establecida en Rumanía. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ahamad et al. (2017) donde reportaron altas concentraciones de zinc en leche de búfalo (0,57 ppm) en Pakistán.

Niveles de arsénico y mercurio

Como se muestra en la tabla 8, los niveles de arsénico y mercurio para todas las muestras de leche estuvieron por debajo del límite de detección, presentado valores inferiores a 0,008 y 0,0010 ppb para el arsénico y mercurio respectivamente. Comparando con otros estudios realizado en diversos países sobre la presencia de arsénico en leche de diferentes especies, nuestros valores difirieron de los encontrados por investigadores como Beltran et al. (2015) donde encontraran

concentraciones de 0,04 ppb para leche fresca de ganado bovino y bufalino. De la misma forma los valores que hemos reportados son menores a los obtenidos en investigaciones realizadas en cinco ciudades de Pakistán por Ahamad et al. (2017) en leche de bufalo, cabra y vaca, donde encontraron niveles promedio de arsénico de 0,048 ppb.

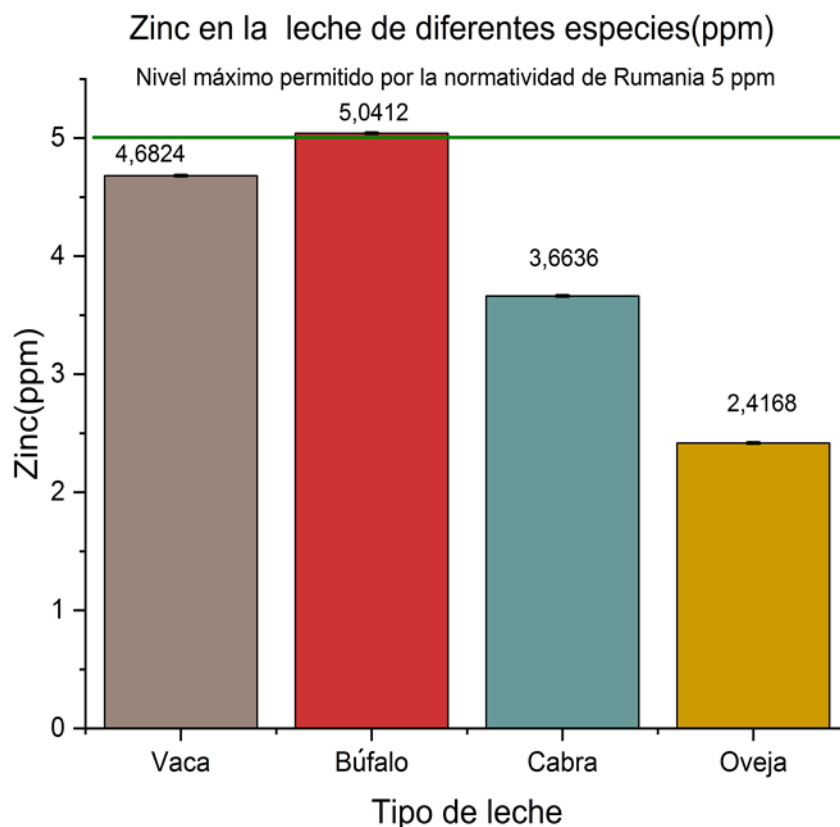


Figura 40. Concentración de zinc en la leche de diferentes especies (fuente el autor).

Como se puede observar en figura 37,39 y 40, la concentración de plomo, cobre y zinc, fue más alta en la leche de búfalo que en las otras especies. Rami (2015) relaciona la variación de metales pesados entre especies con el hábito de pastoreo no selectivo de las especies de búfalos el cual puede pastar en cualquier vegetación contaminada. Si bien el ganado es muy selectivo en los hábitos de pastoreo, es probable que evite el pastoreo o se alimente de fuentes de alimentos contaminados. Ahamad et al. (2017) menciona que la variación entre especies en el nivel de metales pesados podría deberse a la variación en los hábitos de alimentación, pastoreo, las características de disposición de especies particulares con respecto a los metales tóxicos y la intensidad de la exposición en términos de duración y

cantidad. Con relacion a las demás especies(Vaca, cabra, oveja) los niveles de metales pesados reportados en nuestro estudios estuvieron por debajo de los establecidos en distintas normatividades como el codex alimentarius y la normatividad de Rumanía que se utiliza de referencia en muchas investigaciones.

5 CONCLUSIONES

1. El análisis espectroscópico ATR-FTIR ha demostrado ser eficiente en la generación de datos importantes para la discriminación de leche de diferentes especies, demostrando un gran potencial para la determinación de los componentes principales de este alimento.
2. Se halló que los datos espectrales de orden cero en la región de huella dactilar son los que mejor discriminan la leche de diferentes especies, en el PCA sus dos primeras componentes explican el 97,25% de la varianza total.
3. Se encontró mayor porcentaje de área relativo de proteínas en la leche ovina y caprina en relación a la leche vacuna.
4. Se estableció que el mayor porcentaje de área relativo de lípidos se encuentra en la leche ovina y bufalina con respecto a la leche vacuna. El mayor porcentaje de área relativo de carbohidratos se halló en la leche ovina.
5. La determinación de metales pesados (arsénico, cadmio, cobre, mercurio y zinc) en leche de búfala, cabra, oveja y vaca, en la finca Villa Marina del municipio de Pamplonita, departamento de Norte de Santander (Colombia) mediante espectroscopia de absorción atómica, ha permitido comprobar que las concentraciones de metales pesados en la leche de cabra, oveja y vaca está por debajo de los límites permitidos por muchas normativas internacionales como el codex alimentarius y las establecidas en Rumania.
6. La determinación del metal pesado Plomo en leche arrojó niveles ligeramente superiores a lo reportado por el codex alimentarius, para las especies bufalina y vacuna, muy posiblemente debido a la cercanía de los principales potreros de la granja villa marina con la vía que tiene un alto flujo vehicular, el cual arroja altos niveles de metales pesados como Pb, al medio ambiente.
7. Socialización de resultados de esta investigación en encuentro regional y nacional de semilleros: Los resultados de esta investigación fueron socializados en VII encuentro departamental de semilleros, organizado por la fundación RedCOLSI el día 29 de agosto del 2021, asimismo se participó en el XXIV encuentro nacional de semilleros el días 2 de noviembre del presente año, el cual fue organizado por esta misma fundación.

6 RECOMENDACIONES

1. Investigar en futuros trabajos la temática planteada en distintas zonas del departamento de Norte de Santander, además en distintas épocas del año (factores que afectan la composición de la leche), con el fin de general información de los principales componentes de la leche de diferentes especies.
2. Se recomienda seguir utilizando la espectroscopia FTIR, acoplada con la quimiometría para el estudio de la leche, incorporando modelos de regresión lineal como PLS para determinar el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos en este alimento.
3. Utilizar la FTIR con el análisis de componentes principales PCA, para determinar adulterantes en la leche, debido a que en nuestra revisión de la literatura algunos autores discriminan la leche con alto contenido de agua, evidenciando como se crea agrupamientos y separaciones de la leche fraudulenta.
4. Realizar un estudio del agua y de los forrajes de la finca Villa Marina, con esto se corroboran los resultados encontrados en el análisis de metales pesados, además con el fin de establecer como se relacionan la alimentación y la fuente de agua con el contenido de plomo en la leche de búfalo, el cual estuvo por fuera de los límites establecidos por el codex alimentarius
5. Priorizar por parte de las directivas de la granja el mejoramiento de potreros en el parte alta de la granja de forma que el ganado bovino y bufalino pastoree lo más lejos posible de las vías de alto flujo vehicular.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Ashraf, F., Frederick, R., Voort, v., & Sedman, J. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Principles and Applications . En *instrumental methods in food analysis* (págs. 94-125). Quebec, Canada: H9X3v9.
- Acevedo, A., & López, C. (2017). Verificación de los métodos para el análisis proximal en la leche entera en el laboratorio de análisis de aguas y alimentos de la universidad tecnológica de Pereria. . Pereria, Colombia : Universidad tecnológica de Pereria.
- Ahmad, L., Zaman, A., Samad, N., Mazhar, M., Rukh, S., & Ullah, N. (2017). Atomic Absorption Spectrophotometry Detection of Heavy Metals in Milk of Camel, Cattle, Buffalo and Goat from Various Areas of Khyber- Pakhtunkhwa - Pakhtunkhwa. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*,8, 34-42.
- Aidawarti, S., selamat, j., Yong, G., & Nuzul, A. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis of milk from different goat breeds. *International Journal of foo*,22, 1673-1783.
- Andrade, J., Pereira, C., Almeida, J., Carvalho, C., Oliveira, L., Fonseca, P., . . . Carvalho, V. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT - Food Science and Technology* 99, 166-172.
- Amartey, E., Asumadu, A., Quashie, F., Duodu, G., & Bentil, N. (2017). Determination of Heavy Metals Concentration in Hair Pomades on the Ghanaian Market Using Atomic Absorption Spectrometry Technique. *British Journal of Pharmacology and Toxicology* , 192-197.
- Arroyo, J. (2011). Estacionalidad reproductiva de la oveja en México. *Revised received*, 115-120.
- Amazon, K., Solon, F., & Rywlin, A. (2016). Separation of Bilirubin from Hemoglobin by Recording Derivative Spectrophotometry. *American Society of Clinical Pathologists*, 519-526.
- Ayala, J., & Romero, H. (2013). Presencia de metales pesados (arsénico y mercurio) en leche de vaca al sur de ecuador. *scientific paper*, 36-43.
- Badui, S. (2016). Química de los alimentos. En S. Badui Dergal . Ciudad de México: Pearson Educación de México.
- Barłowska, J., Szwajkowska, M., & Litwińczuk, Z. (2016)). Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Food Science and Food Safety*,, 261-291. kk

- Berzins, K., Harrison, S., Leong, C., Fraser, M., & Haper, D. (2020). Qualitative and quantitative vibrational spectroscopic analysis of macronutrients in breast milk. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 246, 1-7.
- Botelho, B., Nádia, R., Lendros, S., & Olivera, M. (2016). Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using. *Food Chemistry*, 181, 31-37.
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Christopher, J. C. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest Biology and Technology* 148, 1-14.
- Buscio V., Álvarez, D., & Gutiérrez, C. (2009). Determinación de metales pesados en tejidos mediante espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica. *Boletín intexter (U.PC)*, 17-23.
- Castano Vidriales, J. (1991). Espectroscopía de derivada en química clínica. *Química Clínica*, 348-358.
- Castro, N., Moreno, R., Calderón, F., Moreno, A., & Tamariz, J. V. (2018). Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 15-24.
- Castillo, K. K. (2018). Caracterización Físicoquímica y Organoléptica de leche entera ultrapasteurizada (UHT) procesadas en las empresas lácteas establecidas en Nicaragua. Managua-Nicaragua: Universidad autónoma de Nicaragua.
- Cebi, N., Durak, Z., Said, O., Sagdic, O., & Muhammet, A. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins . *Food Chemistry* 190, 1109-1115.
- Chavez, M., Margalef, M., & Martínez, C. (2018). Cuantificación de lipólisis en la Leche Caprina (Saaned) Cruda y Térmicamente Tratada. *Inta*, 6, 9-17.
- Cirak, O., Cihat, I., & Durak, Z. (2018). Rapid detection of adulteration of milks from different species using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). *Journal of Dairy Research*, 85, 222-225.
- Ciarán, Ó. F. (2019). Lyophilization of Proteins. *Molecular Biology* 44, 309-321.
- Clua, G. P., Nikolic, S., Coello, J., & Maspoch, S. (2020). Robust freeze-drying process re-design of a legacy product based on risk analysis and design of experiments. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36, 2-8.
- Díaz, F., & Fresco, L. (2011). Estudio de la leche en el departamento de Norte de Santander. *Revista colombiana de Química*.

- Fernández, A. (2017). Composición, cualidades y beneficios de la leche de cabra: revisión bibliográfica. *Rev. prod anim*,56, 32-41.
- Faye, B., & Konuspayeva, G. (2019). The sustainability challenge to the dairy sector e The growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*, 50-56.
- Figueredo , G. M. (2020). *La cabra para los millenials. un diagnóstico frente a los conocimientos, actitudes y prácticas de la leche de cabra y sus productos derivados* . Medellin, Colombia: Universidad Eafit.
- Gabara, S., & Konar, H. (2018). Biodiversity loss leads to reductions in community-wide trophic complexity. *Ecosphere*.
- Gallegos, W., Vega, M., & Noriega, P. (2012). Espectroscopía de absorción atómica con llama y su aplicación para la determinación de plomo y control de productos cosméticos. *CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana*, 22-26.
- Grauer, A., Grunberg , K., & Zardo, S. (2015). *Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos*. Montevideo, Uruguay: Universidad ORT Uruguay.
- Gaucheron, F. (2013). Diversité des laits et des produits laitiers dans le monde. *Collection culture des laits du monde*, 174-185.
- Gantner, V., Mijić, M., Škrtić, Z., & Turalija, A. (2016). The overall and fat composition of milk of various species. *University of Josipa Jurja*,6, 56-61.
- Gobernación Norte de santander instituto departamental de salud. (2016). *análisis de situación de salud (asis) en municipios de frontera*. Cucuta,Norte de Santander.
- González, J. R. (2009). Metales pesados en carne y leche y certificación para la Unión Europea (UE). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 2256-2259.
- González, V., Ramírez, J., & Jaramillo, D. (2019). Manual de producción y consumo Sostenible Gestión de recursos Hídricos. En *Produccion lechera en el departamento de Antioquia* .
- Granados, C., Meza, R., & Acevedo, D. (2015). Elaboración de Queso de Capa a partir de Leche de Búfala del Municipio Carmen de Bolívar (Colombia). *Inf. tecnol*,25, 147-155
- Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., & Apostolopoulos, S. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of physicochemical changes in UHT milk during accelerated storage. *International Dairy Journa*,66, 99-107.

- Gutiérrez, R., Vega, S., Sanchez, M., Coronado, M., Ramírez, A., & González, M. (s.f.). Detection of non-milk fat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. *Journal of Dairy Science* 92, 1846-1855.
- Ibrahim, A., & Khalifa, S. A. (2015). Effect of freeze-drying on camel's milk nutritional properties. *International Food Research Journal* 22, 138-145.
- Jaiwas, P., Narayan, S., Borah, A., Gautam, A., & K, M. (s.f.). Detection and quantification of soymilk in cow–buffalo milk using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 13, 42-48.
- Kaur, M., Chandrapala, J., Donkor, O., & Apostolopoulos, V. (66). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of physicochemical changes in UHT milk during accelerated storage. *International Dairy Journal*, 126-138.
- Kher, A., Udabage, P., McKinnon, I., Naughton, D., & Augustin, M. (2017). FTIR investigation of spray-dried milk protein concentrate powders. *Vibrational Spectroscopy* 44, 375-378.
- Kohler, A., Kristian, N., Jørgensen, K., Randby, A., & Martens, H. (2010). Quality analysis of milk spectroscopy. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 6-10.
- Kupletskaya, M., & Netrusov, A. (2011). Viability of Lyophilized Microorganisms after 50Year Storage. *Microbiology*, 842-846.
- Krzysztof, B., Grabska, J., & Christian, W. (2020). Biomolecular and bioanalytical applications of infrared spectroscopy-A review. *Analytica Chimica Acta* 113, 150-177.
- La guía* . (2019). Obtenido de http://www.metas.com.mx/guiametas/La-Guia-MetAs-12-02-Espectrometria_infrarroja.pdf
- Lastre, G., Carrero, C., Delgado, F., Suarez, M., & Granadillo Morán, V. (2019). Concentraciones de los oligoelementos cobre y zinc en leche materna, de vaca y de cabra. *Revista Cubana de Pediatría*, 649-655.
- Layane, L., Vinciguerra, M., Tanara, M., Motta, L., & Bergold, A. (2018). Chemometri tools and FTIR Spectroscopy Applied in Milk Adulterate with Chesse. *Quim. Nova*, 42, 249-254.
- Loera, J., & Banda, J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 4-11.
- Londoño, L. (2012). *Presencia de metales pesados en hatos lecheros de los municipios de Sanpedro y Entrerrios, Antioquia, Colombia*. León-España: Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Veterinaria.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., & Summer, A. (2002). Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional. *International Dairy Journal*, 869-877.

- Macho, S. (2012). *Metodologías analítica basada en espectroscopia de infrarrojo y calibración multivariante*. Tarranao España: Universidad Rovira Virgili.
- Mata, L., Sánchez, L., & Calvo, M. (2016). Mercurio en leche. *Toxicología*, 136-142.
- Ministerio de salud y protección social . (2010). *Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia*. Obtenido de https://www.icbf.gov.co/sites/default/files/libro_2005.pdf
- Moros , J. (2007). Tratamiento numérico de los datos en el análisis cuantitativo por espectrometría vibracional. en *tratamiento numérico de los datos en el análisis cuantitativo por espectrometría vibracional* (págs. 45-47). Valencia, España: Departamento de Química Analítica Campus de Burjassot .
- Moscoso, C. (2003). *Determinación de metales formadores de vapor mediante generación de hidruros acoplada a espectroscopia de absorción* . Coruña, España: Universidad de cataluña.
- Mondragón, C. (2020). La espectroscopia FTIR-ATR aplicada al análisis de alimentos y bebidas. En *Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos* (págs. 90-110). Zapopan, Jalisco, México: Conacty.
- Muhib, M., Alamgir, M., Easha, N., Rahman, R., Shammi, M., Fardous, M., . . . Uddin, K. (2016). Investigation of heavy metal contents in Cow milk samples from area of Dhaka, Bangladesh. *International Journal Contamination*, 311-320.
- Nicolaou, N., & Goodacre, R. (2018). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in milk using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal Homepage* 21, 97-110.
- Numpaque, M., Sanli, T., & Ayse, E. (2019). Diversity of Milks Other Than Cow, Sheep, Goat and Buffalo. *Turkish Journal of Agriculture*, 7, 2047-2053.
- Ocampo G., Restrepo V., & Cardona C., (2016). Estudio comparativo de parámetros composicionales y nutricionales en leche de vaca, cabra y búfala, Antioquia,. *Revista colombiana de ciencia* , 177-186.
- Owen R, F., & Tannenbaum R, S. (2017). *Introducción a la química de los alimentos* . North Carolina: Massachusetts Institute of Technology.
- Prieto , J., González, C. A., & Román Gutiérrez, A. D. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 29-44.
- publicaciones de la FAO. (17 de 09 de 2020). *Portal lácteo*. Obtenido de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/>
- Puebla*. (05 de 08 de 2019). Obtenido de <https://www.lechepuleva.es/leche/valor-nutritivo-leche>

- Pernía, B., Mero, M., Bravo, K., Ramírez, N., López, D., & Muñoz, J. (2015). Detección de cadmio y plomo en leche de vaca comercializada en la ciudad de Guayaquil, Ecuador. *Cien.Nat*, 81-85.
- Ramírez, J. S. (2006). *LIOFILIZACIÓN DE ALIMENTOS*. Cali, Colombia: Recitela.
- Ramírez, A., Vega, S., Prado, G., & Gutiérrez, T. (2019). Aplicación de tres métodos analíticos para la detección de suero de quesería en la leche UHT comercializada en la ciudad de México. *Asociación Interciencia* 34, 406-412.
- Rahimi, E. (2015). Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 136, 389-391.
- Rashmika, R., Patel, H., Singh, R., Sarvaiya, V., Pawar, M., & Mody, S. (2018). Heavy Metal Concentrations with Regard to Inter-Species Variation in Cattle and Buffalo Milk Collected from Different Areas of North Gujarat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 1774-1784.
- Reyes, N. (2015). *Determinación de los niveles de plomo y cadmio en leche procesada en la ciudad de Bogotá*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 66-67.
- Rodríguez, H., Sánchez, E., Vidales, J., Acuña, A., Martínez, G., & Rodríguez, J. (2017). Metales pesados en leche cruda de bovino. *Revista de alimentos de México*, 124-134.
- Rosch, P., Schmitt, M., & Kiefer, W. (2013). The identification of microorganisms by micro-Raman. *Journal of Molecular Structure* 661, 363-369.
- Rubio, C., Martín, A. J., Revert, R. E., & Lozano, H. (2016). El plomo como contaminante alimentario. *Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna*, 72-77.
- Rutten, M., Bovenhuis, H., Heck, J., & Arendonk, M. (2018). Predicting bovine milk protein composition based on Fourier transform infrared spectra. *American Dairy Science Association* 7, 5683-5690.
- Rojas, R., Sánchez, F., Ortega, A., & Flores, J. (2018). Metales pesados en leche de vacas alimentadas con alfalfa producida en suelos irrigados con aguas residuales en Puebla y Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9, 3-10.
- Rohman, A., & Man, C. (2016). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive. *Food Research International* 43, 886-892.
- Rubison, K., & Rubison, J. (2019). Análisis instrumental. En *Análisis instrumental* (págs. 455-459). Madrid, España: Pearson Educación.

- Rúa, C. V. (2015). Evaluación del efecto del sistema de producción sobre el consumo de alimento y la producción de leche en cabras saanen y alpina. En *Descripción de la Leche de cabra* (págs. 37-41). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, facultad de ciencias exactas y naturales.
- Salcedo, J., Gormaz, M., López, M., Nogarotto, E., & Silvestre, D. (2016). Human milk bactericidal properties: Effect of lyophilization and relation to maternal. *Nutrition*, 63, 527-511.
- Silval, L. R., Goncaves, F. F., & Santos, S. F. (2020). Métodos espectroscópicos (FTIR-ATR) y herramientas quimiométricas para detectar la adición de la leche de vaca a la leche de búfala. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19, 11-20.
- Sanz, M. R., Fernández, J. R., Torre, G., Ramos, E., Carmona, F. D., & Boza, J. (2003). Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 16, 155-166.
- Skoog, D., James, H., & Timothy, N. (2019). Principio de análisis instrumental de Skoog. Pamplona Norte de Santander : Mc Graw Hill.
- Terapoulou, M., Kokkinafta, R., & Theocharis, C. (2020). Chemometric analysis combined with FTIR spectroscopy of milk and Halloumi cheese samples according to species' origin. *Food Science y nutrición*, 8, 3262-3273.
- Vandevoort, F. R. (1980). Evaluation of Milkoscan 104 Infrared Milk Analyzer. *Off. Anal. chem.* 63, 973-980.
- Velioglu, S., Ercioglu, E., & Boyaci, H. (2017). Rapid discrimination between buffalo and cow milk and detection of adulteration of buffalo milk with cow milk using synchronous fluorescence spectroscopy in combination with multivariate methods. *Journal of Dairy Research*, 6, 1-6.
- Yang, Y., Kasper, A., Erasmu, W. S., & Pustjens, A. M. (2020). Opportunities for fraudsters: When would profitable milk adulterations go unnoticed by common, standardized FTIR measurements? *Food Research*, 6, 14-20.
- Zeini, E. (2016). Microstructure Rheologia and Geometrical Properties of Fat Globules of Milk from different Animal Species. *Polish Journal*, 17, 147-154.