

CONICET



Universidad Nacional de Salta

Trabajo de Tesis de Postgrado
presentado para la obtención del Grado
de Doctor en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos, con Orientación en Ciencia.

**Formulación de Queso Mozzarella a
base de Leche de Cabra, con
adición de Fitoesteroles.**

Lic. Noelia Fernanda Paz

Año 2018

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el marco de la carrera de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, en el Instituto de Investigaciones para la Industria Química de la Universidad Nacional de Salta, a través de las becas de posgrado Tipo I y Tipo II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Directora de Tesis

Mgs. Adriana Noemí Ramón – U.N.Sa.

Codirectora de Tesis

Ing. Margarita Armada – U.N.Sa.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su aporte a la realización de la presente tesis a través de su programa de becas doctorales.

A la Universidad Nacional de Salta (U.N.Sa.) y su Centro de Investigaciones (C.I.U.N.Sa.) por el financiamiento del proyecto en el cual se enmarcó el desarrollo del trabajo.

A mi directora Mgs. Adriana Ramón por brindarme la posibilidad de integrar su grupo académico. Por su asesoramiento y apoyo en mis primeros pasos en la investigación, y por la confianza depositada en mí. A mi co-directora Ing. Margarita Armada, por el tiempo que me ha dedicado, y por su contribución durante el desarrollo de la tesis. A ambas, gracias por su dedicación, consejos, apoyo, paciencia, tiempo y ayuda que me han brindado en cada momento.

A la Dra. Mónica Chávez y Dra. María Alicia Judis, por el tiempo dedicado en el seguimiento de este trabajo.

Al Tribunal Evaluador Dr. Rubén Oliszewski, Dra. María Alicia Judis y Dr. Sergio Rozycki, por su interés en la evaluación de la presente tesis y sus aportes realizados.

A la Estación Experimental Agropecuaria del INTA-Cerrillos, especialmente a la Dra. Mónica Chávez, Ing. Silvia Orozco, Tec. Virginia Sánchez y Lic. Nancy Torres, por la capacitación y ayuda brindadas.

A las Facultades de Ciencias de la Salud y de Ingeniería de la U.N.Sa. por el espacio y recursos brindados en mis carreras de grado y postgrado.

A Advanced Organic Materials S.A. por la donación de los fitoesteroles.

Al I.P.E. (Instituto de Patología Experimental) por el espacio cedido en el Bioterio, a la Facultad de Ciencias de la Salud (U.N.Sa.) por la financiación de los recursos necesarios para llevar a cabo los ensayos biológicos, y especialmente a Alejandra Ardaya, José Solís, Marisa Rivas y Enzo Goncalvez de Oliveira, por su colaboración con el manejo de los animales.

A todos los participantes del proyecto de investigación en el que se encuadró la presente tesis, por su aporte al desarrollo del mismo, especialmente a Enzo Goncalvez de Oliveira y Fernando Villalva.

A todos los integrantes del Laboratorio de Alimentos, por su amistad y compañerismo dentro y fuera de la Universidad.

A mi madre Olga y mi abuela Erminia, por su amor infinito y apoyo incondicional.

A mis familiares y amigos por acompañarme en cada etapa de mi vida. Y a Dios.

A todos, GRACIAS!

Noelia

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACV: Accidente Cerebro Vascular

ADGA: American Dairy Goat Association

AGLT: Ácidos Grasos Libres Totales

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos, y Tecnología Médica

AOMSA: Advanced Organic Materials S.A.

BPM: Buenas Prácticas de Manufactura

CAA: Código Alimentario Argentino

CT: Colesterol Total

EC: Enfermedad/es Cardiovascular/es

ECC: Enfermedad Coronaria del Corazón

ECV: Enfermedad Cerebro Vascular

EEA: Estación Experimental Agropecuaria

ENT: Enfermedades No Transmisibles

FDA: Food and Drugs Administration

HDL: Lipoproteína de Alta Densidad (colesterol bueno)

IA: Índice Aterogénico

IDF: Internacional Dairy Federation

IDR: Ingesta Diaria Recomendada

IISA: Instituto de Investigaciones Sensoriales de Alimentos

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad (colesterol malo)

nm: nanómetros

OMS: Organización Mundial de la Salud

ppm: parte por millón

RQ: Rendimiento Quesero

TG: Triglicéridos

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

UNLu: Universidad Nacional de Luján

UNSa: Universidad Nacional de Salta

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | 5 |
| ÍNDICE GENERAL..... | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 14 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 19 |
| CAPÍTULO I..... | 23 |
| MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS..... | 23 |
| 1 MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS | 24 |
| 1.1 MARCO TEÓRICO..... | 24 |
| 1.2 OBJETIVOS | 26 |
| 1.2.1 Objetivo General..... | 26 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos | 26 |
| 1.3 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE TESIS | 27 |
| 1.4 FINANCIAMIENTO Y LUGAR DE REALIZACIÓN..... | 28 |
| 1.5 REFERENCIAS..... | 30 |
| CAPÍTULO II | 32 |
| LECHE DE CABRA | 32 |
| 2 LECHE DE CABRA..... | 33 |
| 2.1 INTRODUCCIÓN | 33 |
| 2.1.1 Definición | 33 |
| 2.1.2 Propiedades físico-químicas..... | 33 |
| 2.1.3 Características organolépticas | 38 |
| 2.1.4 Producción de leche de cabra | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.2 | OBJETIVO..... | 38 |
| 2.3 | MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 2.3.1 | Materiales | 39 |
| 2.3.2 | Métodos | 39 |
| 2.4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 2.4.1 | Análisis físico-químicos de la leche de cabra | 57 |
| 2.4.2 | Análisis microbiológicos..... | 63 |
| 2.5 | CONCLUSIONES..... | 66 |
| 2.6 | REFERENCIAS..... | 67 |
| | CAPÍTULO III | 72 |
| | QUESO MOZZARELLA DE CABRA..... | 72 |
| 3 | QUESO MOZZARELLA DE CABRA | 73 |
| 3.1 | INTRODUCCIÓN | 73 |
| 3.1.1 | Definición | 73 |
| 3.1.2 | Producción de quesos a base de leche de cabra | 76 |
| 3.2 | OBJETIVOS | 78 |
| 3.3 | MATERIALES Y MÉTODOS | 78 |
| 3.3.1 | Materiales | 78 |
| 3.3.2 | Métodos | 79 |
| 3.4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 90 |
| 3.4.1 | Estandarización de la concentración de cultivos lácticos liofilizados a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella | 90 |
| 3.4.2 | Estandarización de la concentración de enzima coagulante quimosina a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella | 92 |
| 3.4.3 | Elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra | 92 |
| 3.4.4 | Análisis físico-químicos del queso mozzarella de cabra | 94 |

| | | |
|-------------------------------|--|------------|
| 3.4.5 | Análisis del Perfil de Textura (APT)..... | 99 |
| 3.4.6 | Microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 101 |
| 3.4.7 | Análisis de color..... | 104 |
| 3.5 | CONCLUSIONES..... | 106 |
| 3.6 | REFERENCIAS..... | 108 |
| CAPÍTULO IV..... | | 114 |
| LOS FITOESTEROLES..... | | 114 |
| 4 | LOS FITOESTEROLES..... | 115 |
| 4.1 | INTRODUCCIÓN..... | 115 |
| 4.1.1 | Generalidades..... | 115 |
| 4.1.2 | Definición..... | 116 |
| 4.1.3 | Mecanismo de acción..... | 117 |
| 4.1.4 | Fuentes naturales de fitoesteroles en alimentos..... | 117 |
| 4.1.5 | Los fitoesteroles y los alimentos..... | 119 |
| 4.1.6 | Estudios clínicos con alimentos..... | 120 |
| 4.2 | OBJETIVOS..... | 121 |
| 4.3 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 121 |
| 4.3.1 | Materiales..... | 121 |
| 4.3.2 | Métodos..... | 122 |
| 4.4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 135 |
| 4.4.1 | Ensayo F61L..... | 136 |
| 4.4.2 | Ensayo F98L..... | 150 |
| 4.4.3 | Ensayo F98HM..... | 156 |
| 4.4.4 | Ensayo F98HMPer..... | 162 |
| 4.4.5 | Ensayo F98LipLec..... | 164 |
| 4.4.6 | Ensayo F98LipGrs..... | 167 |

| | | |
|---|---|------------|
| 4.4.7 | Ensayo F98GT | 168 |
| 4.4.8 | Ensayo F95HM | 170 |
| 4.4.9 | Ensayo F98Inyec | 171 |
| 4.5 | CONCLUSIONES..... | 180 |
| 4.6 | REFERENCIAS..... | 182 |
| CAPITULO V..... | | 192 |
| ENSAYOS BIOLÓGICOS | | 192 |
| 5 ENSAYOS BIOLÓGICOS | | 193 |
| 5.1 | INTRODUCCIÓN | 193 |
| 5.1.1 | Generalidades | 193 |
| 5.1.2 | Dislipemias: Definición y clasificación | 193 |
| 5.1.3 | Índice aterogénico (IA)..... | 195 |
| 5.1.4 | Ensayos biológicos en animales..... | 195 |
| 5.2 | OBJETIVOS | 198 |
| 5.3 | MATERIALES Y MÉTODOS | 199 |
| 5.3.1 | Materiales | 199 |
| 5.3.2 | Métodos | 200 |
| 5.4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 205 |
| 5.4.1 | Dietas..... | 205 |
| 5.4.2 | Diseño experimental | 206 |
| 5.4.3 | Análisis bioquímicos | 206 |
| 5.5 | CONCLUSIONES..... | 219 |
| 5.6 | REFERENCIAS..... | 220 |
| PROYECTO DE VINCULACIÓN TECNOLÓGICA..... | | 224 |
| CONCLUSIONES..... | | 241 |

| | |
|---|------------|
| PERSPECTIVAS FUTURAS..... | 243 |
| ANEXOS | 245 |
| ANEXO I..... | 246 |
| ESPECIFICACIONES DE LOS FITOESTEROLES ESTERIFICADOS (61,20 %) | 246 |
| ANEXO II..... | 249 |
| ESPECIFICACIONES DE LOS FITOESTEROLES ESTERIFICADOS (97-99 %) | 249 |
| ANEXO III..... | 250 |
| ESPECIFICACIONES DE LOS FITOESTEROLES EN POLVO (95 %)..... | 250 |
| PUBLICACIONES..... | 252 |
| TRABAJOS COMPLETOS EN REVISTAS INTERNACIONALES..... | 253 |
| TRABAJOS COMPLETOS EN REVISTAS NACIONALES | 254 |
| RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES.. | 255 |
| RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES | 256 |

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Requisitos físico-químicos de la leche de cabra. | 37 |
| Tabla 2. Características físico-químicas de la leche de cabra. | 57 |
| Tabla 3. Calidad microbiológica de la leche de cabra. | 63 |
| Tabla 4. Características físico-químicas del queso mozzarella. | 74 |
| Tabla 5. Combinaciones de cultivo starter, en diferentes relaciones y concentraciones, utilizadas para alcanzar un pH de 6,0. | 79 |
| Tabla 6. Codificación de los Quesos Mozzarella de Cabra hilados a diferentes pH. | 81 |
| Tabla 7. Tiempos registrados de acuerdo a las diferentes combinaciones de cultivo lácticos liofilizados utilizados durante la etapa de pre-maduración. | 91 |
| Tabla 8. Parámetros físico-químicos de la leche utilizada en la elaboración de los quesos mozzarella. | 95 |
| Tabla 9. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra. | 96 |
| Tabla 10. Parámetros texturales de los quesos mozzarella a base de leche de cabra. | 99 |
| Tabla 11. Parámetros de color de los quesos mozzarella a base de leche de cabra. | 104 |
| Tabla 12. Contenido promedio de fitoesteroles contenidos por porción de alimento. | 118 |
| Tabla 13. Formas de incorporación de fitoesteroles durante el proceso de obtención del queso mozzarella a partir de leche de cabra. | 123 |
| Tabla 14. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada (F61L). | 137 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 15. pH de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 139 |
| Tabla 16. Proteínas ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 140 |
| Tabla 17. Grasa ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 141 |
| Tabla 18. Sólidos Totales ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 142 |
| Tabla 19. Cenizas Totales ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 143 |
| Tabla 20. Calcio ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 144 |
| Tabla 21. Fósforo ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 145 |
| Tabla 22. Sodio ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 146 |
| Tabla 23. Humedad ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L). | 147 |
| Tabla 24. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en el ensayo F98L..... | 150 |
| Tabla 25. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L)..... | 152 |
| Tabla 26. Textura de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L). | 154 |
| Tabla 27. Color de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L). | 155 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 28. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L). | 156 |
| Tabla 29. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en este método (F98HM). | 157 |
| Tabla 30. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98HM). | 158 |
| Tabla 31. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de la muestra F98HM10. | 162 |
| Tabla 32. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en el ensayo F98Inyec. | 174 |
| Tabla 33. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98Inyec). | 176 |
| Tabla 34. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98Inyec). | 179 |
| Tabla 35. Composición de las dietas estándar AIN 93 M (GI) y modificada hipergrasa (GII, GIII, GIV y GV), administradas a los animales. | 201 |
| Tabla 36. Composición de las dietas suplementadas con quesos mozzarella a base de leche de cabra, sin fitoesteroles (F98InyecPatrón), y con el compuesto al 3,33 g% (F98Inyec3) y al 6,66 g% (F98Inyec6). | 202 |
| Tabla 37. Distribución por grupos de los animales de experimentación ($n = 4$). | 203 |
| Tabla 38. Valores de Glucemia (mg/dl) en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 207 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 39. Valores de CT en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 209 |
| Tabla 40. Valores de HDL en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 211 |
| Tabla 41. Valores de LDL en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 212 |
| Tabla 42. Valores de TG en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 214 |
| Tabla 43. Valores de IA en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 216 |

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Flujograma de elaboración de los quesos mozzarella a base de leche de cabra. | 82 |
| Figura 2. Concentración de quimosina ($\text{g}/100\text{mL}^{-1}$) y dureza (g) de la cuajada de los quesos mozzarella a base de leche de cabra. | 92 |
| Figura 3. Flujograma definitivo de la elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra. | 93 |
| Figura 4. Fotografías de los diferentes estados de la cuajada: (A) a los 15 min, (B) a los 90 min, (C) a los 150 min; y del queso mozzarella a base de leche de cabra: (D) producto terminado. | 100 |
| Figura 5. Microestructura de los quesos mozzarella de cabra hilados a diferentes puntos de pH de desuerado: 5,0 (MC50), 5,3 (MC53) y 5,6 (MC56). | 102 |
| Figura 6. Dimensiones de los hilos presentes en los quesos mozzarella de cabra amasados a diferentes puntos de pH de desuerado: 5,0 (MC50), 5,3 (MC53) y 5,6 (MC56). | 103 |
| Figura 7. Estructura química de los principales fitoesteroles y fitoestanoles. . | 116 |
| Figura 8. Flujograma de elaboración de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con adición de fitoesteroles. | 124 |
| Figura 9. Flujograma de obtención de microcápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroles. | 128 |
| Figura 10. Flujograma de obtención de microemulsiones en métodos F98LipLec, F98LipGrs y F98GT, conteniendo fitoesteroles. | 131 |
| Figura 11. Evolución del parámetro L^* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10. | 148 |

| | |
|--|-----|
| Figura 12. Evolución del parámetro a^* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10. | 148 |
| Figura 13. Evolución del parámetro b^* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10. | 149 |
| Figura 14. Cápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroles. | 163 |
| Figura 15. Cápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroles, distribuídas en la matriz del queso mozzarella a base de leche de cabra. | 163 |
| Figura 16. Microemulsión de leche de cabra + lecitina + fitoesteroles (liposomas). | 164 |
| Figura 17. Masa del queso mozzarella desgranada. | 166 |
| Figura 18. Separación de fases de emulsión liposomal con leche de cabra + grasa de leche de cabra + fitoesteroles, a las 12 horas. | 167 |
| Figura 19. Incorporación de la emulsión leche de cabra + goma tragacanto + fitoesteroles | 168 |
| Figura 20. Queso mozzarella a base de leche de cabra, sin retención de fitoesteroles en su matriz. | 169 |
| Figura 21. Queso mozzarella a base de leche de cabra, con fitoesteroles en polvo, adicionados en la etapa de hilado final y moldeado. | 170 |
| Figura 22. Dispositivo de inyección múltiple para incorporación de fitoesteroles al queso mozzarella a base de leche de cabra. | 171 |
| Figura 23. Inyección de fitoesteroles al queso mozzarella a base de leche de cabra. | 172 |
| Figura 24. Fitoesteroles inyectados al queso mozzarella a base de leche de cabra (superficie del producto). | 172 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25. Fitoesteroles inyectados al queso mozzarella a base de leche de cabra (interior del producto). | 173 |
| Figura 26. Ingesta de dieta AIN 93 M de los animales..... | 206 |
| Figura 27. Fracciones de HDL, LDL y otras lipoproteínas, respecto al CT, para los GI, GII, GIII, GIV y GV, según Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento. | 213 |
| Figura 28. Promedio del registro de peso corporal de los animales, por grupo (GI, GII, GIII, GIV y GV), según semana..... | 218 |

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS

1 MARCO TEÓRICO Y OBJETIVOS

1.1 MARCO TEÓRICO

A nivel mundial, son aproximadamente 17 millones las personas que mueren cada año por causas como el IAM y el ACV, y estos sucesos tienen una directa relación con la hipercolesterolemia, al incrementar el riesgo de padecer este tipo de episodios coronarios (Romero Palacio, & Vásquez Trespalacios, 2012).

En la Argentina, las ENT explican más del 60 % de las muertes, y particularmente la EC se asocia a una elevada morbilidad, reduciendo los años de vida en un 16 %. Es por ello, que nuestro país implementa el Programa Nacional de Prevención de Enfermedades Cardiovasculares que propone como lineamientos estratégicos la promoción de alimentos procesados saludables y la priorización en áreas de investigación relacionadas (Ministerio de Salud, 2011).

En este sentido, la investigación científica, la innovación tecnológica y la actual tendencia hacia lo saludable revolucionaron la industria alimenticia con el nuevo concepto de *Alimentos Funcionales* (AF) (Millone, Olagnero, & Santana, 2011). Actualmente, se puede definir como AF a los *“productos con ingredientes capaces de producir efectos saludables, cuya elaboración no sólo contempla su calidad nutricional, sensorial y tecnológica, sino que también aportan componentes bioactivos que contribuyen al bienestar del consumidor y/o previenen el desarrollo de ENT”* (Pang et al., 2012). Dentro de estos componentes, se destacan los fitoesteroles, a los cuales se les atribuyen efectos fisiológicos como su capacidad hipocolesterolemizante. Esto se debe a que en la luz intestinal, desplazan por competencia al colesterol, por lo cual no puede ser

absorbido. Al mismo tiempo, los fitoesteroles presentan escasa absorción en el intestino, también liberándose de la micela en el momento de la transferencia por transporte activo de los ácidos grasos y monoglicéridos siendo finalmente excretado con las heces (Marangoni, & Poli, 2010). Es por ello, que una de las acciones dirigidas a controlar los niveles de colesterol plasmático, consiste en recomendar su ingesta (Romero Palacio, & Vásquez Trespalcios, 2012).

El consumo de 1-3 g/día de esteroides vegetales logra disminuir el colesterol LDL en un 10 %, y 2 g/día con una dieta baja en grasas saturadas lo reduce hasta en un 15 % (Romero Palacio, & Vásquez Trespalcios, 2012). La Unión Europea sugiere que un consumo regular de un mínimo de 2 g/día de fitoesteroides añadidos a alimentos tales como margarinas para untar, productos lácteos y aderezos, reducen un 7-10,5 % las concentraciones sanguíneas de colesterol LDL (Unión Europea, 2010).

Por otro lado, la leche de cabra se caracteriza porque los valores de α 1-caseína, principal responsable de respuestas inmunológicas perjudiciales, son muy bajos, pudiendo ser consumida por personas que presentan intolerancia a la proteína de leche de vaca (Paz et al., 2014). Con respecto a la grasa, el 80 % de los glóbulos mide menos de 5 micras, lo que se traduce en una mayor digestibilidad; también contiene una mayor proporción de ácidos grasos de cadena media (Minervini et al., 2009), que desde el punto de vista tecnológico se traduce en la textura más suave de sus subproductos. En general, el consumo de leche de cabra y sus derivados, se asocia con efectos beneficiosos para la salud que van más allá de su valor nutricional intrínseco, sirviendo también como matrices para vehicular ingredientes funcionales (Silanikovea et al., 2010).

Por último, la elaboración de queso mozzarella se plantea, en nuestra región, como una alternativa estratégica de expansión para la industria de lácteos (Ministerio de Economía, 2009), además la mayoría de las personas están familiarizados con este producto utilizado tradicionalmente en pizzas y una gran variedad de preparaciones dietoterápicas (Sexto Foro Federal de la Industria, 2007). Su principal característica es que se obtiene por hilado de una masa acidificada, complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas (ANMAT, 2014).

Por todo lo expuesto, resulta innovadora la formulación de un producto que tiene propiedades benéficas en todos los ingredientes que lo componen. Nuestro país no dispone de un queso mozzarella semidescremado a base de leche de cabra con adición de fitoesteroles, y no se encontraron antecedentes de estudios que permitan evaluar dosis del fitoquímico y el éxito de su agregado a éste alimento.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- Formular productos adicionados con componentes bioactivos destinados a la población adulta, a fin de prevenir ENT.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la calidad higiénico sanitaria y composición química de la leche de cabra.
- Formular un queso mozzarella semidescremado a base de leche de cabra.

- Evaluar el color y definir perfil de textura y su evolución durante el proceso de obtención del producto, caracterizándolo macro y microscópicamente.
- Cuali-cuantificar fitoesteroles (Brassicasterol, 24-metilencolesterol, Campesterol, Campestanol, Stigmasterol, β -sitoesterol y d-5,24-stigmastadienol).
- Caracterizar sensorialmente el producto de acuerdo a su apariencia, consistencia y flavor; y determinar su aceptabilidad.
- Evaluar el efecto de su ingesta sobre la Glucemia, y concentración plasmática de Colesterol Total, HDL, LDL y Triglicéridos en ratas wistar.

1.3 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido estructurado de la siguiente manera:

- ✓ En el **Capítulo I**, se expone un breve **Marco Teórico** que aborda el tema planteado en el trabajo, los **Objetivos** propuestos en el Plan de Tesis, el financiamiento y lugares de realización.
- ✓ En el **Capítulo II**, se describen la materia prima empleada en el estudio: **Leche de Cabra**.
- ✓ En el **Capítulo III**, se detalla la estandarización del proceso de obtención del producto al cual se añadirá el compuesto bioactivo: **Queso Mozzarella de Cabra**.
- ✓ El **Capítulo IV**, se describe el componente funcional y su incorporación en la matriz alimentaria: **Los Fitoesteroles**.

- ✓ El **Capítulo V**, se evalúa el efecto hipocolesterolemiante del producto final en ratas wistar: **Ensayos Biológicos**.
- ✓ Las **Conclusiones** finales a las que se arribaron a través del trabajo realizado.
- ✓ Por último, se nombran los resúmenes expuestos en Congresos Nacionales e Internacionales y se presentan las **Publicaciones** derivadas del trabajo de Tesis.

1.4 FINANCIAMIENTO Y LUGAR DE REALIZACIÓN

Financiamiento: Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó a través de una Beca Doctoral TIPO I (período 2011-2014) y TIPO II (período 2014-2016) del CONICET, y BIP (Beca de Iniciación Profesional) (período 2016) del CIUNSa (Centro de Investigación de la Universidad Nacional de Salta). Fue financiado por el Proyecto de Investigación del CIUNSa N° 2071: *“Ingredientes bioactivos en la formulación de alimentos con atributos saludables para la prevención de ECNT”* de la directora de Beca.

Lugar de trabajo: El Laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Salud – UNSa, contó con cromatógrafo CG, espectrofotómetro de absorción atómica, balanzas granataria y analítica, centrifugas de mesa y butirométrica, estufas con aire forzado, de cultivo y de secado, mufla, baño termostático, digestor y destilador Kjeldhal, peachímetro, agitadores magnéticos, heladera, cocina y equipamiento para procesar alimentos.

Además, se contó con el Laboratorio de Alimentos del INIQUI (Instituto Nacional para la Industria Química), donde se pudo acceder a: texturómetro

“QTS Texture Analyser” y colorímetro de reflectancia Color Tec PCM- Cole Parmer. Allí fueron realizados los análisis de textura y color.

El análisis sensorial se realizó en el IISA de la Facultad de Ciencias de la Salud – UNSa, que dispuso de la infraestructura necesaria según normas previstas para la realización de evaluaciones sensoriales.

Las pruebas biológicas se realizaron en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud – UNSa, el cual contaba con la infraestructura necesaria para el buen manejo de animales utilizados para fines científicos.

1.5 REFERENCIAS

ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. *Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional*. [En línea] Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/codigo/caa1.htm>

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61, 193-199.

Millone, M. V., Olagnero, G. F., & Santana, E. C. (2011). Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. *DIAETA*, 29 (134), 7-15. [En línea] Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/diaeta/v29n134/v29n134a02.pdf>

Minervini, F.; Bilancia, M. T.; Siragusa, S.; Gobbetti, M., & Caponio, F. (2009). Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food. *Food Microbiology*, 26, 559-564.

Ministerio de Economía (2009). Ley 26.141: Régimen para la Recuperación, Fomento y Desarrollo de la Actividad Caprina. [En línea] Disponible en: <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/120000-124999/120041/norma.htm>

Ministerio de Salud (2011). Ley 25.501: Control y Prevención de las Enfermedades Cardiovasculares. [En línea] Disponible en: <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/180000-184999/183411/norma.htm>

Pang, G., Xie, J., Chen, Q., & Hu, Z. (2012). How functional foods play critical roles in human health. *Food Science and Human Wellness*, 1, 26–60.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Nuñez de Kairuz, M. S., & Ramón, A. N. (2014). Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. *Food Science and Technology*, 34 (3), 629-635.

Romero Palacio, J., & Vásquez Trespacios, E. M. (2012). Fitoesteroles y Fitoestanoles: eficaces para disminución de lípidos plasmáticos. *Revista CES Salud Pública*, 3 (2), 165-173. ISSN 2145-9932.

Sexto Foro Federal de la Industria. (2007). Región Noroeste Cadena Caprina en la Región Noroeste. Jornada de Trabajo. 7 y 8 de junio de 2007. Salta. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/ganaderia/caprinos/05-informacion_caprina/_archivos/000001-Comercialización/000010_Cadena%20caprina%20en%20la%20región%20noroeste.pdf

Silanikovea, N., Leitnerb, G., Merinc, U., & Prosserd, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89, 110-124.

Unión Europea (2010). Diario Oficial de la Unión Europea. *Reglamento N° 376/2010. Modificación del Reglamento (CE) N° 983/2009 sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños*. [En línea] Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:111:0003:0004:ES:PDF>)

CAPÍTULO II

LECHE DE CABRA

2 LECHE DE CABRA

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Definición

El artículo 554, Capítulo VIII, del CAA define con la denominación de Leche sin calificativo alguno, al *“producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados por la Autoridad Sanitaria Bromatológica Jurisdiccional y sin aditivos de ninguna especie”*. Además, agrega que *“la leche proveniente de otros animales, deberá denominarse con el nombre de la especie productora”* (ANMAT, 2014), en este caso, leche de cabra.

2.1.2 Propiedades físico-químicas

El **pH** normal, oscila entre 6,3 y 6,7 (Luquet, 1991). Este valor no es constante, y puede variar de acuerdo a:

- Período de lactación: en el calostro es más bajo que en la leche (6,0) y es debido a un elevado contenido en proteínas. Pueden observarse valores muy altos (mayores a 7,4) al final del mismo (Alais, 1985).
- Presencia de mastitis: cuando los valores se encuentran entre 6,9 y 7,5; puede sospecharse de leches mastíticas (fase subclínica) por aumento de la permeabilidad de las membranas en la glándula mamaria que origina una mayor concentración de iones Na y Cl (Alais, 1985).

- Temperatura: el pH disminuye en promedio 0,01 unidades por cada °C que aumenta, fundamentalmente a causa de la insolubilización del fosfato de calcio (Alais, 1985).
- Tratamiento térmico: la pasteurización causa algunos cambios en el pH debido a la pérdida de CO₂ y a la precipitación de fosfato de calcio. Temperaturas superiores a 100 °C, resultan en una disminución del pH debido a la degradación de la lactosa a varios ácidos orgánicos, especialmente a ácido fórmico. También, la concentración de la leche por evaporación de agua causa una disminución en el pH cuando la solubilidad del fosfato de calcio es alta, y este pasa al estado coloidal (Fox, & McSweeney, 1998).

A pesar de todos estos cambios, el pH varía en un rango muy reducido, por lo que valores inferiores a 6,3 o superiores a 6,7 ponen en evidencia una leche anormal (Luquet, 1991).

La **acidez** se expresa en grados Dornic (1,0 °D equivale a 0,1 g de ácido láctico por litro de leche), y en el momento del ordeño, su valor oscila entre 12-14 °D. Esta acidez natural está en función del período de lactación, en el cual la concentración de caseínas, sales minerales e iones varía. Al final de la misma, pueden observarse valores de acidez de 16-18 °D, asociada a la riqueza de la leche en caseínas (Luquet, 1991).

La **densidad** de la leche de cabra oscila entre 1,026 y 1,042, según que los resultados se hayan obtenido en leches individuales, de rebaño o de mezclas de leche, y en función de la estación, estado fisiológico y raza (Luquet, 1991).

El contenido promedio de **proteínas** en la leche de cabra es de 4,6 g 100 g⁻¹, aunque varía ampliamente según la raza, etapa de lactación, alimentación, clima, paridad, temporada y estado de salud de la ubre. La leche de cabra contiene alrededor de 0,7-1,0 g 100 g⁻¹ de N, la mayor proporción es no proteico; y tiene menos caseína que la leche de vaca, por lo que el rendimiento quesero suele ser más bajo (Park et al., 2007). Las principales proteínas se producen en dos fases distintas:

- *Micelar*: compuesta por cuatro fracciones principales de caseínas: α_{S1} , α_{S2} , κ y β , ésta última predomina sobre las demás, y tiene la característica de tener una mayor solubilidad, que sumado al menor tamaño de las micelas, las cuales se encuentran en suspensión dentro de la matriz láctea, y a su baja estabilidad al calor, hacen que la proteína coagulable de la leche de cabra sea baja (Haenlein, 2004), lo que implica que durante la elaboración de queso el rendimiento sea inferior, afectando la firmeza de la cuajada, tiempo de coagulación y contenido proteico final (Vega et al., 2004). En general, son inestables, precipitan a pH 4,6 a temperatura ambiente, tienen un tamaño promedio de aproximadamente 190 nm de diámetro, y se encuentran vinculadas entre sí por fosfato de calcio y pequeñas cantidades de magnesio, sodio, potasio y citrato, que difunden la luz y dan a la leche su apariencia blanca opaca (Park et al., 2007).
- *Soluble*: compuesta por proteínas estables que, durante la elaboración del queso, difunden al suero (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina y seroalbúmina) (Park et al., 2007).

La **grasa** y sus ácidos grasos (butírico, caproico, caprílico y cáprico) son los componentes de la leche más influenciados por la alimentación de los animales, ocasionando una composición diferente y, por lo tanto, un efecto sobre las propiedades tecnológicas (Olszewski et al., 2002). Los glóbulos de grasa son de un diámetro medio de 1,5 μm , lo que los hace mas digeribles (Albenzio, & Santillo, 2011); y al mismo tiempo, propensos a la lipólisis, ocasionando la ruptura de los triglicéridos, con liberación de ácidos grasos al medio (Deeth, 2006). La concentración de AGLT existentes en la leche está conformada por los AGL iniciales y los formados por lipólisis (Taverna et al., 2007).

Se identifican 3 tipos de lipólisis:

- Espontánea: asociada al potencial lipolítico, que resulta de la combinación de numerosos efectos, como las variaciones relacionadas al estado fisiológico, nutricional y sanitario de los animales (Taverna et al., 2007).
- Inducida: por acción de la lipasa natural sobre los glóbulos grasos de la leche, después que éstos sufrieron daños (rupturas) causados por cambios térmicos (refrigeración, calentamiento) y efectos mecánicos (turbulencia, batido). Estos factores amplían el frente de ataque de las lipasas favoreciendo su acción sobre los triglicéridos (Taverna et al., 2007).
- Microbiana: estrechamente ligada a la calidad bacteriológica, se produce por la acción de las lipasas secretadas por los microorganismos, fundamentalmente bacterias sicrótrofas que constituyen la flora predominante en leche refrigerada (Taverna et al., 2007).

Los **ácidos grasos** liberados de la lipólisis pueden ser de cadena corta, media o larga (mayores a 12 C). Los dos primeros representan un papel importante en el desarrollo del aroma, debido a que tienen un umbral de percepción muy bajo, no así los de cadena larga. Para los insaturados, el aroma puede variar de acuerdo al isómero del que se trate; y los de cadena ramificada son característicos de la leche de cabra. Comúnmente, los ácidos grasos tienen un umbral de percepción más alto que el de los ésteres que forman, y que proporcionan aroma rancio, acre, caprílico, jabonoso o ceroso (López del Castillo, 2010).

El contenido de **lactosa** varía entre 3,11 y 3,50 g 100 g⁻¹ según la raza (Giménez, Ramón, & Núñez de Kairuz, 2005); otras fuentes indican un rango entre 4,4 y 4,7 g 100 g⁻¹, dependiendo del estado de lactación de los animales (Vega et al., 2004).

Por otro lado, la legislación vigente exige requisitos mínimos con respecto a las características físico-químicas que debe cumplir la leche de cabra, las cuales se observan en la **Tabla 1** (ANMAT, 2014).

Tabla 1. Requisitos físico-químicos de la leche de cabra.

| Requisitos | Valores aceptados |
|---|--------------------------|
| Materia grasa (*) (g 100 g ⁻¹) | Mín. 3,0 |
| Extracto Seco No Graso (*) (g 100 g ⁻¹) | Mín. 9,0 |
| Acidez (°D) | 14-22 |
| Proteínas Totales (N x 6,38) (*) (g 100 g ⁻¹) | Mín. 2,8 |

(*) La Autoridad Sanitaria Nacional podrá considerar otros valores como válidos cuando se demuestre fehacientemente que se corresponde a valores de distintas cuencas y razas lecheras del país.

2.1.3 Características organolépticas

La leche de cabra presenta un color blanco mate debido a la ausencia de β caroteno; el olor es neutro, aunque a veces, al final de la lactación aparece el llamado cáprico; presenta un sabor levemente dulce y agradable; y aspecto limpio, sin grumos (Luquet, 1991).

2.1.4 Producción de leche de cabra

La producción lechera caprina constituye una parte importante de la economía nacional en muchos países (García et al., 2014). Según FAOSTAT (2013), la población de cabra en el mundo se incrementó en alrededor del 55 % y la producción de leche un 70 % entre 1991 y 2011, con un rendimiento de 1-3 litros/cabra/día.

En la Argentina se estima una producción de 2 millones de litros de leche por año, con un total de 200 productores, ubicándose el 60 % en la región del noroeste (Oliszewski et al., 2002). Es así que la disponibilidad per cápita promedio en nuestro país es de 80 ml y en Salta asciende a 233 ml (Sexto Foro Federal de la Industria, 2007).

2.2 OBJETIVO

Determinar la calidad higiénico-sanitaria y composición química de la leche de cabra.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Materiales

Para la determinación de la calidad higiénico-sanitaria y composición química se utilizó:

- Leche de cabra biotipo Saanen (LC1), primer trimestre de lactación, de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA-Cerrillos.
- Leche de cabra biotipo Saanen y Criolla (LC2), primer trimestre de lactación, de Finca La Huella, Vaqueros, Salta.
- Leche de cabra biotipo Saanen y Anglo Nubian (LC3), primer trimestre de lactación, de Finca Santa Anita, Coronel Moldes, Salta.
- Leche de cabra biotipo Criolla y Saanen (LC4), primer trimestre de lactación, de Paraje El Rodeo, La Poma, Salta.

2.3.2 Métodos

2.3.2.1 Análisis físico-químicos de la leche de cabra (EEA INTA-Cerrillos)

Los análisis físico-químicos de LC1 se realizaron en la EEA INTA-Cerrillos. La leche de cabra cruda fue transportada desde el tambo hasta el Laboratorio de Análisis de Leche, en frascos de vidrio con capacidad de 200 ml, para ser refrigeradas a 4 °C y realizar, posteriormente, las siguientes determinaciones:

- **pH:** Con pHmetro digital de mesa de pH/mV/temperatura y electrodo específico Schott Z 509 para leche (INTA, 2009).

Fundamento: Este método se basa en la medición de la concentración de hidrogeniones (H^+) libres en una solución, por medio de una diferencia de potencial entre el electrodo y la muestra a medir. La señal captada es enviada a un medidor digital, y traducida en escala de pH (rango 1 a 14).

Procedimiento: Se enciende el equipo con la tecla ON/OFF, el electrodo se lava con agua destilada, se seca con papel absorbente y se calibra introduciéndolo en una solución buffer de pH 7, a 21 °C. Se cambia al modo de Calibración (CAL) con la tecla CAL/MEAS. Se deja estabilizar hasta que la palabra READY deje de titilar en la pantalla. Se presiona la tecla ENTER. Se retira el electrodo, se lava con agua destilada y se seca con papel absorbente. Se introduce en la solución buffer de pH 4, a 21 °C. Se deja estabilizar de la misma manera y se presiona la tecla ENTER. Se cambia el equipo al modo de medición (MEAS) con la tecla CAL/MEAS. Se lava el electrodo con agua destilada y se seca con papel absorbente. De esta forma, el equipo está listo para medir.

Por otro lado, se sumerge el electrodo y el sensor de temperatura en la muestra. La membrana y el diafragma del electrodo deben quedar totalmente sumergidos en la misma sin tocar las paredes ni el fondo del recipiente. Se lee el valor de pH en la pantalla, con la muestra a 21 °C. Se registra el valor cuando la palabra READY deja de titilar. En este punto, es importante que las muestras permanezcan refrigeradas y recién sean llevadas a 21 °C, momentos antes de la medición, para evitar que se acidifiquen naturalmente a esta temperatura. Se retira el electrodo, se lava con agua destilada y se seca con papel absorbente. Al finalizar cada medición, el electrodo debe quedar sumergido en una solución de KCl 3M, evitando dejarlo en contacto con el aire.

Cálculo: El resultado de la medición se visualiza en la pantalla del equipo en unidades de pH.

- **Acidez Titulable:** Determinación de la acidez expresada en grados Dornic (INTA, 2010).

Fundamento: El método consiste en una titulación ácido-base en la que se valoran los ácidos presentes en la leche con una base de concentración conocida. En esta titulación, el punto final se determina mediante una medición potenciométrica: pH 8,30; correspondiente al punto de viraje de la fenolftaleína.

Procedimiento: Se prepara una solución madre de NaOH (1 N): Se pesan 4,1237 g de NaOH de grado analítico (97 % P/P) y se lleva a volumen final de 100 ml con agua destilada. Se miden 11,1 ml, se coloca en un matraz de 100 ml y se enrasa con agua destilada. Esta se valora con solución estándar de HCl 0,1 N. Se calcula la concentración real del NaOH y el Factor de Corrección de la solución. Una vez esto, se mide por triplicado 10 ml de muestra homogeneizada en un tubo de ensayo, se agregan 5 gotas del indicador fenolftaleína (0,5 % p/v en etanol 95%), y se titula con la solución de NaOH 0,1 N hasta llegar a un pH de 8,30; a 21 °C.

Cálculo:

La acidez de la muestra se calcula como:

$$Ac = V_g \times 10 \times f_c$$

Donde:

Ac: Acidez real en grados Dornic (°D)

V_g: Volumen en ml, de NaOH 0,1 N gastado en la titulación

f_c: Factor de corrección del NaOH 0,1 N

• **Composición química:** mediante equipo Lacto Star Funke Gerber se determinó:

- **Proteínas Totales**
- **Grasas**
- **Lactosa**
- **Sólidos No Grasos (SNG)**
- **Cenizas**

Fundamento: Consiste en un equipo analizador de leche con limpiado, desagüe y calibración del punto cero automáticos, de uso exclusivo para investigación rápida y exacta de la leche.

Procedimiento: Se enciende el dispositivo y se verifica que esté ubicado en el biotipo correspondiente al origen de la leche que se pretende analizar (Criolla, Saanen, Nubian o Toggenburg). Las muestras a evaluar deben estar termizadas a 30 °C y homegeneizadas por movimientos de inversión. Se realizan tres mediciones: la primera se descarta, puesto que en la cánula quedan restos de

agua destilada utilizada en el enjuague cuando el equipo se utilizó por última vez, o bien, restos de leche cuando el mismo está siendo utilizado continuamente.

Cálculo: Lectura directa de los valores registrados, en la pantalla digital.

2.3.2.2 Análisis físico-químicos de la leche de cabra (Laboratorio de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Salud, UNSa)

Los análisis físico-químicos de LC2, LC3 y LC4 se realizaron en el Laboratorio de Alimentos de Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta (UNSa). La leche de cabra pasteurizada, fue transportada desde cada tambo hasta el laboratorio, en bidones de polietileno de alta densidad con capacidad de 5 litros, a una temperatura de 4 °C, en conservadoras; donde se determinó:

- **pH:** Con pHmetro digital Hanna Instruments modelo HI 8424.

Fundamento: En general, la determinación de éste parámetro es una medida indirecta de la calidad sanitaria de la leche.

Procedimiento: Se colocan 50 ml de muestra, termizadas a 21 °C, en un vaso de precipitación de 100 ml de capacidad y se introduce el pHmetro. Previo a la determinación, el instrumento se calibra con tampones estándar 4 y 7 (Laboratorio Merk, Argentina).

Cálculo: Lectura directa en la pantalla digital.

- **Acidez Titulable:** determinación de la acidez expresada como ácido láctico (FIL 150:199) (AOAC, 1996).

Fundamento: Las condiciones de higiene deficientes favorecen la proliferación de microorganismos indeseables que degradan la lactosa, dando lugar a la formación de ácido láctico. La acidificación progresiva de la leche puede conducir en último término a la coagulación, por precipitación de las proteínas. Por consiguiente, la determinación del grado de acidez representa un criterio más para evaluar el cuidado puesto durante el ordeño, transporte y conservación de la materia prima. Esta prueba mide mediante una valoración volumétrica, la cantidad de ácido láctico que se ha producido a partir de la lactosa por intervención de los microorganismos.

Procedimiento: Con pipeta de doble aforo se miden 20 ml de muestra de densidad conocida y se introduce en un erlenmeyer. Se diluye aproximadamente dos veces su volumen con agua destilada libre de CO₂, se agregan unas gotas de fenolftaleína como indicador y se titula con NaOH 0,1 N hasta la aparición de color rosado débil persistente.

Cálculo: Los resultados se expresan en g de ácido láctico en 100 ml de muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez titulable (g de ácido láctico)} = (V \times N) \times \text{mEq. Ácido láctico (0,0090)}$$

V = Volumen de NaOH gastado

N = Normalidad del NaOH

- **Proteínas:** Por titulación con formol (Egan, 1991).

Fundamento: Este método se basa en el hecho de que cuando se adiciona formaldehído a leche que ha sido neutralizada, se produce ácido libre (que se puede titular con un álcali) en proporción a la cantidad de proteínas presente.

Procedimiento: A 10 ml de leche se adiciona 0,5 ml de indicador de fenolftaleína al 0,5 % y 0,4 ml de solución neutra, saturada, de oxalato de potasio. Se mezcla, se deja reposar durante unos minutos y se neutraliza con hidróxido de sodio 0,1 M hasta color rosa tenue persistente. Se adiciona 2 ml de formalina y se mezcla. se deja en reposo durante pocos minutos y se titula la nueva acidez producida con hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener el mismo color rosa (titulación *a* ml). Por otro lado, se titula separadamente 2 ml de formalina con 10 ml de agua con álcali 0,1 N (titulación *b* ml) como blanco.

Cálculo: Primero se obtiene el contenido de Nitrógeno (N), multiplicando la titulación por un factor empírico.

$$\% N = 1,7 \times (a - b)$$

Luego, se obtiene el contenido de proteínas, multiplicando % N por un equivalente de conversión para los lácteos caprinos (ANMAT, 2014):

$$\% \text{ proteínas} = \% N \times 6,38$$

- **Grasas:** En butirómetro para leche, por el método Gerber (AOAC, 1996).

Fundamento: El ácido sulfúrico precipita la caseína, mientras que la adición de alcohol amílico facilita la separación de la grasa, recubriéndola y protegiéndola contra la destrucción del ácido sulfúrico.

Procedimiento: En un butirómetro para leche se vierte cuidadosamente lo siguiente, mediante una pipeta:

- 10 ml de SO_4H_3 al 90 %

- 11 ml de leche homogeneizada a 21 °C
- 1 ml de alcohol amílico

Se coloca el tapón y se mezcla con movimientos de inversión, hasta que no se vean partículas blancas. Con el tapón hacia abajo, se coloca en agua a 65 ± 2 °C durante 10 minutos, se centrifuga durante 4-5 minutos a 1100 rpm y se vuelve a llevar con cuidado al baño a 65 ± 2 °C durante 10 minutos.

Cálculo: Lectura directa del espesor de la capa de grasa en escala graduada del butirómetro, por ajuste del tapón de goma.

- **Lactosa:** por diferencia.

Fundamento: Se determina indirectamente su contenido en 100 ml mediante diferencia de nutrientes.

Procedimiento: A 100 ml de leche, se le resta la cantidad de los otros sólidos más la humedad.

Cálculo:

$$\% \text{ lactosa} = 100 - (\text{proteína} + \text{grasa} + \text{cenizas} + \text{humedad})$$

- **Sólidos Totales:** gravimétricamente por desecación en estufa (AOAC, 1996).

Fundamento: Están constituidos por las distintas sustancias en solución, suspensión y emulsión y varía entre ciertos límites; es mucho menos variable si se corrige de la grasa ya que éste es el componente más variable. Por consiguiente, se acostumbra a determinar el extracto seco total y la grasa, para luego corregir el primero de esta y obtener el extracto seco no graso (**SNG**).

Procedimiento: Se secan los pesafiltros en estufa a 105 °C, durante 2 horas, se enfrían en desecador y se pesan poco después de alcanzar la temperatura ambiente. Se vierten 10 g de arena calcinada, y luego 5 g de leche. Se evapora a baño maría 10-15 minutos y luego se completa el secado en estufa a 105 °C, hasta peso constante \pm 5 mg, aproximadamente hasta completar las 5 horas.

Cálculo: El residuo seco corresponde a los sólidos totales y la pérdida de peso a la humedad. El porcentaje se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Extracto Seco} = \frac{\text{Peso de la muestra tras la desecación}}{\text{Peso de la muestra antes de la desecación}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P1 - P2}{P} \times 100$$

P1: Pesafiltro con muestra antes de la estufa

P2: Pesafiltro con muestra después de la estufa

P: Gramos de la muestra

- **Sólidos No Grasos (SNG):** por diferencia.

Fundamento: Se determina indirectamente su contenido en 100 ml mediante diferencia de nutrientes.

Procedimiento: A 100 ml de leche, se le resta la humedad más la cantidad de grasa.

Cálculo:

$$\% \text{ SNG} = 100 - (\text{humedad} + \text{grasa})$$

- **Cenizas Totales:** por calcinación en mufla (AOAC, 1996).

Fundamento: Es una medida del total de minerales presentes en el alimento.

Procedimiento: Se limpian y se marcan los crisoles y se llevan a mufla durante 4-8 horas a 500-600 °C, se enfrían a 100-150 °C aproximadamente, se llevan a un desecador y se pesan. Se agregan 3 g de muestra y se evapora a sequedad en un baño de vapor. Se lleva posteriormente la muestra a una llama baja de gas, hasta su carbonización, evitando la formación de llama dentro de la muestra. Se incinera en mufla a 500-600 °C, durante 3-4 horas aproximadamente hasta coloración blanquecina. Se enfría y se pesa.

Cálculo: Se obtiene el porcentaje de cenizas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{g de cenizas} / 100 \text{ g de muestra} = \frac{\text{Peso de crisol cenizas} - \text{Peso de crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Después de pesar las cenizas de la leche, se agregan 5 ml de solución de CIH (1:1), se calienta suavemente, se filtra la solución ácida a través de un papel de filtro con agua destilada, a un matraz de 100 ml. Se coloca el papel de filtro en la misma cavidad del crisol y se reduce a cenizas sobre llama. Se agrega 5 ml de CIH (1:1) y se calienta unos minutos. Finalmente se filtra y se lleva a volumen, obteniéndose la solución de cenizas para la posterior determinación de minerales.

- **Calcio y Sodio:** por espectrofotometría de absorción atómica (AOAC, 1996).

Fundamento: Se basa en la absorción de la radiación ultravioleta por los átomos libres, en estado gaseoso; mediante atomización en llama.

Procedimiento: Se prepara una solución patrón del mineral (1000 ppm). Se preparan soluciones para obtener patrones de trabajo de 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 y 8 ppm. Las mismas se deben preparar en el momento, dado que pueden sufrir cambios en la concentración debido a microprecipitaciones, evaporaciones parciales, absorción a las paredes del recipiente, etc. Posteriormente, se lee la absorbancia de la curva estándar (λ 589 nm) y se calcula el coeficiente de correlación (r). Finalmente, se mide la absorbancia de las diluciones de las muestras y se calcula la concentración del mineral en ppm.

Cálculo: La concentración del mineral en mg/100 g, se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mg del mineral/100 g de muestra} = \frac{[A] \times V \times D}{1 \text{ mg} \times M \text{ (g)}} \times 100$$

[A]: Concentración del analítico

V: Volumen de la muestra

D: Factor de dilución

M: Peso de la muestra

- **Fósforo** por espectrofotometría de absorción molecular (AOAC, 1996).

Fundamento: La intensidad del color del fosfomolibdovanadato puede ser cuantificada espectrofotométricamente.

Procedimiento: Antes de comenzar, se deben preparar los siguientes reactivos:

- Solución buffer de acetato/ácido acético, pH 4 (ácido acético 1 N y acetato de sodio 0,25 N). Se disuelven 17 g de acetato de sodio trihidratado en agua destilada, 60 g (28,5 ml) de ácido acético glacial y se completa a 500 ml.
- Solución de ácido ascórbico al 1 %, en solución de ácido oxálico al 0,5 %, preparado en el momento de la determinación.
- Molibdato de amonio al 1 % en ácido sulfúrico 0,05 N. Se agregan 5 g de molibdato de amonio disuelto en agua y se completa el volumen a 500 ml. Se guarda en un frasco oscuro a temperatura de refrigeración.
- Solución estándar de fósforo. Se disuelven 1,097 g de fosfato monobásico de potasio en agua destilada. Se agregan 10 ml de ácido sulfúrico 10 N, se mezcla y se completa a 250 ml con agua destilada. Se mezcla cuidadosamente. Esta solución contiene 1 mg de fósforo por ml.

Se prepara una solución estándar de trabajo por dilución de 5 ml de la solución estándar de fósforo a 100 ml con agua destilada. Se usan alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml para la curva estándar, tratándolas en la misma forma que las muestras. Dichas soluciones se llevan a un volumen de 100 ml, y contienen 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 y 0,25 mg de fósforo por 100 ml.

Se pipetea a un balón aforado de 100 ml una alícuota de 1 ml de la solución de cenizas, estimando que no contenga más de 0,25 mg de fósforo. Se agrega 60 ml de agua destilada, 10 ml de buffer de acetato, 1 ml de ácido ascórbico, 10 ml de solución de molibdato de amonio, mezclando después de cada adición. Se lleva a volumen y se mezcla nuevamente. Se deja reposar por 30 minutos a temperatura ambiente y se lee la transmisión de esta solución coloreada en el colorímetro fotoeléctrico, a 600-620 nm.

Cálculo: Se traza la curva estándar y/o se calcula el factor de ella:

$$\text{Factor} = \frac{\text{mg} \times 100 \text{ ml}}{\text{D.O.}}$$

D.O.

D.O.: Densidad Óptica (Absorvancia)

Se determina la cantidad de fósforo en 100 ml de la solución coloreada. De esta cifra, junto con los ml de solución de cenizas de la muestra en la alícuota tomada y el peso de la muestra tomado para las cenizas, se calcula el fósforo en mg por 100 g de muestra.

$$\text{mg de Fósforo/100 g de muestra} = \frac{\text{D.O.} \times \text{factor} \times 100 \times 100}{1 \text{ mg} \times \text{g de muestra}}$$

2.3.2.3 Análisis microbiológicos (EEA INTA-Cerrillos)

Se realizaron análisis microbiológicos a la muestra LC1 en el laboratorio de Microbiología (INTA), en la cual se determinó:

- **Azul de Metileno:** Es colorante más empleado en la industria láctea ya que es fácilmente absorbible por las células vivas y se decolora a una velocidad proporcional a la actividad de las reductasas microbianas (AOAC, 1996).

Fundamento: La mayoría de los gérmenes de la leche cuando se multiplican, elaboran enzimas reductasas que modifican el potencial de óxido-reducción de la misma. Para demostrar ese fenómeno basta añadir a la leche una sustancia que se decolore al pasar de la forma oxidada a la forma reducida. La rapidez con que cambia de color está en función de la población bacteriana y, por ello, puede ser un índice del grado de contaminación de la leche.

Procedimiento: En un tubo de ensayo ancho (aproximadamente 3-4 cm. de diámetro) y estéril se vierte 40 ml de leche, sin mojar el costado de la pared interior del tubo de ensayo. Se agrega con una pipeta estéril 1 ml de la solución de azul de metileno diluída (se prepara disolviendo azul de metileno en alcohol de 96° hasta saturación, diluyendo luego 5 ml de esa solución saturada en 195 ml de agua estéril). Con precauciones asépticas se tapona el tubo, se coloca en baño de agua a 37-38 °C, cuidando que el nivel del agua del baño exceda al de la leche en el tubo y manteniendo la temperatura uniforme. Se observa el tiempo necesario para que se produzca la decoloración.

Cálculo: En base al tiempo transcurrido hasta la decoloración, se puede concluir sobre el estado de conservación y/o carga microbiana de la muestra:

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

- Leche buena: Si conserva el color por más de 5 ½ horas.
- **Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM):** Mediante recuento en placa con medio agar plate count (INTA, 2008a).

Fundamento: Se utiliza para evaluar calidad sanitaria y aplicación de BPM sobre los alimentos, aportando información acerca de las materias primas, condiciones del proceso, del almacenamiento y de su manipulación. La incubación se realiza a 30 ± 1 °C durante 48 ± 3 horas; pero para recuento en leche líquida y en polvo la IDF adopta la modificación de hacerla a 30 ± 1 °C por 72 horas.

En el recuento se debe tener en cuenta que, en los alimentos, las células microbianas se presentan a menudo agrupadas, en racimos, cadenas o parejas, que pueden no estar bien distribuidos, cualquiera que sea la mezcla y la dilución de la muestra. Por consiguiente, cada colonia que se forme en la placa de agar puede proceder de una sola célula o de grupos de células, por lo que el cómputo de colonias puede no reflejar el número real de bacterias viables contenidas en el alimento. Al mismo tiempo, algunos microorganismos pueden no desarrollarse ni formar colonias visibles en el medio de agar si las condiciones de temperatura, oxígeno y nutrición no son favorables, o por la debilidad de las células.

Procedimiento: La muestra debe ser fresca, mantenida a temperatura de refrigeración hasta su análisis dentro de las 24 hs desde su toma. Si es una muestra congelada, se deja fundir a temperatura de refrigeración durante 24 hs.

- Homogeneización del alimento

Se toman 10 ml de leche, mezclada asépticamente, y se añade a 90 ml de solución reguladora de peptona 0,1 % m/v. Se agita para homogenizar la

solución. Ésta es una dilución 10^{-1} del alimento.

- Preparación de diluciones decimales

Se toma con una pipeta 1 ml del homogeneizado y se vierte en un tubo que contiene 9 ml de solución reguladora de peptona (0,1 % m/v) y se mezcla. Ésta es una dilución 10^{-2} del alimento. Se repite la operación hasta obtener el número requerido de diluciones.

- Versión en placas (por duplicado)

Con una pipeta, se coloca 1 ml de cada una de las diluciones preparadas sobre las placas de Petri, las cuales deben estar adecuadamente rotuladas. Sobre ellas, se vierte aproximadamente 15 ml de agar, previamente fundido en baño de agua a 45 ± 1 °C. Se mezcla uniformemente la muestra diluida con el medio de agar y se deja solidificar.

- Incubación

En estufa, se colocan las placas de Petri invertidas, apilando un máximo de seis.

- Recuento de las colonias

Después de la incubación se cuentan todas las colonias de las placas que contengan entre 30-300 colonias y se registran los resultados por cada dilución contada.

Cálculo:

- Para placas examinadas sin presencia de colonias, el resultado se expresa como:

Menos de 1×10^1 UFC/ml

Para placas con dilución 1:10, que contienen menos de 30 colonias, se expresa:

Menos de 3×10^2 (30×10) = 3×10^2 UFC/ml

- Para placas con más de 30 colonias, se deben contar las colonias de los duplicados y calcular la media, se multiplica por el inverso de la dilución correspondiente, y se obtiene el número de bacterias por mililitro.
- **Coliformes Totales:** Mediante recuento directo en placa con medio agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta (INTA, 2008b).

Fundamento: Éste grupo está constituido por bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, bacilos cortos no formadores de esporas, capaces de fermentar la lactosa, produciendo ácido láctico y gas. Su presencia indica un inadecuado procesamiento y/o recontaminación post procesamiento, debido a materias primas muy contaminadas, instalaciones y equipos sucios y/o manipulación no higiénica.

En el recuento, se consideran únicamente como pertenecientes a bacterias coliformes las colonias de un color rojo oscuro, cuyo tamaño sea superior a 0,5 mm de diámetro. Para contarlas se eligen, siempre que sea posible, aquellas placas que presenten menos de 150 colonias características.

Procedimiento:

- Se prepara una serie de diluciones a partir de la muestra: Se toma 1 ml de muestra, se coloca en un tubo con 9 ml de agua peptonada (0,1 % m/v), se tapa, se mezcla con agitador eléctrico o manualmente; se obtiene una dilución

10^{-1} de la muestra. De ésta se toma, con otra pipeta, 1 ml y se agrega a un tubo con 9 ml de agua peptonada, se tapa, se mezcla, se obtiene una dilución 10^{-2} . Se repite la operación hasta obtener el número adecuado de diluciones.

- Se coloca 1 ml de cada dilución de la muestra en placas de Petri estériles.
- Se añade a cada placa de Petri conteniendo el inóculo, 10-15 ml de agar bilis lactosa rojo neutro cristal violeta, a una temperatura de 45 ± 1 °C.
- Se mezcla el contenido de las placas con movimientos de balanceo y rotación, y se deja solidificar por unos 5-10 minutos. A continuación, se añaden otros 3-4 ml de medio fundido, de tal modo que se forme una capa que cubra la superficie del medio solidificado, evitando así la formación de colonias superficiales.
- Se incuban las placas invertidas a 35-37 °C durante 24 horas.

Cálculo: Se multiplica el número de colonias resultantes del recuento por la inversa de la dilución correspondiente.

- **Células somáticas:** El CSS se llevó a cabo por el método de microscopía fluorescente por citometría de flujo, con equipo s/Fossomatic 5000. Realizado por personal especializado de la EEA INTA-Rafaela, Santa Fe.

2.3.2.4 Análisis estadístico

Los valores obtenidos de las determinaciones químicas, se expresaron en porcentaje, promedios y desvío estándar.

Las muestras se analizaron por ANOVA y prueba de Duncan determinando el nivel de significación entre ellas ($P < 0,05$).

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Análisis físico-químicos de la leche de cabra

Los resultados de los análisis físico-químicos de la leche de cabra se detallan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características físico-químicas de la leche de cabra.

| Parámetros físico-químicos | LC1 | LC2 | LC3 | LC4 |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| pH | 6,75 ± 0,04 ^a | 6,68 ± 0,02 ^a | 6,68 ± 0,01 ^a | 6,67 ± 0,02 ^a |
| Acidez Titulable (°D) | 11,59 ± 0,14 ^a | 12,19 ± 0,80 ^a | 13,20 ± 0,25 ^a | 11,90 ± 0,05 ^a |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 2,59 ± 0,18 ^a | 3,24 ± 0,80 ^a | 4,04 ± 0,09 ^a | 4,36 ± 0,48 ^a |
| Grasas (g 100 g ⁻¹) | 3,51 ± 0,14 ^b | 4,20 ± 0,95 ^b | 3,06 ± 0,02 ^b | 7,23 ± 0,46 ^a |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 4,33 ± 0,27 ^{a,b} | 3,79 ± 0,42 ^b | 6,02 ± 0,11 ^a | 4,23 ± 0,88 ^{a,b} |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 7,63 ± 0,50 ^b | 8,02 ± 0,77 ^b | 10,91 ± 0,04 ^a | 9,57 ± 0,40 ^{a,b} |
| Cenizas (g 100 g ⁻¹) | 0,73 ± 0,52 ^a | 0,99 ± 0,03 ^a | 0,85 ± 0,03 ^a | 0,99 ± 0,01 ^a |

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El **pH** fue de 6,75; 6,68; 6,68 y 6,67, para las muestras LC1 ($n=21$), LC2 ($n=8$), LC3 ($n=1$) y LC4 ($n=2$), respectivamente; similar al máximo establecido por Luquet (1991) (6,7), y al de Paz et al. (2014) (6,7). Depende fundamentalmente de la estabilidad de las caseínas, modificándose según la fase de lactación, alimentación, raza de la cabra y además, por las burbujas de gas carbónico desprendidas durante el ordeño, refrigeración o transporte de la leche (Albenzio, & Santillo, 2011).

La **acidez titulable** fue de 11,59; 12,19; 13,20 y 11,90; para las muestras LC1, LC2, LC3 y LC4, respectivamente; superior al de Paz et. al. (2014) (10,50 °D), quien trabajó con leche proveniente del mismo tambo; inferior a lo permitido

por el CAA (ANMAT, 2014) (14-22 °D); pero próximo a lo declarado por Luquet (1991) (12-14 °D).

Por su parte, Quintana López et al. (2011), quién analizó 31 muestras (raza no especificada) obtenidas durante seis meses en una de las explotaciones más importantes de Andalucía (España), registró una acidez media de 17 °D. También analizó 2 muestras de leches comerciales, cuyo valor fue ligeramente superior (19 °D), esto podría deberse a que fueron sometidas a tratamiento térmico y/o desarrollo excesivo de bacterias acidolácticas por conservación a temperatura no adecuada (>5-6 °C).

La acidez puede variar drásticamente entre una muestra y otra, es así que valores altos pueden reflejar leches contaminadas, dado que los microorganismos forman ácido láctico a partir de la lactosa, disminuyendo el pH; y una acidez muy baja puede ser sinónimo de mastitis, aguado de la leche o bien una alteración provocada con algún producto alcalinizante (Quintana López et al., 2011).

En este caso, los niveles bajos observados podrían deberse a que la acidez es también influenciada por la caseína, sales minerales e iones que se encuentran en función al período de lactación, cuyo contenido es menor en los primeros meses del mismo (Paz et al., 2014).

Las **proteínas totales** de LC1 fue de 2,59, inferior al de Paz et al. (2014) (2,90 g 100 g⁻¹) quien trabajó con leche del mismo tambo, y similar al contenido declarado por Raynal-Ljutovac et al. (2008) para leche de cabra biotipo Saanen Británica (2,61 g 100 g⁻¹). Para LC2, LC3 y LC4, los valores fueron 3,24; 4,04 y

4,36, respectivamente; superior a lo mínimo exigido por el CAA (2,8 g 100 g⁻¹) (ANMAT, 2014).

En el estudio llevado a cabo por Quintana López et al. (2011), se observaron valores medios de 3,64 y 3,50 g 100 g⁻¹, para leche de cabra cruda ($n=31$) y comercial ($n=2$), respectivamente.

Kondyli, Katsiari, & Voutsinas (2007), observaron en leche de cabra Indígena Griega ($n=32$), valores promedio de 3,36 g 100 g⁻¹, similar a lo publicado en las tablas de composición de alimentos de la UNLu (2011) (3,3 g 100 g⁻¹) (raza no especificada).

Fedaku et al. (2005) obtuvo una media de 2,88 y 2,95 g 100 g⁻¹, en dos muestras de un pool de leche de cabra Alpina ($n=50$). Observaron que si bien en comparación con otros informes no existían diferencias significativas en el contenido de proteínas, estos valores fueron considerablemente inferiores a los declarados por la ADGA (2003), para la misma raza.

En la leche de cabra, el porcentaje de proteínas es menos susceptible a la manipulación de la dieta (Silanikove et al., 2010), y las mismas pueden estar influenciadas principalmente por el período de lactación, la variabilidad genética dentro de la misma raza, y la mastitis subclínica (Albenzio, & Santillo, 2011).

El contenido **graso** fue de LC1 y LC3 fue de 3,51 y 3,06 g 100 g⁻¹, respectivamente, similar al de Paz et al. (3,56 g 100 g⁻¹) (2014), y al de Raynal-Ljutovac et al. (2008) para la leche de cabra Saanen Británica (3,48 g 100 g⁻¹). El de LC2 fue de 4,20; cercano a lo declarado por Quintana López et al. (2011), quien indica una media de 4,96 g 100 g⁻¹; y el de LC4 fue de 7,23 g 100 g⁻¹. Según las tablas de composición química de alimentos publicadas por el

CENEXA (1995) y la UNLu (2011), la leche de cabra tiene un promedio de materia grasa de 4,8 y 5,9 g 100 g⁻¹, respectivamente. Todos los valores se encuentran por encima del mínimo exigido por el CAA (3 g 100 g⁻¹) (ANMAT, 2014).

Kondyli, Katsiari, & Voutsinas (2007), observaron en cabras indígenas griegas ($n=32$), valores promedio de 4,10 g 100 g⁻¹.

Por su parte, Fedaku et al. (2005) en dos grupos de cabras Alpinas, obtuvo un contenido graso promedio de 2,77 y 2,76 g 100 g⁻¹ ($n=50$), con mínimas de 2,59 y 2,52 g 100 g⁻¹ para el mes de Mayo, y máximas de 3,03 y 3,28 g 100 g⁻¹ para el mes de Octubre. Si bien en comparación con otros estudios no existían diferencias significativas, estos valores, al igual que los de proteínas, resultaron inferiores a los declarados por la ADGA (2003), para la misma raza.

Los lípidos son uno de los componentes más importantes de la leche en términos de costo, nutrición y por las características físicas y sensoriales (sabor, consistencia y textura) que imparte a los productos lácteos (Quintana López et al., 2011). Es el componente más variable, tanto cuantitativa como cualitativamente, y depende del estado de lactación, estación del año, raza, genotipo y alimentación del animal. Los glóbulos grasos de la leche de cabra, tienen un diámetro pequeño (el 80 % mide menos de 5 μm) (Silanikove et al., 2010) y se encuentran mejor distribuidos en la matriz, lo que resulta en un alimento más digerible (Park et al., 2007; Paz et al., 2014), cuyo metabolismo es más eficiente en el tracto intestinal humano (Quintana López et al., 2011). Es por ello que la leche de cabra ha sido utilizada para contrarrestar una amplia gama de trastornos clínicos relacionados al aparato digestivo, tales como síndrome

de malabsorción, esteatorrea, hiperlipoproteinemia, resección intestinal, alimentación de lactantes prematuros, desnutrición infantil, epilepsia, fibrosis quística, by-pass coronario, y litiasis biliar; debido a su capacidad metabólica única para proporcionar energía directa en lugar de depositarse en los tejidos adiposos (Haenlein, 2004).

La cantidad de **lactosa** de LC1 y LC4 fue de 4,33 y 4,23 g 100 g⁻¹, similar a la de Raynal-Ljutovac et al. (2008) en leche de cabra Saanen Británica (4,30 g 100 g⁻¹). El de LC2 fue de 3,79 g 100 g⁻¹, próximos a los declarados por Giménez, Ramón, & Núñez de Kairuz (2005) de 3,11-3,50 g 100 g⁻¹ y las tablas de composición de la UNLu (2011) de 3,00 g 100 g⁻¹. Por otro lado, LC3 tuvo un contenido de 6,02, superior a los de Paz et al. (2014), quien tuvo un valor de 5,01 g 100 g⁻¹.

Por su parte, Quintana López et al. (2011), encontró valores de 4,69 g 100 g⁻¹ y Vega et al. (2004) de 4,4-4,7 g 100 g⁻¹.

Kondyli, Katsiari & Voutsinas (2007), observaron en leche de cabra raza indígena griega ($n=32$), valores promedio de 4,48 g 100 g⁻¹.

Este es el componente mayoritario dentro de los SNG, y posee un gran valor nutricional, al favorecer la absorción intestinal de calcio, magnesio y fósforo, y la utilización de la vitamina D (Quintana López et al., 2011).

La cantidad de **SNG** de LC1 fue de 7,63 g 100 g⁻¹, similar a lo declarado por las tablas de composición de la UNLu (2011), cuyo valor es de 7,90 g 100 g⁻¹. La de LC2 fue de 8,02, parecido a la de Raynal-Ljutovac et al. (2008) para la leche de cabra Saanen Británica (8,12 g 100 g⁻¹). Sólo las muestras LC3 (10,91)

y LC4 (9,57) cumplen con lo establecido por el CAA, que exige un mínimo 9 g 100 g⁻¹ (ANMAT, 2014).

Kondyli, Katsiari & Voutsinas (2007), observaron en leche de cabra raza indígena griega ($n=32$), valores promedio de 8,54 g 100 g⁻¹ para los meses de Diciembre a Julio.

Fedaku et al. (2005) obtuvo en dos muestras de leche de cabra Alpina ($n=50$), un contenido de SNG promedio de 7,42 y 7,49 g 100 g⁻¹, con un mínimo de 7,14 y 7,15 g 100 g⁻¹ para el mes de Mayo, y un máximo de 7,74 y 8,03 g 100 g⁻¹ para el mes de Octubre, respectivamente.

Cabe destacar que esta fracción aumenta ligeramente en la medida que disminuye la producción de leche, debido a la correlación negativa que existe entre ambas variables. Al encontrarse los animales en el primer trimestre de lactación, período de alta producción, es normal que disminuyan sus componentes sólidos (Quintana López et al., 2011). Por este motivo, existe una gran variabilidad de datos referidos a ésta fracción.

El porcentaje de **cenizas** fue de LC1 fue de 0,73 g 100 g⁻¹, similar al encontrado por Quintana López et al. (2011), cuyo promedio fue de 0,74 g 100 g⁻¹. El de LC2 y LC4 fue de 0,99 y 0,99 g 100 g⁻¹, respectivamente, similar al observado por Paz et al. (1,03 g 100 g⁻¹) (2014). El de LC3 fue de 0,85 g 100 g⁻¹, semejante al de Raynal-Ljutovac et al. (2008), cuyo valor declarado fue de 0,80 g 100 g⁻¹, para leche de cabra Saanen Británica. Todos los valores son inferiores a los de las tablas de composición de la UNLu (1,60 g 100 g⁻¹) (2011).

En general, podría decirse que las variaciones entre los resultados obtenidos y los de referencia podrían deberse a diversos factores, entre ellos las

características genéticas de la raza, el estado y momento de lactación en que se realice el ordeño, salud, estado fisiológico y la alimentación del animal (Paz et al., 2014).

2.4.2 Análisis microbiológicos

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados a la muestra LC1, se observan en la **Tabla 3**.

En la prueba de **azul de metileno** no se produjo decoloración del reactivo durante las primeras 5,5 horas, lo que indica que la leche presentó buena calidad higiénica.

Tabla 3. Calidad microbiológica de la leche de cabra.

| Análisis microbiológicos | Leche de cabra | |
|--|---|---------------------|
| Azul de Metileno | Sin modificación de color durante 5,5 horas | |
| Recuento en placa | Valor Mínimo | Valor Máximo |
| BAM (UFC/ml) | 112×10^3 | 5×10^5 |
| CT (UFC/ml) | 16×10^1 | 5×10^2 |
| Células Somáticas (cél/ml) | 246.000 | 355.000 |
| Promedio \pm desvío estándar ($n=21$). | | |

El recuento de **BAM** fue de 5×10^5 UFC/ml como valor máximo; inferior a lo permitido por el CAA (ANMAT, 2014), y al de Paz et al. (2014), cuyo valor fue de $2,6 \times 10^7$ UFC/ml, para leche procedente del mismo tambo.

El máximo recuento de **CT** fue de 5×10^2 UFC/ml, permitido por el CAA (ANMAT, 2014); superior al de Mhone et al. (2011) cuyo valor fue de 1×10^2

UFC/ml ($n=120$) e inferior al de Paz et al. (2014), cuyo resultado fue de $2,5 \times 10^4$ UFC/ml, para leche procedente del mismo tambo.

Ambas pruebas indicaron una buena calidad higiénica de la leche producida por el establecimiento ($<1.000.000$ UFC/ml) (ANMAT, 2014), es decir, sin contaminación fecal producida durante el ordeño, y/o deficiente higiene del equipo de ordeño y personal (Paz et al. 2014).

Para **células somáticas**, los valores mínimos (246.000 cél/ml) y máximos registrados (355.000 cél/ml), fueron inferiores al límite máximo establecido por el CAA: 2.000.000 cél/ml (ANMAT, 2014); y similares a los reportados por Marín et al. (2010): 251.000 a 374.000 cél/ml.

La leche de cabra, como la de cualquier mamífero, contiene una población heterogénea de células somáticas, libres de bacterias, que se desprenden normalmente de la glándula mamaria. Entre ellas pueden mencionarse leucocitos, linfocitos, neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, que sirven como componentes importantes en la defensa contra potenciales patógenos, sobretodo bacterias. Por lo tanto, su recuento es ampliamente utilizado para evaluar la calidad de la leche. Esto se debe a que un valor alto, es signo de un proceso inflamatorio intramamario, constituyendo un marcador sensible de la condición de salud de las ubres (Silanikove et al., 2010).

En la leche de cabra, el nivel basal de células somáticas es de ~ 300.000 cél/ml, mientras que en la de vaca oscila alrededor de ~ 70.000 cél/ml. Esta diferencia tan marcada, hace necesario contar con esquemas de clasificación específicos para cada especie (Silanikove et al., 2010), con el que varios países

no cuentan, pero que en el caso de Argentina, fue incorporado recientemente (ANMAT, 2014).

Leitner et al. (2008) propone un esquema para la clasificación de la leche de cabra en base al recuento de células somáticas en:

- Grado A: < 840.000 cél/ml, asociado a una infección bacteriana subclínica de hasta el 25 % de las cabras del rebaño, una pérdida de leche de hasta el 0,8 % y una pérdida de cuajada de hasta el 3,3 %.
- Grado B: > 840.000 a < 1.200.000 cél/ml, asociado con una infección bacteriana subclínica de hasta el 50 % de las cabras del rebaño, una pérdida de leche de hasta el 1,5 % y una pérdida de la cuajada de hasta el 6,5 %.
- Grado C: > 1.200.000 a < 3.500.000 cél/ml, asociado a una infección bacteriana subclínica de hasta el 75 % de las cabras del rebaño, una pérdida de leche de hasta el 2,3 % y una pérdida de cuajada de hasta 9,8 %.

De acuerdo a esto, una leche con > 3.500.000 cél/ml no debería ser aceptada para su comercialización debido a su alta probabilidad de contener patógenos y toxinas, a su mala calidad industrial (baja eficiencia de la cuajada y rendimiento quesero), y a la potencial formación de sustancias radicales tóxicas en la matriz (Leitner et al., 2008).

Por último, otra particularidad de la leche de cabra, es que la cantidad de células somáticas aumenta considerablemente hacia el final de la lactancia. Es así que en algunos países como Israel, asignan esta leche para su

comercialización exclusivamente fluida, quedando descartada para la elaboración de quesos (Silanikove et al., 2010).

2.5 CONCLUSIONES

Las muestras de leche de cabra producidas en tambos locales, presentaron:

- Valores de pH y acidez adecuados de acuerdo a los antecedentes encontrados.
- Un porcentaje de proteínas que, si bien se encuentra por debajo del mínimo exigido por el CAA, depende de varios factores, tales como especie, raza, variabilidad genética dentro de cada raza, paridad, etapa de lactación, clima, temporada y estado de salud de la ubre y del animal en general.
- Un contenido graso superior al mínimo declarado por el CAA, y el cual está influenciado principalmente por la alimentación.
- Un recuento de BAM, CT y Células Somáticas dentro de los rangos establecidos por el CAA.
- En general, buena calidad higiénico-sanitaria y nutricional.

2.6 REFERENCIAS

ADGA (2003). Lactation DHIR Individual Doe Records. Disponible en: <http://www.adga.org/DHIR/ADGA2002BreedAverages2003.htm>.

Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche: Principios de técnica lechera*. Cuarta edición. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.

Albenzio, M., & Santillo, A. (2011). Biochemical characteristics of ewe and goat milk: effect on the quality of dairy products. *Small Ruminant Research*, 101, 33–40.

ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. *Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional*. [En línea] Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1996). Official methods of analysis (16th ed., 4th revision). Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc.

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada) (1995). *Tabla de Composición Química de Alimentos*. La Plata, Buenos Aires.

Deeth, H. C. (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16, 555-562.

Egan, H., Kirk, R., & Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods* (8th ed.). London: Longman.

FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Disponible en: <http://faostat.fao.org>

Fekadu, B., Soryal, K., Zeng, S., Van Hekken, D., Bah, B., & Villaquiran, M. (2005). Changes in goat milk composition during lactation and their effect on yield and quality of hard and semi-hard cheeses. *Small Ruminant Research*, 59, 55-63.

Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). Dairy chemistry and Biochemistry. Department of Food Chemistry. University College. Cork, Ireland. [En línea] Disponible en: https://books.google.com.ar/books?id=6Q8mX8DsDe4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

García, V., Rovira, S., Boutoial, K., & López, M. B., (2014). Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research*, 121 (1), 51-57.

Giménez, M. B., Ramón, A. N., & Núñez de Kairuz, M. S. (2005). *Formulación de un producto fermentado a partir de mezclas de leche de vaca y cabra*. Tesis de Licenciatura en Nutrición. Salta, Universidad Nacional de Salta.

Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155-163.

INTA EEA Salta (2008a). Método de Enumeración de Bacterias Aerobias Mesófilas en Leche: Recuento Aerobio en Placa. Procedimiento Técnico. Laboratorio de Calidad de Alimentos, 1-4.

INTA EEA Salta (2008b). Método de Recuento de Bacterias Coliformes Recuento Directo en Placa. Procedimiento Técnico. Laboratorio de Calidad de Alimentos, 1-4.

INTA EEA Salta (2009). Método de Determinación de pH en leche caprina. Procedimiento Técnico. Laboratorio de Calidad de Alimentos, 1-4.

INTA EEA Salta (2010). Método de Determinación de la Acidez en leche caprina. Procedimiento Técnico. Laboratorio de Calidad de Alimentos, 1-4.

Kondyli, E., Katsiari, M. C., & Voutsinas, L. P. (2007). Variations of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chemistry*, 100, 226-230.

Leitner, G., Silanikove, N., & Merin, U. (2008). Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research*, 74, 221-225.

López del Castillo Lozano, M. (2010). Mejoramiento del Aroma de la Leche de Cabra. Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz. Universidad Veracruzana. Disponible en: <http://www.uv.mx/agronomia/documents/MEJORAMIENTODELAROMADELALECHEDECABRA.pdf>

Luquet, F. M. (1991). *Leche y productos lácteos. Vaca – Oveja – Cabra*. I.S.B.N. Vol. I: 84-200-0695-5. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Marín, M. P.; Fuenzalida, M. I.; Burrows J., & Gecele, P. (2010). *Recuento de células somáticas y composición de leche de cabra, según nivel de producción y etapa de lactancia, en un plantel intensivo de la zona central de Chile*. Archivos de Medicina Veterinaria N° 42, p.p. 79-85. [En línea] Disponible en: <http://mingaonline.uach.cl/pdf/amv/v42n2/art09.pdf>

Mhone, T. A., Matope, G., & Saidi, P. T. (2011). Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk

from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 223-228.

Oliszewski, R., Rabasa, A. E., Fernández, J., Poli, M. A., & Núñez de Kairúz, M. S. (2002). Composición química y rendimiento quesero de la leche de cabra Criolla Serrana del noroeste argentino. *Zootecnia Tropical*, 20 (2). Disponible en [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692002000200003&lng=es&nrm=iso)

[72692002000200003&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692002000200003&lng=es&nrm=iso)

Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88 – 113.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Nuñez de Kairuz, M. S., & Ramón, A. N. (2014). Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. *Food Science and Technology*, 34 (3), 629-635.

Quintana López, A. V., Ruíz López, M. D., Olalla Herrera, M., & Navarro Alarcón, M. (2011). Caracterización físico-química y nutricional de leches fermentadas de cabra. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79, 57-72.

Sexto Foro Federal de la Industria (2007). Cadena Caprina en la Región Noroeste. Jornada de Trabajo. 7 y 8 de junio de 2007. Salta. Disponible en: http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/ganaderia/caprinos/05-informacion_caprina

/_archivos/000001-Comercialización/000010_Cadena%20caprina%20en%20la%20región%20noroeste.pdf

Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. G. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89, 110-124.

Taverna, M., Páez, R., Chávez, M., & Gaggiotti, M. (2007). "La lipólisis en la leche: causas, formas de prevención e incidencia sobre la calidad de los productos lácteos". Disponible en: http://www.aprocal.com.ar/wp-content/uploads/la_lipolisis.htm.pdf

UNLu (2011). Tabla de composición de alimentos. Leche y derivados. I° Edición. Luján, Buenos Aires. Disponible en: <http://www.argenfoods.unlu.edu.ar/Tablas/Grupo/Leche.pdf>

Vega, S., Gutiérrez Tolentino, R., Díaz González, G., González López M., Ramírez Ayala, A., Salas Morales, J. H., Coronado Herrera, M., & González Cabrera, C. (2004). Leche de cabra: producción, composición y aptitud industrial. Disponible en: www.alfa-editores.com/carnilac/Octubre%20Noviembre%2005/TECNOLOGIA%20Leche%20de%20cabra.htm

CAPÍTULO III

QUESO MOZZARELLA DE CABRA

3 QUESO MOZZARELLA DE CABRA

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 Definición

El Artículo 605, Capítulo VIII, del CAA define como Queso al “*producto fresco o madurado que se obtiene por separación parcial del suero de la leche o leche reconstituida (entera, parcial o totalmente descremada), o de sueros lácteos, coagulados por la acción física, del cuajo, de enzimas específicas, de bacterias específicas, de ácidos orgánicos, solos o combinados, todos de calidad apta para uso alimentario; con o sin el agregado de sustancias alimenticias y/o especias y/o condimentos, aditivos específicamente indicados, sustancias aromatizantes y materiales colorantes*” (ANMAT, 2014).

Por otro lado, en el Artículo 618, define al mozzarella como a aquel que “*se obtiene por hilado de una masa acidificada (producto intermedio obtenido por coagulación de la leche por medio de cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas), complementada o no por la acción de bacterias lácticas específicas*” (ANMAT, 2014), y señala las siguientes características como distintivas de su procesamiento:

- Obtención de una masa acidificada sin hilar.
- Hilado de la masa en baño de agua caliente.
- Salado.
- Estabilización y maduración: mínimo de 24 horas (ANMAT, 2014).

Así mismo, menciona que en su elaboración se utilizan ingredientes:

1. Obligatorios: Leche y/o leche reconstituida estandarizadas o no en su contenido de materia grasa; cuajo y/u otras enzimas coagulantes apropiadas; cloruro de sodio (ANMAT, 2014).
2. Opcionales: Masa acidificada; cultivos de bacterias lácticas específicas; leche en polvo; crema; cloruro de calcio; caseinatos; ácidos cítrico, láctico, acético o tartárico; especias, condimentos y/u otras sustancias alimenticias (ANMAT, 2014).

Por último, establece que el producto debe tener las características físico-químicas que se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características físico-químicas del queso mozzarella.

| Requisitos | Valor |
|--|--------------|
| Humedad (g/100 g) | Máx. 60,0 |
| Materia grasa en extracto seco (g/100 g) | Mín. 35,0 |

Fuente: ANMAT, 2014.

La mozzarella, es una de las variedades de quesos de pasta hilada más consumidas en el mundo, de origen italiano, hecho a partir de leche de búfala (Vogt et al., 2015). Esta última, requiere de una proporción de proteínas (4,3-4,7 g%) y grasas (7,0 g% o superior) para conseguir características funcionales óptimas. En su elaboración, se utilizan cultivos lácticos (starter) naturales, incubados a temperatura ambiente en el suero remanente de la fabricación anterior; y cuajo de ternero líquido; ambos se adicionan a la leche a 34-38 °C. La

coagulación ocurre a los 30 minutos, y a partir de allí se procede al lirado (2-3 cm), lo que permite a la cuajada madurar en el suero en un tiempo muy variable, en la mayoría de los casos 5 horas. El estiramiento se realiza en agua caliente (95 °C) para elevar la temperatura de la cuajada a ~68 °C. Finalmente, se les da forma redonda, se sumergen en salmuera fría y se envasan. Su peso puede variar entre 200 a 800 g. El color es blanco, con corteza muy delgada (1 mm) y superficie lisa. El sabor es característico y delicado, y se debe principalmente a la fermentación del ácido láctico por los cultivos lácticos (De Angelis, & Gobbetti, 2011).

En Argentina, existe el Quesillo como pasta hilada, un producto tradicional típico de la región Noroeste. Se consume fresco y es habitualmente elaborado por productores artesanales, utilizando leche cruda y cultivos lácticos naturales que se obtienen de la misma materia prima, dejándola estacionar 12 horas a 25 °C, previo a la adición de cuajo vacuno líquido. La coagulación ocurre entre los 30-40 minutos, a partir de lo cual la cuajada se corta y se deja reposar bajo suero por unos 140-180 minutos, hasta alcanzar el punto de elasticidad ideal, que se verifica introduciendo una porción de masa (~20 g) en agua a 70-75 °C. Este producto se caracteriza por su forma ovalada (20-30 cm de largo y 0,5-1 cm de alto), masa flexible y elástica, peso variable (100-200 g), textura firme y compacta, color blanco o blanco amarillento de acuerdo al porcentaje de leche de cabra o vaca utilizado, sabor láctico suave, carente de corteza u ojos.

En particular, la Mozzarella se caracteriza por su particular consistencia plástica (Niro et al., 2014), producto de la etapa de estiramiento termo-mecánico al que se somete la cuajada durante el procesamiento, lo cual alinea las fibras de caseína de forma paralela, entrelazándolas con canales de grasa y suero

(Vogt et al., 2015). Sus propiedades físico-químicas, características texturales y microestructurales se ven afectadas por diversas variables involucradas durante su elaboración, tales como la composición de la leche, pH del suero previo al estiramiento, tiempo y temperatura de hilado, y condiciones de almacenamiento (Cavalier-Salou, & Cheftel, 1991; Ennis, & Mulvihill, 1999; Hennelly et al., 2005; Lee, Anema, & Klostermeyer, 2004). Sin embargo, el pH del suero es la variable que más influye en la capacidad de la cuajada para ser plastificada y estirada en agua caliente (Yazici et al., 2010), determinando el punto en el que es posible el hilado.

En la elaboración convencional de quesos mozzarella de vaca, el pH de la cuajada disminuye hasta un rango entre 5,8-5,1 (Yazici et al., 2010), favoreciendo la solubilización de fosfato de calcio micelar, la hidratación de la para-caseína y aumentando la proporción de calcio coloidal soluble (Guinee et al., 2002), que pueden afectar la calidad del producto final (Yun et al., 1995).

3.1.2 Producción de quesos a base de leche de cabra

En América del Sur existen 21 millones de cabezas de ganado caprino. Argentina ocupa el segundo lugar en esta actividad (FAOSTAT, 2013), con la mayoría de los animales localizados en la región noroeste, cuya leche obtenida se destina principalmente a la fabricación de quesos (Taboada et al., 2015).

Si bien la venta de quesos posiciona a la Argentina, como un país preferentemente consumidor de quesos de vaca (438.000 Tn/año), hace unos años se abrió un nuevo mercado de quesos de cabra (Oliszewski et al., 2002), debido a que el 30 Agosto de 2006 se promulgó la Ley 26.141 de “*Régimen para la Recuperación, Fomento y Desarrollo de la Actividad Caprina*” (Ministerio de

Economía, 2009), que promovió la expansión de este tipo de explotaciones y el interés creciente de la industria en la producción de quesos diferenciados, considerados como delicatesses (Oliszewski et al., 2002).

Por otro lado, la leche de cabra se caracteriza por poseer glóbulos de grasa de tamaño pequeño y de un color más blanco, debido a que todo el β -caroteno es transformado a vitamina; contiene más de 20 ácidos grasos volátiles de cadena ramificada tales como el ácido 4-metiloctanoico y 4-etiloctanoico, que contribuyen a darle un sabor típico; es pobre en caseínas y a la vez éstas son menos estables al calor; el tiempo de coagulación por enzimas es corto, y la débil consistencia del gel explica el bajo rendimiento quesero (Niro et al., 2014). Nutricionalmente constituye una fuente natural de oligosacáridos derivados de la lactosa, ácido linoleico conjugado, vitaminas A y del complejo B (Haenlein, & Anke, 2011), y calcio (Paz et al., 2014).

Varios autores han informado los efectos del pH sobre las características físico-químicas de las mozzarellas de vaca (Yun et al., 1993; Joshi, Muthukumarappan, & Dave, 2002, 2004; Zisu, & Shah, 2005) y búfala (Yazici et al., 2010); sin embargo, no se registran estudios relacionados a la producción de éste tipo de queso a base de leche de cabra debido a la menor capacidad para su fabricación en comparación con la de vaca, lo que hace del estiramiento un procedimiento difícil (Niro et al., 2014). En este sentido, el desarrollo de la tecnología adecuada para la producción de quesos innovadores, encaminados a la obtención de productos con características apropiadas, resulta de gran interés.

3.2 OBJETIVOS

Estandarizar el proceso de elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra, a fin de obtener un producto de adecuadas características físico-químicas y texturales.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Materiales

Para la elaboración del Queso Mozzarella a base de leche de cabra se utilizaron los siguientes materiales:

- Leche de cabra biotipo Saanen y Criolla, obtenida en el primer trimestre de lactación, de productores de la localidad de Vaqueros, Salta, Argentina.
- Enzima coagulante CHY-MAX™, quimosina 100% pura (Chr. Hansen, Argentina), producida por fermentación, lo cual requiere menor dosificación y facilita un mejor control de los procesos de elaboración.
- Bacterias lácticas liofilizadas de inoculación directa como cultivo starters: *Streptococcus thermophilus* (ST-M7 ®) y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB-12 ®) (Chr. Hansen, Argentina).
- Cloruro de calcio (Anedra, Brasil).
- Cloruro de sodio comercial.

3.3.2 Métodos

3.3.2.1 Estandarización de la concentración de cultivos lácticos liofilizados a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella

Con el objetivo de acortar los tiempos de elaboración del producto, se procedió a establecer la relación y concentración de cultivos lácticos liofilizados (Morales-Celaya et al., 2012) a utilizar durante la etapa de pre-maduración. Se prepararon 7 muestras de leche de cabra, homogéneas entre sí, que fueron inoculadas con los starters en cantidades recomendadas por el proveedor, de acuerdo a las combinaciones que se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Combinaciones de cultivo starter, en diferentes relaciones y concentraciones, utilizadas para alcanzar un pH de 6,0.

| Muestras | Relación | Concentración | Temperatura de Incubación (°C) |
|----------|---------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| | coco:bacilo | (g 100 mL ⁻¹ de leche) | |
| | ST-M7 : LB-12 | ST-M7 : LB-12 | |
| 1 | 1 : 0 | 0,010 : 0,000 | 37 |
| 2 | 1 : 0 | 0,010 : 0,000 | 45 |
| 3 | 0 : 1 | 0,000 : 0,010 | 37 |
| 4 | 1 : 1 | 0,010 : 0,010 | 37 |
| 5 | 1 : 1,5 | 0,010 : 0,015 | 37 |
| 6 | 2 : 1 | 0,020 : 0,010 | 37 |
| 7 | 3 : 1 | 0,030 : 0,010 | 37 |

Se seleccionó aquella muestra que registró menor tiempo para alcanzar un pH de 6,00 ± 0,01, punto en el cual se ha demostrado que la enzima presenta

la máxima actividad proteolítica sobre la caseína (Van Hooydonk, Hagedoorn, & Boerrigter, 1986). Las temperaturas utilizadas variaron de acuerdo a los rangos mínimos y máximos recomendados por el proveedor.

3.3.2.2 Estandarización de la concentración de enzima coagulante quimosina a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella

A partir del resultado del ensayo anterior, se procedió a aumentar la temperatura de la leche hasta los 43 ± 2 °C, y se adicionó la enzima coagulante en los rangos mínimo, medio y máximo recomendados por el proveedor: 0,001; 0,002 y 0,003 g 100 mL⁻¹, respectivamente. Manteniendo la temperatura, se dejó reposar 30 minutos hasta obtener un coágulo firme, homogéneo y de superficie brillante. Se midió la dureza del gel con un analizador de textura QTS (Brookfield), y se eligió la concentración de enzima que otorgó mayor consistencia a la cuajada.

3.3.2.3 Elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra

Para la elaboración del queso mozzarella, se partió de leche de cabra entera pasteurizada, a la que se le adicionó CaCl₂. Se incorporaron los cultivos lácticos liofilizados en la relación y concentración seleccionadas de acuerdo a ensayos previos. Se dejó en estufa hasta pH de 6,0. Transcurrido el tiempo de pre-maduración, se adicionó la quimosina, se dejó coagular y se procedió al corte de la cuajada. Se desueró de manera parcial, y se reposó la masa bajo suero hasta alcanzar tres puntos diferentes de pH de desuerado, que permitieran un posterior amasado e hilado de la cuajada (**Tabla 6**).

Tabla 6. Codificación de los Quesos Mozzarella de Cabra hilados a diferentes pH de desuerado.

| Queso Mozzarella de Cabra hilado a pH de suero | Codificación |
|---|---------------------|
| 5,0 | MC50 |
| 5,3 | MC53 |
| 5,6 | MC56 |

Obtenidos los productos, se sumergieron en salmuera fría y se dejó estacionar por 24 horas antes de realizar los análisis. El proceso de elaboración del queso mozzarella puede observarse en la **Figura 1**.

3.3.2.4 Análisis físico-químicos del queso mozzarella de cabra

Para la determinación de la composición físico-química de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, se realizaron los siguientes ensayos:

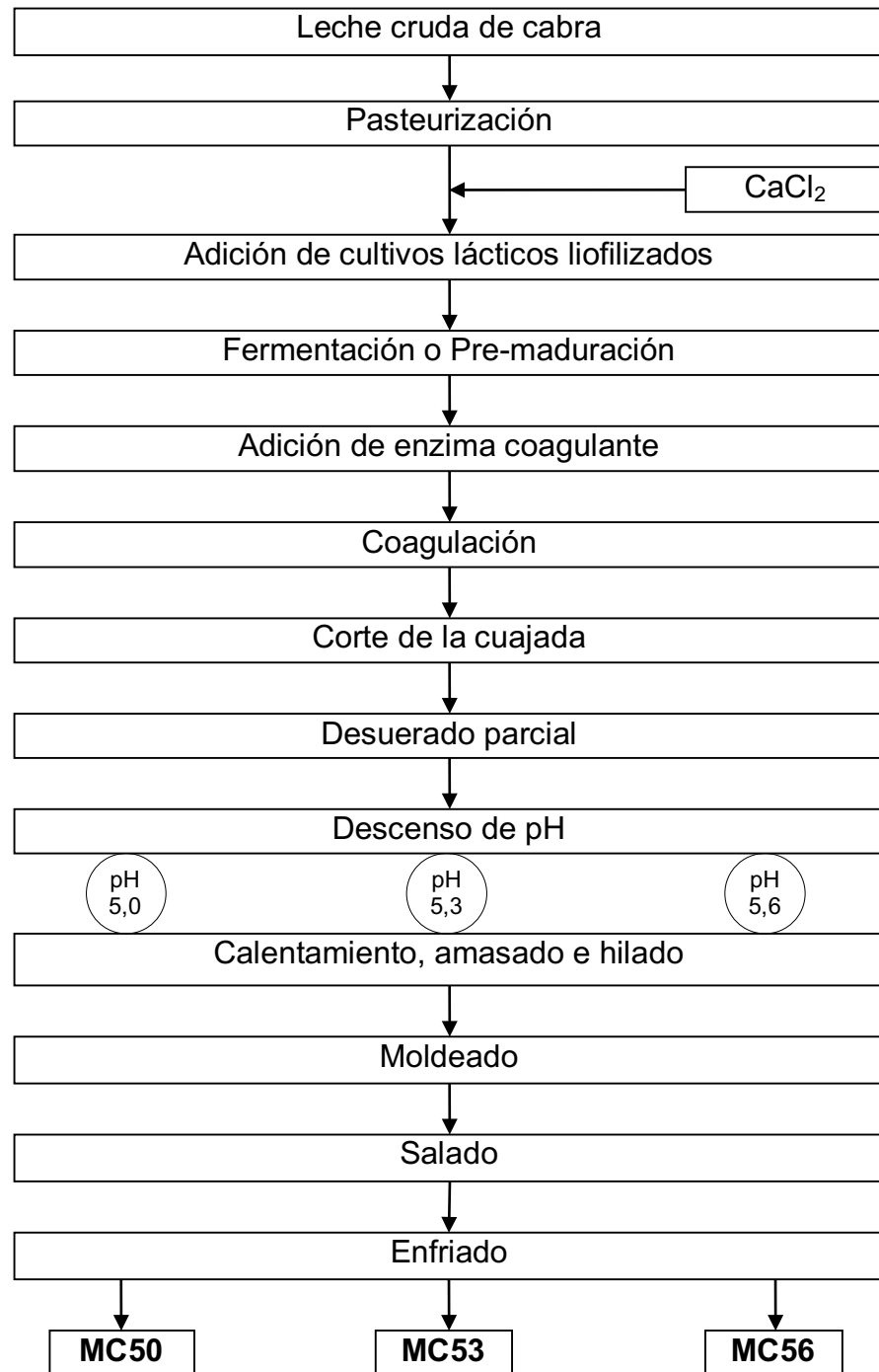
- **pH:** Con pHmetro digital Hanna Instruments modelo HI 8424.

Fundamento: Indica la concentración de iones hidrógeno en una disolución.

Procedimiento: Se suspenden 10 gramos de muestra en 10 ml de agua destilada (Niro et al, 2014) previamente calentada a 70 °C (El Galiou et al., 2015), se mezcla y se homogeniza. Se toma el pH en la suspensión resultante. Previo a la determinación, el peachímetro se calibra con tampones estándar 4 y 7 (Laboratorio Merk, Argentina).

Cálculo: Lectura directa en la pantalla digital.

Figura 1. Flujograma de elaboración de los quesos mozzarella a base de leche de cabra.

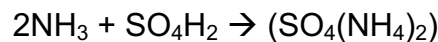


- **Proteínas:** Por el método micro-Kjeldhal (AOAC, 1996).

Fundamento: Este método se utiliza para determinar todo el nitrógeno reducido presente (-NH₂ y -NH) de modo que los compuestos amoniacales, urea y aminoácidos libres también son determinados (purinas, pirimidinas, creatina, creatinina, metil-aminas, nitritos, nitratos). Involucra una oxidación húmeda con ácido sulfúrico, convirtiendo el nitrógeno presente a sulfato de amonio. La descomposición de este último se realiza por alcalinización con hidróxido de sodio y el amonio se destila captándolo en solución con ácido sulfúrico 0,1 N, titulando posteriormente su exceso, con hidróxido de sodio 0,1 N.

La determinación de nitrógeno por este método se realiza en tres etapas:

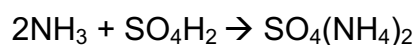
1º Etapa: Mineralización o Digestión: El ácido sulfúrico (SO₄H₂) convierte el nitrógeno (N₂) en amoníaco (NH₃) y éste queda retenido como sulfato de amonio (SO₄(NH₄)₂).



2º Etapa: Neutralización: Liberación de la base débil mediante una base fuerte. En esta fase el NaOH en concentración alta desplaza a la base débil, es decir, NH₃.



3º Etapa: Destilación: del amoníaco con el ácido, formándose el sulfato de amonio SO₄(NH₄)₂.



Se utiliza el sulfato de cobre como catalizador de la oxidación, permitiendo acortar el tiempo de digestión al actuar como transportador de oxígeno.

El sulfato de potasio o de sodio se utiliza para aumentar el punto de ebullición del ácido sulfúrico en la etapa de digestión.

Procedimiento:

- Se coloca una muestra de 0,1 g en un tubo de mineralización Kjeldhal, se agrega 1,5 g de sulfato de cobre, 7,5 g de sulfato de sodio y 10 ml de ácido sulfúrico (95-98 %, densidad 1,84 g/ml).
- Se coloca el tubo en el digestor, se lo deja por 2 horas para completar la mineralización, hasta coloración verde brillante.
- Se enfría a 25 °C y se adiciona 30-40 ml de agua destilada. Se agrega hidróxido de sodio concentrado (40 %) para llevar el medio a la alcalinidad. Se conecta rápidamente el tubo al sistema de destilación, en cuyo extremo final se coloca un erlenmeyer de 250 ml de boca ancha, para recibir el destilado sobre ácido sulfúrico 0,1 N (no menos de 25 ml), utilizando rojo de metilo como indicador.

Cálculo: El cálculo del porcentaje de nitrógeno se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(N - n) \times 0,014 \times 100}{g}$$

g

N = Volumen x normalidad x factor de corrección, del ácido.

n = Volumen x normalidad x factor de corrección, de la base.

g = Gramos de muestra.

Luego, se obtiene el contenido de proteínas, multiplicando % N por un equivalente de conversión para los lácteos caprinos (ANMAT, 2014):

$$\% \text{ proteínas} = \% \text{ N} \times 6,38$$

- **Grasas:** En butirómetro para queso, por el método Gerber (AOAC, 1996).

Fundamento: El ácido sulfúrico precipita la caseína, mientras que la adición de alcohol amílico facilita la separación de la grasa, recubriéndola y protegiéndola contra la destrucción del ácido sulfúrico.

Procedimiento: En el butirómetro para queso se vierte cuidadosamente lo siguiente, mediante una pipeta:

- 10 ml de SO_4H_2 al 90 %
- 6-7 ml de agua destilada a 60 °C
- 1 ml de alcohol amílico

En el tapón contenedor se pesan 3 g de queso, se lo coloca en el butirómetro, se mezcla con movimientos de inversión, hasta que no se vean partículas blancas. Con el tapón hacia abajo, se coloca en agua a 65 ± 2 °C, se centrifuga durante 4-5 minutos a 1100 rpm y se vuelve a llevar con cuidado al baño a 65 ± 2 °C durante 10 minutos.

Cálculo: Lectura directa del espesor de la capa de grasa en escala graduada del butirómetro, por ajuste del tapón de goma.

- **Sólidos Totales:** gravimétricamente por desecación en estufa (AOAC, 1996).

Fundamento: Están constituidos por las distintas sustancias en solución, suspensión y emulsión y varía entre ciertos límites; es mucho menos variable si se corrige de la grasa ya que éste es el componente más variable. Por consiguiente, se acostumbra a determinar el extracto seco total y la grasa, para luego corregir el primero de esta y obtener el extracto seco no graso (**SNG**).

Procedimiento: Se secan los pesafiltros en estufa a 105 °C, durante 2 horas, se enfrían en desecador y se pesan poco después de alcanzar la temperatura ambiente. Se vierten 5 g de queso. Se seca en estufa a 105 °C, hasta peso constante ± 5 mg, aproximadamente hasta completar las 5 horas.

Cálculo: El residuo seco corresponde a los sólidos totales y la pérdida de peso a la humedad. El porcentaje se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Extracto Seco} = \frac{\text{Peso de la muestra tras la desecación}}{\text{Peso de la muestra antes de la desecación}} \times 100$$

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P1 - P2}{g} \times 100$$

P1: Pesafiltro con muestra antes de la estufa

P2: Pesafiltro con muestra después de la estufa

g: Gramos de la muestra

- **Cenizas Totales:** por calcinación en mufla (AOAC, 1996).

Fundamento: Es una medida del total de minerales presentes en el alimento.

Procedimiento: Se limpian y se marcan los crisoles y se llevan a mufla durante 4-8 horas a 500-600 °C, se enfrían a 100-150 °C aproximadamente, se llevan a un desecador y se pesan. Se agrega 1 g de muestra y se carboniza lentamente en mechero bajo campana. Se incinera en mufla a 600 °C. Se enfría y se pesa.

Cálculo: Se obtiene el porcentaje de cenizas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{\text{Peso de crisol cenizas} - \text{Peso de crisol}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Después de pesar las cenizas, se agregan 5 ml de solución 1:1 de agua destilada y CIH (36,5-38 %, densidad 1,18 g/ml), se calienta suavemente, se filtra la solución ácida a través de un papel de filtro con agua destilada, a un matraz de 100 ml. Se coloca el papel de filtro en la misma cavidad del crisol y se reduce a cenizas sobre llama. Se agrega 5 ml de CIH (1:1) y se calienta unos minutos. Finalmente se filtra y se lleva a volumen, obteniéndose la solución de cenizas para la posterior determinación de **Calcio** y **Sodio** por espectrofotometría de absorción atómica (AOAC, 1996); y **Fósforo** por espectrofotometría de absorción molecular (AOAC, 1996).

Finalmente, luego de la caracterización físico-química de los productos obtenidos, se calculó el **Rendimiento Quesero (RQ)**. Éste se describe como el contenido de nutrientes recuperados a partir de la leche (Solorza, & Bell, 1998), por lo que estará especialmente relacionado con el contenido de proteínas, grasa y calcio en el coágulo, asociados con la humedad. Se expresa en porcentaje, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{RQ (\%)} = \frac{\text{Peso del queso obtenido (Kg)}}{\text{Cantidad de leche utilizada (Lts.)}} \times 100$$

- **Humedad:** por diferencia.

Fundamento: Se determina indirectamente su contenido en 100 g mediante diferencia de nutrientes.

Procedimiento: A 100 g de queso, se le resta la cantidad de sólidos totales.

Cálculo:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \text{Sólidos Totales}$$

3.3.2.5 Análisis del Perfil de Textura (APT)

Los cambios en la microestructura influyen sobre las propiedades físico-químicas de los quesos, por lo que resulta fundamental estudiar cómo afectan las condiciones de procesamiento sobre la misma (Ong et al., 2012). Las características de textura de los productos se analizaron en equipo QTS (Brookfield). Para ello, las muestras refrigeradas (4 °C) se cortaron con un molde cilíndrico de 50 mm de diámetro x 15 mm de altura, y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente (~22 °C) durante 10 minutos. Se utilizó una celda de carga de 500N, con un émbolo plano de 10 mm de diámetro, a una velocidad de 30 mm min⁻¹. Se seleccionó una compresión del 50 % a fin de permitir una deformación sin romper la muestra. Los datos fueron recolectados a través del software Pro v2.0. Por otro lado, se utilizó el escáner Hewlett Packard C3180

para fotografiar la macroestructura de las muestras durante el proceso de elaboración.

3.3.2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para conocer la microestructura de las muestras se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) Jeol (JSM 6480 LV, Tokio, Japón), con un voltaje de aceleración entre 0,2 y 30 Kv, incluyendo los sensores de electrones secundarios y retrodispersados, trabajando con alto y bajo vacío. Los quesos fueron analizados utilizando muestras cilíndricas de 0,5 cm de diámetro por 0,2 cm de alto y fijadas en formol al 36 % a temperatura de refrigeración durante 2 meses. Las muestras fijadas se deshidrataron con una serie graduada de etanol (30, 50, 70, 80, 90 y 100 g por 100 g, 15 min en cada una), se secaron por punto crítico, se metalizaron con oro y finalmente se colocaron en los tubos del equipo SEM para conocer su microestructura interna. Las microfotografías SEM más representativas fueron las seleccionadas para su presentación.

3.3.2.7 Análisis de color

El color de los quesos se determinó con un colorímetro Coleman Parmer utilizando los parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^*) (CIE, 1996). Las sensaciones visuales que se envían al cerebro crean las tres dimensiones de la respuesta juicio color que se refieren a menudo como el espacio de color tridimensional. En el sistema CIE Lab, estas dimensiones se expresan como: L^* definida como como luminancia o luminosidad, variando de negro (cero) a blanco (100), indicando la capacidad de un objeto para reflejar o transmitir la luz; y los otros dos están relacionados con la cromaticidad: a^* de verde ($-a^*$) a rojo ($+ a^*$) y b^* de azul ($-b^*$) a amarillo ($+ b^*$). El CIE (Commission Internationale de l'Eclairage)

L*, a*, b* y características de color se determinaron utilizando el ColorTec, PCM colorímetro (Precision Microsensor Inc., Pittsford, EE.UU.) equipado con fuente de luz D65 y un ángulo de observación de 10°. Las mediciones se realizaron por triplicado por cada muestra de queso.

3.3.2.8 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar de las mediciones replicadas. Para encontrar diferencias significativas entre los análisis, las medias fueron analizadas mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y Prueba de Duncan para determinar el nivel de significación entre ellas ($P < 0,05$), utilizando Microsoft de Excel StatPro™.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Estandarización de la concentración de cultivos lácticos liofilizados a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella

Los cultivos lácticos liofilizados que presentaron un descenso de pH de 6,66 a 6,00, en el menor tiempo posible, se encontraron en la muestra 5, en la cual se utilizó una combinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, con una relación coco:bacilo de 1,0:1,5, que corresponden a una concentración de 0,010:0,015 g 100 mL⁻¹ de leche (**Tabla 7**), respectivamente.

Tabla 7. Tiempos registrados de acuerdo a las diferentes combinaciones de cultivo lácticos liofilizados utilizados durante la etapa de pre-maduración.

| Muestras | Tiempo (min) |
|-----------------|---------------------|
| 1 | 65 |
| 2 | 48 |
| 3 | 60 |
| 4 | 45 |
| 5 | 30* |
| 6 | 40 |
| 7 | 35 |

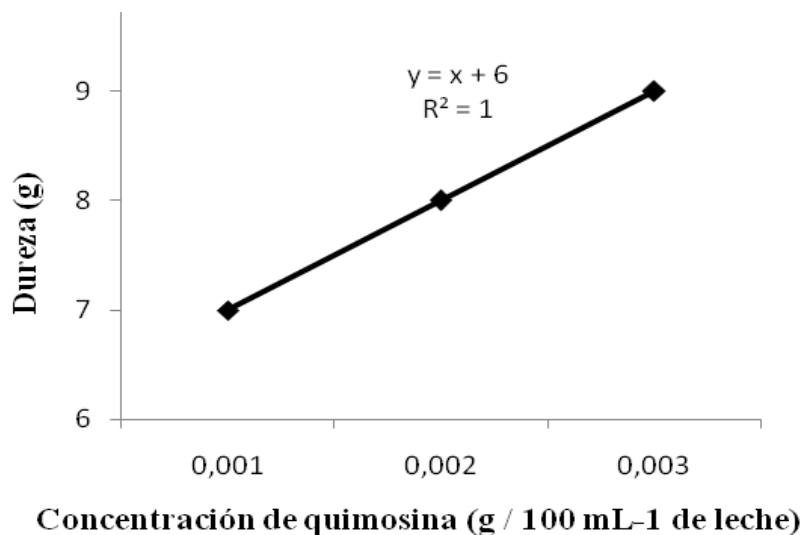
*Menor tiempo registrado.

Se ha demostrado que, al disminuir el pH inicial de la leche con el empleo de cultivos lácticos liofilizados (pre-maduración) (Morales-Celaya et al., 2012), el mismo está más próximo al óptimo de la quimosina por lo que la coagulación ocurre en forma más rápida (Hannon et al., 2006); además, reducen la repulsión electroestática entre las micelas de caseína de carga superficial (potencial Z) negativa a pH normal de la materia prima, neutralizándose parcialmente a medida que el pH desciende; por último, alteran la distribución de calcio entre las micelas y la fase sérica (Ong et al., 2012). Todo esto resulta en tiempos más cortos de elaboración del producto.

3.4.2 Estandarización de la concentración de enzima coagulante quimosina a utilizar durante la elaboración del queso mozzarella

Los resultados mostraron que a mayor concentración de enzima coagulante adicionada, la consistencia del gel aumenta, presentando valores de dureza de 7,00; 8,00 y 9,00 g para la adición de 0,001, 0,002 y 0,003 g% de quimosina por cada 100 mL⁻¹ de leche, respectivamente (**Figura 2**), por lo que se eligió la concentración más alta, de modo de obtener un coágulo más firme.

Figura 2. Concentración de quimosina (g/100mL⁻¹) y dureza (g) de la cuajada de los quesos mozzarella a base de leche de cabra.

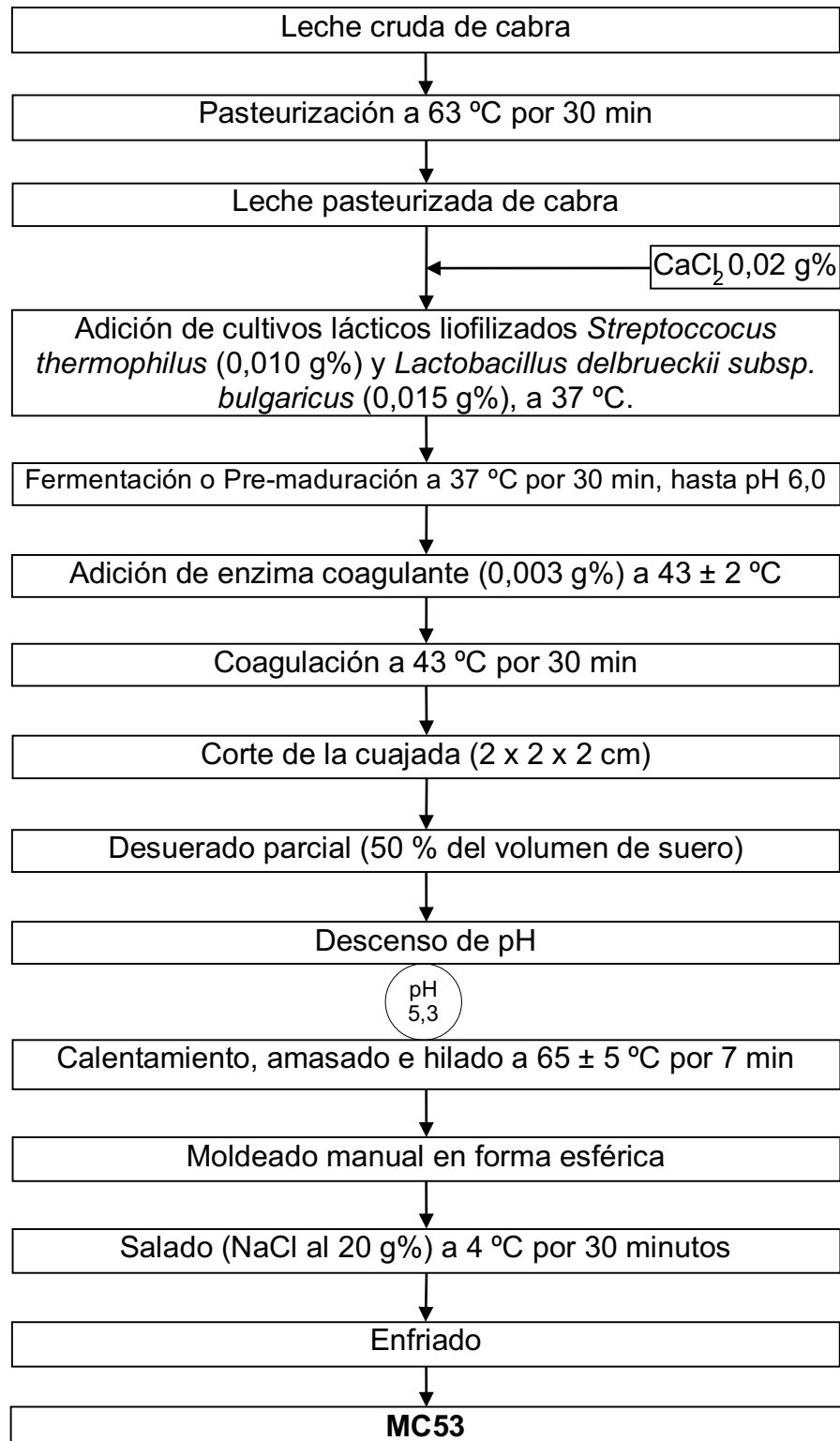


3.4.3 Elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra

Para la elaboración de los productos, se siguió el esquema de la **Figura**

3.

Figura 3. Flujograma definitivo de la elaboración del queso mozzarella a base de leche de cabra.



La leche de cabra entera se pasteurizó a 63 °C por 30 minutos, se le adicionó CaCl₂ en una concentración del 0,02 g% (p/v). A 37 °C, se incorporaron los cultivos lácticos liofilizados *Streptococcus thermophilus* (0,010 g%) y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (0,015 g%). Se dejó pre-madurar en estufa por 30 minutos, hasta alcanzar un pH de 6,0. Se aumentó la temperatura de la leche hasta los 43 ± 2 °C, se adicionó la quimosina en una concentración de 0,003 g% y se dejó coagular por 30 minutos.

Se procedió al corte de la cuajada en un tamaño de 2 x 2 x 2 cm, es decir, cuadrados grandes para favorecer la retención de humedad, necesario en este tipo de quesos de pasta blanda a muy blanda. Se desueró parcialmente, eliminando el 50 % del volumen, y se dejó reposar la masa bajo suero hasta obtener el valor de pH en estudio. Se sumergió la masa en agua caliente y se observó que, cuanto menor era el pH de desuerado, a la misma temperatura (65 ± 5 °C), menores tiempos de amasado, y por lo tanto exposición al calor se requirieron, registrando 5 (MC50), 7 (MC53) y 15 (MC56) minutos. Luego de obtener una pasta elástica y fibrosa para cada muestra, se les dió forma esférica (de aproximadamente 15 cm de diámetro por 5 cm de espesor) y se sumergieron en salmuera fría (4 ± 2 °C) para cortar con la cocción, en una concentración de 20 g% de NaCl, por un tiempo de 30 minutos. Por último, se dejó estacionar 24 horas a 8 ± 2 °C, antes de realizar los análisis.

3.4.4 Análisis físico-químicos del queso mozzarella de cabra

Los resultados del análisis físico-químico de la leche de cabra pasteurizada se muestran en la **Tabla 8**.

La acidez titulable (10,83 °D), los valores de proteínas (2,52 g 100 g⁻¹) y SNG (7,38 g 100 g⁻¹), fueron inferiores a lo mínimo establecido por la legislación vigente (14-22 °D; 2,8; y 9,0 g 100 g⁻¹, respectivamente); mientras que el contenido de grasa (3,48 g 100 g⁻¹) fue superior (3 g 100 g⁻¹) (ANMAT, 2014).

Tabla 8. Parámetros físico-químicos de la leche utilizada en la elaboración de los quesos mozzarella.

| Parámetros físico-químicos | Leche de cabra pasteurizada |
|--|------------------------------------|
| pH | 6,66 ± 0,01 |
| Acidez Titulable (°D) | 10,83 ± 0,19 |
| Proteína (g 100 g ⁻¹) | 2,52 ± 0,05 |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 3,48 ± 0,02 |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 3,87 ± 0,26 |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 10,86 ± 0,15 |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 7,38 ± 0,22 |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 0,99 ± 0,00 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 219,99 ± 20,23 |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 272,62 ± 0,34 |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 132,82 ± 11,48 |

Promedio ± desvío estándar (*n*=1) en base a las determinaciones por triplicado.

Los resultados del análisis físico-químico de los quesos mozzarella a base de leche de cabra se resumen en la **Tabla 9**.

El **pH** de los productos fue de 5,42 (MC50); 5,70 (MC53) y 5,94 (MC56). Se observaron diferencias significativas, y los valores estuvieron directamente

relacionados al pH del suero previo al calentamiento, amasado e hilado de la masa.

Tabla 9. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra.

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | MC50 | MC53 | MC56 |
| pH | 5,42 ± 0,12 ^b | 5,70 ± 0,05 ^{a,b} | 5,94 ± 0,09 ^a |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 26,66 ± 0,43 ^a | 26,50 ± 0,51 ^a | 28,87 ± 0,51 ^a |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 22,66 ± 0,28 ^b | 23,66 ± 0,28 ^a | 20,66 ± 0,28 ^c |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 51,44 ± 0,18 ^a | 52,49 ± 0,42 ^a | 53,89 ± 0,10 ^b |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 2,64 ± 0,10 ^a | 2,98 ± 0,12 ^a | 3,27 ± 0,17 ^a |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 601,30 ± 1,00 ^c | 725,95 ± 14,31 ^b | 853,58 ± 24,45 ^a |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 573,64 ± 0,29 ^c | 620,25 ± 0,68 ^b | 644,28 ± 0,84 ^a |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 284,97 ± 3,75 ^a | 277,20 ± 9,50 ^a | 297,70 ± 6,42 ^a |
| Humedad (g 100 g ⁻¹) | 48,56 ± 0,18 ^a | 47,51 ± 0,42 ^a | 46,11 ± 0,10 ^b |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El valor de MC53 fue parecido al obtenido por Niro et al. (2014), de 5,72, para un queso de pasta hilada (Caciocavallo) con mezcla de leches de vaca y cabra, en una proporción de 65:35.

Con respecto a las **proteínas**, su contenido fue de 26,66; 26,50 y 28,87 g 100 g⁻¹, para las muestras MC50, MC53 y MC56, respectivamente. Si bien el contenido de proteínas fue mayor a medida que aumentó el pH, no se observaron diferencias significativas entre las muestras, y fueron superiores a los de Niro et al. (2014): 24,26 g 100 g⁻¹.

La materia **grasa** para MC50, MC53 y MC56 en *base seca* fue de 42,44; 45,07 y 38,33 g 100 g⁻¹, respectivamente, los mismos se encuentran por encima del mínimo establecido (35 g 100 g⁻¹) por el CAA, con respecto a los requisitos químicos de un queso mozzarella.

La menor retención de grasa de MC56, se debió a que fue sometida a calentamiento durante un mayor período de tiempo para que ocurra el hilado, provocando una mayor pérdida en el agua caliente que se utiliza para estirar la cuajada, causada por los glóbulos de grasa más pequeños en la leche de cabra (Paz et al., 2014).

MC53 fue la muestra que tuvo un contenido graso en base seca, similar al de Niro et al. (2014) en queso Caciocavallo (45,90 g 100 g⁻¹). Se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Los porcentajes de **Sólidos Totales** fueron de 51,44 (MC50); 52,49 (MC53) y 53,89 (MC56) g 100 g⁻¹; similares a los de Niro et al. (2014), quien tuvo un valor de 54,8 g 100 g⁻¹.

El contenido de **cenizas totales** fue de 2,64; 2,98 y 3,27 g 100 g⁻¹, para las muestras MC50, MC53 y MC56, respectivamente; inferiores a los de Niro et al. (2014), cuyo valor fue de 4,48 g 100 g⁻¹.

En este estudio, no se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Las concentraciones de **calcio** fueron 601,30 (MC50); 725,95 (MC53) y 853,58 (MC56) mg 100 g⁻¹. Se observaron diferencias significativas entre todas las muestras, lo cual se debe a que a altos valores de pH de desuerado, el tiempo

para la solubilización del fosfato de calcio micelar y el aumento en la proporción de Ca coloidal soluble, es menor (Guinee et al., 2002), lo que produce mayor retención de éste mineral en el producto final (Ong et al., 2015).

En cuanto al **fósforo**, se obtuvo valores de 573,64; 620,25 y 644,28 mg 100 g⁻¹, para las muestras MC50, MC53 y MC56, respectivamente; manteniendo en todas las muestras una relación Ca/P superior a 1, por lo cual no estaría presente el factor desencadenante de pérdida de masa ósea (Teegarden, 1998). También se observaron diferencias significativas.

Con respecto al **sodio**, los valores obtenidos fueron 284,97; 277,20 y 297,70 mg 100 g⁻¹, para las muestras MC50, MC53 y MC56, respectivamente; inferiores a las mozzarellas comerciales, a base de leche de vaca, contempladas en otros estudios (Agarwal et al., 2011). No se observaron diferencias significativas.

Los porcentajes de **humedad** de MC50 (48,56 g 100 g⁻¹) y MC53 (47,51 g 100 g⁻¹), fueron superiores al de MC56 (46,11 g 100 g⁻¹). Sin embargo, todos son de “*alta humedad*” de acuerdo a la clasificación general de quesos del CAA (46-54,9 g 100 g⁻¹) y no superan el máximo (60 g 100 g⁻¹) establecido como requisito químico de un queso mozzarella (ANMAT, 2014). Se observaron diferencias significativas.

El **RQ** fue de 10,82^a; 11,20^a y 9,44^b para las muestras MC50, MC53 y MC56, respectivamente. Las diferencias observadas entre ellas concuerdan con la composición química general de los quesos: a pH alto de suero, menor humedad por mayor exposición a tiempo de amasado y estiramiento en agua caliente, con la consecuente pérdida de grasa, y concentración de calcio y proteína en la masa

del queso; en cambio, a pH bajo de suero, ocurre todo lo contrario (Solorza, & Bell, 1998).

3.4.5 Análisis del Perfil de Textura (APT)

La muestra MC56 fue la que presentó un valor de dureza más alto (**Tabla 10**), lo cual podría estar relacionado al menor porcentaje de humedad provocado por el largo tiempo de amasado y estiramiento en agua caliente, y mayor contenido de proteínas y, por lo tanto, de calcio micelar retenido en la cuajada, resultando en un producto menos adhesivo.

Tabla 10. Parámetros texturales de los quesos mozzarella a base de leche de cabra.

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|----------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MC50 (n=1) | MC53 (n=1) | MC56 (n=1) |
| Dureza | 1421,33 ± 52,08 ^b | 1194,00 ± 149,92 ^c | 1798,00 ± 117,38 ^a |
| Cohesividad | 0,44 ± 0,05 ^a | 0,70 ± 0,05 ^a | 0,65 ± 0,04 ^a |
| Adhesividad | 5,78 ± 0,00 ^b | 12,98 ± 0,00 ^b | 0,08 ± 0,00 ^a |
| Elasticidad | 7,08 ± 0,30 ^a | 6,58 ± 0,09 ^a | 6,26 ± 0,54 ^a |
| Masticabilidad | 7236,94 ± 1023,84 ^a | 6601,53 ± 917,72 ^a | 8485,57 ± 334,57 ^a |

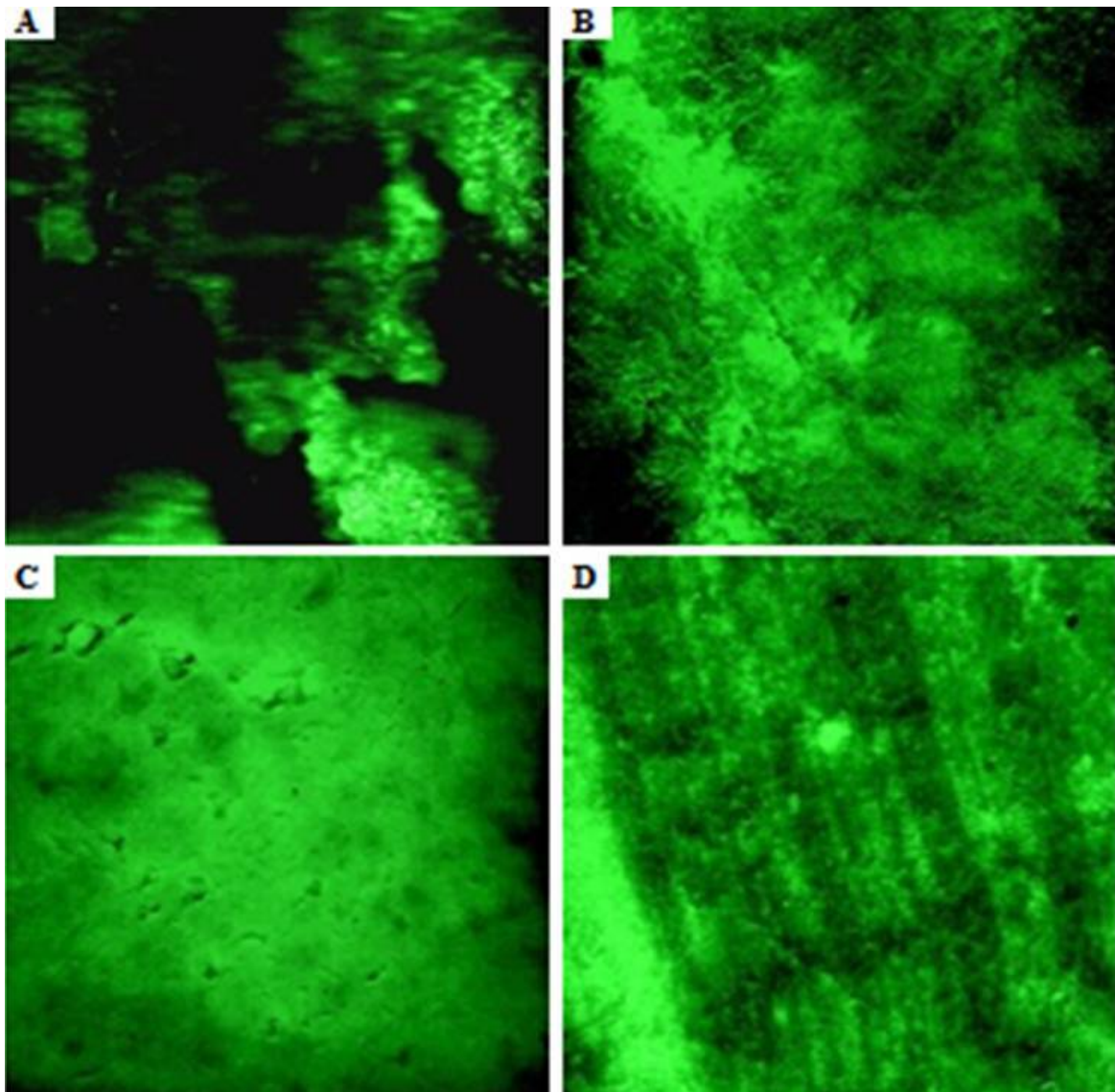
Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas.

Para el resto de los parámetros (cohesividad, elasticidad y masticabilidad), no se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Las fotografías macroestructurales, tomadas durante la elaboración de los quesos (**Figura 4**), muestran que al principio la cuajada carece de estructura, debido a que 15 minutos no sería un tiempo suficiente para que la enzima coagulante ejerza su efecto, a los 90 minutos puede verse como de a poco se

van agregando las proteínas y los 150 minutos la cuajada luce más uniforme y continua. Además, hubo una gran diferencia entre la cuajada y el producto terminado, donde claramente se observa una estructura fibrosa.

Figura 4. Fotografías de los diferentes estados de la cuajada: (A) a los 15 min, (B) a los 90 min, (C) a los 150 min; y del queso mozzarella a base de leche de cabra: (D) producto terminado.



La textura característica de los quesos de pasta hilada puede explicarse, por el rearrreglo estructural que las moléculas de caseína (α , β y κ , que forman parte de las micelas descalcificadas) sufren al someterse la cuajada a calentamiento y trabajo mecánico, alterando su conformación β -placa y α -hélice (Ren et al., 2013). El estiramiento en un sentido (dirección) espacial, orientan y “alinean” a las proteínas, como si fuesen “hilos”. Asimismo, la grasa butirosa, funcionaría como un lubricante para la alineación de las fibras de caseína (Yazici et al., 2010).

3.4.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con microscopía SEM, se observaron diferentes arreglos estructurales de acuerdo al pH utilizado para su elaboración, principalmente con respecto a la presencia y distribución de los hilos de caseína (**Figura 5**).

Los componentes como humedad y grasa fueron retirados de los quesos durante la preparación de las muestras, por lo que las áreas vacías de coloración negra representarían sacos de aire, originalmente ocupados por suero que puede haber sublimado y/o glóbulos de grasa, estos últimos han sido considerados los responsables de formar espacios esféricos vacíos dentro del queso mozzarella; por lo tanto, el fondo sólido de cada microfotografía constituye la matriz proteica (Oberg, McManus, & McMahon, 1993).

En todas las muestras puede observarse la presencia de grandes conglomerados de proteína, debido, posiblemente, a que las mismas se han fusionado durante la formación de la cuajada, dando lugar a la formación de una estructura compacta dentro de la matriz, cuyas dimensiones pueden observarse en la **Figura 6**.

MC50 presentó pocos hilos (grosor aproximado de 21,5 μm) y poros (entre 24,4-55,7 μm de diámetro).

Figura 5. Microestructura de los quesos mozzarella de cabra hilados a diferentes puntos de pH de desuerado: 5,0 (MC50), 5,3 (MC53) y 5,6 (MC56).

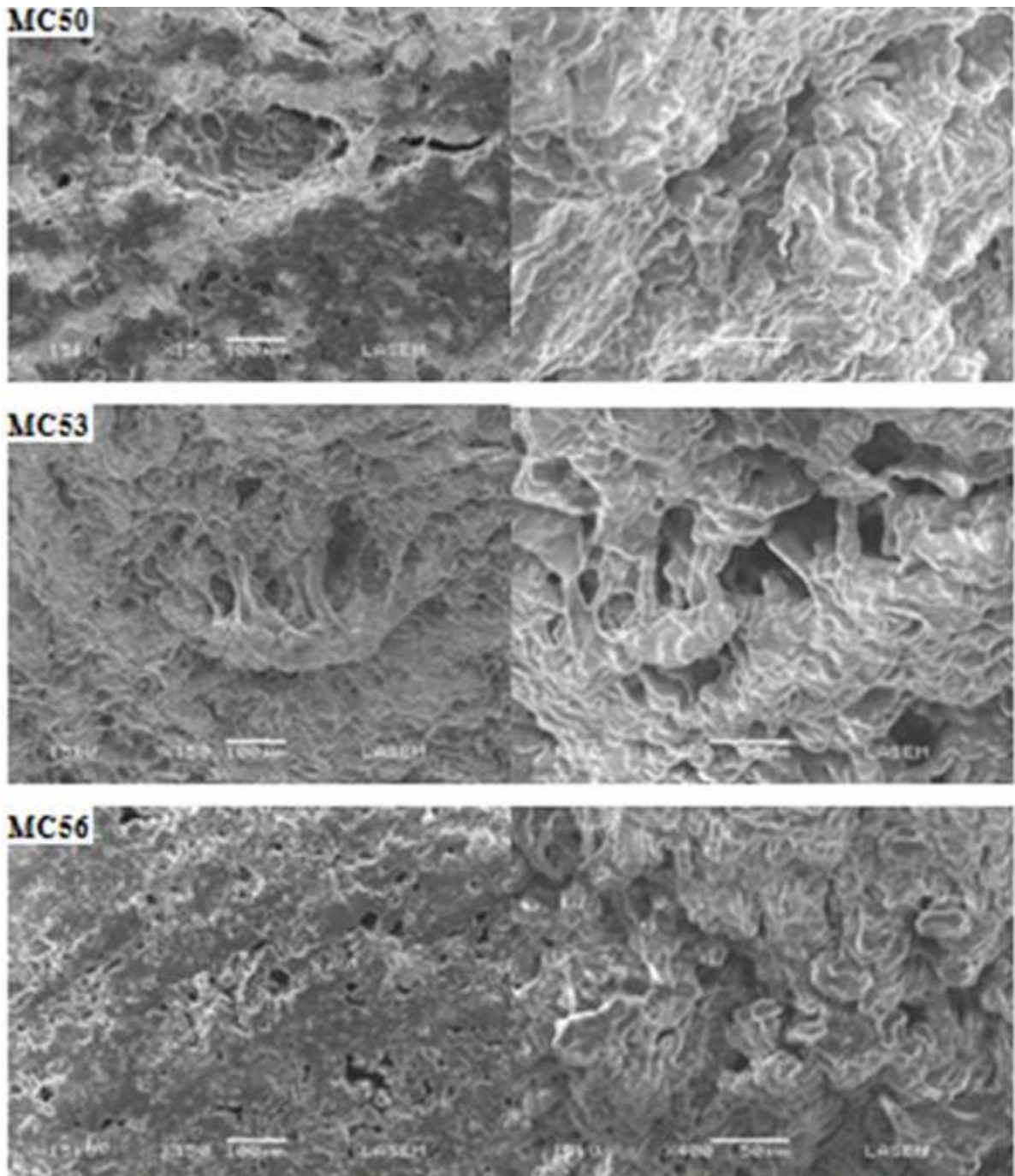
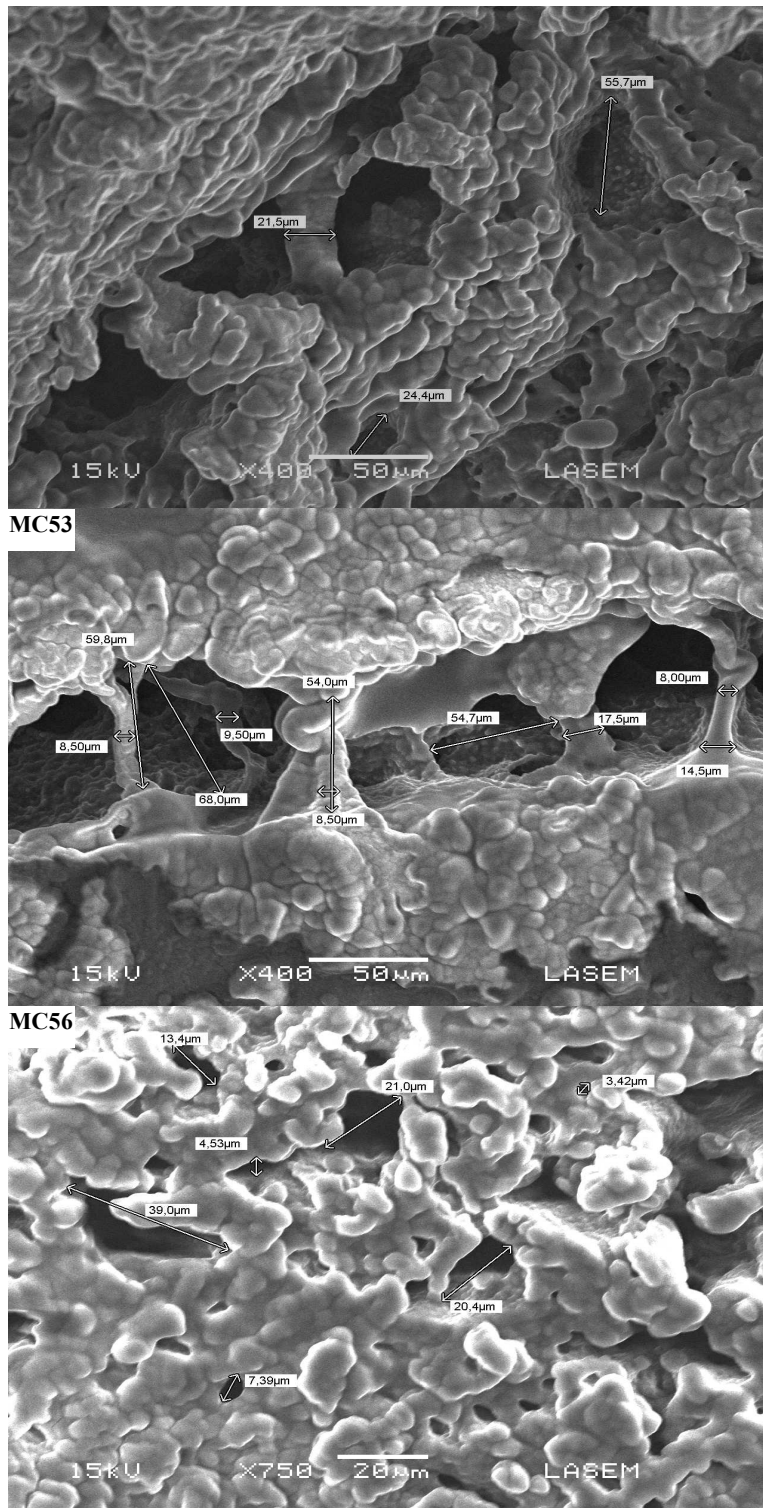


Figura 6. Dimensiones de los hilos presentes en los quesos mozzarella de cabra amasados a diferentes puntos de pH de desuerado: 5,0 (MC50), 5,3 (MC53) y 5,6 (MC56).



En MC56 no se observaron hilos, pero si varios poros pequeños (entre 3,42-39,0 μm). Debido al alto pH de esta muestra, la cuajada debió ser sometida a mayor tiempo de hilado en agua caliente, lo que provocó pérdida de humedad en el producto. Al disminuir el volumen de la fase acuosa, las miscelas de caseína lograron estar más juntas, dejando pocos espacios para la formación de grandes poros.

Por último, en MC53 se observó la presencia de largos (hasta 60 μm) y finos (5,60-9,20 μm) hilos, manteniendo un mismo entramado dentro de la matriz e inclusive en áreas superficiales fisuradas.

3.4.7 Análisis de color

Los resultados de la evaluación del color pueden observarse en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Parámetros de color de los quesos mozzarella a base de leche de cabra.

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | MC50 (n=1) | MC53 (n=1) | MC56 (n=1) |
| L* | 78,06 \pm 0,44 ^a | 77,42 \pm 0,28 ^a | 78,31 \pm 1,07 ^a |
| a* | 5,88 \pm 0,24 ^a | 4,61 \pm 0,99 ^a | 5,06 \pm 0,39 ^a |
| b* | 22,83 \pm 0,71 ^a | 24,00 \pm 0,39 ^a | 21,45 \pm 0,31 ^a |

Promedio \pm desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas.

Los valores de L* fueron de 78,06 (MC50), 77,42 (MC53) y 78,31 (MC56). Los promedios encontrados para todas las muestras en este estudio fueron

inferiores a los encontrados por Niro et al. (2014) (92,5) para un queso de pasta hilada (Caciocavallo) a base de una mezcla de leche de vaca y cabra 65:35 y los de Ramos do Egypto Queiroga et al. (2013) (92,95) para un queso Coalho a partir de leche de cabra.

Los parámetros de a^* fueron de 5,88 (MC50), 4,61 (MC53) y 5,06 (MC56); superior a lo observado por Niro et al. (2014) cuyo valor fue de -6,3. Los quesos de cabra son generalmente de color más blanco ya que estos animales son capaces de convertir el β -caroteno en vitamina A y también producen leche con glóbulos de grasa de menor diámetro en comparación con la de las vacas (Lucas et al, 2008; Park, 2006). Así, cuando los quesos se hacen a partir de mezclas de leche, el aumento de valores de a^* está directamente relacionada a la mayor proporción de leche de cabra (Sheehan et al., 2009).

Las mediciones de b^* (componente azul) fueron de 22,83 (MC50), 24,00 (MC53) y 21,45 (MC56). No se observaron diferencias significativas entre las muestras. Sin embargo, sus valores fueron inferiores a lo reportado por Niro et al. (2014). El aumento en valores de b^* se ha relacionado con la reacción de Maillard, que disminuyen la luminosidad debido a la producción de compuestos de pardeamiento (Lucas et al., 2008).

En general, las muestras evaluadas presentaron valores altos de luminosidad (L^*), con predominio del componente amarillo (b^*) en lugar del componente verde (a^*), lo que sugiere un predominio del blanco-amarillento como principal característica del color de este tipo de queso.

3.5 CONCLUSIONES

A partir de este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La dosis de inoculación que presentó menor tiempo de pre-maduración fue la que utilizó una combinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, con una relación coco:bacilo de 1,0:1,5, y una concentración de 0,010:0,015 g 100 mL⁻¹ de leche, respectivamente.
- La concentración más alta de enzima coagulante adicionada es la que resulta en una mayor consistencia del gel, ayudando a acortar el tiempo de elaboración.
- A pH 5,0 la cuajada estaría próxima al punto isoeléctrico de las proteínas, por lo cual este nutriente precipita y migra hacia el suero, con la consecuente pérdida de calcio micelar ligado a ella. Por otro lado, dió lugar a la formación de hilos, pero siendo estos muy escasos.
- A pH 5,3 el producto presentó adecuado contenido de humedad, grasas, proteínas y calcio. El rendimiento quesero fue mayor, los parámetros de dureza fueron menores y su microestructura reveló la presencia de largos y finos hilos, que le dieron un entramado característico para este tipo de quesos.
- A pH 5,6 la cuajada no alcanzó un punto en el cual sea fácil su estiramiento, lo que requirió un mayor tiempo de exposición a calentamiento para poder obtener el hilado. Esto resultó en un producto con menor contenido de grasa y rendimiento quesero, más calcio, valores altos de dureza, menos adhesividad y ausencia de hilos.

- En general, la leche presentó adecuada aptitud al procesamiento característico de éste tipo de quesos; y a pH 5,3 resultó factible obtener una mozzarella de cabra, con adecuadas características físico-químicas; constituyendo una alternativa para la expansión de las economías regionales dedicadas a la producción de leche y quesos de cabra.

3.6 REFERENCIAS

Agarwal, S., McCoy, D., Graves, W., Gerard, P.D., & Clark, S. (2011). Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and process cheeses varies considerably in the United States. *Journal of Dairy Science*, 94, 1605-1615.

ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. *Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional.* [En línea] Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_VIII.pdf

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1996). Official methods of analysis (16th ed., 4th revision). Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc.

Cavalier-Salou, C., & Cheftel, J.C. (1991). Emulsifying salts influence on characteristics of cheese analogs from calcium caseinate. *Journal of Food Science*, 56 (6), 1542–1547.

CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) (1996). Colourimetry (2nd ed.). Vienna: CIE Publication.

De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Pasta-Filata Cheeses: Traditional Pasta-Filata Cheese. University of Bari, Bari, Italy. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074005124>

El Galiou, O., Zantar, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Centeno, J. A., & Carballo, J. (2015). Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco. *Small Ruminant Research*, 129, 108-113.

Ennis, M. P., & Mulvihill, D. M. (1999). Compositional characteristics of rennet caseins and hydration characteristics of the caseins in a model system as indicators of performance in Mozzarella cheese analogue manufacture. *Food Hydrocolloids*, 13 (4), 325–337.

FAOSTAT, 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Disponible en: <http://faostat.fao.org>

Guinee, T. P., Feeney, E. P., Auty, M. A. E., & Fox, P. F. (2002). Effect of pH and calcium concentration of some textural and functional properties of Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 1655–1669.

Haenlein, G. F. W., & Anke, M. (2011). Mineral and trace element research in goats: a review. *Small Ruminant Research*, 95, 2–19.

Hannon, J. A., Lopez, C., Madec, M. N., & Lortal, S. (2006). Altering renneting pH changes microstructure, cell distribution, and lysis of *Lactococcus lactis* AM2 in cheese made from ultrafiltered milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 812–823.

Hennelly, P. J., Dunne, P. G., O'Sullivan, M., & O'Riordan, D. (2005). Increasing the moisture content of imitation cheese: effects on texture, rheology and microstructure. *European Food Research and Technology*, 220(3), 415–420.

Joshi, N. S., Muthukumarappan, K., & Dave, R. I. (2002). Role of soluble and colloidal calcium contents on functionality of salted and unsalted part skim Mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 203–210.

Joshi, N. S., Muthukumarappan, K., & Dave, R. I. (2004). Effects of reduced calcium, test temperature and storage on stretchability of part skim Mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59, 60–64.

Lee, S. K., Anema, S., & Klostermeyer, H. (2004). The influence of moisture content on the rheological properties of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(7), 763–771.

Lucas, A., Rock, E., Agabriel, C., Chilliard, Y., & Coulon, J. B. (2008). Relationships between animal species (cow versus goat) and some nutritional constituents in raw milk farmhouse cheeses. *Small Ruminant Research*, 74, 243-248.

Ministerio de Economía (2009). Ley 26.141: Régimen para la Recuperación, Fomento y Desarrollo de la Actividad Caprina. Disponible en <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/120000-124999/120041/norma.htm> (en línea, 3.02.15)

Morales-Celaya, M. F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramirez, J., & Vernon-Carter, E. J. (2012). Effect of milk pasteurization and acidification method on the chemical composition and microstructure of a Mexican pasta filata cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 132-141.

Niro, S., Fratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfili, G., & Coppola, R. (2014). Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk. *Journal of Dairy Science*, 97, 1296–1304.

Oberg, C. J., McManus, W. R., & McMahon, D. J. (1993). Microstructure of mozzarella cheese during manufacture. *Food Structure*, 12, 251-258.

Oliszewski, R., Rabasa, A. E., Fernández, J., Poli, M. A., & Núñez de Kairúz, M. S. (2002). Composición química y rendimiento quesero de la leche de cabra Criolla Serrana del noroeste argentino. *Zootecnia Tropical*, 20 (2).

Ong, L., Dagastine, R. R., Kentish, S. E., & Gras, S. L. (2012). The effect of pH at renneting on the microstructure, composition and texture of Cheddar cheese. *Food Research International*, 48, 119–130.

Ong, L., Soodam, K., Kentish, S. E., Powell, I. B., & Gras, S. L. (2015). The addition of calcium chloride in combination with a lower draining pH to change the microstructure and improve fat retention in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 46, 53-62.

Park, Y. W. (2006). Goat milk-chemistry and nutrition. In Y. W. Park, & Haenlein, G. F. W. (Eds.), *Handbook of milks of non bovine mammals* (pp. 34-58). Ames, IO, USA: Blackwell Publishing.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Nuñez de Kairuz, M. S., & Ramón, A. N. (2014). Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. *Food Science and Technology*, 34 (3), 629-635.

Ramos do Egypto Queiroga, R. C., Melo Santos, B., Pereira Gomes, A. M., Monteiro, M. J., Teixeira, S. M., Leite de Souza, E., Dias Pereira, C. J., & Estevez Pintado, M. M. (2013). Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 538-544.

Ren, D., Chen, B., Chen, Y., Miao, S., & Liu, J. (2013). The effects of k-casein polymorphism on the texture and functional properties of mozzarella cheese. *International Dairy Journal*, 31, 65-69.

Sheehan, J. J., Drake, M. A., & Mcsweenwy, P. L. H. (2009). Effect of partial or total substitution of bovine for caprine milk on the compositional, volatile,

nonvolatile and sensory characteristics of semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 19, 498-509.

Solorza, F. J., & Bell, A. E. (1998). Effect of calcium on the minerals retention and cheesemaking parameters of milk. *International Journal Dairy Technology*, 51, 37-43.

Taboada, N., Van Nieuwenhove, C., López Alzogaray, S., & Medina, R. (2015). Influence of autochthonous cultures on fatty acid composition, esterase activity and sensory profile of Argentinean goat cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 86–94.

Teegarden, D. (1998). Dietary calcium, protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 749-754.

Van Hooydonk, A. C. M., Hagedoorn, H. G., & Boerrigter, I. J. (1986). The effect of various cations on the renneting of milk. *Netherlands Milk & Dairy Journal*, 40, 369-390.

Vogt, D. J., Smith, J. R., Seymour, J. D., Carr, A. J., Golding, M. D., & Codd, S.L. (2015). Assessment of the changes in the structure and component mobility of Mozzarella and Cheddar cheese during heating. *Journal of Food Engineering*, 150, 35-43.

Yazici, F., Dervisoglu, M., Akgun, A., & Aydemir, O. (2010). Effect of whey pH at drainage on physicochemical, biochemical, microbiological, and sensory properties of Mozzarella cheese made from buffalo milk during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 93, 5010-5019.

Yun, J. J., Barbano, D. M., & Kindstedt, P. S. (1993). Mozzarella cheese: Impact of milling pH on chemical composition and proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 76, 3629–3638.

Yun, J. J., Barbano, D. M., Kindstedt, P. S., & Larose, K. L. (1995). Mozzarella cheese: Impact of whey pH at draining on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science*, 78, 1–7.

Zisu, B., & Shah, N. P. (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15, 957–972.

CAPÍTULO IV

LOS FITOESTEROLES

4 LOS FITOESTEROLES

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Generalidades

La prevalencia de ENT, está aumentando rápidamente, se ha calculado que en el 2001, las mismas han causado el 60 y 46 % del total de casos de mortalidad y morbilidad del mundo, respectivamente y se prevé que la proporción de esta última, se incremente a un 57 % para el año 2020 (OMS, 2003). Si bien estas patologías tiene un origen complejo y se deben a la conjunción de muchos factores, se acepta que los niveles altos de colesterol plasmático constituyen un importante indicador de riesgo para su desarrollo (Nichols et al, 2012).

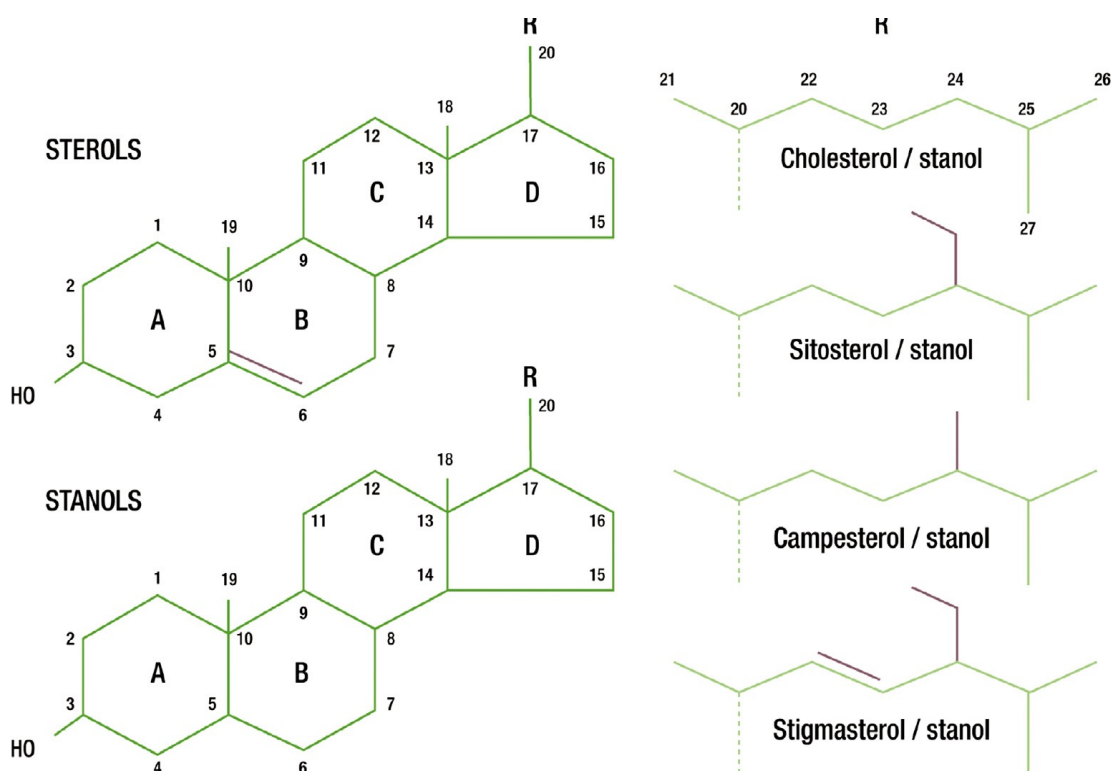
Es por ello, que la intervención dietoterápica clásica se orienta a una menor ingesta de colesterol; sin embargo, también pueden aplicarse estrategias nutricionales innovadoras, como la incorporación de compuestos que disminuyen el colesterol sanguíneo, entre ellos, los fitoesteroles (Stock, 2014). La Unión Europea sugiere que un consumo de 1,5 a 2,4 g/día de fitoesteroles añadidos a productos lácteos, por un período de dos a tres semanas, reducen un 7-10 % las concentraciones sanguíneas de colesterol LDL (Unión Europea, 2010).

Por otro lado, la FDA recomienda que el consumo diario de un mínimo de 2 g/día de fitoesteroles (FDA, 2003), lograría un descenso de entre el 8-15 % en el colesterol LDL (AOMSA, 2006).

4.1.2 Definición

Los fitoesteroles, son compuestos derivados de plantas con ordenación y funciones análogas al colesterol de los vertebrados: intervienen en la estabilización de la bicapa de fosfolípidos de las membranas celulares y en la estructura del núcleo de las plantas. Dentro del grupo se encuentran dos categorías: los esteroides con un doble enlace en C5, y los estanoles con una reducción en la misma posición, pero que pueden ser convertidos a los primeros mediante hidrogenación (Lagarda, García Llatas, & Farré, 2006). En la actualidad se han identificado más de 200 tipos de fitoesteroles, siendo más abundantes los que se observan en la **Figura 7**.

Figura 7. Estructura química de los principales fitoesteroides y fitoestanoles.



Fuente: Gylling et al., 2014.

4.1.3 Mecanismo de acción

Los fitoesteroles son metabolizados en el intestino delgado a través de un proceso que implica tres etapas:

1) Lumen intestinal/micela mixta: los fitoesteroles son más lipofílicos que el colesterol, por lo tanto pueden desplazarlo competitivamente de la micela mixta formada por sales biliares, fosfolípidos y lípidos provenientes de la dieta. En consecuencia, el mismo no se emulsiona y no puede ser absorbido, por lo que se elimina junto a los esteroides a través de las deposiciones (Olagnero, Marcenado, & Irei, 2007).

2) Célula intestinal/enzima AcilCoa Colesterol Acil Transferasa (ACAT): Para formar los quilomicrones (lipoproteínas transportadoras), se necesita la transformación del colesterol, de su forma libre a su forma esterificada por la acción de la enzima ACAT. Los fitoesteroles absorbidos inhiben la acción de la misma, por lo tanto, parte del colesterol libre absorbido no puede reesterificarse para ser incorporado al quilomicrón y aumentan su excreción al lumen intestinal (Olagnero, Marcenado, & Irei, 2007; Valenzuela, & Ronco, 2004).

3) Célula intestinal/transportador ATP Binding Cassette (ABC): los esteroides y estanoles aumentan la actividad del transportador ABC, cuya acción es bombear las moléculas de colesterol no reesterificado al lumen intestinal, aumentando su excreción (Olagnero, Marcenado, & Irei, 2007; Valenzuela, & Ronco, 2004).

4.1.4 Fuentes naturales de fitoesteroles en alimentos

Los fitoesteroles no pueden ser sintetizados endógenamente por los seres humanos, por lo que su incorporación al organismo sólo dependen de la dieta.

Sus principales fuentes vegetales (**Tabla 12**) están representadas por los aceites, frutos secos, brotes, coliflores y aceitunas; y entre las animales por la yema de huevo, hígado de los mamíferos y crustáceos (Marangoni, & Poli, 2010).

Tabla 12. Contenido promedio de fitoesteroles contenidos por porción de alimento.

| Alimentos | Porción recomendada (g) | Fitoesteroles aportados por porción (g) |
|-----------------------|-------------------------|---|
| Aceite de maíz | 13 | 0,12 |
| Aceite de girasol | 13 | 0,05 |
| Aceite de soja | 13 | 0,04 |
| Margarina | 10 | 0,02 |
| Aceite de oliva | 13 | 0,03 |
| Semillas sésamo | 15 | 0,05 |
| Almendras | 30 | 0,05 |
| Nueces | 30 | 0,04 |
| Salvado de trigo | 10 | 0,02 |
| Pan de trigo | 60 | 0,05 |
| Harina trigo integral | 50 | 0,03 |
| Pan | 60 | 0,03 |
| Naranja | 80 | 0,02 |
| Higo | 80 | 0,02 |
| Limón | 80 | 0,01 |
| Pomelo | 80 | 0,01 |
| Ananá | 80 | 0,01 |
| Manzanas | 80 | 0,01 |
| Aceitunas negras | 20 | 0,01 |
| Coliflores | 80 | 0,03 |
| Zanahorias | 80 | 0,01 |

Fuente: Marangoni, & Poli, 2010; ANMAT, 2014.

Debido a las grandes diferencias en el consumo de alimentos vegetales en todo el mundo, la ingesta dietética de fitoesteroles varía entre 1,67 g/día en Gran Bretaña (aportados principalmente por aceites vegetales) y 3,75 g/día en Japón. Estas también se observan dentro de los grupos de poblaciones occidentales, siendo marcadamente superior en los vegetarianos (>50 %). En un estudio llevado a cabo por la EPIC (European Prospective Investigation on Cancer), realizado en 22.256 sujetos, la ingesta de fitoesteroles varió entre 1,78 g/día (quintil más bajo) y 4,63 g/día (quintil más alto) (Marangoni, & Poli, 2010).

Sin embargo, si se tiene en cuenta la recomendación de 2 g/día (FDA, 2003; Stock, 2014), en general, las cantidades consumidas de fitoesteroles son insuficientes para tener un efecto significativo en la disminución del colesterol (Nolasco, 2008), motivo por el cual se justifica su adición, frecuentemente en formas esterificadas, para aumentar su solubilidad, permitiendo su incorporación en alimentos de base más bien lipídica (Marangoni, & Poli, 2010).

4.1.5 Los fitoesteroles y los alimentos

Los cálculos de las grandes cantidades de fitoesteroles en la dieta ancestral estimularon la investigación sobre su papel en la salud humana, especialmente con el objetivo de corregir su baja ingesta en las modernas. Por lo tanto, estos pasaron de ser componentes naturales a ser incorporados en medicamentos, suplementos, o bien, alimentos. En el último caso, se incorporaron primero a productos grasos, en su mayoría margarinas. Posteriormente, el desarrollo de la tecnología permitió mejorar su solubilidad e incorporación a jugos de frutas, helados, horneados, etc. (Marangoni, & Poli, 2010).

Por otro lado, el impacto de las diferentes composiciones de los alimentos en el efecto hipocolesteremiante de los fitoesteroles contenidos en una matriz, aún no ha sido completamente aclarado. Abumweis, Barake, & Jones (2008) han clasificado los alimentos en cuatro grupos de acuerdo con el contenido de grasa y las características físicas utilizados para administrar los fitoesteroles en: 1) las grasas para untar, 2) mayonesa y aderezos para ensaladas, 3) leche y yogur y 4) otros como chocolate, barras de cereales, bebidas, jugos, carne y productos horneados. La incorporación en los grupos 1, 2 y 3 se asoció con una mayor eficacia en la reducción del colesterol LDL con respecto a la de otros alimentos, lo que sugiere el papel importante de la matriz alimentaria en el efecto de la reducción del colesterol. En particular, se ha demostrado que los fitoesteroles adicionados a leches parcialmente descremadas tienen un impacto tres veces mayor con respecto al pan y los cereales (Clifton et al., 2004).

En general, los datos de los ensayos a corto y largo plazo indican que la reducción del colesterol sanguíneo por la administración de fitoesteroles se observa dentro de pocas semanas y permanece estable durante un año de suplementación (Plat, & Mensink, 2005).

4.1.6 Estudios clínicos con alimentos

El control no farmacológico del perfil lipídico del plasma se está explorando activamente, siendo los fitoesteroles ampliamente utilizados en alimentos y suplementos. Su efecto hipocolesterolémico se conoce desde 1950, cuando se observó una caída del 27 % en los niveles plasmáticos de colesterol de 26 sujetos sanos suplementados con 5-10 g/día del compuesto, por un período de 2 semanas (Marangoni, & Poli, 2010).

En España, se evaluó la eficacia hipocolesterolemizante de un yogur bebible comercial, en 32 personas de ambos sexos con colesterol LDL superior a 120 mg/dl. Los pacientes consumieron 130 ml del producto conteniendo 2 g de fitoesteroles, durante 3 semanas. Al inicio y al final del tratamiento, se valoraron colesterol total, LDL, HDL e índice LDL/HDL, observándose una reducción significativa ($P < 0,01$) del colesterol total (235 ± 34 a 219 ± 35), LDL (157 ± 30 a 140 ± 34 , mg/dl) e índice LDL/HDL ($3,2 \pm 1,0$ a $3,0 \pm 1,2$), sin modificación significativa en HDL (48 ± 15 a 53 ± 29) (Algorta Pinedaa, 2005).

La evidencia disponible lleva a pensar que la reducción del LDL pueden corresponder a una disminución de las personas que mueren cada año por causas como el IAM y ACV, sucesos que tienen una directa relación con la hipercolesterolemia.

4.2 OBJETIVOS

Obtener un queso mozzarella semidescremado a base de leche de cabra, con cantidades adecuadas de fitoesteroles, de acuerdo a la recomendación.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Materiales

Para la elaboración del Queso Mozzarella a base de leche de cabra se utilizaron los materiales descritos en el Capítulo III, página 78, y además tres tipos de presentación del compuesto en estudio, otorgado por la empresa A.O.M.S.A.:

- ADVASTEROL ÉSTER – Contenido de ésteres de esteroides: 61,20 %.
Líquido viscoso amarillo claro (Anexo I).

- ADVASTEROL ÉSTER – Contenido de esteroides: 97-99 %. Líquido viscoso amarillo claro (Anexo II).
- ADVASTEROL 95 - Contenido de esteroides: 95 %. Polvo grisáceo (Anexo III).

4.3.2 Métodos

La elaboración del Queso Mozzarella se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo III, página 93, a partir de la cual se procedió a evaluar la forma de incorporación de los fitoesteroides, en diferentes etapas del procesamiento y en sus distintas presentaciones (líquido y polvo).

Adición de fitoesteroides

La adición de fitoesteroides, se realizó teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

1. El RQ: alrededor del 10 % (1L de leche = 100g de queso);
2. La porción recomendada de ingesta de queso/día: 30 g, de acuerdo al CAA (ANMAT, 2014);
3. La IDR de fitoesteroides/día: 2 g, para que los mismos tengan efecto hipocolesterolemico en el organismo (FDA, 2003).

Por último, de acuerdo a la concentración estimada de fitoesteroides/100 g de queso, las muestras se denominaron de la siguiente manera:

- 0,00 g de fitoesteroides/100 g de queso -> Muestra**Patrón**
- 3,33 g de fitoesteroides/100 g de queso -> Muestra**3**
- 6,66 g de fitoesteroides/100 g de queso -> Muestra**6**

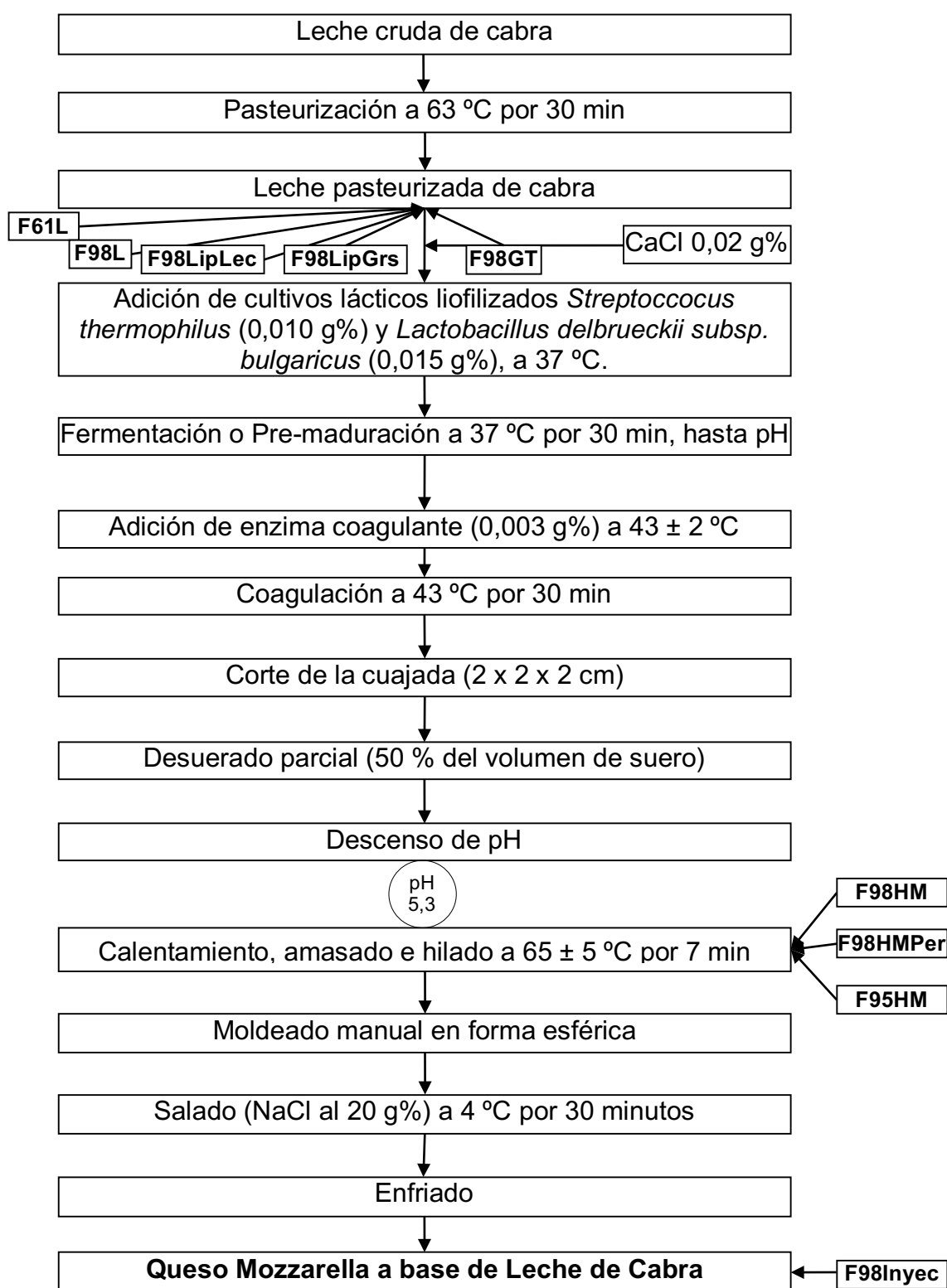
- 10,00 g de fitoesteroles/100 g de queso -> Muestra10

Sus formas de adición se describen en la **Tabla 13** y se resumen en la **Figura 8**.

Tabla 13. Formas de incorporación de fitoesteroles durante el proceso de obtención del queso mozzarella a partir de leche de cabra.

| Producto | Etapas | Proceso | Denominación del ensayo |
|-----------------------------|----------------------------------|---|-------------------------|
| Advasterol Éster 61,20 % | Leche pasteurizada de cabra. | Adición directa | F61L |
| Advasterol Éster 97-99 % | Leche pasteurizada de cabra. | Adición directa | F98L |
| Advasterol Éster 97-99 % | Calentamiento, amasado e hilado. | Adición directa | F98HM |
| Advasterol Éster 97-99 % | Calentamiento, amasado e hilado. | Microencapsulación en perlas de alginato de sodio | F98HMPer |
| Advasterol Éster 97-99 % | Leche pasteurizada de cabra. | Microemulsión liposomal con lecitina | F98LipLec |
| Advasterol Éster 97-99 % | Leche pasteurizada de cabra. | Microemulsión liposomal con grasa de leche de cabra | F98LipGrs |
| Advasterol Éster 97-99 % | Leche pasteurizada de cabra. | Emulsión con goma tragacanto | F98GT |
| Advasterol 95 % | Calentamiento, amasado e hilado. | Adición directa | F95HM |
| Advasterol Éster 97-99 % | Queso. | Inyección de fitoesteroles | F98Inyec |

Figura 8. Flujoograma de elaboración de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con adición de fitoesteroles.



4.3.2.1 Ensayo F61L

Se elaboraron tres Quesos Mozzarellas: uno sin el compuesto bioactivo (F61LPatrón), y dos con la adición de fitoesteroles al 3,33 (F61L3) y 10 g% (F61L10), los cuales aportarían el 50 y 150 % de la recomendación diaria, respectivamente. Se determinaron los **parámetros físico-químicos** de la **leche** [pH con peachímetro digital Hanna Instruments modelo HI 8424, Acidez Titulable expresada como grados Dornic (°D) (AOAC, 1996), Proteínas por titulación con formol (Egan, Kirk, & Sawyer, 1991), Grasas con butirómetro para leche por el método Gerber (AOAC, 1996), Lactosa por diferencia (100 - [humedad + proteína + grasa + cenizas]), Sólidos Totales gravimétricamente por desecación en estufa, Sólidos No Grasos (100 - [humedad + grasa]), Cenizas Totales por calcinación en mufla, Calcio y Sodio por espectrofotometría de absorción atómica, y Fósforo por espectrofotometría de absorción molecular (AOAC, 1996)]; los **quesos** [pH con peachímetro digital Hanna Instruments modelo HI 8424, Proteínas por el método micro-Kjeldhal, Grasas con butirómetro para queso por el método Gerber, Sólidos Totales gravimétricamente por desecación en estufa, Cenizas Totales por calcinación en mufla, Calcio y Sodio por espectrofotometría de absorción atómica, y Fósforo por espectrofotometría de absorción molecular, Humedad gravimétricamente por desecación en estufa, (AOAC, 1996)]; **RQ** (Peso del queso obtenido expresado en Kg/ Cantidad de leche utilizada expresada en Lts x 100); el **color** de los productos con y sin fitoesteroles se determinó con un colorímetro Coleman Parmer utilizando los parámetros CIELAB (L*, a*, b*) (CIE, 1996). Los análisis se realizaron por triplicado, a los 5, 15 y 30 días. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración, dentro de recipientes herméticos plásticos, simulando el

almacenamiento en el hogar, y teniendo en cuenta de que se trata de un queso de pasta blanda, de alta humedad, que se consume fresco, por lo que no requiere de períodos largos de maduración (ANMAT, 2014).

4.3.2.2 Ensayo F98L

Se elaboraron tres Quesos Mozzarellas: uno sin el compuesto bioactivo (F98LPatrón), y dos con fitoesteroles al 3,33 (F98L3) y 10 g% (F98L10) adicionados directamente a la leche pasteurizada, los cuales aportarían en el producto final, el 50 y 150 % de la recomendación diaria, respectivamente. Se determinaron los parámetros físico-químicos de la leche y los productos obtenidos, y las modificaciones producidas en el color de acuerdo a los métodos del ensayo anterior. La textura de los quesos se analizaron en equipo QTS (Brookfield), con las muestras refrigeradas (4 °C), cortadas con un molde cilíndrico de 20 mm de diámetro x 15 mm de longitud, que se dejaron equilibrar a temperatura ambiente (~22 °C) durante 10 minutos. Se utilizó una carga celular de 500N, con un émbolo plano a una velocidad de 30 mm min⁻¹. Se seleccionó una compresión del 50 % a fin de permitir una deformación sin romper la muestra. Los datos fueron recolectados a través del software Pro v2.0.

Finalmente, se determinó Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles (Brassicasterol, 24-metilencolesterol, Campesterol, Campestanol, Stigmasterol, β -sitoesterol y d-5,24-stigmastadienol), por cromatografía gaseosa.

4.3.2.3 Ensayo F98HM

Se elaboraron dos Quesos Mozzarellas: uno sin el compuesto bioactivo (F98HMPatrón), y otro con fitoesteroles al 10 g% (F98HM10), adicionados durante la etapa de hilado y moldeado. Se determinaron los parámetros físico-

químicos de la leche y los productos obtenidos de acuerdo a los métodos de los ensayos anteriores; Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles por cromatografía gaseosa.

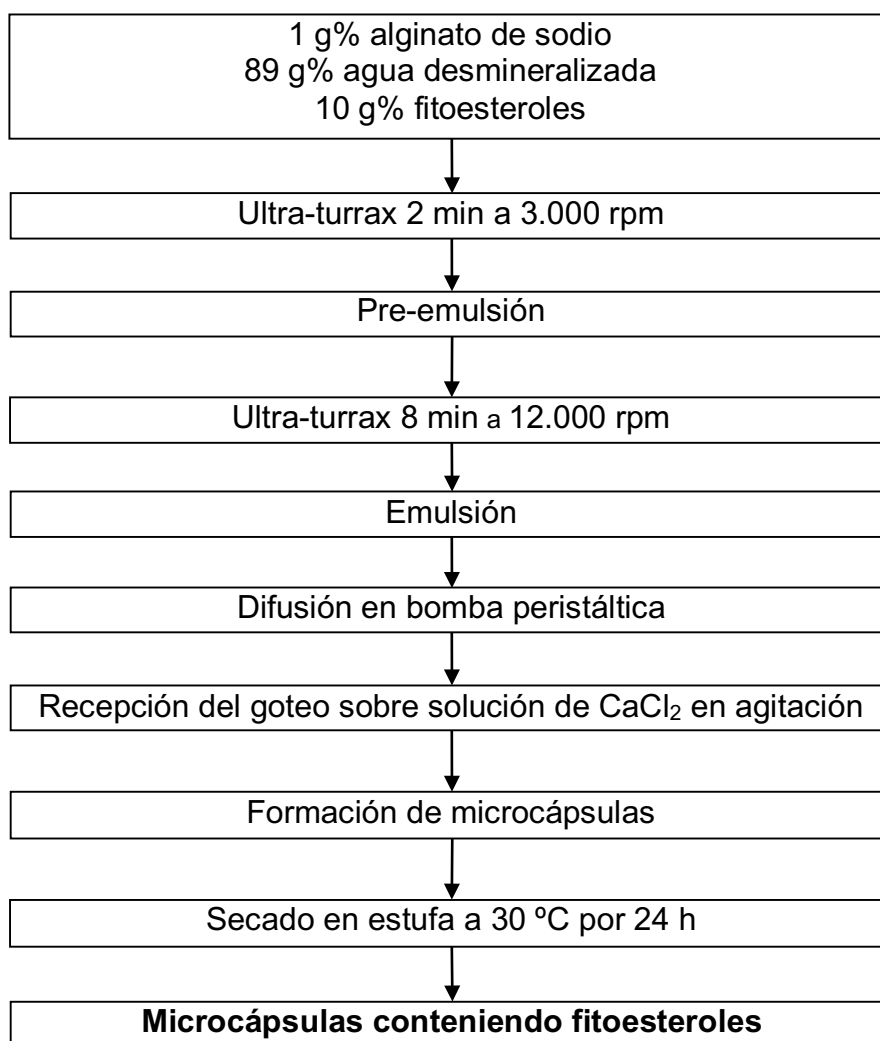
4.3.2.4 Ensayo F98HMPer

La microencapsulación en perlas de alginato de sodio por el método químico de gelación, está basado en interacciones de polímeros cargados de forma opuesta, ó estos y un polication o polianión; dicha propiedad permite la encapsulación de agentes bioactivos hidrófobos (Benavides et al., 2016; Comunian, & Favaro-Trindade, 2016).

El alginato, como material de pared, se utiliza en la industria de la ingeniería y biotecnología, debido a su biocompatibilidad, bajo costo (Baimark, & Srisuwan, 2014) y ausencia de toxicidad (Paques, Sagis, van Rijn, & Van Der Linden, 2014). Está compuesto por dos monómeros: 1-4b-D-manurónico (M) y a-L-gulurónico (G). (Benavides et al., 2016); tiene la capacidad de formar un polímero estable a través de enlaces con cationes polivalentes, generando una estructura reticulada entre sus grupos G de diferentes cadenas (Rees, 1969). La completa formación de microcápsulas resulta de obtener una emulsión de aceite/grasa y alginato, que gotea sobre una solución de calcio, dando lugar a la gelificación (Paques, Sagis, van Rijn, & Van Der Linden, 2014).

El proceso de microencapsulado se llevó a cabo de acuerdo a la **Figura 9**. Se prepararon 100 ml de una solución acuosa de alginato de sodio (1 g%) y agua desmineralizada (89 g%), y se dispersaron los fitoesteroles (10 g%). Esta pre-emulsión se agitó 2 min a 3.000 rpm, y la emulsión 8 min a 12.000 rpm; en ambos casos con Ultra-turrax (CAT, Modelo X120, Buenos Aires, Argentina).

Figura 9. Flujograma de obtención de microcápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroides.



Con una bomba de infusión NB400B (Electrónica NB, Córdoba, Argentina), se difundió la emulsión sobre una solución de CaCl₂ (Anedra, p.a.) (5 g%), fijando la punta de la aguja (0,25 mm de diámetro interior) a 6 cm por encima de la superficie de reticulación. El baño gelificante se agitó suavemente con un agitador magnético para evitar la aglomeración de las cápsulas. Después de su generación, se secaron en estufa a 30 °C durante 24 h, y se las adicionaron a un

queso mozzarella a base de leche de cabra, durante la etapa de hilado y moldeado.

4.3.2.5 Ensayo F98LipLec

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas sobre sí, formadas a partir de una doble capa lipídica que se flexibiliza y se curva, incorporando y liberando sustancias hacia y desde su interior, pueden tener una o más membranas concéntricas y su tamaño puede variar desde dos decenas de nanómetros a decenas de micrómetros. Se forman a partir de anfífilos, es decir, moléculas lipídicas activas en su superficie, que pueden ser hidrofílicas o hidrofóbicas, según la parte que expongan (Fili, Margalef, & Armada, 2015).

Las lecitinas son sus precursoras más frecuentes, debido a que contienen dos cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos o “colas” no polares, pegadas a una “cabeza” polar afín al agua, resultando en liposomas mucho más estables (Fili, Margalef, & Armada, 2015; Eh Suk, & Misran, 2017).

Uno de los métodos más utilizados para la obtención de microemulsiones, consiste en el uso de homogeneizadores de alta velocidad, que permiten incorporar sustancias de interés dentro de las partículas liposomales (Fili, Margalef, & Armada, 2015).

Otra forma efectiva para encapsular más material de interés, es la aplicación de ciclos de congelado y descongelado (*Freeze Thawing -FT-*), para la ruptura y refusión de liposomas, proceso que permite que los solutos del interior y el exterior se reorganicen y, de esta manera, pueda incorporarse más material. Este efecto se debería a que las fuerzas de congelado sobre partículas

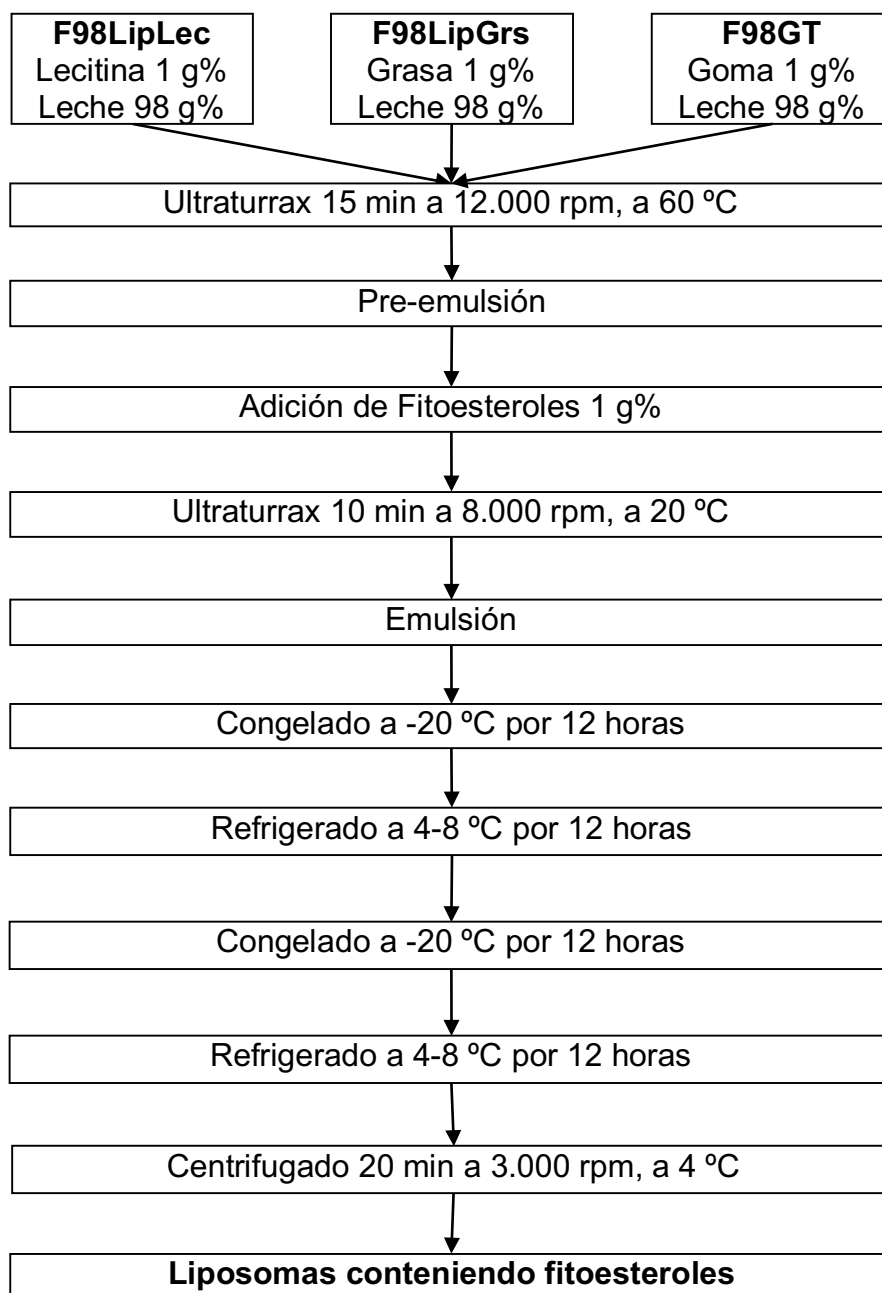
esféricas permitirían un mejor encapsulado de poliedros (Fili, Margalef, & Armada, 2015).

A partir de lo expuesto, se planteó el desarrollo de una microemulsión liposomal utilizando lecitina de soja de uso alimenticio. Los liposomas fueron preparados empleando el protocolo de Fili, Margalef, & Armada (2015), el cual fue optimizado teniendo en cuenta las siguientes condiciones de operación: velocidad (rpm) y tiempo de proceso; y tamaño de las partículas liposomales obtenidas, con algunas modificaciones de acuerdo al equipamiento disponible, sus características, y sustancia a encapsular.

En la **Figura 10** se resumen los pasos seguidos para la obtención de microemulsiones liposomales en los diferentes ensayos, utilizando Lecitina (F98LipLec), Grasa de leche de cabra (F98LipGrs) y Goma Tragacanto (F98GT).

Se preparó una pre-emulsión con 10 g de lecitina y 980 ml de leche de cabra, se calentó a 60 °C, y se llevó a agitación a una velocidad de 12.000 rpm por 15 min. Se dispersaron 10 g de fitoesteroles, y se llevó a baño de agua hielo para bajar la temperatura a 20 °C y obtener la emulsión definitiva, la cual fue sometida a 8.000 rpm durante 10 min; ambos procesos realizados con Ultraturrax (CAT, Modelo X120, Buenos Aires, Argentina). Se freezó a -20 °C por 12 horas, y luego se refrigeró a 4-8 °C por 12 horas. Este ciclo de congelado-descongelado se repitió dos veces. Se centrifugó por 20 min a 3.000 rpm en centrífuga refrigerada (Damon/IEC Division, Needham Heights, Massachusetts, USA) para verificar la estabilidad. Con los liposomas obtenidos, se elaboró un queso mozzarella a base de leche de cabra, adicionándolos al pool inicial de leche pasteurizada.

Figura 10. Flujograma de obtención de microemulsiones en métodos F98LipLec, F98LipGrs y F98GT, conteniendo fitoesteroles.



4.3.2.6 Ensayo F98LipGrs

En este método se utilizaron los mismos procedimientos que en el anterior, reemplazando la lecitina por grasa de leche de cabra, la cual fue obtenida

por separación en centrífuga refrigerada (Damon/IEC Division, Needham Heights, Massachusetts, USA), durante 15 min a 7.000 rpm (Paz et al., 2014).

Los pasos seguidos para la obtención de la emulsión, se detallan en la **Figura 10**.

Se preparó una pre-emulsión de 10 g de grasa y 980 ml de leche de cabra, la cual se calentó a 60 °C, y se llevó a agitación a una velocidad de 12.000 rpm por 15 min. Se dispersaron 10 g de fitoesteroles y se bajó la temperatura a 20 °C para preparar la emulsión definitiva, la cual fue sometida a 8.000 rpm durante 10 min; con Ultra-turrax (CAT, Modelo X120, Buenos Aires, Argentina); se freezó a -20 °C por 12 horas, y luego se refrigeró a 4-8 °C por 12 horas. Este ciclo de congelado-descongelado se repitió dos veces. Se centrifugó por 20 min a 3.000 rpm en centrífuga refrigerada (Damon/IEC Division, Needham Heights, Massachusetts, USA) para verificar la estabilidad de la emulsión.

Con los liposomas obtenidos, se elaboró un queso mozzarella a base de leche de cabra, adicionándolos al pool inicial de leche pasteurizada.

4.3.2.7 Ensayo F98GT

Budde, Cravero Bruneri, & Ramón (2011) formularon un yogur dietético adicionado con fitoesteroles al 2 g%, a base de leche de cabra, en el que emplearon emulsionantes/emulsificantes adecuados para lácteos, según lo establecido por el CAA (ANMAT, 2014). Los ingredientes utilizados fueron: i) carboximetilcelulosa sódica (0,2 g%), observándose separación de fases e importante desuerado; ii) goma guar (0,2 g%), con la cual el producto resultó heterogéneo y con sabor residual a grasa, y iii) goma tragacanto (0,2 g%), que

permitió la formulación de un yogur estable de características homogéneas. Es por ellos que decidió utilizar ésta última, como emulsificante.

Los pasos seguidos para la obtención de la emulsión, se detallan en la **Figura 10**.

Se preparó una solución acuosa de 10 g de goma tragacanto, 980 ml de leche de cabra, y se dispersaron 10 g de fitoesteroles. Esta mezcla fue sometida a 8.000 rpm durante 10 min; con Ultra-turrax (CAT, Modelo X120, Buenos Aires, Argentina) y se refrigeró a 4-8 °C por 12 horas, para verificar la estabilidad de la emulsión. Con ésta se elaboró un queso mozzarella a base de leche de cabra, adicionándola al pool inicial de leche pasteurizada.

4.3.2.8 Ensayo F95HM

Los fitoesteroles en polvo son otra forma de presentación del compuesto bioactivo. Benitez et al. (2015) elaboraron un pan con mezclas de harinas trigo-chía en una proporción 80:20, aceite de oliva, leche descremada, levadura, azúcar, extracto de malta y fitoesteroles en polvo al 4 g%. El contenido final de éste último en el producto fue de 1,47 g%, aportando en una porción de 50 g, el 25 % de la IDR de fitoesteroles/día.

Teniendo en cuenta este antecedente, se procedió a elaborar un Queso Mozzarella y a adicionar fitoesteroles en polvo en una concentración del 10 g% (F95HM). La empresa AOMSA recomienda su uso en matrices alimenticias sólidas (no líquidas), por lo que el agregado del compuesto se hizo en la etapa final del hilado, y moldeado del queso.

4.3.2.9 Ensayo F98Inyec

Se elaboraron Quesos Mozzarellas siguiendo los pasos de la **Figura 8**: uno sin el compuesto bioactivo (F98InyecPatrón), y otros dos con fitoesteroles inyectados al 3,33 (F98Inyec3) y 6,66 g% (F98Inyec6), los cuales aportarían en el producto final, el 50 y 100 % de la recomendación diaria, respectivamente. El ingrediente funcional fue coloreado con el objetivo de observar la factibilidad de su incorporación y distribución en la matriz alimentaria.

Se preparó una mezcla con la siguiente composición: 8 g% de fitoesteroles y 2 g% de colorante amaranto de uso alimentario (INS 123). Se procedió a calentar la misma hasta una temperatura de 55 °C y se homogeneizó agitando manualmente; se la colocó en una jeringa de 10 ml de capacidad y se la inyectó en distintos puntos del queso. Para ello, se tuvo en cuenta el peso del producto final y la concentración de compuesto bioactivo a incorporar.

Finalmente, se evaluó la aceptabilidad de los quesos, en el IISA de la UNSa, con un panel constituido por 100 jueces no entrenados, de entre 20 y 60 años de edad. Para ello, las muestras fueron previamente estabilizadas en refrigeración por 24 horas, tiempo de maduración mínimo exigido por el CAA (ANMAT, 2014) para éste producto. Los evaluadores recibieron aproximadamente 20 g de cada uno de los quesos, colocados en recipientes plásticos transparentes codificados con números aleatorios de tres dígitos, cortados y servidos inmediatamente después de ser sacados del almacenamiento refrigerado. Se pidió a los evaluadores utilizar galletas sin sal y agua desmineralizada para limpiar su paladar entre cada una de las muestras evaluadas. Los datos de aceptabilidad se recogieron en una planilla conteniendo

una escala hedónica de nueve puntos (9 = Me gusta muchísimo, 8 = Me gusta mucho, 7 = Me gusta moderadamente, 6 = Me gusta poco, 5 = No me gusta ni me disgusta, 4 = Me disgusta poco, 3 = Me disgusta moderadamente, 2 = Me disgusta mucho y 1 = Me disgusta muchísimo); y los de preferencia con prueba de ranking u ordenamiento (1 = más preferido, 2 = medianamente preferido y 3 = menos preferido). Los datos fueron analizados por Programa Infostat, y Tablas de Newell y MacFarlane (Newell, & MacFarlane, 1987).

4.3.2.10 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar de las mediciones replicadas. Para encontrar diferencias significativas entre los análisis, las medias fueron analizadas mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y Prueba de Duncan para determinar el nivel de significación entre ellas ($P < 0,05$), utilizando Microsoft de Excel StatPro™.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Adición de fitoesteroles

Teniendo en cuenta el RQ, la porción recomendada de ingesta de queso por día, la IDR de compuesto bioactivo por día y la pureza de los productos, la cantidad de fitoesteroles que se usó de cada uno de ellos, fue la siguiente:

- ADVASTEROL ÉSTER (61,20 %): Se adicionó 5,44 y 16,33 g de producto por Litro de leche o 100 g de queso, para que contengan 3,33 y 10,00 g de fitoesteroles, y la porción aporte 1 y 3 g de fitoesteroles/porción de queso, es decir, el 50 y 150 % de la recomendación.

- ADVASTEROL ÉSTER (~98 %): Se adicionó 3,40; 6,80 y 10,20 g de producto por Litro de leche o 100 g de queso, para que contengan 3,33; 6,66 y 10,00 g de fitoesteroles, y la porción aporte 1 , 2 y 3 g de fitoesteroles/porción de queso, es decir, el 50, 100 y 150 % de la recomendación.
- ADVASTEROL 95 (95 %): Se adicionó 10,52 g de producto por 100 g de queso, para que contenga 10,00 g de fitoesteroles, y la porción aporte 3 g de fitoesteroles/porción de queso, es decir, el 150 % de la recomendación.

Una metodología similar utilizaron Bermúdez-Aguirre, & Barbosa-Cánovas (2012), quienes evaluaron en un queso mozzarella a base de vaca, la adición de cuatro fuentes diferentes de omega-3: aceite de pescado microencapsulado en polvo y aceite de pescado procesado, como las de origen animal; aceite de semilla de linaza y polvo de linaza, como fuentes vegetales. Todos fueron adicionados a una concentración del 1 % de acuerdo al RQ (10 %), y en la cantidad máxima permitida de omega-3 en la fortificación de quesos (1,8 %), establecido por la FDA (2007).

A continuación se describen los ensayos realizados en la adición de los fitoesteroles al Queso Mozzarella.

4.4.1 Ensayo F61L

Los resultados de los análisis físico-químicos de la leche utilizada en este método, se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada (F61L).

| Parámetros físico-químicos | LC |
|--|----------------|
| pH | 6,65 ± 0,01 |
| Acidez Titulable (°D) | 11,99 ± 0,05 |
| Proteína (g 100 g ⁻¹) | 2,94 ± 0,08 |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 4,35 ± 0,11 |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 3,78 ± 0,27 |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 12,05 ± 0,08 |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 7,69 ± 0,18 |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 0,99 ± 0,04 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 198,16 ± 12,77 |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 263,28 ± 0,12 |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 129,57 ± 18,46 |

Promedio ± desvío estándar ($n=1$) en base a las determinaciones por triplicado.

El pH fue de 6,65; similar al de Paz et al. (2017a) quienes tuvieron un valor de 6,66 para leche de cabra Saanen. Este depende principalmente de la estabilidad de las caseínas y se ve afectada por el período de lactación, la dieta, la raza y la presencia de burbujas de dióxido de carbono liberadas durante el ordeño, refrigeración y transporte de la leche.

La acidez titulable fue de 11,99 °D, inferior a lo permitido por la normativa vigente (14-22 °D); la misma está en función del período de lactación y del contenido de caseínas, iones y sales minerales. Al final de dicho período su valor normal es de 16-18 °D, en tanto que en el momento del ordeño, oscila entre 12-14 °D (Quintana López et al., 2011).

El porcentaje de proteínas ($2,94 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) estuvo próximo a lo mínimo exigido ($2,8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), y el de grasa ($4,35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) y sólidos totales ($12,05 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) por encima de lo establecido por la legislación vigente: $3 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ y $9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente (ANMAT, 2014). Esto resulta positivo, ya que mientras mayor sea el contenido de nutrientes presentes en la leche, mejor RQ se obtendrá, y cambios en sus niveles originarían fluctuaciones estacionales del potencial de la materia prima (Guo et al., 2004); aspecto de fundamental importancia para los elaboradores artesanales de queso, en el que pequeñas diferencias se traducen en términos de pérdidas o ganancias monetarias, es así que un aumento del 1 % en el rendimiento es equivalente a una ganancia del 20 % (St-Gelais, 2002).

El contenido de cenizas totales ($0,99 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) fue igual al de Paz et al. (2017a). Esto también se evidenció en las concentraciones de calcio, fósforo y sodio, que para Paz et al. (2017a) fueron de 219,99; 272,62 y 132,82 $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente. El contenido de minerales depende fundamentalmente del período de lactación, estado nutricional, así como de los factores genéticos de los animales (Kondyli, Katsiari, & Voutsinas, 2007).

Los parámetros físico-químicos obtenidos de los quesos mozzarella, a los 5, 15 y 30 días, se presentan a continuación.

Los valores de pH (**Tabla 15**) oscilaron entre 5,25 y 5,42. Durante el almacenamiento, hubo una marcada diferencia por cada una de las muestras, observándose valores significativamente inferiores al día 30.

Tabla 15. pH de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 5 días | | |
| 5,39 ± 0,01 ^{a,A} | 5,42 ± 0,01 ^{a,A} | 5,42 ± 0,01 ^{a,A} |
| 15 días | | |
| 5,31 ± 0,01 ^{b,B} | 5,38 ± 0,01 ^{a,A} | 5,37 ± 0,01 ^{a,B} |
| 30 días | | |
| 5,25 ± 0,01 ^{b,C} | 5,31 ± 0,01 ^{a,B} | 5,32 ± 0,01 ^{a,C} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los mismos fueron similares a los de Paz et al. (2017a), quienes registraron un valor de 5,42 para un queso mozzarella de cabra hilado a un pH de desuerado de 5,0; al mismo tiempo, son inferiores a otros hilados a 5,3 (5,70) y 5,6 (5,94).

La disminución del pH del queso en la etapa de maduración depende principalmente de dos factores: los niveles cada vez más altos de ácido láctico y el aumento en la solubilización de los iones fosfatos liberados del calcio (Moynihan et al., 2016).

Los porcentajes de proteínas (**Tabla 16**) fluctuaron entre un mínimo de 25,70 y un máximo de 31,78 g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Tabla 16. Proteínas (g 100 g⁻¹) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 5 días | | |
| 25,70 ± 0,79 ^{a,A} | 26,95 ± 0,50 ^{a,B} | 25,91 ± 0,76 ^{a,B} |
| 15 días | | |
| 27,91 ± 0,72 ^{a,A} | 29,06 ± 0,59 ^{a,A-B} | 28,09 ± 0,75 ^{a,A-B} |
| 30 días | | |
| 28,91 ± 0,72 ^{a,A} | 31,78 ± 0,67 ^{a,A} | 30,17 ± 0,47 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Se encontró un aumento gradual de las mismas desde el día 5, al 15 y al 30; estas diferencias podrían deberse a variaciones de humedad durante su almacenamiento.

Las cifras estuvieron próximas a las registradas por Paz et al. (2017a), cuyos valor fue de 26,50 g 100 g⁻¹.

La materia grasa (**Tabla 17**) osciló entre valores mínimos de 19,66; 20,66 y 22,66 al día 5, y máximos de 22,66; 24,66 y 28,66 g 100 g⁻¹ al día 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente.

Se observaron diferencias significativas entre una y otra, lo que podría deberse a incipientes grasos contenidos en el producto de fitoesteroles que no es 100 % puro, por lo que su mayor adición representa un aporte más alto de grasa; también hubieron diferencias para cada una de las muestras a lo largo del

tiempo, quizás relacionado a la mayor concentración de nutrientes que ocurre durante el almacenamiento.

Tabla 17. Grasa ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 5 días | | |
| 19,66 \pm 0,28 ^{b,B} | 20,66 \pm 0,28 ^{b,C} | 22,66 \pm 0,28 ^{a,C} |
| 15 días | | |
| 20,66 \pm 0,28 ^{c,B} | 22,66 \pm 0,28 ^{b,B} | 25,66 \pm 0,28 ^{a,B} |
| 30 días | | |
| 22,66 \pm 0,28 ^{c,A} | 24,66 \pm 0,28 ^{b,A} | 28,66 \pm 0,28 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores al día 5 son cercanos a los correspondientes al día 1 de Paz et al. (2017a) ($22,82 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$).

Para comparar con los parámetros exigidos por el CAA, se calculó la cantidad de grasa en *base seca*, y para el día 5 se observaron valores de 39,61; 40,62 y 44,27 $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ para F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente; los mismos se encontraron dentro de los requisitos químicos mínimos esperados para un queso mozzarella ($35 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) (ANMAT, 2014).

La retención de grasa depende de la relativa rigidez y estructura de la cuajada, y temperaturas utilizadas durante la etapa de coagulación; momento

del corte o lirado; temperaturas y tiempos de calentamiento durante el amasado e hilado (Moynihan et al., 2016; Paz et al., 2017a).

El contenido de sólidos totales (**Tabla 18**) estuvo entre 49,63; 50,50 y 51,18 g 100 g⁻¹ al día 5, y 55,73; 59,95 y 62,33 g 100 g⁻¹ al día 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre ellas para el primer momento de análisis, pero si durante los días de almacenamiento entre y para cada una de las muestras.

Tabla 18. Sólidos Totales (g 100 g⁻¹) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 5 días | | |
| 49,63 ± 0,64 ^{a,C} | 50,50 ± 0,64 ^{a,C} | 51,18 ± 0,87 ^{a,C} |
| 15 días | | |
| 52,07 ± 0,39 ^{b,B} | 54,79 ± 0,83 ^{a,b,B} | 56,89 ± 0,68 ^{a,B} |
| 30 días | | |
| 55,73 ± 0,21 ^{c,A} | 59,95 ± 0,46 ^{b,A} | 62,33 ± 0,85 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Las cifras al día 5 estuvieron próximas a las registradas por Paz et al. (2017) al día 1: 52,49 g 100 g⁻¹.

Los contenidos de cenizas totales (**Tabla 19**) estuvieron entre 2,77; 2,57 y 2,90 g 100 g⁻¹ al día 5, y 3,50; 3,51 y 3,50 g 100 g⁻¹ al día 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente. No se observaron diferencias

significativas entre ellas. Por el contrario, si las hubo dentro de la misma muestra para los días 5, 15 y 30, aumentando su concentración durante el almacenamiento.

Tabla 19. Cenizas Totales (g 100 g⁻¹) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 5 días | | |
| 2,77 ± 0,27 ^{a,B} | 2,57 ± 0,13 ^{a,C} | 2,90 ± 0,18 ^{a,B} |
| 15 días | | |
| 3,05 ± 0,00 ^{a,A-B} | 3,07 ± 0,01 ^{a,B} | 3,14 ± 0,08 ^{a,A-B} |
| 30 días | | |
| 3,50 ± 0,00 ^{a,A} | 3,51 ± 0,10 ^{a,A} | 3,50 ± 0,04 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores al día 5 fueron próximos a los del día 1 de Paz et al. (2017a), para quesos mozzarella de cabra hilados a pH de desuerado 5,0 (2,64 mg 100 g⁻¹) y 5,3 (2,98 mg 100 g⁻¹).

Las concentraciones de calcio (**Tabla 20**) estuvieron entre 635,83; 653,75 y 669,49 mg 100 g⁻¹ al día 5, y 683,38; 705,85 y 709,38 mg 100 g⁻¹ al día 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente; las mismas resultaron similares en todas las mediciones y no se observaron diferencias significativas.

Tabla 20. Calcio ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 5 días | | |
| 635,83 \pm 35,60 ^{a,A} | 653,75 \pm 28,58 ^{a,A} | 669,49 \pm 19,57 ^{a,A} |
| 15 días | | |
| 658,94 \pm 35,60 ^{a,A} | 683,49 \pm 19,47 ^{a,A} | 688,84 \pm 17,83 ^{a,A} |
| 30 días | | |
| 683,38 \pm 28,59 ^{a,A} | 705,85 \pm 22,84 ^{a,A} | 709,38 \pm 19,64 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores fueron levemente inferiores a los de Paz et al. (2017a) ($725,95 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$). Este mineral es uno de los componentes más importante del queso, y su mayor concentración se asocia a un alto contenido de proteínas (Moynihan et al., 2016).

En cuanto al contenido de fósforo (**Tabla 21**), los productos presentaron valores similares, y sólo se observaron diferencias significativas en la muestra F61LPatrón.

Las cifras fueron inferiores a las de Paz et al. (2017a), quienes registraron un valor de $620,25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$.

Tabla 21. Fósforo (mg 100 g⁻¹) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 5 días | | |
| 519,53 ± 3,17 ^{b,A} | 573,58 ± 4,92 ^{a,A} | 579,93 ± 5,83 ^{a,A} |
| 15 días | | |
| 527,84 ± 2,84 ^{b,A} | 588,73 ± 5,95 ^{a,A} | 591,83 ± 4,75 ^{a,A} |
| 30 días | | |
| 532,85 ± 4,46 ^{b,A} | 598,65 ± 4,97 ^{a,A} | 597,74 ± 6,87 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Todas las muestras tuvieron una relación calcio/fósforo mayor a 1, que evitaría desencadenar una pérdida ósea (Teegarden et al., 1998).

Con respecto al sodio (**Tabla 22**), los valores oscilaron entre 239,84; 230,48 y 242,84 g 100 g⁻¹ en el día 5, y 279,43; 279,27 y 277,34 g 100 g⁻¹ en el día 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre ellas para los diferentes puntos de análisis, pero si las hubo dentro de la misma muestra en F61L3 y F61L10, entre el día 5, y los días 15 y 30. Los valores fueron menores que las mozzarellas comerciales reportadas en otros estudios (Agarwal et al., 2011).

Tabla 22. Sodio ($\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L3 | F61L10 |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 5 días | | |
| 239,84 \pm 9,42 ^{a,A} | 230,48 \pm 5,29 ^{a,B} | 242,84 \pm 7,38 ^{a,B} |
| 15 días | | |
| 267,67 \pm 9,42 ^{a,A} | 272,75 \pm 6,50 ^{a,A} | 268,37 \pm 3,94 ^{a,A} |
| 30 días | | |
| 279,43 \pm 7,90 ^{a,A} | 279,27 \pm 3,86 ^{a,A} | 277,34 \pm 7,34 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La humedad de los quesos (**Tabla 23**) para el día 5, fue de 50,37 (F61LPatrón); 49,15 (F61L3) y 48,82 (F61L10) $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$.

No se observaron diferencias significativas entre las muestras para el primer momento de análisis. Por el contrario, si las hubo para el día 30, en el que se evidenció una marcada pérdida de humedad.

De acuerdo a la clasificación general de quesos del CAA, los productos puede considerarse inicialmente como de “*alta humedad*” ($46\text{-}54,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$); al mismo tiempo, no superaron el máximo ($60 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) establecido como requisito químico para una mozzarella (ANMAT, 2014).

Tabla 23. Humedad ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) de los quesos mozzarella a base de leche de cabra, con y sin adición de fitoesteroles, al día 5, 15 y 30 (F61L).

| F61LPatrón | F61L5 | F61L16 |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 5 días | | |
| 50,37 \pm 0,64 ^{a,A} | 49,15 \pm 0,64 ^{a,A} | 48,82 \pm 0,87 ^{a,A} |
| 15 días | | |
| 48,72 \pm 0,39 ^{a,B} | 44,82 \pm 0,83 ^{b,B} | 42,96 \pm 0,68 ^{b,B} |
| 30 días | | |
| 45,26 \pm 0,21 ^{a,C} | 40,05 \pm 0,46 ^{b,C} | 37,62 \pm 0,85 ^{c,C} |

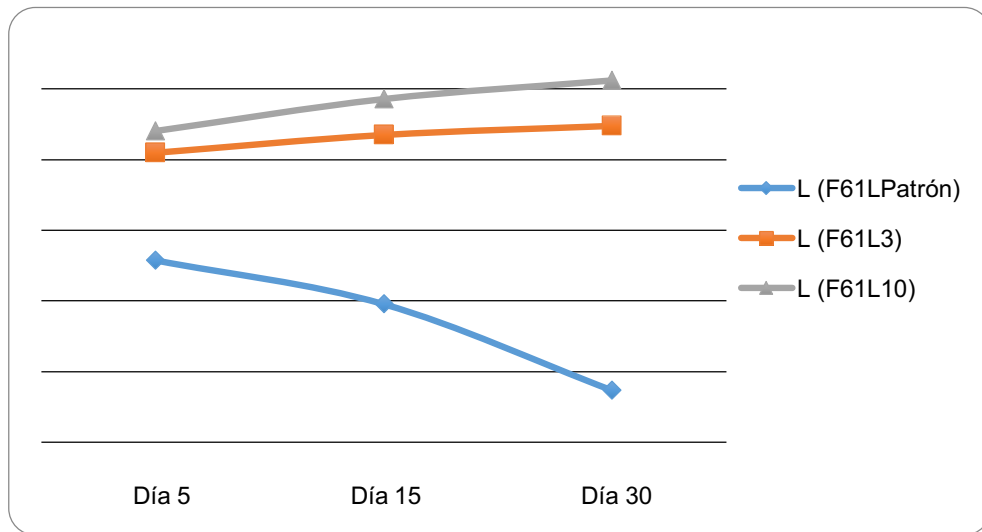
Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los RQ de las Mozzarellas obtenidas fueron de 10,84; 11,19 y 10,63 % para F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente.

Kalantzopoulos (1993) indicó que la capacidad de rendimiento del queso, se relaciona principalmente con el contenido de proteínas, grasas y sólidos totales de la leche de cabra, mientras que otros autores agregan que también influyen factores como el pretratamiento de la leche, tipo de coagulante, firmeza de la cuajada al momento del lirado y manejo de la misma, diseño de la tina, etc. (Fenelon, & Guinee, 1999).

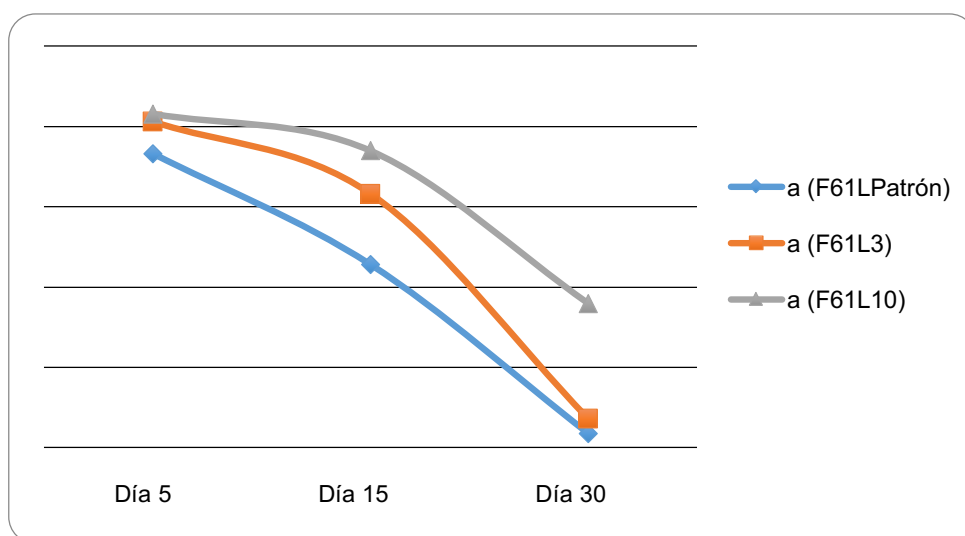
Respecto al color, el parámetro L^* (**Figura 11**) no mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras F61L3 (78,61a) y F61L10 (79,58a).

Figura 11. Evolución del parámetro L* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10.



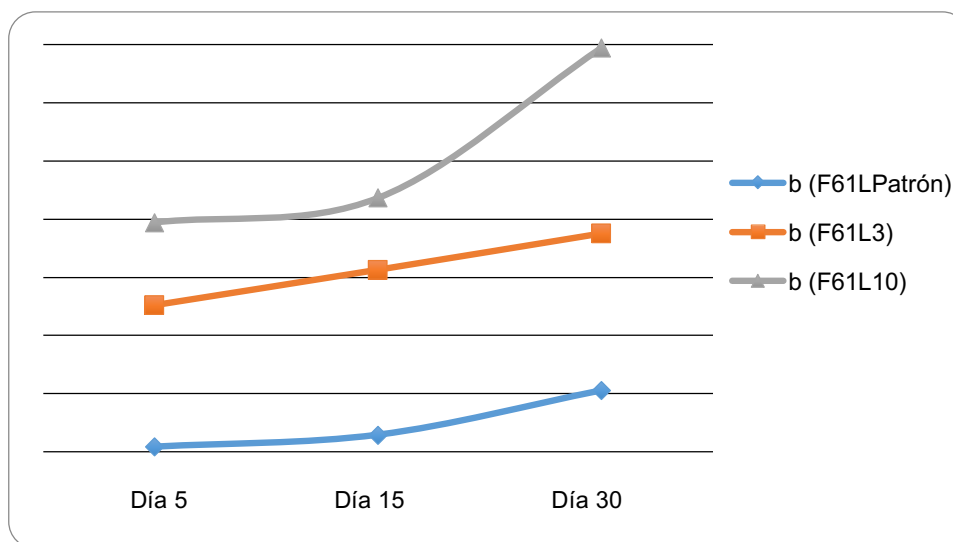
Los parámetros de a* (**Figura 12**) no fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre las muestras (18,06a; 18,79a y 19,83a para F61LPatrón, F61L3 y F61L10, respectivamente).

Figura 12. Evolución del parámetro a* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10.



Los valores de b^* (**Figura 13**) presentaron un incremento en F61LPatrón, F61L3 y F61L10, tendiendo al blanco, crema y amarillo-crema (16,96c; 22,27b y 26,16a, respectivamente).

Figura 13. Evolución del parámetro b^* al día 5, 15 y 30, para las muestras F61LPatrón, F61L3 y F61L10.



La leche de cabra se caracteriza por tener un color blanco debido a la ausencia de carotenos y a que sus micelas son muy pequeñas, permitiendo una mayor difusión de la luz (Quintana López et al., 2011), por lo que las diferencias observadas podrían deberse a compuestos incipientes levemente amarillentos presentes en los fitoesteroles al 61,20 %, que podrían estar afectando a los productos finales.

La evaluación del color mostró que a medida que se aumentó la adición de fitoesteroles, el parámetro L^* evidenció mayor luminosidad; y para b^* , los quesos tendieron al amarillo. Por otro lado, los valores de a^* resultaron similares en las muestras, presentando todas un tinte crema.

4.4.2 Ensayo F98L

Los resultados de los análisis físico-químicos de la leche utilizada en este método, se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en el ensayo F98L.

| Parámetros físico-químicos | LC |
|--|----------------|
| pH | 6,60 ± 0,00 |
| Acidez Titulable (°D) | 12,02 ± 0,05 |
| Proteína (g 100 g ⁻¹) | 3,25 ± 0,04 |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 2,73 ± 0,02 |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 5,16 ± 0,06 |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 11,87 ± 0,44 |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 9,14 ± 0,13 |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 0,73 ± 0,05 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 166,82 ± 7,57 |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 328,20 ± 11,12 |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 46,14 ± 4,25 |

Promedio ± desvío estándar (*n*=1) en base a las determinaciones por triplicado.

La acidez titulable fue inferior a lo permitido por el CAA (14-22 °D), y su valor depende fundamentalmente de la presencia de caseína, minerales e iones; la misma es mayor durante el período de primavera-verano (Paz et al., 2017a).

El contenido de proteínas (3,25 g 100 g⁻¹) y sólidos totales (11,87 g 100 g⁻¹) se encontraron por arriba de lo mínimo exigido por la legislación (2,8 y 9 g

100 g⁻¹, respectivamente) (ANMAT, 2014), y por debajo de los registrados por Paz, Armada, & Ramón (2014) para leche de cabra raza Saanen (4,80 y 14,23 g 100 g⁻¹, respectivamente).

El porcentaje de grasa se ajustó a un valor de 2,73 g 100 g⁻¹, de manera de obtener una leche semidescremada (1,5-2,9 g 100 g⁻¹) (ANMAT, 2014).

Los valores de lactosa (5,16 g 100 g⁻¹) estuvieron próximos a los de Paz, Armada, & Ramón (2014) (5,29 g 100 g⁻¹).

El contenido de cenizas totales (0,73 g 100 g⁻¹) y calcio (166,82 mg 100 g⁻¹) fue inferior (0,99 g y 198,16 mg 100 g⁻¹, respectivamente); y el de fósforo (328,20 mg 100 g⁻¹), superior (263,28 mg 100 g⁻¹) (Paz, Armada, & Ramón, 2014). La composición nutricional de la leche de cabra se ve principalmente afectada por el período de lactación, alimentación, contenido de caseínas, iones y sales minerales (Quintana López et al., 2011).

Los parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella obtenidos por el método F98L se presentan en la **Tabla 25**.

El pH de los quesos fue de 5,18; 5,18 y 5,21 para F98LPatrón, F98L3 y F98L10, respectivamente; y no se observaron diferencias significativas.

Los valores fueron levemente superiores a los de Moynihan et al. (2016), quienes registraron 5,07 para una mozzarella de vaca hilada a pH 5,2 de la cuajada; y cercanos a los de Tyagi et al. (2017): 5,28 para el mismo tipo de producto aunque a partir de leche de búfala. Estas diferencias podrían deberse a la acidez inicial de la leche, enzima coagulante (tipo, concentración, fuerza,

tiempo), pH de desuerado y/o cuajada elegidos al momento de calentar, amasar e hilar los quesos (Early, 1998).

Tabla 25. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | F98LPatrón (n=1) | F98L3 (n=1) | F98L10 (n=1) |
| pH | 5,18 ± 0,01 ^a | 5,18 ± 0,01 ^a | 5,21 ± 0,01 ^a |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 30,06 ± 0,51 ^a | 29,17 ± 0,07 ^a | 29,17 ± 0,51 ^a |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 22,16 ± 0,28 ^a | 22,33 ± 0,28 ^a | 22,66 ± 0,28 ^a |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 51,75 ± 0,29 ^a | 51,38 ± 0,55 ^a | 51,91 ± 0,26 ^a |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 3,33 ± 0,36 ^a | 2,84 ± 0,07 ^a | 3,48 ± 0,20 ^a |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 848,23 ± 13,06 ^a | 846,46 ± 1,87 ^a | 847,79 ± 19,56 ^a |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 647,81 ± 10,30 ^a | 647,35 ± 19,42 ^a | 648,39 ± 7,99 ^a |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 257,71 ± 1,15 ^a | 256,21 ± 6,45 ^a | 258,54 ± 6,98 ^a |
| Humedad (g 100 g ⁻¹) | 48,24 ± 0,29 ^a | 48,61 ± 0,55 ^a | 48,08 ± 0,26 ^a |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los porcentajes de proteínas fueron 30,06 (F98LPatrón), 29,17 (F98L3) y 29,17 (F98L10) g 100 g⁻¹; no se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Los valores estuvieron levemente inferiores a los de Paz, Armada, & Ramón (2014) (33,54 g 100 g⁻¹); al igual que las grasas (28,61 g 100 g⁻¹). Sin embargo, los valores de sólidos totales fueron similares (51,94 g 100 g⁻¹). Los contenidos de cenizas totales, calcio y fósforo resultaron inferiores, teniendo valores de 2,97 g 100 g⁻¹, 635,83 y 519,53 mg 100 g⁻¹, respectivamente. Estas

diferencias podrían deberse a variables tales como el pH de desuerado, tiempo y temperatura de calentamiento, fuerza aplicada en el amasado manual, entre otros (Paz et al, 2017a).

No se observaron diferencias significativas entre las composiciones químicas de los productos obtenidos.

Los Quesos Mozzarellas tuvieron un RQ de 9,16^a; 9,58^a y 9,35^a % para F98LPatrón, F98L3 y F98L10, respectivamente, siendo menor al ensayo anterior, debido a que se partió de materia prima parcialmente descremada.

Dependiendo de la composición de la leche, el tipo de queso y su tecnología de elaboración, el 75-78 % de la proteína y 85-95 % de la grasa quedan retenidos en la cuajada, dando un rendimiento total que oscila entre el 9-15 %. En la producción de la Mozzarella, la retención de grasa rara vez supera el 90 % debido a las pérdidas adicionales que suceden en la etapa de estiramiento en agua caliente (Farkye, 2004).

Las características de textura de los quesos mozzarella obtenidos se presentan en la **Tabla 26**.

Los valores de Elasticidad (6,65; 7,08; 6,67) y Cohesividad (0,71; 0,69; 0,64) de las muestras F98LPatrón, F98L3 y F98L10, fueron similares, por lo que no se evidenciaron diferencias significativas ($P>0,05\%$). La Gomosidad fue mayor en F98LPatrón (2547,53) y disminuyó conforme aumentó la cantidad de fitoesteroles, de 2062,72 (F98L3) a 1309,50 (F98L10); lo que podría deberse al aumento en la presencia de insipientes grasos, que actuarían como lubricantes para la alineación de las fibras proteicas durante el hilado, facilitando y acortando el tiempo de estiramiento, obteniéndose productos menos gomoso. Al mismo

tiempo, esto impactaría arrojando valores bajos de Masticabilidad en la muestra F98L10 (8776,95), con respecto a F98LPatrón (16949,66) y F98L3 (14609,33); y en la Dureza, variando de menos (F98L10: 1662,66) a más duro (F98LPatrón: 3119,00).

Tabla 26. Textura de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|----------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | F98L (n=1) | F98L3 (n=1) | F98L10 (n=1) |
| Textura | | | |
| Gomosidad | 2547,53 ± 125,53 ^a | 2062,72 ± 65,05 ^b | 1309,50 ± 187,50 ^c |
| Dureza | 3119,00 ± 160,30 ^a | 2534,33 ± 97,44 ^{a,b} | 1662,66 ± 206,03 ^b |
| Cohesividad | 0,71 ± 0,01 ^a | 0,69 ± 0,02 ^a | 0,64 ± 0,02 ^a |
| Elasticidad | 6,65 ± 0,05 ^a | 7,08 ± 0,16 ^a | 6,67 ± 0,38 ^a |
| Masticabilidad | 16949,66 ± 854,29 ^a | 14609,3 ± 750,92 ^a | 8776,95 ± 1619,2 ^b |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los factores que pueden influir en la textura de un queso, son su composición química, pH, interacciones entre la caseína y proteínas séricas, proteólisis, retención de Ca, fuerza iónica, contenido de sal y protocolos de fabricación (McMahon, Oberg, & McManus, 1993; Rowney et al., 1999; Guinee et al., 2002).

Con respecto al color (**Tabla 27**) en F98LPatrón, F98L3 y F98L10, los valores fueron: L* 78,7; 79,4; 79,53; a* 5,44; 5,72; 7,28; y b* 24,61; 24,94; 24,95; respectivamente; y no se observaron diferencias significativas.

Tabla 27. Color de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | F98LPatrón (n=1) | F98L3 (n=1) | F98L10 (n=1) |
| Color | | | |
| L* | 78,70 ± 1,12 ^a | 79,40 ± 2,10 ^a | 79,53 ± 1,79 ^a |
| a* | 5,44 ± 0,33 ^a | 5,72 ± 1,33 ^a | 7,28 ± 0,96 ^a |
| b* | 24,61 ± 0,46 ^a | 24,94 ± 2,77 ^a | 26,95 ± 0,79 ^a |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La cantidad de fitoesteroles totales retenidos en la matriz del queso mozzarella, se muestran en la **Tabla 28**.

Las concentraciones de Fitoesteroles Totales en las muestras fueron de 0,00 (F98LPatrón); 0,04 (F98L3) y 0,19 (F98L10) g%. En este ensayo, la adición del compuesto bioactivo al pool inicial de leche de cabra pasteurizada, no garantizaría que el mismo se encuentre en cantidades esperadas en el producto final, ya que debido a su afinidad con el agua, estarían perdiéndose parcialmente en la etapa de desuerado, y amasado típico de éste tipo de queso, por lo cual se replantea adicionarlos en otra etapa del proceso de elaboración.

Tabla 28. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98L).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--------------------------------|-------------------------------|---------|---------|
| | F98LPatrón | F98L3 | F98L10 |
| Fitoesteroles Totales | 0,00 g% | 0,04 g% | 0,19 g% |
| Colesterol | 99,61 mg% | - | - |
| Perfil de Fitoesteroles | | | |
| Brassicasterol | 0,38 % | 1,00 % | 0,47 % |
| 24-metilencolesterol | - | 0,83 % | 0,30 % |
| Campesterol | - | 20,89 % | 21,16 % |
| Campestanol | - | 0,52 % | 0,34 % |
| Stigmasterol | - | 23,81% | 24,97 % |
| β -sitoesterol | - | 51,80 % | 1,57 % |
| d-5,24-stigmastadienol | - | 0,57 % | 0,57 % |

4.4.3 Ensayo F98HM

Los resultados de los análisis físico-químicos de la leche utilizada en este método, se muestran en la **Tabla 29**.

La acidez titulable fue próxima a lo permitido por el CAA (14-22 °D), las proteínas y los sólidos totales por encima de 2,8 g 100 g⁻¹ y 9 g 100 g⁻¹, respectivamente (ANMAT, 2014). Se trabajó con leche semidescremada, de igual manera que el método precedente.

Tabla 29. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en este método (F98HM).

| Parámetros físico-químicos | LC |
|--|---------------|
| pH | 6,66 ± 0,01 |
| Acidez Titulable (°D) | 13,80 ± 0,25 |
| Proteína (g 100 g ⁻¹) | 3,79 ± 0,04 |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 2,06 ± 0,05 |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 4,26 ± 0,35 |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 11,20 ± 0,28 |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 9,14 ± 0,61 |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 1,09 ± 0,06 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 172,90 ± 2,82 |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 372,38 ± 8,82 |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 70,50 ± 2,14 |

Promedio ± desvío estándar (*n*=1) en base a las determinaciones por triplicado.

Los parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella obtenidos se presentan en la **Tabla 30**.

El pH de ambos quesos fue de 5,46; por lo que no hubo diferencias significativas entre los productos.

Los valores fueron superiores a los de Moynihan et al. (2016) (5,07) para una mozzarella de vaca hilada a un pH de la cuajada de 5,2; y similares a los de Paz et al. (2017a): 5,42 para un queso mozzarella de cabra hilado a un pH de

desuerado de 5,0. Estas diferencias podrían deberse al pH de desuerado y/o cuajada elegidos al momento de calentar, amasar e hilar los quesos.

Tabla 30. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98HM).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | |
|--|-------------------------------|----------------------------|
| | F98HMPatrón | F98HM10 |
| pH | 5,46 ± 0,01 ^a | 5,46 ± 0,01 ^a |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 27,21 ± 0,51 ^a | 27,95 ± 0,62 ^a |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 19,00 ± 0,00 ^a | 19,50 ± 0,00 ^a |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 47,86 ± 0,18 ^a | 48,27 ± 0,33 ^a |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 3,43 ± 0,02 ^a | 3,29 ± 0,08 ^a |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 871,51 ± 0,96 ^a | 858,60 ± 1,60 ^a |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 807,28 ± 12,08 ^a | 800,09 ± 3,59 ^a |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 218,79 ± 10,91 ^a | 234,02 ± 3,79 ^a |
| Humedad (g 100 g ⁻¹) | 52,14 ± 0,18 ^a | 51,72 ± 0,33 ^a |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los porcentajes de proteínas fueron 27,21 (F98HMPatrón) y 27,95 (F98HM10) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Las cifras son superiores a las de Tyagi et al. (2017): 19,22 g 100 g⁻¹, para un queso mozzarella a base de leche de búfala; y próximas a las de Smith et al. (2017) (25,40 g 100 g⁻¹) para la de vaca. Esto podría deberse al contenido inicial de proteínas de la materia prima.

La materia grasa en *base húmeda* fue de 19,00 (F98HMPatrón) y 19,50 (F98HM10) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras, lo que estaría demostrando la escasa retención del compuesto bioactivo en la matriz.

Los valores fueron levemente inferiores a los de Tyagi et al. (2017), para quesos mozzarella de búfala (22,48 g 100 g⁻¹); y próximos a los de Smith et al. (2017) (20,02 g 100 g⁻¹) para los de vaca.

Por otro lado, la cantidad de grasa en *base seca* fue de 41,43 (F98HMPatrón) y 40,38 (F98HM10) g 100 g⁻¹, superiores a los requisitos químicos mínimos exigidos para un queso mozzarella (35 g 100 g⁻¹). (ANMAT, 2014). Al mismo tiempo, fue inferior a la de Tyagi et al. (2017) cuya cifra informada fue de 46,47 g 100 g⁻¹; esto podría deberse al contenido graso inicial de la materia prima: la leche de búfala fue estandarizada a 4 g 100 g⁻¹, y la de cabra a 2,06 g 100 g⁻¹.

El contenido de sólidos totales fue de 47,86 (F98HMPatrón) y 48,27 (F98HM10) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Los valores fueron inferiores a los registrados por Tyagi et al. (2017) (51,99 g 100 g⁻¹) y Smith et al. (2017) (51,00 g 100 g⁻¹) para quesos mozzarella de búfala y vaca, respectivamente. Esto podría deberse a diferencias en: el contenido inicial de sólidos de la materia prima utilizada, y el proceso llevado a cabo para la obtención del producto, principalmente al trabajo en tina.

El porcentaje de cenizas totales fue de 3,43 (F98HMPatrón) y 3,29 (F98HM10) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Los valores fueron similares a los de Smith et al. (2017) para quesos mozzarella a base de leche de vaca (3,17 mg 100 g⁻¹).

El contenido de calcio fue de 871,51 (F98HMPatrón) y 858,60 (F98HM10) mg 100 g⁻¹, y no se observaron diferencias significativas.

Las cifras fueron superiores a los de Smith et al. (2017) (593,15 mg 100 g⁻¹) y Paz et al. (2017a) (725,95 mg 100 g⁻¹), para quesos mozzarella de vaca y cabra, respectivamente.

El contenido de fósforo fue de 807,28 (F98HMPatrón) y 800,09 (F98HM10) mg 100 g⁻¹, y no se observaron diferencias significativas.

Las muestras tuvieron una relación calcio/fósforo mayor a 1, importante en la prevención de la osteoporosis (Teegarden et al., 1998).

El contenido de sodio fue de 218,79 (F98HMPatrón) y 234,02 (F98HM10) mg 100 g⁻¹, y no se observaron diferencias significativas.

Los valores fueron superiores a los de Tyagi et al. (2017), quienes registraron 138,00 mg 100 g⁻¹, para quesos mozzarella a base de leche de búfala; sin embargo, resultaron inferiores a los comerciales reportados en otros estudios (Agarwal et al., 2011).

La humedad de los quesos fue de 52,14 (F98HMPatrón) y 51,72 (F98HM10) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras.

Las cifras fueron similares a los de Tyagi et al. (2017), quienes registraron 51,62 g 100 g⁻¹, para mozzarellas de búfala; y levemente superiores a los de Smith et al (2017) para quesos a base de leche de vaca: 49,00 g 100 g⁻¹.

De acuerdo a la clasificación general de quesos del CAA, los productos puede considerarse como de “*alta humedad*” (46-54,9 g 100 g⁻¹); al mismo tiempo, no superaron el máximo (60 g 100 g⁻¹) establecido como requisito químico para este tipo de quesos (ANMAT, 2014).

El RQ de ambas Mozzarellas fue de 10,82 %, próximos al de Paz et al. (2017) (11,20 %).

Se determinaron los Fitoesteroles Totales sólo en la muestra adicionada con el compuesto bioactivo (**Tabla 31**).

Los resultados mostraron un contenido final de 0,18 g% de fitoesteroles totales en el producto final, por lo que puede afirmarse que su adición durante la etapa de calentamiento, amasado e hilado, y moldeado, tampoco garantizarían que los mismos se encuentren en cantidades suficientes, debido al estiramiento mecánico y manipulación de la masa, que favorecerían una mayor pérdida de grasa y compuesto.

Tabla 31. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de la muestra F98HM10.

| | |
|--------------------------------|---------|
| Fitoesteroles Totales | 0,18 g% |
| Colesterol | - |
| Perfil de Fitoesteroles | |
| Brassicasterol | 0,39 % |
| Campesterol | 21,45 % |
| Stigmasterol | 25,23 % |
| β -sitoesterol | 51,68 % |
| Sitostanol | 0,58 % |

4.4.4 Ensayo F98HMPer

Se obtuvo una emulsión con la siguiente composición: alginato de sodio 1 g%, agua desmineralizada 89 g% y fitoesteroles 10 g%. La agitación durante 8 min a 12.000 rpm resultó en un producto homogéneo, y la difusión de gotas sobre el baño gelificante de CaCl_2 , bajo agitación continua, permitió obtener perlas que presentaron las siguientes características: forma esférica con diámetros promedio de 0,5 mm; tamaño uniforme y definido, sin aglomeración; incoloras y traslúcidas (**Figura 14**).

Benavides et al. (2016) evaluaron diferentes condiciones de emulsificación, e indicaron que si el proceso de emulsión se produce por un tiempo de entre 3-5 min a más de 10.000 rpm, se forma un flujo turbulento con remolinos que ejercen esfuerzos de cizallamiento sobre las gotas, reduciendo su tamaño y favoreciendo la homogeneidad de la fase dispersa; por el contrario,

tiempos de hasta 1 min a velocidades iguales o inferiores a 8.000 rpm, aumentan la polidispersabilidad.

Figura 14. Cápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroles.



Con las cápsulas obtenidas, se elaboró el queso mozzarella, adicionándolas durante las etapas de calentamiento, amasado e hilado, y moldeado; sin embargo, no lograron incorporarse a la matriz del queso mozzarella de una manera homogénea (**Figura 15**), por lo cual este método no se consideró adecuado.

Figura 15. Cápsulas de alginato de sodio, conteniendo fitoesteroles, distribuídas en la matriz del queso mozzarella a base de leche de cabra.



4.4.5 Ensayo F98LipLec

Se obtuvo una emulsión con la siguiente composición: lecitina 1 g%, leche 98 g% y fitoesteroles 1 g%. En cuanto a su estabilidad, a las 48 horas, no se observó separación de fases antes ni después de la centrifugación, lo cual podría atribuirse a la lecitina que tiene la capacidad de evitar el floculado, de actuar como barrera mecánica y electrostática a la coalescencia, sin agregación de partículas (McClements, 2005). La disminución de la temperatura y la velocidad de agitación cuando se obtuvo la pre-emulsión, permitió reorganizar la estructura liposomal, estabilizando a la misma (McClements, 2005; Fili, Margalef, & Armada, 2015).

La homogeneidad de la microemulsión final (**Figura 16**) se debería a que, cuando el surfactante (en este caso, lecitina de soja líquida) se dispersa en agua, sus moléculas con una región cabeza polar y una región cola apolar, se auto-asociarían, dando lugar a una fase en equilibrio que depende de interacciones inter e intramoleculares (Carlucci, Cicconi Vidal, & Bregni, 2004).

Figura 16. Microemulsión de leche de cabra + lecitina + fitoesteroles (liposomas).



Por otro lado, los fitoesteroles que también son anfífilos, se ubicarían como componente de la membrana liposomal de la misma manera en que el colesterol se incorpora a las bicapas de fosfolípidos en los mamíferos, insertándose con su grupo OH hacia el exterior acuoso y su estructura plana hidrofóbica entre las cadenas hidrocarbonadas (Hermida, Bregni, & Barnadas Rodríguez, 2006).

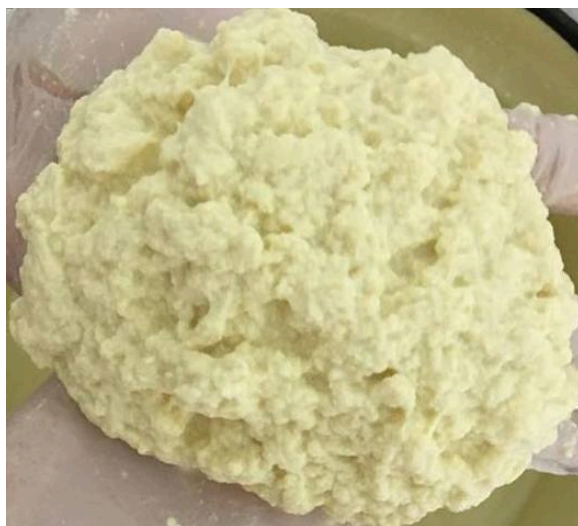
Se adicionó la emulsión a la leche pasteurizada, pudiendo homogeneizarse totalmente con el pool inicial. Esto se debería a la morfología de los liposomas, cuyos componentes básicos son las moléculas de fosfolípidos. Cuando estas se dispersan en agua, producen micelas (esferas) de bicapas cerradas para proteger sus grupos hidrofóbicos en el interior lipófilo, mientras su cabeza hidrófila permanece en contacto con la fase acuosa. Esta característica, permite incorporar una amplia variedad de componentes funcionales en su centro (Kaya-Celiker, & Mallikarjunan, 2012), como los fitoesteroles.

Durante la elaboración del queso mozzarella, cuando se alcanzó un pH de 5,3, se calentó la masa para proceder al hilado, y se observó un desgranamiento de la misma, haciéndose imposible su unión y amasado (**Figura 17**).

Este efecto podría estar dado por la presencia de lecitina, que al tener un bajo peso molecular y alta solubilidad, en emulsiones de aceite en agua, se adsorben más rápido en las gotitas (Dickinson, 1991), compitiendo con las proteínas y pudiendo moverlas inclusive cuando estas ya fueron fijadas en la

superficie (Pugnaroni et al., 2004).

Figura 17. Masa del queso mozzarella desgranada.



Por otro lado, dependiendo de las propiedades físico-químicas de sus constituyentes y de su composición, la estabilidad de una microemulsión puede verse afectada por las altas temperaturas requeridas para este tipo de quesos de pasta hilada, que ejercen un efecto sobre la formación y existencia de regiones, en la que el balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de los surfactantes puede cambiar y desestabilizar la interfase (Carlucci, Cicconi Vidal, & Bregni, 2004). Al mismo tiempo, esto provoca la difusión de una fase a la otra, ayudando a formar estructuras autoensambladas (como microemulsiones bicontinuas) cerca de la interfase, que al hidratarse con la fase continua, estallan o sufren inversión provocando una emulsión espontánea (Riehm et al., 2017). Es decir que, la estabilidad de la formulación microemulsiva final debe ser siempre examinada en términos de temperaturas de aplicación, e inclusive, almacenamiento

(Carlucci, Cicconi Vidal, & Bregni, 2004), por lo que esta forma de adición de fitoesteroles no fue considerada.

4.4.6 Ensayo F98LipGrs

Se obtuvo una emulsión liposomal con la siguiente composición: grasa de leche de cabra 1 g%, leche de cabra 98 g% y fitoesteroles 1 g%. En cuanto a la estabilidad, el producto resultó homogéneo inmediatamente después de la centrifugación; pero a las 12 horas, se observó claramente como la grasa junto con los fitoesteroles, se separaron del resto de la leche (**Figura 18**).

Figura 18. Separación de fases de emulsión liposomal con leche de cabra + grasa de leche de cabra + fitoesteroles, a las 12 horas.



Esto podría deberse a la ausencia de un agente emulsionante, ya que el papel de estas moléculas tensioactivas, que se absorben en la superficie de las gotitas de aceite/grasa recién formadas durante la homogeneización, es reducir la tensión interfacial para evitar la sedimentación, floculación o coalescencia de las emulsiones durante su procesamiento, almacenamiento y/o utilización

(Moran-Valero, Pizones Ruiz-Henestrosa, & Pilosof, 2017), motivo por el cual este método no fue contemplado para continuar con la elaboración del queso.

4.4.7 Ensayo F98GT

Se obtuvo una emulsión con la siguiente composición: goma tragacanto 1 g%, leche 98 g% y fitoesteroles 1 g%. La misma fue homogénea y no presentó grumos ni separación de fases (**Figura 19**). Estudios anteriores han reportado que la goma tragacanto puede ser adecuada para crear emulsiones de aceite en agua (Balaghi, Mohammadifar, & Zargaraan, 2010; Dickinson, 2009).

Figura 19. Incorporación de la emulsión leche de cabra + goma tragacanto + fitoesteroles



Una vez obtenido el producto, se lo adicionó a la leche pasteurizada y se procedió a elaborar el queso. Durante la coagulación, el suero tuvo apariencia traslúcida, levemente amarillenta, sin micelas grasas perceptibles visualmente. No obstante, en la etapa de calentamiento, amasado e hilado, se observó cómo los fitoesteroles iban separándose de la masa, dando como resultado una mozzarella sin retención de fitoesteroles en su matriz (**Figura 20**).

Figura 20. Queso mozzarella a base de leche de cabra, sin retención de fitoesteroles en su matriz.



La mayoría de las emulsiones estabilizadas electrostáticamente son sensibles al pH de la fase continua, perdiendo estabilidad con su disminución (Hunter, 1998), lo que ocurre desde el comienzo de la elaboración del queso en el que la leche tiene un pH aproximado de $6,60 \pm 0,10$, hasta el momento previo al hilado en el que el pH es de $5,3 \pm 0,05$. Esto se debería a la disminución de la fuerza de repulsión electrostática entre las gotitas, hasta un punto en el que no llega a ser suficiente para inhibir su agregación. Sumado a lo anterior, está el hecho de que tampoco son termodinámicamente estables, por lo tanto, no se ven favorecidas durante la etapa de calentamiento típico de los quesos de pasta hilada, por lo que tienden a romperse a través de varios mecanismos, tales como cremado o sedimentación, floculación, coalescencia e inversión de fases (Abdolmaleki et al., 2016).

4.4.8 Ensayo F95HM

La adición de fitoesteroles en polvo, durante la etapa de calentamiento, amasado e hilado, y moldeado, presentó dificultad para incorporarlo a la masa, formándose grumos dentro de su matriz y sobre la superficie; como resultado se obtuvo un producto heterogéneo, con una gran cantidad de compuesto bioactivo que no logró integrarse a la mozzarella (**Figura 21**).

Figura 21. Queso mozzarella a base de leche de cabra, con fitoesteroles en polvo, adicionados en la etapa de hilado final y moldeado.

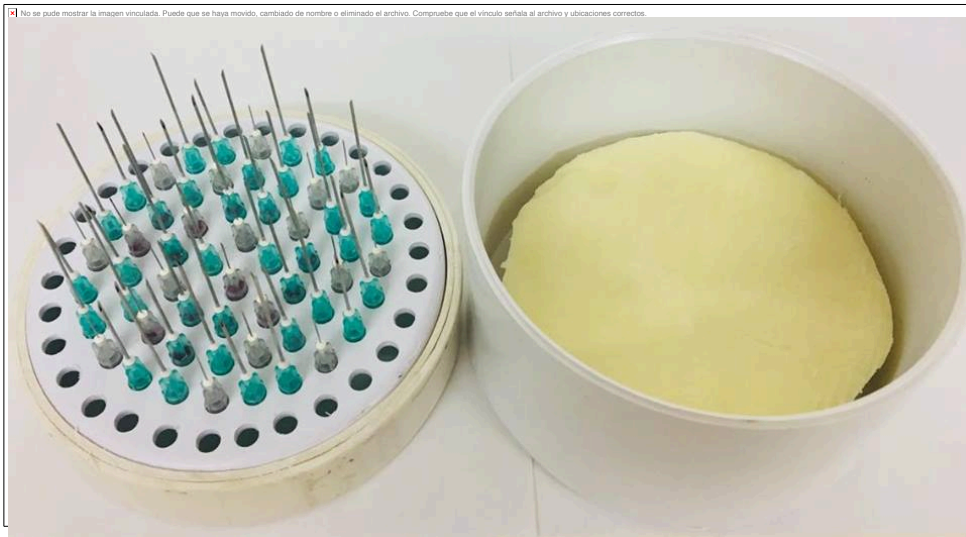


Algo similar les sucedió a Bermúdez-Aguirre, & Barbosa-Cánovas (2012), quienes no pudieron incorporar durante el estiramiento, polvo de linaza como fuente de omega-3 a un queso mozzarella de vaca, debido a que su alta higroscopicidad provocó su mayor absorción en el desuerado, haciendo que se pierda y quedando fuera de la cuajada de queso.

4.4.9 Ensayo F98Inyec

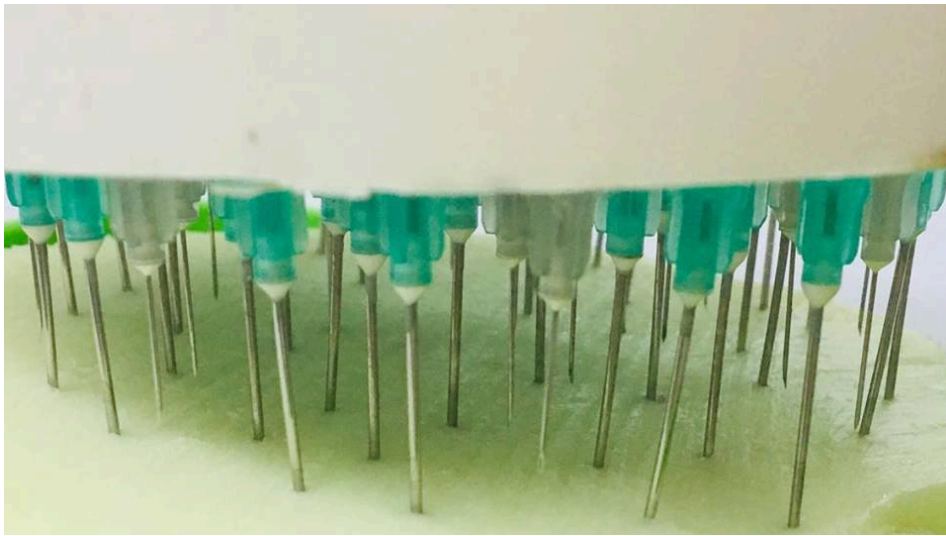
La inyección del compuesto se realizó con un dispositivo que contaba de dos partes: 1) un contenedor donde se colocaba el queso mozzarella; y 2) una tapa con incrustaciones de agujas de diferentes longitudes y diámetros, distribuidas de manera uniforme (**Figura 22**).

Figura 22. Dispositivo de inyección múltiple para incorporación de fitoesteroles al queso mozzarella a base de leche de cabra.



La mezcla de fitoesteroles fundidos coloreados con amaranto, se colocó en una jeringa de 10 ml de capacidad, y se incorporó de forma homogénea al producto final. Este procedimiento resultó factible y no presentó dificultad durante su ejecución (**Figura 23**).

Figura 23. Inyección de fitoesteroles al queso mozzarella a base de leche de cabra.



Una vez terminado este paso, se observó que el compuesto bioactivo se deslizó por los canales formados por las agujas, distribuyéndose de manera homogénea en la superficie (**Figura 24**) e interior (**Figura 25**) del producto.

Figura 24. Fitoesteroles inyectados al queso mozzarella a base de leche de cabra (superficie del producto).

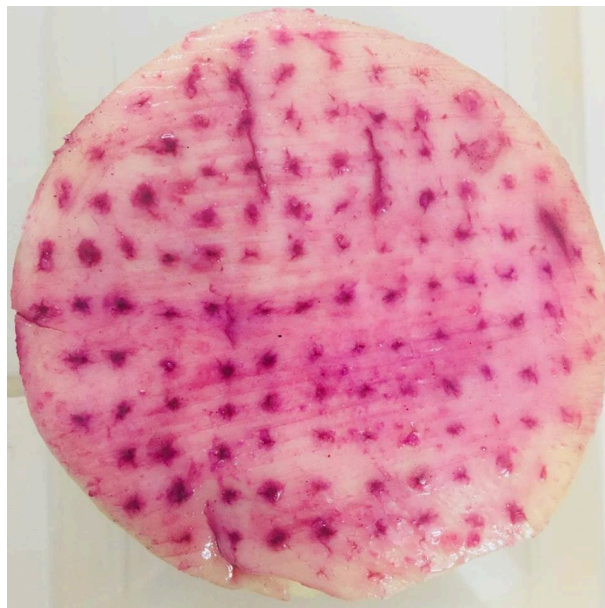


Figura 25. Fitoesteroles inyectados al queso mozzarella a base de leche de cabra (interior del producto).



Los resultados de los análisis físico-químicos de la leche utilizada en este método, se muestran en la **Tabla 32**.

El pH de la leche de cabra fue de 6,60, similar al de Palma Parodi, Barrionuevo, & Corradetti, (2015) para raza Saanen (6,68), quienes registraron valores constantes durante todo el periodo productivo (primavera, verano y otoño). La acidez titulable fue inferior a lo permitido por el CAA (14-22 °D), y su valor depende fundamentalmente del período de lactación (Paz, Armada, & Ramón, 2014).

El contenido de proteínas ($3,21 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) estuvo por arriba de lo mínimo exigido por la legislación ($2,8 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente) (ANMAT, 2014), y similar a los de Palma Parodi, Barrionuevo, & Corradetti (2015) para leche de cabra raza Saanen ($3,48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$).

Tabla 32. Características físico-químicas de la leche de cabra utilizada en el ensayo F98Inyec.

| Parámetros físico-químicos | LC |
|--|---------------|
| pH | 6,60 ± 0,00 |
| Acidez Titulable (°D) | 11,20 ± 0,05 |
| Proteína (g 100 g ⁻¹) | 3,21 ± 0,09 |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 2,90 ± 0,05 |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 4,60 ± 0,06 |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 11,83 ± 0,47 |
| SNG (g 100 g ⁻¹) | 8,93 ± 0,18 |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 1,12 ± 0,08 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 182,79 ± 7,74 |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 367,48 ± 9,35 |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 42,96 ± 3,96 |

Promedio ± desvío estándar (*n*=1) en base a las determinaciones por triplicado.

El porcentaje de grasa (2,90 g 100 g⁻¹) se ajustó de manera de obtener una leche semidescremada (1,5-2,9 g 100 g⁻¹) (ANMAT, 2014). Palma Parodi, Barrionuevo, & Corradetti (2015) observaron que este componente es el que presentó mayor variación durante el período de su estudio (4,24 g 100 g⁻¹), iniciando en 3,07 g 100 g⁻¹, y llegando al final de la lactancia a un valor de 6,00 g 100 g⁻¹, siempre por sobre el rango estipulado por el CAA (Mín. 3,00 g 100 g⁻¹).

Los valores de lactosa ($4,60 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) estuvieron próximos a los de Palma Parodi, Barrionuevo, & Corradetti (2015) ($4,51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), quienes registraron valores constantes, sin grandes fluctuaciones durante todo el período de estudio.

El contenido de sólidos totales ($11,83 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) fue superior a lo mínimo exigido por la legislación ($9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente) (ANMAT, 2014); esto depende fundamentalmente del período de lactación, presentando un aumento de sus valores hacia el final de la misma (Palma Parodi, Barrionuevo, & Corradetti, 2015).

El contenido de cenizas totales ($1,12 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), calcio ($182,79 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$), fósforo ($367,48 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) y sodio ($42,96 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) son similares a la de otros autores (Paz, Armada, & Ramón, 2014), los cuales se ven influenciados principalmente por el período de lactación, contenido de caseínas, iones y sales minerales (Quintana López et al., 2011).

Los parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella obtenidos por el método F98L se presentan en la **Tabla 33**.

El pH de los quesos fue de 5,22 para todos los productos, similar a los productos anteriores (Paz et al, 2014; 2017; Tyagi et al., 2017).

Los porcentajes de proteínas fueron 29,17 (F98InyecPatrón), 29,76 (F98Inyec3) y 27,68 (F98Inyec6) $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$; no se observaron diferencias significativas entre las muestras. Los valores son superiores a las registradas por Paz et al. (2017b), quienes analizaron la composición química de mozzarellas a base de leche de cabra, de cuatro establecimientos elaboradores artesanales de quesos (26,58; 26,74; 26,35 y 21,66 $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$).

Tabla 33. Parámetros físico-químicos de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98Inyec).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | F98InyecPatrón | F98Inyec3 | F98Inyec6 |
| pH | 5,22 ± 0,01 ^a | 5,22 ± 0,01 ^a | 5,22 ± 0,01 ^a |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 29,17 ± 0,51 ^a | 29,76 ± 0,51 ^a | 27,68 ± 0,01 ^a |
| Grasa (g 100 g ⁻¹) | 21,33 ± 0,28 ^c | 24,83 ± 0,28 ^b | 28,33 ± 0,28 ^a |
| Sólidos Totales (g 100 g ⁻¹) | 53,75 ± 0,66 ^b | 58,19 ± 0,34 ^a | 59,21 ± 0,25 ^a |
| Cenizas Totales (g 100 g ⁻¹) | 2,17 ± 0,13 ^a | 2,28 ± 0,05 ^a | 2,18 ± 0,02 ^a |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 874,23 ± 9,73 ^a | 873,93 ± 11,03 ^a | 883,72 ± 9,35 ^a |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 634,81 ± 13,65 ^a | 639,42 ± 9,24 ^a | 642,47 ± 8,68 ^a |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 249,71 ± 4,13 ^a | 252,39 ± 7,29 ^a | 252,54 ± 7,87 ^a |
| Humedad (g 100 g ⁻¹) | 46,25 ± 0,66 ^b | 41,80 ± 0,34 ^a | 40,78 ± 0,25 ^a |

Promedio ± desvío estándar en base a las determinaciones por triplicado. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Los valores de grasa en *base húmeda* fueron de 21,33; 24,83 y 28,33 g 100 g⁻¹ para F98InyecPatrón, F98Inyec3 y F98Inyec6, respectivamente. Se observaron diferencias significativas entre las muestras, lo que evidenciaría la presencia y el aumento de la concentración de fitoesteroles según la cantidad incorporada.

Los valores se encuentran dentro de los rangos registrados por Paz et al. (2017b) para quesos mozzarella a base de leche de cabra (19,90-28,75 g 100 g⁻¹), elaboradas en diferentes tambos de la región NOA.

Por otro lado, la cantidad de grasa en *base seca* fue de 39,68 (F98InyecPatrón), 42,67 (F98Inyec3) y 47,84 (F98Inyec6) g 100 g⁻¹, superiores

a los requisitos químicos mínimos exigidos para un queso mozzarella (35 g 100 g⁻¹). (ANMAT, 2014).

Los porcentajes de sólidos totales fueron de 53,75 (F98InyecPatrón), 58,19 (F98Inyec3) y 59,21 (F98Inyec6) g 100 g⁻¹. No se observaron diferencias significativas entre las muestras adicionadas con fitoesteroles, pero sí entre estas y el producto patrón. Sin embargo, todas las cifras resultaron similares a las reportadas por Paz et al. (2017b) (51,33; 52,38; 53,47 y 55,09 g 100 g⁻¹) para el mismo tipo de alimento.

Dentro de los rangos de cenizas totales (2,17-2,28 g 100 g⁻¹), calcio (873,93-883,72 g 100 g⁻¹), fósforo (634,81-642,47 g 100 g⁻¹) y sodio (249,71-252,54 g 100 g⁻¹), no se observaron diferencias significativas, y los valores resultaron próximos a estudios similares (Paz et al., 2017a; 2017b; Smith et al., 2017).

La humedad de los quesos fue de 46,25; 41,80 y 51,72 g 100 g⁻¹ para F98InyecPatrón, F98Inyec3 y F98Inyec6, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las muestras adicionadas con fitoesteroles, pero sí entre estas y el producto patrón.

Las cifras fueron similares a los rangos reportados por Paz et al. (2017b) (44,91-48,67 g 100 g⁻¹) para el mismo tipo de queso.

De acuerdo a la clasificación general de quesos del CAA, los productos pueden considerarse generalmente como de “*alta humedad*” (46-54,9 g 100 g⁻¹); al mismo tiempo, no superaron el máximo (60 g 100 g⁻¹) establecido como requisito químico para este tipo de producto (ANMAT, 2014).

Los Quesos Mozzarellas tuvieron un RQ del 12,77, levemente superior al rango registrado por Paz et al. (2017b) (9-11 %) para quesos mozzarella a base de leche de cabra.

En la evaluación sensorial, las muestras F98InyecPatrón, F98Inyec3 y F98Inyec6 gustaron por igual para Aceptabilidad Global (7,05; 6,67; 6,81) y los atributos de Color (7,42; 7,38; 7,25), Textura (6,69; 6,89; 6,70), Sabor (6,46; 5,86; 6,30) y Aroma (6,69; 6,65; 6,84), por lo que no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05\%$) entre ellas. Con respecto a la preferencia, tampoco se evidenciaron diferencias significativas para F98InyecPatrón (191), F98Inyec3 (209) y F98Inyec6 (200).

La cantidad de fitoesteroles totales retenidos en la matriz del queso mozzarella, se muestran en la **Tabla 34**.

Las concentraciones de Fitoesteroles Totales en las muestras fueron de 0,00 (F98InyecPatrón); 3,30 (F98Inyec3) y 6,59 (F98Inyec6) g%; y dentro de ellos el que se encuentra en mayor proporción es el β -sitosterol, comúnmente presente en grasas animales y aceites vegetales (Kin et al., 2014). En este ensayo, la adición del compuesto bioactivo mediante inyección directa a los productos finales, garantizaría que el mismo se encuentre en las cantidades requeridas.

Tabla 34. Fitoesteroles Totales y Perfil de Fitoesteroles de los quesos mozzarella a base de leche de cabra (F98Inyec).

| Parámetros | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| | F98InyecPa trón | F98Inyec3 | F98Inyec6 |
| Fitoesteroles Totales | 0,00 g% | 3,30 g% | 6,59 g% |
| Colesterol | 99,36 mg% | - | - |
| Perfil de Fitoesteroles | | | |
| Brassicasterol | 0,28 % | 0,98 % | 1,00 % |
| 24-metilencolesterol | - | 0,85 % | 0,80 % |
| Campesterol | - | 21,08 % | 21,06 % |
| Campestanol | - | 0,25 % | 0,30 % |
| Stigmasterol | - | 24,51 % | 24,69 % |
| β -sitoesterol | - | 52,25 % | 52,17 % |
| d-5,24-stigmastadienol | - | 0,53 % | 0,54 % |

Kin et al. (2014) determinaron este compuesto en mozzarellas comerciales, cuya muestra estuvo constituida por ocho productos *naturales* (99 % leche de vaca + 1% otros ingredientes) y cuatro de *imitación* (99 % de aceite vegetal -aceite de palma y aceite de oleína de palma- + 1 % otros ingredientes), y obtuvieron valores entre 0,000177-0,000275 y 0,005761-0,006821 g de Fitoesteroles Totales; 0,000117-0,000143 y 0,001090-0,001349 g de Campesterol; 0,000047-0,000049 y 0,000595-0,000702 g de Stigmasterol; 0,000059-0,000105 y 0,004076-0,004770 g de β -sitoesterol, por 100 g de muestra, respectivamente. Esto sucede debido a que los fitoesteroles en las

muestras naturales se derivan principalmente de las grasas lácteas, mientras que los de imitación se obtienen a partir de aceites vegetales (Kin et al., 2014).

Bermúdez-Aguirre, & Barbosa-Cánovas (2012), mencionan que en general la incorporación de compuestos en el queso, utilizando un proceso de elaboración convencional, parece ser un gran reto; y en el caso de los fitoesteroles esto se acrecienta debido a su naturaleza hidrofóbica e insoluble que dificultan su aplicación (Di Battista et al., 2015). A la vez, mencionan que las condiciones de elaboración, tales como temperatura, oxígeno o tiempos de procesamiento, pueden afectar de manera negativa el contenido final de nutrientes añadidos (Bermúdez-Aguirre, & Barbosa-Cánovas, 2012).

Sin embargo, existen nuevos enfoques que ofrecen una manera interesante de incorporarlos a la matriz en el proceso de elaboración. Uno de ellos, consiste en el uso de la alta presión hidrostática en el queso mozzarella, en términos de incorporación de compuesto bioactivo en concentraciones deseables, y afirman que esta nueva tecnología ofrecería muchas ventajas no sólo para el consumidor, sino también para el tecnólogo de alimentos (Bermúdez-Aguirre, & Barbosa-Cánovas, 2012).

4.5 CONCLUSIONES

A partir de los ensayos realizados en el presente capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La incorporación directa de fitoesteroles, en sus distintas presentaciones, sobre la leche pasteurizada o durante la etapa de calentamiento, amasado e hilado de la masa del queso, no fue factible.

- La obtención de perlas de alginato de sodio lograron la encapsulación de los fitoesteroles, sin pérdida de compuesto bioactivo durante la etapa de hilado y amasado. Sin embargo, no es posible su homogeneización en la matriz, dando como resultado un producto heterogéneo.
- La formación de liposomas de fitoesteroles con lecitina fue posible, obteniendo una microemulsión homogénea y estable después de la centrifugación, que podía ser adicionada a la leche. No obstante, se observó un desgranamiento de la masa del queso durante la etapa de coagulación, que se acentuó durante el calentamiento, haciéndose imposible el amasado del coágulo.
- La obtención de liposomas de fitoesteroles reemplazando la lecitina por grasa de leche de cabra, no fue factible debido a la inestabilidad de la emulsión, lo que originó separación de fases con imposibilidad de ser incorporada al pool de leche inicial.
- La emulsión con goma tragacanto resultó homogénea y estable, pero durante la etapa de calentamiento, hilado y amasado, los fitoesteroles se funden, drenando fuera de la matriz del queso.
- El uso de fitoesteroles en polvo no resulta un ingrediente posible de utilizar en este tipo de productos.
- La inyección de fitoesteroles al queso, resulta sencillo y factible, por lo cual es posible su correcta difusión homogénea a través del producto final.

4.6 REFERENCIAS

Abdolmaleki, K., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, R., Fadavi, G., & Meybod, N. M. (2016). The effect of pH and salt on the stability and physicochemical properties of oil-in-water emulsions prepared with gum tragacanth. *Carbohydrate Polymers*, 140, 342-348.

Abumweis S. S., Barake R., & Jones P. J. (2008). Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Food & Nutrition*, 52.

Agarwal, S., McCoy, D., Graves, W., Gerard, P. D., & Clark, S. (2011). Sodium content in retail Cheddar, Mozzarella, and process cheeses varies considerably in the United States. *Journal of Dairy Science*, 94 (3), 1605-1615.

Algorta Pinedaa, J., Chinchetru Ranedob, M. J., Aguirre Andaa, J., & Terrerosa, S. F. (2005). Eficacia hipocolesterolemizante de un yogur que contiene ésteres de estanol vegetal. *Revista Clínica Española*, 205(2), 63-6.

ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. *Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional*. [En línea] Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/codigo/caa1.htm>

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1996). Official methods of analysis (16th ed., 4th revision). Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc.

AOMSA (Advanced Organic Materials S. A.) (2006). Fitoesteroles en Productos Lácteos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 41, 38-41.

Baimark, Y., & Srisuwan, Y. (2014). Preparation of alginate microspheres by water-in-oil emulsion method for drug delivery: Effect of Ca²⁺ post-cross-linking. *Advanced Powder Technology*, 25 (5), 1541-1546.

Balaghi, S., Mohammadifar, M. A., & Zargaraan, A. (2010). Physicochemical and rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian Astragalus. *Food Biophysics*, 5 (1), 59-71.

Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77-83.

Benítez, C. A., Yapura, A. L., Cravero Bruneri, A. P., & Millán, M. P. (2015). Utilización de mezclas de harinas de trigo-chía y fitoesteroles en polvo para la elaboración de un producto de panificación dietético. *DIAETA*, 33 (151), 7-13.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Fortification of queso fresco, cheddar and mozzarella cheese using selected sources of omega-3 and some nonthermal approaches. *Food Chemistry*, 133, 787-797.

Budde, E.N.V., Cravero Bruneri, A.P., & Ramón, A.N. (2011). Formulación de un yogur dietético con fitoesteroles a partir de leche de cabra. Tesis para la obtención del grado de Licenciado en Nutrición, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta.

Carlucci, A. M., Cicconi Vidal, M., & Bregni, C. (2004). Las Microemulsiones como Vehículos para Administración de Drogas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23 (4), 550-557.

CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) (1996). *Colourimetry* (2nd ed.). Vienna: CIE Publication.

Clifton, P. M., Noakes, M., Ross, D., Fassoulakis, A., Cehun, M., & Nestel, P. (2004). High dietary intake of phytosterol esters decreases carotenoids and increases plasma plant sterol levels with no additional cholesterol lowering. *Journal of Lipids*, 45, 1493–1499.

Comunian, T. A., & Favaro-Trindade C. S. (2016). Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. *Food Hydrocolloids*, 61, 442-457.

Di Battista, C. A., Constenla, D., Ramírez-Rigo, M. V., & Piña, J. (2015). The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286, 193-201.

Dickinson, E. (1991). Competitive adsorption of lecithin and β -casein in oil in water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1365–1368.

Dickinson, E. (1997). Properties of emulsions stabilized with milk proteins: Overview of some recent developments. *Journal of Dairy Science*, 80, 2607-2619.

Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23 (6), 1473-1482.

Early, R (1998). *"Tecnología de los Productos Lácteos"* Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España.

Egan, H., Kirk, R., & Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods* (8th ed.). London: Longman.

Eh Suk, V. R., & Misran, M. (2017). Preparation, characterization and physicochemical properties of DOPE-PEG2000 stabilized oleic acid-soy lecithin liposomes (POLL). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 513, 267–273.

Farkye, N. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 91-98.

FDA (Foods and Drogas Administration) (2003). GRAS status of Phytosterols at a Level Necessary to Justify the Proposed Health Claim. Appendix A. [En línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0316/06p-0316-cp00001-02-Appendix-A-vol1.pdf>

FDA (Foods and Drogas Administration) (2007). GRAS Notice No. GRN 000200. US Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Washington, D. C. [En línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm264061.pdf>

Fenelon, M. A., & Guinee, T. P. (1999). The effect of milk fat on Cheddar cheese yield and its prediction, using modifications of the Van Slyke cheese yield formula. *Journal of Dairy Science*, 82, 2287-2299.

Fili, Margalef, & Armada, (2015). Microencapsulación de hierro para fortificación de leche caprina. Tesis Doctoral. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta.

Guinee, T. P., Feeney, E., Auty, M., & Fox, P. (2002). Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 85, 1655-1669.

Guo, M., Park, Y. W., Dixon, P. H., Gilmore, J. A., & Kindstedt, P. S. (2004). *Small Ruminant Research*, 52, 103-107.

Gylling, H., Plat, J., Turley, S., Ginsberg, H. N., Ellegård, L., Jessup, W., Jones, P. J., Lütjohann, D., Maerz, W., Masana, L., Silbernagel, G., Staels, B., Borén, J., Catapano, A. L., De Backer, G., Deanfield, J., Descamps, O. S., Kovanen, P. T., Riccardi, G., Tokgözoğlu, L., & Chapman, M. J. (2014). Review Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 232, 346-360.

Hermida, L., Bregni, C., & Barnadas Rodríguez, R. (2006). Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Hunter, R. J. (1998). Recent developments in the electroacoustic characterisation of colloidal suspensions and emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 141 (1), 37-66.

Kalantzopoulos, G. C. (1993). Cheeses from ewes' and goats' milk. In: Fox, P.F. (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Major Cheese Groups*, vol. 2, 2nd ed. Chapman & Hall, New York, pp. 533-540.

Kaya-Celiker, H., & Mallikarjunan, K. (2012). Better Nutrients and Therapeutics Delivery in Food Through Nanotechnology. *Food Engineering Reviews*, 4, 114-123.

Kim, N. S., Lee, J. H., Han, K. M., Kim, J. W., Cho, S., & Kim, J. (2014). Discrimination of commercial cheeses from fatty acid profiles and phytosterol contents obtained by GC and PCA. *Food Chemistry*, 143, 40-47.

Kondyli, E., Katsiari, M. C., & Voutsinas, L. P. (2007). Variations of vitamin and mineral contents in raw goat milk of the indigenous Greek breed during lactation. *Food Chemistry*, 100, 226-230.

Lagarda, M. J., García-Llatas, G., Farré, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*, 41, 1486-1496.

Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61, 193–199.

McClements, D.J. (2005) Food emulsions: principles practices and techniques 2nd ed. Boca Ratón, CRC Press.

McMahon, D. J., Oberg, C. J., & McManus, W. (1993). Functionality of Mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 48, 99-104.

Moran-Valero, M. I., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., & Pilosof, A. M. R. (2017). Synergistic performance of lecithin and glycerol monostearate in oil/water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 151, 68-75.

Moynihan, A. C., Govindasamy-Lucey, S., Molitor, M., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., McSweeney, P. L. H., & Lucey, J. A. (2016). Effect of standardizing the lactose

content of cheesemilk on the properties of low-moisture, part-skim Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 99, 7791-7802.

Newell, G. J., & MacFarlane, J. D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science*, 52 (6), 1712-1725.

Nichols, M., Townsend, N., Scarborough, P., Rayner, M., Leal, J., Luengo-Fernandez, R., & Gray, A. (2012). *European cardiovascular disease statistics 2012*. Brussels/Sophia Antipolis: European Heart Network, European Society of Cardiology.

Nolasco, S. M. (2008). La Naturaleza al Servicio de la Salud. *Énfasis Alimentación*, 4, 68-74.

Olagnero, G., Marcenado J., & Irei, V. (2007). Alimentos Funcionales: compuestos de naturaleza lipídica. *DIAETA*, 25 (120), 31-42.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (2003). Dieta, nutrición y prevención de Enfermedades Crónicas. ISBN 92 4 320916 7. *Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO*. [En Línea] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42755/1/WHO_TRS_916_spa.pdf

Palma Parodi, C., Barrionuevo, S., & Corradetti, M. A. (2015). Calidad de leche y queso de cabra. Evaluación de rendimiento quesero. Tesis para la obtención del grado de Licenciado en Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA).

Paques, J. P., Sagis, L. M. C., van Rijn, C. J. M., & van der Linden, E. (2014). Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃. *Food Hydrocolloids*, 40, 182-188.

Paz, N. F., Armada, M., & Ramón, A. N. (2014). Queso mozzarella a partir de leche de cabra. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 80, 59-61.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Villalva, F. J., Armada, M., & Ramón, A. N. (2017a). Effect of pH at drainage on the physicochemical, textural and microstructural characteristics of mozzarella cheese from goat milk. *Food Science and Technology, Campinas*, 37 (2), 193-201.

Paz, N. F., Ibarguren, C., Cravero Bruneri, A. P., Gonçalves de Oliveira, E., Villalva, F. J., Garay, P. A., Millán, M. P., Núñez de Kairuz, M., Armada, M., & Ramón, A. N. (2017b). Vinculación tecnológica: una estrategia para agregado de valor a quesos caprinos elaborados por productores de la región NOA. Trabajo completo presentado en el XVI Congreso CYTAL, 2017.

Plat, J., & Mensink, R. P. (2005). Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *American Journal of Cardiology*, 96, 15D–22D.

Pugnaloni, L. A., Dickinson, E., Ettelaie, R., Mackie, A. R., & Wilde, P. J. (2004). Competitive adsorption of proteins and lowmolecular-weight surfactants: Computer simulation and microscopic imaging. *Advances in Colloid and Interface Science*, 107, 27-49.

Quintana López, A. V., Ruíz López, M. D., Olalla Herrera, M., & Navarro Alarcón, M. (2011). Caracterización físico-química y nutricional de leches fermentadas de

cabra. Tesis Doctoral. Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, España.

Rees, D. A. (1969). Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 24, 267–332.

Riehm, D. A., Rokke, D. J., Paul, P. G., Seung Lee, H., Vizanko, B. S., & McCormick, A. V. (2017). Dispersion of oil into water using lecithin-Tween 80 blends: The role of spontaneous emulsification. *Journal of Colloid and Interface Science*, 487, 52–59.

Rowney, M., Roupas, P., Hickey, W., & Everett, D. (1999). Factors affecting functionality of Mozzarella cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 54, 94-102.

Smith, J. R., Hindmarsh, J. P., Carr, A. J., Golding, M. D., & Reid, D. (2017). Molecular drivers of structural development in Mozzarella cheese. *Journal of Food Engineering*, 214, 257-265.

St-Gelais, D. (2002). Fromage. In C. L. Vignola (Ed.), *Science et technologie du lait: Transformation du lait* (pp. 349–407). Montréal: Presses Internationales Polytechnique.

Stock, J. (2014). Focus on lifestyle: EAS Consensus Panel Position Statement on Phytosterol-added Foods. *Atherosclerosis*, 234, 142-145.

Teegarden, D., Lyle, R. M., McCabe, G. P., McCabe, L. D., Proulx, W. R., Michon, K., Knight, A. P., Johnston, C. C., & Weaver, C. M. (1998). Dietary calcium,

protein, and phosphorus are related to bone mineral density and content in young women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (3), 749-754.

Tyagi, A., Kumar, A., Kumar Mohanty, A., Kumar Kaushik, J., Grover, S., & Kumar Batish, V. (2017). Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 733-739.

Unión Europea (2010). Diario Oficial de la Unión Europea. *Reglamento n° 376/2010. Modificación del Reglamento (CE) n° 983/2009 sobre la autorización o la denegación de autorización de determinadas declaraciones de propiedades saludables en los alimentos relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.* [En línea] Disponible en: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:111:0003:0004:ES:PDF>)

Valenzuela, B. A., & Ronco, A. M. (2004). Fitoesteroles y Fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Revista Chilena de Nutrición*, 31(1), 161-169.

CAPITULO V

ENSAYOS BIOLÓGICOS

5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

5.1 INTRODUCCIÓN

5.1.1 Generalidades

La enfermedad cardiovascular (ECV) es un gran desafío para la población mundial (Kobayashi et al., 2012). En 2008, 17,3 millones de personas murieron por enfermedades cardiovasculares, y se prevé que será la principal causa de muerte para el 2030, afectando aproximadamente 23,6 millones de individuos en todo el mundo (World Health Organization –WHO-, 2009, 2014; Ogunremi, Sanni, & Agrawal, 2015).

La hipercolesterolemia, es una elevación de los lípidos, que incluye grasas, ácidos grasos, colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos en el torrente sanguíneo; constituye la causa principal de la aterosclerosis y otras condiciones asociadas a la misma, como la enfermedad coronaria del corazón, cerebrovascular isquémica y vascular periférica (Kumar et al., 2012; Wang et al., 2010).

5.1.2 Dislipemias: Definición y clasificación

Con el nombre de dislipemias se conoce a aquellas situaciones caracterizadas principalmente por el aumento en la concentración de una, varias, o todas las fracciones lipídicas del plasma (Longo, & Navarro, 2004).

Los principales lípidos plasmáticos, como colesterol y triglicéridos, circulan en el plasma unidos a macromoléculas transportadoras denominadas lipoproteínas. Al mismo tiempo, ellas son el resultado de la combinación de lípidos con partículas proteicas llamadas apoproteínas. Según el tamaño, los

principales lípidos que transportan, el tipo de apoproteínas que contienen y otras características, las lipoproteínas se clasifican en seis grupos:

- 1) Quilomicrones: Son las de mayor tamaño, están compuestas principalmente (90-95 %) por triglicéridos de origen exógeno y contienen varias apoproteínas (A y C son las más abundantes). Su función primordial es el transporte de los triglicéridos y el colesterol ingerido con los alimentos, desde el intestino hacia el hígado y los tejidos periféricos (adiposo, muscular).
- 2) VLDL (Very Low Density Lipoproteins): Son de menor tamaño, contienen algo menos de triglicéridos (50-65 %), los que además son de origen endógeno, y algo más de colesterol y sus apoproteínas principales son las del grupo C (I, II y III) y la B 100. Su función es transportar los triglicéridos que sintetiza el hígado hacia la periferia.
- 3) LDL (Low Density Lipoproteins): Tienen un tamaño mucho menor que las anteriores, su componente lipídico mayor (35-45 %) es el colesterol esterificado y su única apoproteína es la B 100. Son las responsables de la mayor cantidad del transporte del colesterol del hígado a los tejidos.
- 4) HDL (High Density Lipoproteins): Son las más pequeñas, ricas en fosfolípidos y colesterol, contienen apoproteínas del grupo A (I y II) y funcionan como vehículos principales del transporte del colesterol de los tejidos al hígado).

Por lo dicho anteriormente, se entiende que las dos primeras sean lipoproteínas ricas en triglicéridos y las dos últimas, ricas en colesterol.

Durante el metabolismo normal de estas lipoproteínas se originan otras dos macromoléculas transportadoras, son las remanentes:

- 5) Q: Originadas después que ha tenido lugar la degradación catabólica de los Quilomicrones.
- 6) IDL: Originadas después que ha tenido lugar la degradación catabólica de las VLDL (Longo, & Navarro, 2004).

5.1.3 Índice aterogénico (IA)

Hasta hace 30 años, el Dr. William Castelli refirió que la relación entre el CT y HDL era capaz de actuar como predictora de riesgo coronario (Castelli, 1984; Castelli et al., 1986), por lo que se construyó un índice denominado “de Castelli”, para posteriormente llamarse “aterogénico”. Al principio se sugirió como valor límite la cifra de 4,5; teniendo que si o sí establecer medidas de prevención mayores y/o la indicación de tratamiento hipolipemiente cuando el valor fuese mayor (Siniawski et al., 2010), ya que estaría directamente asociado con el aumento en el riesgo de padecer una ECV. Asimismo, otros autores recomiendan que, dado el aumento de los niveles de colesterol en la población mundial, el valor límite del IA debería revisarse y proponen una cifra estimada de 3,25 (Siniawski et al., 2011).

5.1.4 Ensayos biológicos en animales

Ferreira-Santos et al. (2017), estudiaron el efecto de un hidrolizado de caseína de leche suplementado con fitoesteroles en 24 ratas SHR machos de 13 semanas de edad, naturalmente hipertensas pero con hipercolesterolemia inducida por una dieta estándar, suplementada con 1 % de colesterol y 0,25 %

de ácido cólico. Luego de 2 semanas de adaptación, se dividieron en cuatro grupos alimentadas de la siguiente manera (n = 6):

Grupo C: SHR control + dieta estándar

Grupo CH: SHR hipercolesterolémicas

Grupo CHL: SHR hipercolesterolémicas + hidrolizado de caseína (300 mg/kg/día)

Grupo CHLP: SHR hipercolesterolémicas + hidrolizado de caseína (300 mg/kg/día) + fitoesteroles (450 mg/kg/día)

Luego de 8 semanas de tratamiento, el grupo CH presentó un aumento drástico de los niveles plasmáticos de CT y LDL, una ligera disminución de HDL, sin cambios significativos en los TG, lo que demostró que el modelo hiperlipidémico se estableció con éxito. Por otro lado, aunque la administración de caseína hidrolizada no tuvo ningún efecto en la prevención de alteraciones relacionadas con el estado hipercolesterolémico (Grupo CHL), la adición de fitoesteroles dio como resultado una recuperación significativa de los niveles de CT y LDL (Grupo CHLP).

En general se observó que, si bien en ratas hipercolesterolémicas hipertensas el tratamiento con hidrolizado de caseína mejoró los parámetros relacionados con el proceso hipertensivo, la incorporación de fitoesteroles previno otras alteraciones relacionadas a estas patologías, principalmente el estrés oxidativo y el perfil lipídico alterado, por lo que su administración estaría indicada cuando ambos trastornos se producen juntos.

Por otro lado, Athithan, & Srikumar (2017) evaluaron el efecto de la ingesta oral de esteroides vegetales [fitoantasteroide ketoisoforma 28-Homocastasterona (28-HC)], sobre los niveles de glucosa en sangre y lípidos plasmáticos en ratas Wistar machos normales y diabéticas, por un período de 15 días. Los animales se dividieron en los siguientes grupos (n = 6):

Grupo I: Control (0,1 ml de etanol al 50%)

Grupo II: Control + 28-Homocastasterona (50 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo III: Control + 28-Homocastasterona (100 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo IV: Control + 28-Homocastasterona (150 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo V: Control diabético (0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo VI: Diabético + 28-Homocastasterone (50 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo VII: Diabético + 28-Homocastasterone (100 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

Grupo VIII: Diabético + 28-Homocastasterone (150 µg en 0,1 ml de etanol al 50 %)

La administración de 28-Homocastasterona resultó en una reducción del nivel circulante de glucosa en sangre en ambos grupos: en el control se redujo de 92 a 65 mg/dl, dentro del rango permitido (50-135 mg/dl), siendo el valor normal 72 mg/dl; en los animales diabéticos varió en 34-54 % (para el uso de 50-150 µg 28-HC, respectivamente), observándose una reducción doble de la glucemia debido a este compuesto.

El valor de CT en el grupo I fue de 77 mg/dl, siendo lo normal de 76,8 mg/dl. Para el resto del control (II, III, y IV), la administración de 28-HC (50-150 µg) produjo una reducción, al igual que con el diabético (VI, VII y VIII) cuya disminución varió entre el 33-62 %. El grupo V (control diabético), en cambio, registró un aumento del 24 % en el nivel de colesterolemia.

Los niveles de TG fueron, en el grupo control 98 mg/dl, y en el diabético significativamente elevado en un rango de entre el 132-228 %. La administración de 28-HC (50-150 µg) redujo su nivel a valores porcentuales de entre el 31-44 % en el control (grupo II, III y IV) y 59-88 % en el diabético (VI, VII y VIII).

De esta manera, queda demostrada la potencia biológica de este producto natural (fitoesteroide 28-HC), atenuando los niveles elevados de Glucosa, CT y TG en sangre.

Aunque los efectos beneficiosos de los fitoesteroles en la salud cardiovascular se han informado en diferentes estudios (Misawa et al., 2008; Chien et al., 2010; Liang et al., 2011; Marineli et al., 2012; Ferreira-Santos et al., 2017; Athithan, & Srikumar, 2017), no se han investigado la administración conjunta de éste compuesto bioactivo en una matriz como la del queso mozzarella a base de leche de cabra.

5.2 OBJETIVOS

Evaluar el efecto del queso mozzarella a base de leche de cabra, adicionado con fitoesteroles, sobre el perfil lipídico en ratas Wistar albinas, con Dislipemia inducida.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Materiales

Se utilizaron 20 ratas Wistar albinas hembras de 4 semanas de edad, con un peso promedio inicial de $100,91 \pm 9,15$ g, libres de patógenos específicos, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata (U.N.L.P.).

Para la elaboración de los Quesos Mozzarella a base de leche de cabra se utilizaron los materiales descritos en el Capítulo III, página 78, y el compuesto bioactivo denominado Advasterol Éster 97-99 % (A.O.M.S.A.) mencionado en el Capítulo IV, página 122. Los productos se obtuvieron de acuerdo al Ensayo F98Inyec, desarrollado en el Capítulo IV.

El pellet consumido por los animales durante las dos primeras semanas de adaptación consistió en Alimento Balanceado Completo Gepsa Feeds, obtenido de la empresa Grupo Pilar S. A. (Buenos Aires, Argentina).

Por último, para la elaboración de las dietas normales e hipergrasa, se utilizó:

- Caseinato de calcio 100% puro, Grado USP, Pura Química®, Grupo Todo Droga (Córdoba, Argentina).
- Grasa. Aceite de girasol comercial Natura® (100 ml: 100 g de grasas totales, de las cuales 10 g saturadas, 0 g trans, 22,30 g monoinsaturadas, 60 g poliinsaturadas, 0 mg colesterol), AGD (Buenos Aires, Argentina) para las dietas normales, y grasa bovina comestible refinada La Cordobesa® (100 g: 100 g de grasas totales,

de las cuales 51 g saturadas, 6 g trans, 37 g monoinsaturadas, 6 g poliinsaturadas, 80 mg colesterol), RDC (Córdoba, Argentina) para las hipergrasa.

- Almidón. Fécula de maíz Maizena®, adquirida en locales comerciales.
- Fructosa. Alimento a base de jarabe de maíz de alta fructosa y dextrina, sabor caramelo, de Alimentos Natalí®, obtenido de dietéticas locales.
- Minerales. Mineral Mix AIN 93 M, marca MP Biomedicals™, de ETC Internacional S. A. (Buenos Aires, Argentina).
- Vitaminas. Vitamin Mix, marca MP Biomedicals™, de ETC Internacional S. A. (Buenos Aires, Argentina).

5.3.2 Métodos

5.3.2.1 Dietas

Las dietas experimentales para el grupo control fueron preparadas teniendo en cuenta los estándares dietéticos de mantenimiento recomendados por el último reporte final del American Institute of Nutrition (AIN-93M) (American Institute of Nutrition, 1993; Reeves, Nielsen, & Fahey, 1993); en los 4 grupos restantes la dislipemia fue inducida incluyendo 25 g% de grasa bovina comestible refinada en la dieta estándar AIN-93M y la administración de agua con fructosa al 10 g%. La composición de ambas se detalla en la **Tabla 35**.

Tabla 35. Composición de las dietas estándar AIN 93 M (GI) y modificada hipergrasa (GII, GIII, GIV y GV), administradas a los animales.

| Composición (g 100 g ⁻¹) | Dieta Control AIN 93 M (GI) | Dieta hipergrasa (GII, GIII, GIV y GV) |
|--------------------------------------|-----------------------------|--|
| Caseinato | 12,80 | 12,80 |
| Grasa | 9,70* | 25,00** |
| Almidón | 77,50 | 67,20 |
| Mineral Mix AIN 93 M | 3,50 | 3,50 |
| Vitamin Mix | 1,00 | 1,00 |
| L-cistyne | 1,80 | 1,80 |
| Choline Bitartrate | 2,50 | 2,50 |
| T-butyl- hydroquinone | 0,008 | 0,008 |

*Aceite de girasol **Grasa bovina

La composición de las dietas suplementadas con queso mozzarella a base de leche de cabra, sin fitoesteroles (GIII) y con el compuesto bioactivo en dos concentraciones [3,33 (GIV) y 6,66 (GV) g%], administradas durante el período de tratamiento (Semanas 11-20), se detallan en la **Tabla 36**.

De acuerdo a las diferentes composiciones químicas de los quesos, primero se procuró aportar la cantidad suficiente para cubrir las necesidades de grasa, que para las muestras F98InyecPatrón, F98Inyec3 y F98Inyec6, se logró con una porción de 45,47; 39,06 y 34,23 g de queso, respectivamente. Finalmente, el requerimiento del resto de los nutrientes se alcanzó agregando caseína, almidón, minerales y vitaminas según sea necesario.

Tabla 36. Composición de las dietas suplementadas con quesos mozzarella a base de leche de cabra, sin fitoesteroles (F98InyecPatrón), y con el compuesto al 3,33 g% (F98Inyec3) y al 6,66 g% (F98Inyec6).

| Composición (g 100 g ⁻¹) | Muestras de quesos mozzarella | | |
|--------------------------------------|---|---|--|
| | F98InyecPatrón (45,47 g) | F98Inyec3 (39,06 g) | F98Inyec6 (34,23 g) |
| Proteína (queso/caseinato) | 13,26 [*] / 0,00 ^{**} | 11,62 [*] / 1,18 ^{**} | 9,47 [*] / 3,33 ^{**} |
| Grasa (queso/grasa) | 9,70 / 0,00 | 9,70 / 0,00 | 9,70 / 0,00 |
| H de C (queso/almidón) | 0,00 / 77,04 | 0,00 / 77,50 | 0,00 / 77,50 |
| Min. (queso/minerales) | 0,98 / 2,52 | 0,89 / 2,61 | 0,74 / 2,76 |
| Vit. (queso/vitaminas) | 0,00 / 1,00 | 0,00 / 1,00 | 0,00 / 1,00 |

*Nutrientes aportados por el queso. **Nutrientes para completar el requerimiento nutricional según AIN 93 M.

5.3.2.2 Diseño experimental

Los animales fueron mantenidos según la guía establecida por la National Research Council: Guide for the care and use of Laboratory Animals (2011), en el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud – U.N.Sa., en forma individual en jaulas higiénicas de 30 x 40 x 30 cm, de policarbonato. Se mantuvieron a una humedad de 60 ± 10 %, con circulación de aire libre a temperatura ambiente (24 ± 2 °C), y un ciclo de 12 horas luz (artificial de 8 am a 8 pm) y 12 horas de oscuridad.

Previo al inicio del ensayo, los animales tuvieron un periodo de aclimatación durante las Semanas 0-2, en el que se les proporcionó alimento (pellet según recomendación AIN 93 M) y agua potable *ad libitum*. Se los dividió aleatoriamente en 5 grupos experimentales. Durante las Semanas 2-11, se

administró una alimentación normal (AIN 93 M) al GI y en los GII, III, IV y V, se indujo la hipercolesterolemia mediante una dieta hipergrasa. Finalmente, en las Semanas 11-20, los GI y II fueron alimentados con dieta normal, mientras que los demás recibieron como alimento, queso mozzarella a base de leche de cabra sin fitoesteroles (GIII), y con el compuesto bioactivo al 3,33 (GIV) y 6,66 (GV) g%. Esta división aleatoria de los grupos, se resume en la **Tabla 37**.

Tabla 37. Distribución por grupos de los animales de experimentación ($n = 4$).

| Grupo (G) | Dieta | Dieta | Dieta |
|---------------------|--------------------------|----------------------------------|--|
| | Semana 0-2 (Tiempo 0) | Semana 2-11 (Pre-Tratamiento) | Semana 11-20 (Post-Tratamiento) |
| GI (Control) | AIN 93 M | AIN 93 M | AIN 93 M |
| GII | AIN 93 M | Modificada hipergrasa | AIN 93 M |
| GIII | AIN 93 M | Modificada hipergrasa | Queso mozzarella sin fitoesteroles* |
| GIV | AIN 93 M | Modificada hipergrasa | Queso mozzarella con fitoesteroles al 3,33 g%* |
| GV | AIN 93 M | Modificada hipergrasa | Queso mozzarella con fitoesteroles al 6,66 g%* |

* F98InyecPatrón: sin el compuesto bioactivo. / F98Inyec3 y F98Inyec6: fitoesteroles al 3,33 y 6,66 g%, los cuales aportarían en el producto final, el 50 y 100 % de la recomendación diaria, respectivamente (FDA, 2003).

5.3.2.3 Análisis bioquímicos

Las extracciones de sangre para la toma de muestras se realizaron la Semana 2 previo al inicio del ensayo (Tiempo 0), la Semana 11 luego de la administración de la dieta hipergrasa (Pre-Tratamiento), y la semana 20 cuando se finalizó con la administración del compuesto bioactivo a evaluar (Post-Tratamiento).

Se midieron las concentraciones de Glucemia (G), Colesterol Total (CT), Lipoproteínas de Alta Densidad (HDL), Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y Triglicéridos (TG). Las determinaciones se realizaron mediante un analizador automático A-15 de ©Biosystems S. A. (Buenos Aires, Argentina), por técnicas enzimáticas, con controles de calidad externos en el Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC) de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, mediante el ProgBA sobre la preparación de muestras y esquemas de control externos. Con los datos de CT y HDL, se calculó el Índice Aterogénico (IA), de acuerdo a la siguiente fórmula (Olmez et al., 2015; Ferreira-Santos et al., 2017):

$$IA = \frac{CT - HDL}{HDL}$$

Por otro lado, las variaciones en el peso corporal de cada animal fueron controladas semanalmente, mediante una balanza electrónica Kern EG/EW (precisión: 0,01 g).

5.3.2.4 Consideraciones éticas

Todos los procedimientos (estabulación, manipulación, toma de muestra, anestesia y eutanasia) se realizaron de acuerdo con las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y los principios éticos de la experimentación animal del National Research Council: Guide for the care and use of Laboratory Animals (2011). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud (Resolución –CD- N° 286/18), de la Universidad Nacional de Salta.

5.3.2.5 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm desvío estándar de las mediciones replicadas. Para encontrar diferencias significativas entre las mediciones, las mismas fueron procesadas mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y Prueba de Duncan para determinar el nivel de significación entre ellas ($P < 0,05$), utilizando Microsoft de Excel StatPro™.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Dietas

En todo momento, la ingesta de alimentos por parte de los animales fue suficiente para permitir un continuo crecimiento, que se evidenció tanto en el aumento de tamaño como de peso. Los mismos aceptaron positivamente la dieta AIN 93 M (**Figura 26**) brindada durante el período de Pre-Tratamiento, la cual consistió en un polvo blanco de consistencia ligera en la normal y un poco apelmazada, aunque igualmente suelta, en la hipergrasa. Así mismo, en el Post-Tratamiento, la suplementación con queso mozzarella a base de leche de cabra patrón y con el compuesto bioactivo, fue igualmente bien recibida.

El consumo diario de alimento por animal fue de 7,27 g/día para todos los grupos en las dos primeras semanas de aclimatación; para el período de Pre y Post-Tratamiento, ascendió alrededor de 13,33 g/día para GI y 18,33 g/día para GII, GIII, GIV y GV; por lo que podría decirse que la dieta alta en contenido graso provocó un aumento de la ingesta, con respecto al grupo control.

Figura 26. Ingesta de dieta AIN 93 M de los animales.



5.4.2 Diseño experimental

Durante el período experimental, se observó que los animales se adaptaron al ambiente y sus jaulas sin inconvenientes, respondiendo adecuadamente al tratamiento; no ocurrieron muertes durante el transcurso de dicho estudio; tampoco evidenciaron ningún cambio corporal y/o conductual que implique la posible presencia de enfermedad.

5.4.3 Análisis bioquímicos

Para la toma de muestras, en cada momento de análisis, las ratas fueron privadas de alimentos durante la noche anterior y mantenidas únicamente con agua *ad libitum*. Para realizar las extracciones de sangre, los animales fueron previamente anestesiados mediante vapor de isoflurano (algodón empapado con 0,5 ml) en una cámara individual de vidrio. Una vez dormidas, se realizó un corte de entre 1-2 mm del extremo de la cola, en un ángulo de 45°. Las muestras se obtuvieron por goteo, y fueron recepcionadas en tubos eppendorf estériles, conteniendo en sus paredes heparina como anticoagulante. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, para separar el suero de los elementos formes.

Finalmente, se mantuvieron a temperatura de refrigeración (4 ± 1 °C) hasta el momento de su análisis bioquímico. Los controles realizados a los animales luego de la extracción, incluyeron mantener presionada la cola hasta la detención del sangrado, recuperación inmediata de su total vitalidad (respiración, recuperación de la movilidad, desplazamiento dentro de la jaula) y comportamiento en el corto período (consumo de agua y alimento, y acicalamiento).

Los resultados de los análisis de Glucemia de los animales, se muestran en la **Tabla 38**.

Tabla 38. Valores de Glucemia (mg/dl) en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| GI | 140,33 \pm 1,13 ^{a,A} | 145,33 \pm 3,66 ^{a,B} | 141,33 \pm 1,61 ^{a,C} |
| GII | 131,50 \pm 0,75 ^{c,B} | 215,50 \pm 1,53 ^{a,A} | 165,00 \pm 1,55 ^{b,A-B} |
| GIII | 135,50 \pm 1,89 ^{c,A} | 216,50 \pm 1,47 ^{a,A} | 165,25 \pm 1,60 ^{b,A} |
| GIV | 129,67 \pm 1,66 ^{c,B} | 217,33 \pm 2,04 ^{a,A} | 157,67 \pm 1,59 ^{b,B} |
| GV | 135,00 \pm 2,88 ^{b,A-B} | 216,67 \pm 2,45 ^{a,A} | 157,33 \pm 3,79 ^{b,B} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Para el Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento, en el GI no se observaron diferencias significativas, esto se debería a que recibió el mismo tipo de dieta durante todo el tiempo de ensayo. Para el resto de los grupos, se observaron grandes diferencias entre la segunda determinación (Pre-Tratamiento), en la cual se registraron los valores más altos de glucemia. Luego

del tratamiento, si bien las cifras bajan de manera significativa, no vuelven a los valores iniciales de la primera toma de muestra.

Entre los grupos, para el Tiempo 0, los valores tuvieron un valor mínimo de 129,67 y máximo de 140,33 mg/dl, siendo significativamente diferentes, lo cual podría deberse a variaciones individuales en los animales. Para la determinación realizada en el Pre-Tratamiento, se observaron valores altos de glucemia en GII, GIII, GIV y GV, por lo que si hubo diferencias significativas respecto al control (GI). Lo mismo podría deberse a que este último se hidrató todo el tiempo sólo con agua, mientras que el resto recibió una solución con fructosa al 10 g%.

Los valores, para todos los grupos en el Tiempo 0, son superiores a los de Athithan, & Srikumar (2017) para ratas Wistar albinas machos, cuyo grupo control, sin patología y sin tratamiento, registró una cantidad promedio de 92 ± 6 mg/dl de glucosa en sangre; al mismo tiempo, fueron cercanos a las de las diabéticas que recibieron medicación (150 μ g de fitoesteroide 28-Homocastasterone en 0,1 ml de etanol al 50 %) (150 ± 14 mg/dl). Por otro lado, los valores de todos los grupos a lo largo del ensayo, resultaron inferiores a las cifras informadas para las diabéticas sin tratamiento, cuya cantidad ascendía a los 330 ± 16 mg/dl. Esto podría deberse a que los autores, indujeron esta patología en sus animales, con la inyección intraperitoneal de 60 mg/kg de estreptozocina (STZ), una sustancia química de origen natural, particularmente tóxica para las células beta del páncreas, productoras de insulina.

Los resultados de los análisis de CT de las ratas Wistar, se muestran en la **Tabla 39**.

Tabla 39. Valores de CT en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| GI | 79,33 ± 6,80 ^{a,A} | 88,33 ± 8,40 ^{a,A} | 96,67 ± 9,00 ^{a,A} |
| GII | 74,50 ± 8,80 ^{a,A} | 97,50 ± 8,60 ^{a,A} | 92,50 ± 9,90 ^{a,A} |
| GIII | 74,00 ± 8,90 ^{a,A} | 99,50 ± 8,60 ^{a,A} | 77,75 ± 7,10 ^{a,A} |
| GIV | 79,00 ± 9,10 ^{a,A} | 97,67 ± 9,90 ^{a,A} | 71,00 ± 7,00 ^{a,A} |
| GV | 76,67 ± 9,66 ^{a,A} | 98,33 ± 5,13 ^{a,A} | 70,67 ± 2,08 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Para el CT, no se observaron diferencias significativas dentro del mismo grupo durante el transcurso de la experimentación, aunque tampoco para el mismo tiempo entre ellos. Sin embargo, en el Tiempo 0 pueden verse datos cercanos para todos los grupos; en el Pre-Tratamiento la cifra más baja se registra para GI (control), teniendo el resto de los grupos valores más altos y similares; y en el Post-Tratamiento, las cifras de GIII, GIV y GV bajan considerablemente respecto al grupo que no recibió queso mozzarella como alimento, siendo 70,67 mg/dl la cifra más baja registrada, correspondiente a los animales que fueron suplementados con fitoesteroles al 6,66 g%.

Teniendo en cuenta el ensayo de Athithan, & Srikumar (2017), los datos para todos los grupos en el Tiempo 0, son similares al control (77 ± 8 mg/dl); y los del Pre-Tratamiento con dieta hipergrasa (GII, GIII, GIV y GV) cercanos a los de las diabéticas sin medicación (95 ± 10 mg/dl). Al final del ensayo (Post-Tratamiento), las cifras de GI y GII también son similares a las del grupo diabético

sin medicación (95 ± 10 mg/dl), sin embargo, las que recibieron queso mozzarella a base de leche de cabra, tuvieron valores próximos al control (77 ± 8 mg/dl).

Ferreira-Santos et al. (2017), determinaron 95,5 mg/dl de CT en el grupo SHR hipercolesterolémico, cuya alimentación estuvo suplementada con hidrolizado de caseína (300 mg/kg/día) y fitoesteroles (450 mg/kg/día); los mismos son próximos al de GI y GII. Por su parte, GIII, GIV y GV, quienes recibieron queso mozzarella a base de leche de cabra sin fitoesteroles, y con el compuesto bioactivo al 3,33 y 6,66 g%, respectivamente, presentan cifras más bajas, inclusive que su grupo control (84,5 mg/dl), en el cual no se indujo la colesterolemia alta. Esto podría deberse a que, además del beneficio aportado por el componente funcional, los lácteos caprinos en general poseen glóbulos grasos pequeños y se encuentran mejor distribuidos en la matriz, lo que resulta en una digestión más eficiente a nivel gastrointestinal (Paz et al., 2014; Paz et al., 2017), por lo que su consumo es recomendado en una amplia gama de trastornos clínicos, debido a su capacidad metabólica única para proporcionar energía directa, no dando lugar a la formación de lipoproteínas y/o a su depósito en los tejidos adiposos (Haenlein, 2004).

Los resultados de los análisis de la fracción HDL de los animales, se muestran en la **Tabla 40**.

Tabla 40. Valores de HDL en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| GI | 33,67 ± 4,80 ^{a,A} | 33,00 ± 4,20 ^{a,A} | 33,00 ± 3,00 ^{a,A} |
| GII | 34,50 ± 4,60 ^{a,A} | 42,00 ± 3,90 ^{a,A} | 30,50 ± 2,90 ^{a,A} |
| GIII | 26,75 ± 4,40 ^{a,A} | 42,75 ± 4,20 ^{a,A} | 28,00 ± 3,00 ^{a,A} |
| GIV | 36,67 ± 2,70 ^{a,A} | 41,00 ± 5,00 ^{a,A} | 27,33 ± 2,50 ^{a,A} |
| GV | 31,33 ± 7,64 ^{a,A} | 40,66 ± 4,58 ^{a,A} | 27,67 ± 3,06 ^{a,A} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Para HDL, no se observaron diferencias significativas para cada uno de los grupos a lo largo del ensayo, y tampoco para el mismo tiempo entre los ellos. Sin embargo, dentro de GI, pueden verse valores muy próximos en las tres determinaciones, debido a que siempre recibió el mismo tipo de alimentación; por el contrario, para el resto se evidencia un aumento de HDL durante el período de Pre-Tratamiento, seguida de su disminución hacia el final (Post-Tratamiento), con una media máxima de 33,00 mg/dl en el grupo control (GI) y mínima de 27,33 y 27,67 para GIV y GV, los cuales recibieron como alimento (semana 11-20) queso mozzarella a base de leche de cabra con fitoesteroles al 3,33 y 6,66 g%, respectivamente.

Algo similar les ocurrió a Ferreira-Santos et al. (2017), cuyo grupo control (sin hipercolesterolemia y sin administración de fitoesteroles) registra un promedio de $38,0 \pm 3,7$ mg/dl de HDL; mientras que el hipercolesterolémico, cuya alimentación estuvo suplementada con 300 mg/kg/día de hidrolizado de caseína

y 450 mg/kg/día de fitoesteroles, obtuvo una media de $32,1 \pm 1,5$ mg/dl de HDL.

Los resultados de los análisis de LDL de los animales, se muestran en la

Tabla 41.

Tabla 41. Valores de LDL en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| GI | 43,33 \pm 2,50 ^{a,A} | 55,33 \pm 4,40 ^{a,A} | 62,67 \pm 6,10 ^{a,A} |
| GII | 37,50 \pm 4,30 ^{b,A} | 55,00 \pm 5,00 ^{a-b,A} | 61,50 \pm 7,00 ^{a,A} |
| GIII | 44,50 \pm 4,60 ^{a,A} | 54,75 \pm 4,20 ^{a,A} | 49,00 \pm 4,20 ^{a,A} |
| GIV | 39,33 \pm 6,50 ^{a,A} | 56,33 \pm 4,90 ^{a,A} | 42,67 \pm 4,60 ^{a,A-B} |
| GV | 42,67 \pm 9,35 ^{a,A} | 56,67 \pm 2,52 ^{a,A} | 41,67 \pm 2,08 ^{a,B} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

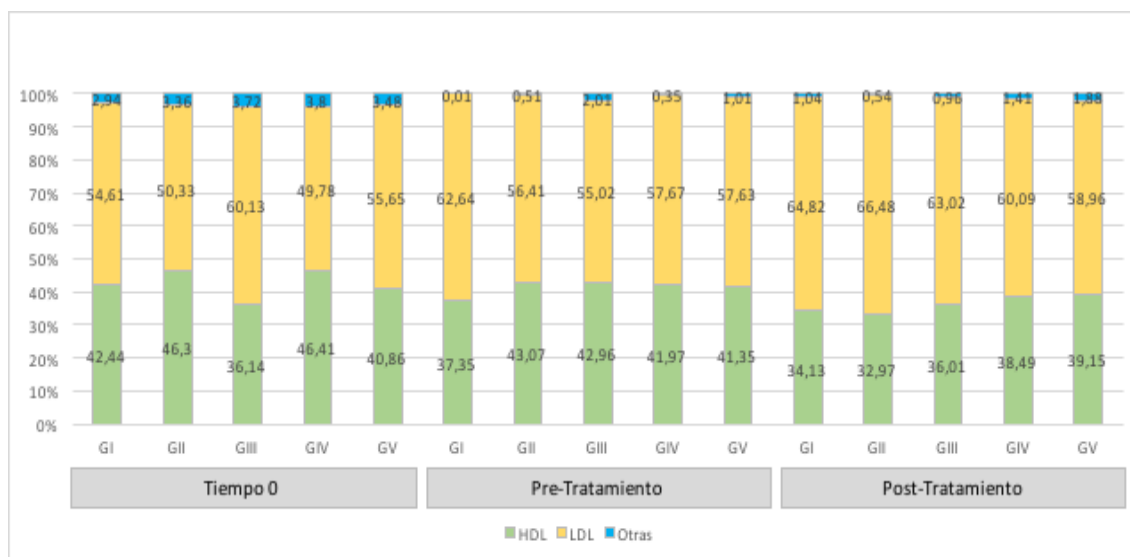
Para la fracción LDL, no se observaron diferencias significativas dentro del mismo grupo durante todo el tiempo de ensayo. Sin embargo, en el período de Post-Tratamiento, luego de la administración de queso mozzarella a base de leche de cabra suplementado con fitoesteroles al 3,33 y 6,66 g%, se observaron cifras significativamente más bajas para sus correspondientes grupos: GIV y GV, respectivamente.

De acuerdo a lo reportado por Ferreira-Santos et al. (2017), los datos a Tiempo 0, serían próximos a su grupo control ($36,5 \pm 5,2$ mg/dl de LDL), lo que es esperable ya que los animales fueron siempre alimentados con dieta normal; al mismo tiempo, los datos de GIV y GV resultaron muy similares al grupo

suplementado con 300 mg/kg/día de hidrolizado de caseína y 450 mg/kg/día de fitoesteroles, el cual registró una media de $42,6 \pm 7,4$ mg/dl de LDL.

Cabe destacar que los datos de HDL y LDL registrados a lo largo del ensayo, fueron informados teniendo en cuenta las cifras absolutas, por lo que resulta importante considerar ambas fracciones en términos relativos (porcentajes) con respecto al CT, tal como se observa en la **Figura 27**.

Figura 27. Fracciones de HDL, LDL y otras lipoproteínas, respecto al CT, para los GI, GII, GIII, GIV y GV, según Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.



Para HDL, puede verse cómo en GI va cambiando de 42 (Pre-Tratamiento) a 34 % (Pos-Tratamiento), a pesar de no haber consumido una dieta hipergrasa; en GII de 46 a 33 %, partiendo de un valor inicial (Tiempo 0) más alto, podría decirse que ésta reducción resulta más marcada que en el grupo anterior, debido a que además de que se le suministró más grasa en las semanas 2-11, no recibió el alimento bajo estudio de la 11-20; en GIII, alimentado con queso mozzarella a base de leche de cabra, se observó un restablecimiento de

su cifra hacia el final del ensayo (36 %); y GIV y GV registran cantidades relativas muy próximas en los tres tiempos determinados, por lo que teniendo en cuenta lo sucedido con el grupo control (GI), podría afirmarse que la suplementación con fitoesteroles ayudó al mantenimiento de los valores de HDL, a pesar de los cambios sucedidos en la alimentación a lo largo del período de experimentación.

Los resultados de los análisis de TG de los animales, se muestran en la

Tabla 42.

Tabla 42. Valores de TG en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| GI | 86,33 ± 9,80 ^{a,A} | 84,50 ± 6,70 ^{a,B} | 80,33 ± 1,10 ^{a,B} |
| GII | 84,00 ± 1,29 ^{a,A} | 103,67 ± 8,60 ^{a,A} | 107,50 ± 9,00 ^{a,A} |
| GIII | 86,80 ± 1,12 ^{a,A} | 108,25 ± 7,60 ^{a,A} | 89,00 ± 9,40 ^{a,A-B} |
| GIV | 86,67 ± 1,08 ^{b,A} | 109,33 ± 1,25 ^{a,A} | 80,00 ± 6,10 ^{b,B} |
| GV | 82,33 ± 4,19 ^{b,A} | 108,33 ± 4,98 ^{a,A} | 65,00 ± 4,58 ^{b,B} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Respecto a los TG, no se observaron diferencias significativas dentro del mismo grupo durante todo el tiempo de experimentación para GI, GII y GIII, aunque si para GIV y GV. Estos últimos, tuvieron valores altos de TG luego de la administración de la dieta hipergrasa, por lo que hubo diferencias significativas entre el Pre-Tratamiento y los otros dos períodos cuyas cifras fueron más bajas.

Por otro lado, para el Tiempo 0 no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos, ya que hasta ese momento, todos los animales recibían el mismo tipo de dieta. Por el contrario, si las hubo para el período de Pre-Tratamiento, en el que se observó que GI registró valores significativamente inferiores a los del resto; esto podría deberse al consumo de sólo agua como fuente de hidratación durante toda la experimentación, diferente a GII, GIII, GIV y GV que recibieron solución de fructosa al 10 g%. Hacia el final del ensayo (Post-Tratamiento), los valores más bajos de TG estuvieron entre GI que tuvo una dieta normal, y GIV y GV que, si bien fueron alimentadas con dieta hipergrasa, se les proporcionó queso mozzarella con fitoesteroles al 3,33 y 6,66 g%, respectivamente; los mismos tuvieron diferencias significativas respecto a GII y GIII, cuyas cifras fueron más altas, debido posiblemente a que, si bien recibieron una alimentación alta en grasa durante la semana 2-11, no se les administró el compuesto bioactivo.

Los valores de todos los grupos a Tiempo 0, son inferiores a los del grupo control (sin diabetes y sin medicación) de Athithan, & Srikumar (2017), cuya cifra promedio fue de 98 ± 6 mg/dl. Sin embargo, durante el Pre-Tratamiento, si bien GII, GIII, GIV y GV aumentan esta fracción lipídica en sangre, no lo hacen tanto como en el grupo diabético (sin medicación) estudiado por dichos autores (228 ± 12 mg/dl); y para el período de Post-Tratamiento, GIV y GV tienen valores próximos, aunque inferiores, a los grupos diabéticos con medicación: 94 ± 14 mg/dl (50 μ g de fitoesteroide 28-Homocastasterone en 0,1 ml de etanol al 50 %) y 74 ± 10 mg/dl (100 μ g de fitoesteroide 28-Homocastasterone en 0,1 ml de etanol al 50 %), respectivamente.

Los resultados obtenidos en la ecuación de IA, se muestran en la **Tabla 43**.

Tabla 43. Valores de IA en los diferentes Grupos de animales, registrados en los períodos de Tiempo 0, Pre-Tratamiento y Post-Tratamiento.

| Grupos | Tiempo 0 | Pre-Tratamiento | Post-Tratamiento |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GI | 1,35 ± 0,02 ^{c,B} | 1,67 ± 0,03 ^{b,A} | 1,92 ± 0,03 ^{a,B} |
| GII | 1,15 ± 0,03 ^{c,C} | 1,32 ± 0,02 ^{b,B} | 2,03 ± 0,02 ^{a,A} |
| GIII | 1,76 ± 0,03 ^{a,A} | 1,32 ± 0,03 ^{b,B} | 1,77 ± 0,02 ^{a,C} |
| GIV | 1,15 ± 0,02 ^{c,C} | 1,38 ± 0,05 ^{b,B} | 1,59 ± 0,03 ^{a,D} |
| GV | 1,44 ± 0,03 ^{a,B} | 1,41 ± 0,03 ^{a,B} | 1,55 ± 0,03 ^{a,D} |

Letras minúsculas diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$). Letras mayúsculas diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tal como se observa, mientras que GIII y GV presentaron un restablecimiento y mantenimiento del IA, respectivamente; en GI, GII y GIV, se observó un aumento hacia el final (Post-Tratamiento).

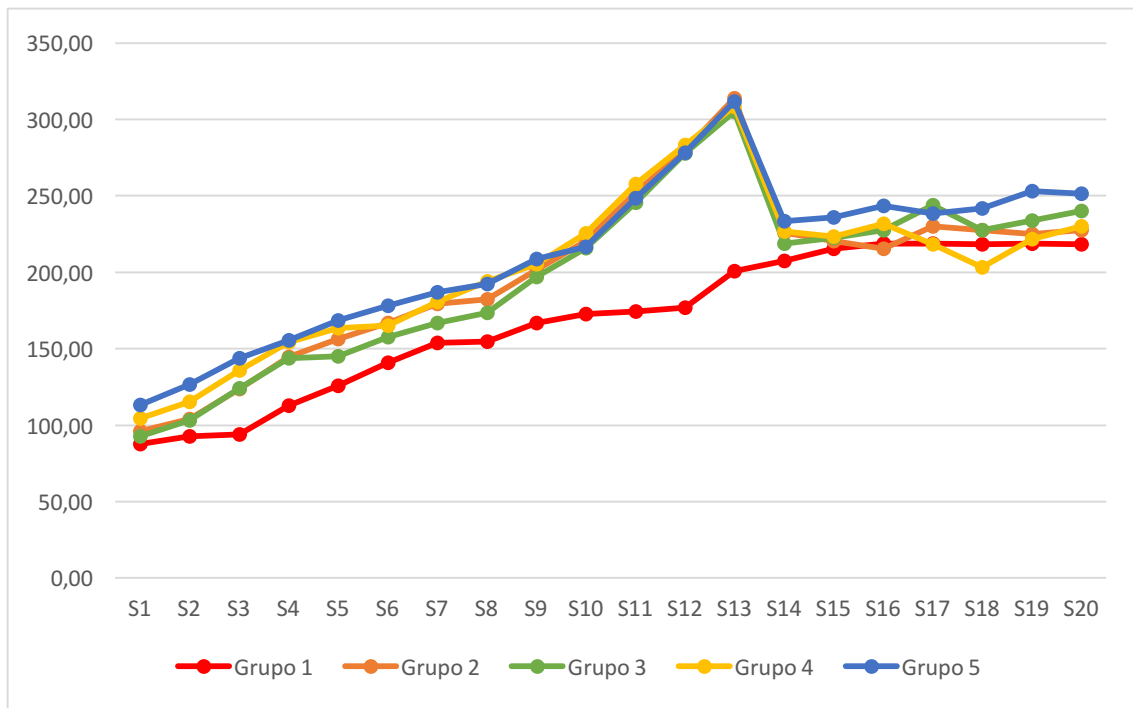
Por otro lado, a Tiempo 0 se detectaron diferencias significativas entre todos los grupos, lo que podría deberse a variaciones individuales previo al inicio del ensayo. Sin embargo, hacia el final del mismo, los valores más altos se observaron en los grupos control sin hipercolesterolemia y sin tratamiento (GI) y el hipercolesterolémico sin tratamiento (GII); cifras medianas para el alimentado con queso mozzarella a base de leche de cabra sin fitoesteroles (GIII), y los índices más bajos para los suplementados con el alimento y el compuesto bioactivo bajo estudio (GIV y GV). La mejora de esta cifra en los últimos tres grupos, estaría favorecida tanto por las propiedades de la leche de cabra como

materia prima, como así también por el agregado de esteroides vegetales. A la vez, resulta destacable que ninguno de los índices supera el valor límite de 4,5 indicado por Castelli (1984); ni por otros autores más estrictos que propusieron una cifra estimada de 3,25 (Siniawski et al., 2011; Zubiaga Toro et al., 2016), por lo que podría afirmarse que los animales no tuvieron riesgo de padecer una enfermedad coronaria durante el tiempo de investigación.

En general, los valores en el Tiempo 0 y Pre-Tratamiento, son similares a los de Ferreira-Santos et al. (2017), quienes informaron $1,3 \pm 0,3$ para su grupo control (sin hipercolesterolemia); ninguno de los grupos del presente estudio, alcanzó cifras tan altas como las de los autores: $4,3 \pm 0,4$ (hipercolesterolémicas sin tratamiento) y $4,5 \pm 0,7$ (hipercolesterolémicas alimentadas con 300 mg/kg/día de hidrolizado de caseína); y para el período de Post-Tratamiento, GI y GII presentan un índice próximo: $2,0 \pm 0,2$ para las hipercolesterolémicas suplementadas con 300 mg/kg/día de hidrolizado de caseína y 450 mg/kg/día de fitoesteroides, por su parte GIII, GIV y GV, resultaron inferiores. Los autores concluyeron que, aunque la administración oral de hidrolizado de caseína no tuvo ningún efecto en la prevención de alteraciones relacionadas con el estado hipercolesterolémico, la adición de fitoesteroides dio como resultado una recuperación significativa de los niveles de CT, LDL e IA.

Por último, las variaciones semanales en el peso corporal de cada grupo, se muestran en la **Figura 28**.

Figura 28. Promedio del registro de peso corporal de los animales, por grupo (GI, GII, GIII, GIV y GV), según semana.



Para GI, GII, GIII, GIV y GV, el promedio de peso corporal inicial fue de $87,8 \pm 4,20^d$; $96,25 \pm 9,02^c$; $92,9 \pm 5,35^c$; $104,32 \pm 4,72^b$ y $113,33 \pm 6,25^a$; y el final de $218,33 \pm 8,02^d$; $227,50 \pm 7,46^c$; $240,00 \pm 4,25^b$; $230,00 \pm 7,55^c$ y $251,66 \pm 6,60^a$; respectivamente, por lo que podría decirse que las diferencias significativas observadas hacia el final, están en concordancia con las registradas al inicio. El aumento de peso de todos los grupos, desde el inicio y hasta el final del ensayo, fue de entre 130-150 g, similar al de Hadrich et al. (2016) para ratas Wistar machos alimentadas con dieta hipergrasa: de $145,40 \pm 9,20$ a $290,68 \pm 10,05$ g, es decir un incremento total de 145,28 g.

El promedio del aumento semanal de peso para GI, GII, GIII, GIV y GV fue de $6,60^d$; $8,67^b$; $9,33^a$; $8,48^c$ y $8,50^c$, respectivamente. En los GII, GIII, GIV y

GV, existe un notable ascenso hacia la semana 13, debido posiblemente a la ingesta de la dieta hipergrasa, situación que no se evidencia en el control (GI), cuyo promedio es el más bajo y estable durante todo el tiempo de experimentación. Luego, en el período de Post-Tratamiento, en el cual los animales vuelven a una alimentación normograsa, puede verse como el peso vuelve a parámetros muy parecidos a los de GI. Por lo mencionado, podría decirse que la dieta alta en contenido graso provocó un aumento del peso corporal, con respecto al grupo control.

5.5 CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente capítulo, se arribaron a las siguientes conclusiones:

- El comportamiento de los animales fue normal durante todo el experimento.
- Las variaciones en la Glucemia estarían atribuidas principalmente al suministro de fructosa.
- La dieta hipergrasa afecta de manera desfavorable las distintas fracciones lipoproteicas; sin embargo, su perfil mejora considerablemente conforme aumenta la suplementación con fitoesteroles.
- La mejora general del perfil lipídico en sangre, redundando en valores bajos de IA y, por lo tanto, en la menor probabilidad de desarrollar una enfermedad coronaria en los animales.

5.6 REFERENCIAS

ANMAT (2014). Código Alimentario Argentino. *Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias. Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional*. [En línea] Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/codigo/caa1.htm>

Athithan, V., & Srikumar, K. (2017). 28-Homocastasterone down regulates blood glucose, cholesterol, triglycerides, SREBP1c and activates LxR expression in normal & diabetic male rat. *Chemico-Biological Interactions*, 277, 8-20.

Castelli W. P., Garrison, J. R., Wilson, P. W., Abbott, R. D., Kalousdian, S., & Kannel, W.B. (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 256 (20), 2835-2838.

Castelli, W. P. (1984). Epidemiology of Coronary Heart Disease: The Framingham Study. *The American Journal of Medicine*, 76 (2A), 4-12.

Chien, Y. L., Wu, L. Y., Lee, T. C., & Hwang, L. S. (2010). Cholesterol-lowering effect of phytosterol-containing lactic-fermented milk powder in hamsters. *Food Chemistry*, 119, 1121-1126.

Ferreira-Santos, P., Carrón, R., Recio, I., Sevilla, M. A., & Montero, M. J. (2017). Effects of milk casein hydrolyzate supplemented with phytosterols on hypertension and lipid profile in hypercholesterolemic hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 28, 168–176.

Foods and Drogas Administration (FDA) (2003). GRAS status of Phytosterols at a Level Necessary to Justify the Proposed Health Claim. Appendix A. [En línea] Disponible en: <https://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0316/06p-0316->

cp00001-02-Appendix-A-vol1.pdf

Hadrich, F., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I., Isoda, H., Feve, B., & Sayadi, S. (2016). Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-Biological Interactions*, 252, 54-60.

Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155-163.

Kobayashi, M., Hirahata, R., Egusa, S., & Fukuda, M. (2012). Hypocholesterolemic effects of lactic acid-fermented soymilk on rats fed a high cholesterol diet. *Nutrients*, 4, 1304-1316.

Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S., & Yadav, H. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 902-917.

Liang, Y. T., Wong, W. T., Guan, L., Tian, X. Y., Ma, K. Y., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2011). Effect of phytosterols and their oxidation products on lipoprotein profiles and vascular function in hamster fed a high cholesterol diet. *Atherosclerosis*, 219, 124-133.

Longo, E. N., & Navarro, E. T. (2004). *Técnica Dietoterápica*. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.

Marineli, R., S., Castro Marques, A., Busch Furlan, C. P., & Maróstica, M. R. (2012). Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. *Food Research International*, 49, 487-493.

Misawa, E., Tanaka, M., Nomaguchi, K., Yamada, M., Toida, T., Takase, M., Iwatsuki, K., & Kawada, T. (2008). Administration of phytosterols isolated from Aloe vera gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Obesity Research & Clinical Practice*, 2, 239-245.

National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington, DC: National Academy of Sciences; 2011.

Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Hypolipidaemic and antioxidant effects of functional cereal-mix produced with probiotic yeast in rats fed high cholesterol diet. *Journal of Functional Foods*, 17, 742–748.

Olmez, E., Vural, K., Gok, S., Ozturk, Z., Kayalar, H., Ayhan, S., & Var, A. (2015). Olive leaf extract improves the atherogenic lipid profile in rats fed a high cholesterol diet. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1652–1657.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Nuñez de Kairuz, M. S., & Ramón, A. N. (2014). Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. *Food Science and Technology*, 34 (3), 629-635.

Paz, N. F., Gonçalves de Oliveira, E., Villalva, F. J., Armada, M., & Ramón, A. N. (2017). Effect of pH at drainage on the physicochemical, textural and microstructural characteristics of mozzarella cheese from goat milk. *Food Science and Technology, Campinas*, 37 (2), 193-201.

Reeves, P., Nielsen, F., & Fahey, G. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, 123, 1939-1951.

Siniawski, D., Masson, W., Bluro, I., Sorroche, P., Scordo, W., Krauss, J., & Cagide, A. (2010). Niveles plasmáticos de apolipoproteínas en una población saludable de la Argentina: Implicaciones en prevención cardiovascular. *Revista Argentina de Cardiología*, 78, 123-128.

Siniawski, D., Masson, W., Sorroche, P., Casañas, L., Krauss, J., & Cagide, A. (2011). Correlación entre las razones apolipoproteína B/apolipoproteína A1 y colesterol total/ colesterol-HDL en una población saludable: ¿debería actualizarse el índice de Castelli?. *Revista Argentina de Cardiología*, 79, 1-6.

Wang, Y. M., Zhang, B., Xue, Y., Li, Z. J., Wang, J. F., Xue, C. H., & Yanagita, T. (2010). The mechanism of dietary cholesterol effects on lipids metabolism in rats. *Lipids in Health and Disease*, 9, 4.

World Health Organization (WHO) (2009). Cardiovascular disease. Fact sheet no. 317, WHO, Geneva, Switzerland.

World Health Organization (WHO) (2014). Global Health Observatory. Raised cholesterol. [En línea] Disponible en: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/cholesterol_text/en/

Zubiaga Toro, L., Ruiz-Tovar, J., Giner, L., González, J., Aguilar, M. M., García, A., Calpena, R., & Durán, M. (2016). Valoración del riesgo cardiovascular después de gastrectomía vertical: comparativa del IMC, la adiposidad, el índice de Framingham y el índice aterogénico como marcadores del éxito de la cirugía. *Nutrición Hospitalaria*, 33 (4), 832-837.

*PROYECTO DE
VINCULACIÓN
TECNOLÓGICA*

VINCULACIÓN TECNOLÓGICA: UNA ESTRATEGIA PARA AGREGADO DE VALOR A QUESOS CAPRINOS ELABORADOS POR PRODUCTORES DE LA REGIÓN NOA

Paz^{2,5}, Noelia F.; Iburguren^{1,2}, Carolina; CraveroBruneri^{2,5}, Andrea P.; Goncalvez de Oliveira^{1,2,5}, Enzo; Villalva^{1,2,5}, Fernando J.; Garay^{2,5}, Pablo A.; Millán^{2,5}, Mónica; Núñez de Kairuz³, Marta; Armada^{1,3}, Margarita; Ramón,^{1,2,5}Adriana N.

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Química INQUI-CONICET;

²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta; ³Facultad de

Ingeniería-Universidad Nacional de Salta. Argentina.⁴Centro de Referencias

para Lactobacilos CERELA-CONICET, SM de Tucumán; ⁵ Consejo de

Investigaciones, UNSa. Argentina. e-mail: cibar@unsa.edu.ar

RESUMEN

En nuestro país, la Mozzarella tradicional se elabora con leche de vaca. Su obtención a partir de leche de cabra se plantea como una alternativa para las economías regionales del NOA, en donde la explotación lechera caprina tiene gran importancia. Con el fin de implementar el proceso de obtención de la mozzarella a partir de leche de cabra, se realizaron actividades de capacitación y estandarización de la elaboración en pequeñas plantas queseras de la región NOA, y posteriormente se evaluaron los productos obtenidos. Se llevaron a cabo visitas de entrenamiento en tres plantas productoras, adecuando el proceso a las instalaciones y equipamiento disponibles en cada establecimiento. Durante cada elaboración, se analizó el efecto de variables (pH, composición de leche de cabra, tiempos, temperaturas) sobre la producción y rendimiento quesero. Al final

de cada capacitación, se indagó a los participantes sobre la experiencia llevada a cabo y la factibilidad para su implementación. Además se realizó el control de calidad de la materia prima y los productos finales, mediante análisis físico-químicos (pH, humedad, lactosa, proteínas, grasas, cenizas totales, calcio, fósforo, sodio, textura y color) y microbiológicos (Recuento de Coliformes y *Staphylococcus aureus*, investigación de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*). También, se determinó el rendimiento quesero (RQ = kg de queso/litros de leche x 100). En cada establecimiento visitado se labraron actas para registrar la actividad. El proceso optimizado fue entregado a cada productor y todo el personal capacitado se interiorizó en el mismo, así como en la utilización de nuevos ingredientes de uso industrial (cultivos starter y enzima quimosina): registrando concentraciones, tiempos, temperaturas y pH óptimo para la elaboración. Con respecto a la materia prima, se observó en todos los casos ausencia de actividad de fosfatasa alcalina en la leche pasteurizada y, tanto los análisis físico-químicos como los microbiológicos tuvieron valores de acuerdo a la legislación argentina (Código Alimentario Argentino-CAA). Para los quesos, se determinó que a pH 5,3 se obtenía un producto con buena calidad nutricional y sensorial, independientemente de la composición de la leche. El RQ osciló entre 9 a 11 %, similar a otros tipos de quesos caprinos. Tanto la composición química como microbiológica de los quesos cumplió con las normas vigentes (CAA). Los parámetros de dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad fueron los esperados para este tipo de producto de pasta hilada, mientras que la masticabilidad fue algo mayor. Con respecto al color, los valores resultaron acordes a la materia prima utilizada, reflejando productos más blancos y luminosos. La actividad de capacitación fue positiva, con gran interés por parte

de los participantes, manifestando la factibilidad de incorporar la elaboración de este producto en sus establecimientos. Durante la degustación, los comentarios con respecto al sabor y la textura fueron adecuados. La implementación y el desarrollo de queso mozzarella, en pequeñas plantas elaboradoras de lácteos, permitiría mejorar la producción, agregar valor y ofrecer alternativas para dinamizar las economías regionales.

Palabras clave: leche de cabra, queso mozzarella, NOA, vinculación tecnológica.

1. Introducción

El queso Mozzarella, es una variedad de queso hilado, originalmente de Italia, y elaborado con leche de búfala. Se caracteriza por su estructura y consistencia plástica debida al estiramiento termo-mecánico al que se somete la cuajada durante su procesamiento, lo que origina una alineación paralela de fibras de caseínas, entrelazadas con canales de grasa y suero (Vogt et al, 2015).

En nuestro país, la Mozzarella tradicional se elabora con leche de vaca (Paz et al, 2017). Su obtención a partir de leche de cabra se plantea como una alternativa para las economías regionales del NOA, en donde la explotación lechera caprina tiene gran importancia.

Con el fin de implementar el proceso de obtención de la Mozzarella a partir de leche de cabra, se realizaron actividades de capacitación y estandarización de la elaboración en pequeñas plantas queseras de la región NOA, y posteriormente se evaluaron los productos obtenidos.

2. Materiales y métodos

Se implementó el proceso de elaboración de quesos Mozzarella a partir de leche de cabra, en las siguientes plantas elaboradoras: Finca Santa Anita (**Figura 1**), Coronel Moldes, Salta (en dos momentos); Escuela de Lácteos Artesanales Los Hacedores de Quesos, Provincia de Santiago del Estero junto a la Asociación Grupos Unidos del Sur, Graneros, sobre el camino vecinal La Esperanza, La Madrid, Tucumán; y Finca La Huella, Vaqueros, Salta. Se relevaron instalaciones y equipamiento a fin de prever necesidades en función de los parámetros tecnológicos para implementación del proceso.

Figura 1. Implementación del proceso de elaboración de Queso Mozzarella a base de leche de cabra, en Finca Santa Anita.



2.1 Elaboración de queso Mozzarella en plantas productoras

Se realizó el proceso de elaboración de queso a través de clases demostrativas, transfiriendo conocimientos y permitiendo la participación activa de los productores.

Durante la elaboración, se analizaron los efectos de variables (pH, composición de leche de cabra, tiempos, temperaturas) sobre la producción y RQ. Al final de cada capacitación, se indagó a los participantes sobre la experiencia llevada a cabo y la factibilidad para su implementación.

El proceso se realizó a partir de leches pasteurizadas. Se adicionó CaCl_2 al 0,02 %, bacterias lácticas liofilizadas de inoculación directa: *Streptococcus thermophilus* (ST-M7 ®) y *Lactobacillus helveticus subsp. bulgaricus* (LB-12 ®) con una relación coco:bacilo 1,0:1,5, que corresponden a una concentración de 0,010:0,015 %, a 37 °C por 30 minutos, y enzima coagulante CHY-MAX™, quimosina 100% pura (Chr. Hansen, Argentina) al 0,003 %, a 43 °C por 30 minutos (Paz et al, 2017).

Se lizó la cuajada, se desueró parcialmente y se midió pH. Cuando este llegó a 5,3 se procedió al amasado e hilado de la cuajada en agua caliente (**Figura 2**), hasta obtener una pasta elástica y fibrosa que se sumergió en salmuera fría al 20 % (Paz et al, 2017). En la planta de la Finca Santa Anita se envasó al vacío, en las otras se dispusieron sobre estantes refrigerados. Se valoró vida útil y almacenamiento por parámetros sensoriales.

Figura 2. Clase demostrativa del procedimiento de amasado e hilado de la cuajada en agua caliente.



2.2 Control físico-químico de leche pasteurizada y queso mozzarella

En las muestras de leche de cabra, se determinó fosfatasa alcalina (Kit enzimático), pH (peachímetro digital HI8424 Hanna Instruments), Acidez Dornic (por titulación) y prueba de azul de metileno (AOAC, 1996). Se tomaron muestras de leche de los diferentes establecimientos, que fueron transportadas al laboratorio de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Salud y se determinó humedad gravimétricamente por desecación en estufa; lactosa por diferencia $[100 - (\text{humedad} + \text{proteína} + \text{grasas} + \text{cenizas})]$; proteínas con técnica de formaldehído (Egan, Kirk & Sawyer, 1991); grasas: Gerber, cenizas totales por calcinación en mufla; calcio y sodio por Espectrofotometría de Absorción Atómica y fósforo por Espectrofotometría de Absorción Molecular (AOAC, 1996).

Las muestras de queso de las plantas elaboradoras fueron trasladadas al Laboratorio de Alimentos y se determinó pH, humedad; lactosa, grasas; cenizas totales; calcio, sodio, fósforo por métodos descriptos anteriormente; proteínas por Kjeldahl (AOAC, 1996); textura con Texturómetro QTS (Brookfield), las muestras refrigeradas se cortaron con moldes cilíndricos de 20 mm de diámetro, utilizando una célula de carga 500N con un émbolo plano a una velocidad de 30 mm min⁻¹, compresión al 50% y los datos se recolectaron a través del software Pro v2.0 (Pons and Fiszman, 1996) y color por colorímetro de Reflectancia ColorTec PCM (Precision Microsensor Inc., Pittsford, EUA), se utilizó escala de color CIE Lab (L*, a*, b*) con un iluminante D65 (luz diurna estándar) y un ángulo de medición de 10°, según Comisión Internationale de l'Eclairage.

2.3 Control microbiológico de leche pasteurizada y queso mozzarella

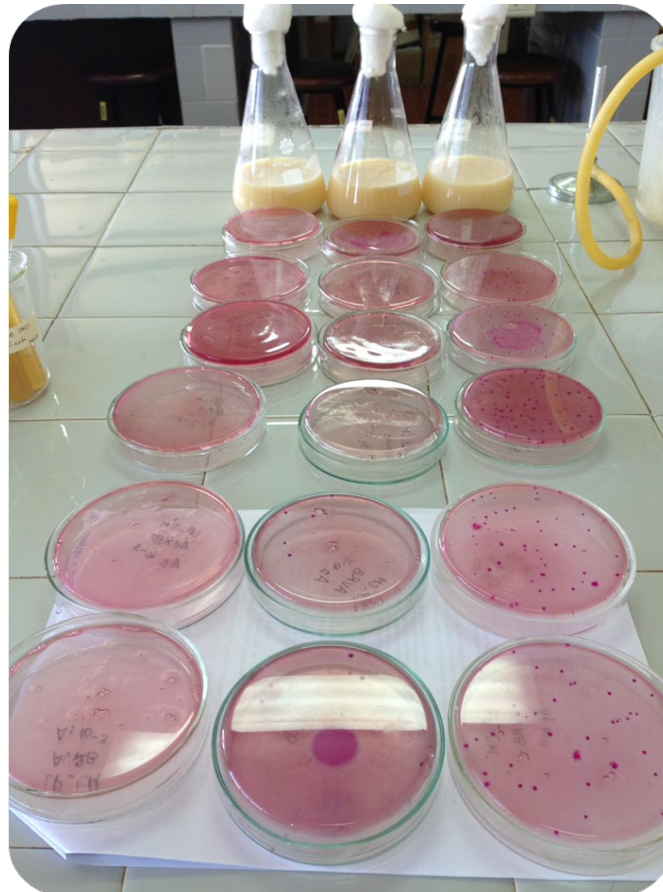
Los análisis de microbiología se realizaron de acuerdo al criterio microbiológico y normativas establecidas para leche entera pasteurizada (ANMAT, 2015, CAA-Capítulo VII-Art. 558) y queso mozzarella (Res GMC Mercosur N° 78/96).

Para el control de leche pasteurizada se realizaron Recuento de Aerobios Mesófilos Totales (Agar recuento en placa), Recuento de Coliformes Totales (Agar Bilis Rojo Violeta Lactosa, con confirmación en Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis 2%), e investigación de *Escherichia coli* (Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis 2%, agar EMB y confirmación mediante pruebas bioquímicas (Gram, Oxidasa, IMVyC)).

En el caso del queso mozzarella, el control microbiológico consistió en el recuento de Coliformes Totales (Norma FIL 73A:1985), recuento de Coliformes

Fecales (Norma APHA 1992 c.24), recuento de *Estafilococos coagulasa* positivos (Norma FIL 145:1990), investigación de *Salmonella* spp. (FIL 93A:1985) e investigación de *Listeria monocytogenes* (FIL 143:1990) (**Figura 3**).

Figura 3. Control microbiológico a las muestras de Queso Mozzarella a base de leche de cabra.



2.4 Rendimiento quesero

El rendimiento quesero de los productos obtenidos (**Figura 4**), se calculó según la siguiente formula

$$RQ = (\text{Kg de queso} / \text{Lts de leche}) \times 100$$

Figura 4. Productos finales.



3. Resultados y discusión

Los integrantes del proyecto, en cada visita de entrenamiento en las plantas productoras, transfirieron conocimientos, habilidades y destrezas en función a la demanda de los productores, capacidad de las instalaciones y equipamiento disponibles en los establecimientos.

En cada uno de los establecimientos visitado se labraron actas para registrar las actividades. Participaron productores de la planta y de parajes cercanos.

3.1 Elaboración de queso Mozzarella en plantas productoras

La elaboración de queso Mozzarella fue factible en todos los establecimientos.

El proceso optimizado fue entregado a cada productor y todo el personal capacitado se interiorizó en el mismo, así como en la utilización de nuevos ingredientes de uso industrial (cultivos starter y enzima quimosina): registrando concentraciones, tiempos, temperaturas y pH óptimo para la elaboración.

Se determinó que en todas las muestras de queso Mozzarella, a pH 5,3 se obtenía un producto con buena calidad nutricional y sensorial, independientemente de la composición de la leche.

Cabe destacar que los productores no utilizan en su producción fermentos liofilizados, por lo que se los entrenó en su pesaje, conservación y utilización, demostrando cada productor la habilidad y destreza adquirida.

3.2 Control físico-químico de leche pasteurizada y queso Mozzarella

Con respecto a la materia prima, se observó en todos los casos ausencia de actividad de fosfatasa alcalina, lo que determinó un buen tratamiento de pasteurización; no se observó decoloración de azul de metileno por más de 5 horas y en donde el pH y acidez Dornic correspondieron a leche fresca.

Los análisis físico-químicos de leche de cabra tuvieron valores de acuerdo a la legislación argentina, se presentan en la **Tabla 1** (ANMAT, CAA, 2015).

Tabla 1. Características físico-químicas de leche de cabra.

| Parámetros/Plantas | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| pH | 6,77 ± 0,01 ^a | 6,69 ± 0,01 ^a | 6,72 ± 0,01 ^a | 6,70 ± 0,01 ^a |
| Ac Titulable (°D) | 11,88 ± 0,00 ^a | 11,23 ± 0,02 ^a | 12,03 ± 0,02 ^a | 13,25 ± 0,21 ^b |
| Proteínas (g 100 g ⁻¹) | 3,25 ± 0,03 ^c | 3,40 ± 0,00 ^b | 3,51 ± 0,02 ^b | 3,67 ± 0,01 ^a |
| Grasas (g 100 g ⁻¹) | 4,00 ± 0,00 ^a | 2,95 ± 0,04 ^b | 2,45 ± 0,04 ^b | 4,81 ± 0,02 ^a |
| Lactosa (g 100 g ⁻¹) | 2,85 ± 0,10 ^b | 4,14 ± 0,22 ^a | 4,33 ± 0,09 ^a | 2,46 ± 0,09 ^b |
| Sól Tot. (g 100 g ⁻¹) | 11,09 ± 0,20 ^a | 11,35 ± 0,22 ^a | 11,20 ± 0,01 ^a | 11,90 ± 0,11 ^a |
| Cenizas (g 100 g ⁻¹) | 0,98 ± 0,01 | 0,84 ± 0,01 | 0,92 ± 0,00 | 0,95 ± 0,00 |
| Calcio (mg 100 g ⁻¹) | 163 ± 4,03 ^b | 168 ± 2,25 ^b | 172 ± 1,66 ^b | 216 ± 8,37 ^a |
| Sodio (mg 100 g ⁻¹) | 136 ± 1,65 ^a | 133 ± 3,39 ^a | 125 ± 1,13 ^a | 130 ± 2,84 ^a |
| Fósforo (mg 100 g ⁻¹) | 149 ± 1,56 ^c | 156 ± 1,28 ^c | 196 ± 1,13 ^b | 214 ± 2,83 ^a |

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La composición física-química de los quesos cumplió con las normas vigentes (**Tabla 2**) (ANMAT, CAA, 2015).

Todas las muestras correspondieron a quesos de alta humedad, así mismos al pasar el contenido de grasa a base seca (39,27; 37,99; 42,22 y 52,18 g 100 g⁻¹, para los quesos de los establecimientos 1, 2 3 y 4 respectivamente) se observó que todas las muestras superaron el mínimo requerido por ley para este tipo de producto (35,0 g 100 g⁻¹) (ANMAT, CAA, 2015).

Tabla 2. Características físico-químicas de queso mozzarella de cabra.

| Parámetros | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Proteína (g 100 g⁻¹) | 26,58 ± 0,12 ^a | 26,74 ± 0,10 ^a | 26,35 ± 0,10 ^a | 21,66 ± 0,16 ^b |
| Grasas (g 100 g⁻¹) | 20,16 ± 0,23 ^c | 19,90 ± 0,31 ^d | 22,58 ± 0,11 ^b | 28,75 ± 0,20 ^a |
| Lactosa (g 100 g⁻¹) | 1,62 ± 0,11 ^{ab} | 2,47 ± 0,19 ^a | 1,80 ± 0,22 ^{ab} | 2,20 ± 0,00 ^{ab} |
| Sól Tot. (g 100 g⁻¹) | 51,33 ± 0,12 ^c | 52,38 ± 0,31 ^b | 53,47 ± 0,12 ^b | 55,09 ± 0,03 ^a |
| Cenizas (g 100 g⁻¹) | 2,92 ± 0,08 ^a | 3,25 ± 0,03 ^a | 2,73 ± 0,00 ^b | 2,48 ± 0,00 ^c |
| Calcio (mg 100 g⁻¹) | 801 ± 1,25 ^d | 824 ± 4,18 ^c | 921 ± 3,93 ^a | 858 ± 4,13 ^b |
| Sodio (mg 100 g⁻¹) | 568 ± 4,95 ^b | 566 ± 11,74 ^b | 630 ± 7,71 | 560 ^b ± 9,50 ^a |
| Fósforo (mg 100 g⁻¹) | 588 ± 3,03 ^b | 609 ± 3,02 ^b | 702 ± 4,91 ^a | 628 ± 7,89 ^b |

Promedio ± desvío estándar. Letras diferentes, en la misma fila, indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En las muestras, se determinó que el contenido de calcio fue mayor que el de fósforo, con una relación Ca:P mayor a 1, lo cual se debe al control de la acidez de la materia prima y al agregado de cloruro de calcio. Es importante para la salud mantener esta relación, para evitar pérdida de calcio por orina y descalcificación ósea (Ramón et al, 2013).

Los parámetros de dureza, cohesividad, adhesividad y elasticidad fueron los esperados para este tipo de producto de pasta hilada, mientras que la masticabilidad fue algo mayor.

Con respecto al color, la luminosidad (L^*) fue alta, para el parámetro a^* se observaron valores mayores que en los quesos de leche de vaca, ya que los de

leche de cabra, generalmente son de color más blanco, debido a que estos animales son capaces de convertir el β -caroteno en vitamina A y también producen leche con glóbulos de grasa de menor diámetro en comparación con los de las vacas. Los valores de b^* fueron altos debido a la reacción de Maillard, que disminuyó la luminosidad debido a la producción de compuestos de pardeamiento, los resultados fueron acordes a la materia prima utilizada (**Tabla 3**).

Tabla 3. Característica de textura y color de quesos.

| Parámetros | Rango mínimo - máximo |
|----------------|-----------------------|
| <i>Textura</i> | |
| Dureza | 1045 - 1343 |
| Cohesividad | 0,65 – 0,70 |
| Adhesividad | 12- 13 |
| Elasticidad | 6,49 – 6,67 |
| Masticabilidad | 5684 – 7518 |
| <i>Color</i> | |
| L * | 77,14 – 77,70 |
| a* | 3,62 – 5,60 |
| b* | 23,61 – 24,39 |

3.3 Control microbiológico de leche pasteurizada y queso Mozzarella

El leche y quesos los análisis microbiológicos tuvieron valores de acuerdo a la legislación argentina (Código Alimentario Argentino-CAA).

3.4 Rendimiento quesero

El RQ osciló entre 9 a 11 %, similar a otros tipos de quesos caprinos, la mayor retención de calcio origina un mayor rendimiento.

4. Conclusiones

Las actividades de capacitación fueron positiva, con gran interés por parte de los participantes, manifestando la factibilidad de incorporar la elaboración de este producto en sus establecimientos. Durante la degustación, los comentarios con respecto al sabor y la textura fueron adecuados. Con respecto al color, los valores resultaron acordes a la materia prima utilizada, reflejando productos más blancos y luminosos.

La implementación y el desarrollo de queso mozzarella, en pequeñas plantas elaboradoras de lácteos, permitió mejorar la producción, agregar valor y ofrecer alternativas para dinamizar las economías regionales. Además implicó la cooperación y apoyo interinstitucional entre docentes, investigadores y personal de apoyo administrativo de las Facultades de Ciencias de la Salud, Facultad de Ingeniería e INIQUI de la Universidad Nacional de Salta, CERELA (Tucumán), Universidad Santo Tomás de Aquino (Tucumán) para que productores de localidades de Salta (Coronel Moldes, Vaqueros), Santiago del Estero y Tucumán desarrollen y optimicen el proceso de acuerdo a sus posibilidades.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Secretaría de Políticas Universitarias de Salta, Ministerio de Educación y Deportes, Presidencia de la Nación (PVT-Ernesto Sabato44-143-082), al Consejo de Investigaciones de la Universidad de Salta

(CIUNSa) (PI N°2417) y a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta. Enzo Goncalvez de Oliveira y Fernando Josué Villalva, agradecen a CONICET por su Beca Doctoral. Noelia Fernanda Paz agradece a CIUNSa por su Beca de finalización de Doctorado. Pablo Agustín Garay agradece a la SPU por su Beca.

6. Referencias

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos, y Tecnología Médica (ANMAT) (2013). *Código Alimentario Argentino*, Ministerio de Salud. Poder Ejecutivo Nacional. Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995). *Official methods of analysis*, 16th ed., 4th revision. Arlington: Association of Official Analytical Chemists Inc.

Egan H., Kirk, R., & Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods* (8th ed.). London: Longman.

Paz, NF, Gonçalves de Oliveira, E, Villalva, FJ, Armada, M and Ramón, NA. 2017. Effect of pH at drainage on the physicochemical, textural and microstructural characteristics of mozzarella cheese from goat milk. *Food Sci. Technol, Campinas*, 37(2): 193-201.

Pons, M.; & Fiszman, S.M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, 27, 597–624. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4603.1996.tb00996.x/abstract>

Ramón, A N; Paz, N F, de la Vega, S M, Quipildor, S L; Vargas Ferra, E y Armada, M. Determinación de Ca y P en quesos comerciales obtenidos de leches no tradicionales. Trabajo completo presentado en el XIV Congreso CYTAL, 2013.

Vogt, D.J., Smith, J.R., Seymour, J.D., Carr, A.J., Golding, M.D., & Codd, S.L. 2015. Assessment of the changes in the structure and component mobility of Mozzarella and Cheddar cheese during heating. *Journal of Food Engineering*, 150, 35-43. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414004464>.

CONCLUSIONES

En base a la hipótesis planteada y a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye lo siguiente:

- En general, las muestras de leche de cabra pertenecientes a tambos locales, poseen buena calidad higiénico-sanitaria y nutricional.
- Es posible obtener una mozzarella de cabra, con adecuadas características físicas, químicas, texturales, microestructurales, colorimétricas y sensoriales; al mismo tiempo, su proceso de obtención, desde el punto de vista técnico y económico, es viable de ser transferido a productores artesanales de quesos de cabra.
- El método adecuado para la incorporación de fitoesteroles al queso, es el de inyección del compuesto bioactivo a través de canales en los productos terminados; éstos, a su vez, poseen buenas propiedades nutricionales y sensoriales.
- Los fitoesteroles incorporados al queso mozzarella a base de leche de cabra, mejora el perfil lipídico en animales con hipercolesterolemia inducida, por lo que la formulación de un producto destinado a personas con ENT, es factible.

PERSPECTIVAS

FUTURAS


Las perspectivas que se abren a partir de este trabajo comprenden:

- Utilizar leche de cabra u otras leches no tradicionales, para la elaboración de diversos productos lácteos de consumo masivo, como leche en polvo, leches fermentadas, yogurths y distintas variedades de quesos.
- Formular un queso mozzarella a base de leche de cabra, adicionado con otros tipos de sustancias bioactivas (omega-3, DHA, CLA, inulina, FOS, GOS, carotenoides, flavonoides, *L. casei*).
- Evaluar la vida útil del queso mozzarella a base de leche de cabra, con adición de fitoesteroles, estudiando los posibles cambios bioquímicos que podrían experimentar en términos de oxidación y/o interacción sustancia bioactiva-alimento.
- Estudiar la aplicación de fitoesteroles en alimentos no lácteos de consumo frecuente, tales como el pan.
- Desarrollar otras metodologías de incorporación de fitoesteroles, que permitan su agregado a matrices alimentarias sólidas y líquidas, asegurando su estabilidad y adecuada concentración en productos finales.
- Microencapsular fitoesteroles con otros materiales de pared que permitan su utilización en diversas tecnologías de procesamiento de alimentos y evaluar eficiencia de encapsulación.
- Continuar profundizando en áreas de investigación referentes a la adición de compuestos con actividad biológica (probióticos, prebióticos, fitoquímicos) a diferentes matrices alimentarias, a fin de prevenir y/o ayudar al tratamiento de ENT o demás patologías asociadas a la nutrición y estilos de vida inadecuados.

ANEXOS


ANEXO I

Especificaciones de los fitoesteros esterificados (61,20 %)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------|---|---|-----------------|---|---|-------------------|----|----|-------------------|----|----|-------------------|---|----|--------------------|---|---|
|  <p>AOM ADVANCED ORGANIC MATERIALS</p> | <p>ADVASTEROL ESTER PHYTOSTEROL ESTERS SPECIFICATIONS</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Name Chemical name: Phytosterol Esters</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Description ADVASTEROL ESTER is a light yellow liquid viscous, having a slight characteristic vegetable oil aroma. It is obtained by esterification of free plant sterols with fatty acids from vegetable oil (rapeseed). AVASTEROL ESTER is a concentrated form of phytosterol esters (mainly Beta-sitosterol, Campesterol, Stigmasterol and Sitostanol).</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>General Characteristics:</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Appearance: Light yellow (liquid, above 45°C)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Creamy White (solid, ambient temperature)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Odour: Slightly vegetable oil</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Taste: Little to none</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Colour (Gardner units) (liquid): 12 max.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Acidity (rapeseed fatty acids): 0.5% max.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*Rapeseed fatty acid profile. Min(%) Max(%)</p> <table border="1" data-bbox="347 1317 730 1496"> <tbody> <tr> <td>C16 fatty acids</td> <td>4</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>C18 fatty acids</td> <td>1</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>C18:1 fatty acids</td> <td>55</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>C18:2 fatty acids</td> <td>18</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>C18:3 fatty acids</td> <td>6</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>>C18:3 fatty acids</td> <td>-</td> <td>5</td> </tr> </tbody> </table> | | C16 fatty acids | 4 | 6 | C18 fatty acids | 1 | 3 | C18:1 fatty acids | 55 | 65 | C18:2 fatty acids | 18 | 25 | C18:3 fatty acids | 6 | 12 | >C18:3 fatty acids | - | 5 |
| C16 fatty acids | 4 | 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C18 fatty acids | 1 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C18:1 fatty acids | 55 | 65 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C18:2 fatty acids | 18 | 25 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C18:3 fatty acids | 6 | 12 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| >C18:3 fatty acids | - | 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Molecular weight: (calculated for each sterol as the oleic acid ester)</p> <p>*Campesterol ester 667.11 *Stigmasterol ester 679.12 *B-Sitosterol ester 681.14</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Microbiological tests (cfu/g):</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>(EP 6.0, RD 3177/83)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>*E. Coli: None/g *Salmonella: None/10g *Lysteria Monocytogenes : None/10g *Shigella : None/10g *Clostridium Perfringens : None/g</p> | <p>*Staphylococcus Aureus : None/g *Enterobacteriaceae: max 100/g *Total Aerobic Count: max 1000/g *Yeast & Moulds: max 100/g</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ANEXO I

(Continuación)



AOM
ADVANCED
ORGANIC MATERIALS

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product: Plant Sterol Esters (ADVASTEROL ESTER)
Batch Number: 350-000150210

| Parameters | Results |
|---------------------------------|---|
| Appearance | Light yellow (liquid) Creamy white (solid) |
| Taste | Little to none |
| Odour | Slightly vegetable oil |
| Colour (Gardner Units - Liquid) | 4 - 5 |
| Total sterol Esters | 99,20% |
| Total Sterol Content | 61,20% |
| Free Sterols | 0,10% |
| Acidity | 0,26% |
| Benzo (a) pyrene | < 2 ppb |
| Microbiology test (CFU/g) | |
| E. Coli | None |
| Salmonella | None / 10 |
| Lysteria Monocytogenes | None / 10 |
| Shigella | None / 10 |
| Clostridium Perfringens | None |
| Staphylococcus Aureus | None |
| Enterobacteriaceae | < 10 |
| Total aerobic Count | < 100 |
| Yeast & Moulds | < 10 |

Manufacturing Date: January-10
Expiration Date: July-11


Storage: Store in closed packaging under close and dry conditions.

Analysis Date: February 5, 2010

Analyzed: Q.C. María J. Blanco

Approval: Q.A. Santiago Prizzon

ANEXO I
(Continuación)

| | |
|---|--|
|  <p>AOM ADVANCED ORGANIC MATERIALS</p> | <p>ADVASTEROL ESTER PHYTOSTEROL ESTERS SPECIFICATIONS</p> |
| <p>Standard Specifications:</p> | |
| *Total free sterols and sterol ester content (%) | 98 % min |
| *Total sterol ester content(%) | 97 % min |
| *Total sterols content calculated (%) | 60 % min |
| *Total free sterols content (%) | 2 % max |
| *Beta-sitosterol | < 80% |
| *Campesterol | < 40% |
| *Stigmasterol | < 30% |
| *Campestanol | <5% |
| *B-Sitostanol | <15% |
| *Brassicasterol | < 3 |
| *Other sterols | < 3% |
| <p>Ingredients: Antioxidants: mixed tocopherols derived from soya IP Ascorbyl Palmitate</p> | |
| <p>Irradiation: This product has not been irradiated.</p> | |
| <p>Viscosity (30°C) 2400 – 2700 cP</p> | |
| <p>Specific gravity 25°C 0.91 – 0.98 g/cm3</p> | |
| <p>Uses: ADVASTEROL ESTER is widely used in food preparations or supplements as LDL cholesterol reducer.</p> | |
| <p>Storage: Store under cool and dry conditions, protect from heat, light and oxygen. Store in tightly closed containers.</p> | |
| <p>Stability: The shelf life is at least 18 months from packaging date (unopened).</p> | |
| <p>Advanced Organic Materials SA Parque Industrial Pilar Calle 14, Lote 1 Pilar, Buenos Aires, 1629 Argentina TEL: 54-2322-496-456 FAX: 54-2322-496-531</p> | |
| <p><small>This technical specification contains information base on our laboratory analysis. Advanced Organic Materials SA assumes no responsibility with regards to the suitability of the products for any specific purposes intended by the user. Recommendations for the use and application of the product are given for information purposes. These suggestions do not release customers from conducting the necessary tests as suitability of the product is dependant on the characteristics of the intended process. The user of the product is solely responsible for compliance with all laws and regulations applying to the use of the product, including intellectual property rights of third parties.</small></p> | |

ANEXO II

Especificaciones de los fitoesteroles esterificados (97-99 %)

FITOESTEROLES



ADVASTEROL ESTER

Especificaciones de producto

NOMBRE

ADVASTEROL ESTER

DESCRIPCIÓN

ADVASTEROL ESTER es un líquido viscoso amarillo claro con un ligero aroma característico de los aceites vegetales. Son obtenidos por la esterificación de esteroleos vegetales con ácidos grasos también de origen vegetal. ADVASTEROL ESTER es una forma concentrada de Fitoesteroles Esteres (Beta-sitosterol, Campesterol and Stigmasterol).

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Composición

| | |
|--|-----------|
| Contenido total de esteroleos (ésteres + libres) | 97 - 99 |
| Esteroleos libres | 0.5 - 3.0 |
| Beta-Sitosterol | 34 - 50 |
| Campesterol | 17 - 30 |
| Stigmasterol | 22 - 30 |

Características

| | |
|--|-----------------|
| Viscosidad a 30° (cP)* | 2400 - 2700 |
| Peso Molecular* | 665.05 - 681.14 |
| Peso específico (25°C)* | 0.91 - 0.98 |
| Índice de Acidez (mg KOH/g)* | Max. 1.00 |
| Compuestos Orgánicos Volátiles* Cumple USP 32, Method IV | Max. 10 |

Metales Pesados

| | |
|----------------------------------|---------|
| Metales pesados como Pb (mg/kg)* | Max. 10 |
| Micotoxinas (Aflatoxina B1)* | Ausente |
| Residuos de Pesticidas (ppm)* | Max. 2 |

Análisis Microbiológicos

| | |
|---------------------------------------|----------|
| Recuento de aerobios Totales (CFU/g)* | Max. 100 |
| Hongos (CFU/g)* | Max. 25 |
| Levaduras (CFU/g)* | Max. 25 |
| Coliformes (MPN/100g)* | Max. 40 |
| Salmonella * | Ausente |
| Escherichia Coli * | Negativo |
| Staphylococcus aureus* | Negativo |

NORMAS DE ETIQUETADO

La FDA permite colocar la siguiente declaración para productos que contienen esteroleos:

“Alimentos que contienen por lo menos 0.65 gramos de esteroleos esterados por porción, ingeridos dos veces por día para un total de 1.3 gramos, como parte de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol, puede reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.”

APLICACIÓN DEL PRODUCTO

ADVASTEROL ESTER es una sustancia liposoluble que puede ser utilizada en una amplia gama de preparaciones alimenticias como reductor del colesterol LDL. Requiere de un proceso de emulsionantes cuando se adiciona a la leche o otras sustancias con alto contenido de agua.

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Se debe almacenar en envases sellados, ya que el producto es sensible a la exposición con aire, luz o altas temperaturas.

VIDA ÚTIL

La vida útil es de 18 meses desde la fecha de manufactura.

ENVASE

ADVASTEROL ESTER está disponible en envases metálicos de 18 kg y en tambores metálicos de 190 kg.

CERTIFICACIONES

ADVASTEROL ESTER es un producto con certificación Kosher.

*:Información demostrada estadísticamente, no se determina regularmente.

Responsable de Aseguramiento de Calidad
AOM S.A.

DISCLAIMER

Esta especificación técnica contiene información basada en nuestros análisis de laboratorio. Advanced Organic Materials SA no asume ninguna responsabilidad en relación a la aplicación particular de estos productos por parte del usuario final. Recomendaciones sobre la utilización del producto son a título informativo. Dichas recomendaciones no eximen al cliente de llevar a cabo las pruebas necesarias ya que la aplicabilidad del producto depende de las características de cada proceso. El usuario de estos productos es el responsable de cumplir con las leyes y regulaciones vigentes, incluyendo derechos de propiedad intelectual.

La información proporcionada representa valores típicos. Los métodos se encuentran a disposición del cliente.

ANEXO III

Especificaciones de los fitoesteroles en polvo (95 %)



ADVASTEROL 95 PHYTOSTEROLS

Nombre

Phytosterols Esteroles

derivados del aceite vegetal

Descripción Los esteroides de planta de ADVASTEROL 95 son un polvo grisáceo que tiene un aroma característico leve del aceite vegetal. ADVASTEROL 95 se deriva de los aceites vegetales y es rico en Beta-sitosterol, el estigmasterol y el campesterol junto con pequeñas cantidades de otros esteroides. Características de producto

Características de producto

Esteroides de planta totales: Mínimo el 95%

Beta-sitosterol: 35 - el 50% *

Campesterol: 18 - el 27% *

Estigmasterol: 21 - el 30% *

Brassicasterol: 0 - el 2% *

Sitostanol: 0 - el 2% *

Otros esteroides: 2 - el 3% *

* Como por ciento de esteroides totales

Peso molecular 400.69 –

aspecto 414.72 del polvo blanco

Olor: Aceite vegetal leve Densidad: 0.3 - 0.5 g/cm³

Punto de fusión 135 - 145°C

Máximo de los metales pesados 10 PPM

Solubilidad en insoluble en agua

Pautas de etiquetado :El FDA permitirá la demanda siguiente para los productos que contienen los esteroides de planta: Los “alimentos que contienen por lo menos 0.4 gramos por la porción de los esteroides de planta, comida dos veces al día con las comidas para un producto total diario por lo menos de 0.8 gramos, como parte de una dieta baja en grasa saturada y colesterol, pueden reducir el riesgo de enfermedad cardíaca.”

Uso del producto ADVASTEROL 95: se puede utilizar en una gran variedad de preparaciones de alimento como colesterol de LDL reductor. Puede también ser utilizado en los cosméticos para sus características de emulsión y estabilizadoras.

Condiciones de almacenaje: Almacén en el empaquetado cerrado bajo condiciones secas. Proteja contra calor, luz y humedad

Vida útil: La vida útil del producto está por lo menos a 48 meses a partir de la fecha de empaquetado.

Empaquetado ADVASTEROL 95: está disponible en envases de 25 kilogramos o en bolsos grandes de 400 kilogramos.

Estándares ADVASTEROL 95: tiene certificación kosher Avanzado

<http://www.aomsa.com.ar/pdf/STEROL%2090%20-%20Product%20Data%20Sheet.pdf>

ÉSTERES DEL FITOSTEROL ÉSTER DE ADVASTEROL

Nombre

Ésteres del esteroles de planta Ésteres del fitosterol

Descripción El ÉSTER de ADVASTEROL es derivado por la esterificación de los esteroides de planta con los ácidos grasos obtenidos del aceite vegetal. El ÉSTER de ADVASTEROL es un color crema a la goma amarillo claro en la temperatura ambiente. Los tocoferoles mezclados se agregan como antioxidantes naturales.

Características de producto

Esteroides de planta totales: Mínimo el 56%

Beta-sitosterol: 35 - el 50% *

Campesterol: 18 - el 27% *

Estigmasterol: 21 - el 30% *

Brassicasterol: 0 - el 2% *

Sitostanol: 0 - el 2% * Otros esteroides: 2 - el 3% *

* Como por ciento de esteroides totales

Peso molecular 665.05 - 681.14 (MW calculado como el éster del esteroles del ácido oléico) Goma aceitosa viscosa amarilla del aspecto

Olor: Aceite vegetal leve

Punto de fusión 25 - 30°C Máximo 1.0 g KOH/g del grado de acidez Máximo del valor del peróxido 2.0 mEq/Kg

Contenido en agua, máximo 0.1% del K. Fischer

Pautas de etiquetado El FDA permitirá la demanda siguiente para los productos que contienen los esteroides de planta: Los "alimentos que contienen por lo menos 0.65 gramos por la porción de los ésteres del esteroles de planta, comida dos veces al día con las comidas para un producto total diario por lo menos de 1.3 gramos, como parte de una dieta baja en grasa saturada y colesterol, pueden reducir el riesgo de enfermedad cardíaca." Uso del producto El ÉSTER de ADVASTEROL es las sustancias solubles en la grasa que se pueden utilizar en una gran variedad de alimento preparaciones como reductor del colesterol de LDL. Requiere la emulsificación cuando está agregado a la leche o a otros productos alimenticios con agua.

Los usos incluyen: aceites vegetales, margarina y extensiones, yogur, barras de bocado, ensalada las preparaciones, queso, bebidas de la salud, y fomentan más.

Condiciones de almacenaje y vida útil Almacén en el empaquetado cerrado bajo condiciones frescas y secas. Cuando están almacenados refrigerados en la vida útil de 4 a 8 °C son 6 meses.

Empaquetado El ÉSTER de ADVASTEROL está disponible en envases de 25 kilogramos o en tambores de 180 kilogramos. Estándares El ÉSTER de ADVASTEROL tiene certificación kosher Avanzado

<http://www.aomsa.com.ar/pdf/PHYTOSTEROLS%20ESTER%20-%20Product%20Data%20Sheet.pdf>

PUBLICACIONES

TRABAJOS COMPLETOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

- Paz, N. F.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Effect of pH at drainage on the physicochemical, textural and microstructural characteristics of mozzarella cheese from goat milk.*** Food Science and Technology, Campinas, 37(2), 193-201. [En Línea] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.05116>. Año 2017.

TRABAJOS COMPLETOS EN REVISTAS NACIONALES

- **Paz, N. F.;** Iburguren, C.; Cravero Bruneri, A. P.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Garay, P. A.; Millán, M. P.; Núñez de Kairúz, M. S.; Armada, M. Y Ramón, A. N. ***Vinculación tecnológica: una estrategia para agregado de valor a quesos caprinos elaborados por productores de la región NOA.*** XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL 2017. 7º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Vº Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. 3º Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias. Mar del Plata, Argentina. 18 al 20 de Septiembre de 2017.
- **Paz, N. F.;** Armada, M. y Ramón, A. N. ***Queso Mozzarella a partir de leche de cabra.*** Tecnología Láctea Latinoamericana, Año XVIII, N° 80, Pág. 59-61. Editorial Publitec S.A. Año 2014. [En Línea] Disponible en: <http://www.publitecbrasil.com/contenido/categorias/TLL80w.pdf>
- **Paz, N. F.;** Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Fitoesteroides adicionados a alimentos: una alternativa para la prevención de la hipercolesterolemia.*** Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta. Pág. 22-25. Diciembre, 2013.

RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS INTERNACIONALES

- Alcócer, J. C.; Goncalvez de Oliveira, E. Villalva, F. J.; Armada, M.; Ramón, A. N. y Paz, N. F. ***Fitoesteroles encapsulados en vesículas liposomales a partir de lecitina y su adición a un Queso Mozzarella de cabra.*** VII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. CICYTAC 2018. Córdoba, Argentina. 01 a 03 de Octubre de 2018.
- Paz, N. F.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Texture Profile Analysis (TPA) and Color in low fat mozzarella cheese, made from goat's milk, with added phytosterols.*** 17th International Congress of Dietetics. Granada, España. 7 al 10 de Septiembre de 2016.
- Paz, N. F.; Lotufo Haddad, A. M.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Acceptability and preference of low-fat mozzarella cheese, made from goat's milk, with added phytosterols.*** 17th International Congress of Dietetics. Granada, España. 7 al 10 de Septiembre de 2016.
- Paz, N. F.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Evaluation of cholesterol-lowering effect of low-fat mozzarella cheese, made from goat's milk, with added phytosterols.*** 17th International Congress of Dietetics. Granada, España. 7 al 10 de Septiembre de 2016.
- Paz, N. F.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Efecto del pH en el hilado de la mozzarella de cabra y las características químicas del producto final.*** V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC). Córdoba, 17 al 19 de Noviembre de 2014.

RESÚMENES PRESENTADOS EN CONGRESOS NACIONALES

- Alcócer, J. C.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M.; Ramón, A. N. y Paz, N. F. **Queso Mozzarella a base de leche de cabra, adicionado con fitoesteroles encapsulados en perlas de alginato de sodio, por el método de gelación iónica.** XIII Congreso Argentino de Graduados en Nutrición. Mar del Plata, Argentina. 15 a 17 de Mayo de 2018.
- Paz, N. F.; Ibarguren, C.; Cravero Bruneri, A. P.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Garay, P. A.; Millán, M. P.; Núñez de Kairúz, M. S.; Armada, M. y Ramón, A. N. **Vinculación tecnológica: una estrategia para agregado de valor a quesos caprinos elaborados por productores de la región NOA.** XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. CYTAL 2017. 7º Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Vº Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. 3º Simposio de Innovación en Industrias Alimentarias. Mar del Plata, Argentina. 18 al 20 de Septiembre de 2017.
- Paz, N. F.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Garay, P. A.; Ibarguren, C.; Cravero Bruneri, A. P.; Millán M. P.; Armada, M. y Ramón, A. N. **Optimización y desarrollo de queso mozzarella a base de leche de cabra, en pequeñas plantas elaboradoras de lácteos.** I Congreso AADyND (Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas Dietistas) de Nutrición y Alimentación. Buenos Aires, Argentina. 29 al 31 de Agosto de 2016.
- Paz, N. F.; Goncalvez de Oliveira, E.; Villalva, F. J.; Armada, M. y Ramón, A. N. **Adición de fitoesteroles a la leche semidescremada de cabra, destinada a la elaboración de queso tipo mozzarella.** I Congreso AADyND (Asociación

Argentina de Dietistas y Nutricionistas Dietistas) de Nutrición y Alimentación. Buenos Aires, Argentina. 29 al 31 de Agosto de 2016.

- **Paz, N. F.;** Armada, M. y Ramón, A. N. ***Impacto del hilado a diferentes pH, sobre la microestructura del queso mozzarella de cabra.*** XXI Congreso Argentino de Graduados en Nutrición. Por el derecho a la alimentación. Salta, Argentina. 19 al 22 de Mayo de 2015.
- **Paz, N. F.;** Jiménez, P. L.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Composición química y TPA del queso mozzarella a partir de leche de cabra, hilado a diferentes pH.*** XXI Congreso Argentino de Graduados en Nutrición. Por el derecho a la alimentación. Salta, Argentina. 19 al 22 de Mayo de 2015.
- **Paz, N. F.;** Armada, M. y Ramón, A. N. ***Composición química del queso mozzarella a partir de leche de vaca y cabra.*** XXI Congreso Argentino de Graduados en Nutrición. Por el derecho a la alimentación. Salta, 19 al 22 de Mayo de 2015.
- **Paz, N. F.;** Goncalvez de Olivera, E.; Armada, M. y Ramón, A. N. ***Efecto de la adición de fitoesteroles en los parámetros de color durante el almacenamiento de la mozzarella de cabra.*** IV Congreso de Alimentos Siglo XXI y la XXXVII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). Catamarca, 6 al 8 de Noviembre de 2014.
- **Paz, N. F.;** Armada, M. y Ramón, A. N. ***Parámetros tecnológicos críticos durante la elaboración de queso mozzarella a partir de leche de cabra.*** XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Rosario, 23 al 25 de Octubre de 2013.

- **Paz, N. F.;** Ramón, A. N. y Armada, M. ***Evolución del pH y características de textura durante la obtención de mozzarella de cabra.*** VI Jornada de la Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios - FILIAL NOA. Salta, 19 de Abril de 2013.