



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**"INCIDENCIA DE LA ESTACIÓN DEL AÑO SOBRE EL
PERFIL DE OLOR Y LA EVOLUCIÓN DE COLOR EN
LECHE ENTERA EN POLVO BAJO PRÁCTICAS
COMERCIALES DE PROCESAMIENTO Y
ALMACENAMIENTO"**

ANDREA BIOLATTO

TESIS
Nº 122

DIRECTOR: DRA. NORMA PENSEL

COORDIRECTOR: DRA. MARIA CRISTINA AÑON

A122

AÑO 2005

DONACION.....

A.....

Fecha.....

Inv. E.....Inv.....

B.....

58384

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“INCIDENCIA DE LA ESTACIÓN DEL AÑO
SOBRE EL PERFIL DE OLOR Y
LA EVOLUCIÓN DE COLOR
EN LECHE ENTERA EN POLVO
BAJO PRÁCTICAS COMERCIALES DE
PROCESAMIENTO Y ALMACENAMIENTO”**

ANDREA BIOLATTO

Director: Dra. Norma A. Pensel

Codirector: Dra. María Cristina Añon

La Plata, Buenos Aires, 2005

A mi hijo Francis.

A mi esposo, Alejandro y al segundo fruto de nuestro amor.

A mis padres Amanda y Clicerio.

A mis hermanos Betina y Carlos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer a la Dra. Norma Pensel, por haber depositado una vez más su confianza en mi y haber dirigido mi trabajo de tesis.

A la Dra. María Cristina Añon, mi codirectora, por haber sido guía durante el desarrollo de la presente investigación.

Nuevamente a la Dra. Norma Pensel, directora del Instituto de Tecnología de Alimentos y al Dr. Ricardo Rodríguez, director del Centro de Investigaciones Agropecuarias-INTA Castelar, por haber brindado los medios necesarios para el desarrollo de mi trabajo.

A la Lic. Ana Sancho por el valioso aporte de sus conocimientos en estadística, por su amistad y por haber cumplido en muchas oportunidades junto a su esposo Rubén el papel de padres de mi hijo Francis.

A la Dra. Gabriela Grigioni por el aporte de sus conocimientos en la discusión de los resultados y su invaluable dedicación en la revisión del presente escrito.

A las Dras. Adriana Descalzo y Adriana Pazos por alentarme en mis horas de desaliento y cansancio y por su colaboración en la discusión de los resultados.

Al Dr. Sergio Vaudagna por el aporte de sus conocimientos en el área de procesos industriales y al Dr. Guillermo Sánchez por su ayuda en el tema de Gestión de Calidad.

A la Dra. Claudia González, a la Lic. Silvina Guidi, a la Lic. Luciana Rosetti, a la Bioqca. Virginia Salomón, a la Ing. Cecilia Elías, a la Ing. Natalia Szerman, y a los Dres. Martín Irurueta, Darío Pighin y Gustavo Polenta, por sus palabras de aliento.

A Patricia Benedetti por su colaboración en el trabajo de laboratorio y en el armado de esta tesis.

A Ilda Avila por su siempre buena predisposición en el desarrollo de las tareas de laboratorio.

Especialmente a Virginia Salomón, Richard De Piero Belmonte, Cecilia Elías y Natalia Szerman por su invalorable ayuda en el cuidado de mi hijo Francis.

A la Estación Experimental de Rafaela-INTA, al Instituto de Tecnología de Alimentos-Universidad Nacional del Litoral, y al Laboratorio de Servicios Analíticos-Universidad Nacional del Litoral, por su contribución en el desarrollo de parte de las metodologías analíticas aplicadas en este trabajo de investigación.

A Angel y Vanina de la Secreteraria de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, quienes en todo momentos me brindaron su ayuda en la presentación de papeles.

A Gladis y Elsio, abuelos de Francis, por la dedicación a su nieto.

Con inmenso amor a mi Madre, Padre y hermanos, Betina y Carlos, quienes aún a la distancia fueron, son y serán mi contención emocional.

Muy especialmente a mi amado hijo Francis, quién estuvo privado de la dedicación de su madre.

Y último pero siempre en mi corazón, deseo expresar un profundo agradecimiento a la persona con quién comparto la vida, Alejandro, por su infinito amor, paciencia y apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....vi

ÍNDICE DE FIGURAS.....ix

RESUMEN xiii

I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS1

 I.1. MERCADO DE PRODUCTOS LÁCTEOS1

 I.1.1. Mercado Nacional de Productos Lácteos1

 I.1.2. Producción de Productos Lácteos.....1

 I.1.3. Producción y Exportación Nacional de Leche Entera en Polvo .3

 I.1.4. Producción y Exportación de Productos Lácteos de la Provincia
 de Santa Fe6

 I.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE EN POLVO .8

 I.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LECHE ENTERA EN POLVO 10

 I.4. LA CALIDAD 17

 I.4.1. Breve historia de la calidad 17

 I.4.2. Normativas de calidad 17

 I.4.3. Dimensiones de la calidad 19

 I.4.4. Calidad en la Cadena Agroalimentaria..... 21

 I.4.5. Inserción del concepto de la calidad en la Cadena Láctea 22

 I.5. IMPORTANCIA DEL COLOR EN LA CALIDAD INTEGRAL DE
 LOS ALIMENTOS 24

 I.5.1. Medición del color en los alimentos..... 25

 I.5.1.1. La iluminación..... 27

 I.5.1.2. Objeto..... 29

 I.5.1.3. Observador..... 31

 I.5.1.4. Entorno 32

 I.6. IMPORTANCIA DEL FLAVOR EN LA CALIDAD INTEGRAL DE
 LOS ALIMENTOS 32

 I.6.1. Medición del *flavor* en los alimentos 33

 I.7. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LOS CAMBIOS DE COLOR
 DE LOS ALIMENTOS 38

 I.7.1. Reacciones de amarronamiento no enzimático 38

I.7.2. Reacción de Maillard	42
I.8. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LOS CAMBIOS DE FLAVOR DE LOS ALIMENTOS	45
I.8.1. Producción microbiológica de <i>off-flavors</i>	45
I.8.2. Producción de <i>off-flavors</i> de fuentes ambientales	49
I.8.3. Producción oxidativa de <i>off-flavors</i>	50
I.8.4. Producción de <i>off-flavors</i> debido a los tratamientos por calor.....	53
I.8.5. Reacción de Maillard	55
I.8.6. Lipólisis	55
I.8.6.1. Lipólisis espontánea	57
I.8.6.2. Lipólisis inducida	57
I.8.6.3. Lipólisis microbiana.....	58
I.8.6.4. Importancia de la lipólisis en el proceso industrial.....	59
I.9. MARCO DEL TRABAJO A DESARROLLAR	61
I.10. HIPÓTESIS	61
I.11. OBJETIVOS	62
I.11.1. Objetivos Generales	62
I.11.2. Objetivos Específicos	62
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
II.1. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO.....	63
II.2. METODOLOGÍAS	65
II.2.1. Composición química	66
II.2.2. Humedad.....	66
II.2.3. Proteínas de suero no desnaturalizadas (WPNI).....	67
II.2.4. Índice de insolubilidad.....	69
II.2.5. Cobre.....	70
II.2.6. Concentración de oxígeno residual en el espacio de cabeza	71
II.2.7. Valor peróxido (VP).....	71
II.2.8. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRTBA)	73
II.2.9. Grasa Libre	74
II.2.10. Lipólisis	76
II.2.11. Perfil de ácidos grasos libre (AGL)	77
II.2.12. Hidróximetil furfural libre (HMF)	81

II.2.13. Color objetivo 82

II.2.14. Compuestos volátiles 82

II.2.15. Perfil de olor 90

II.2.16. Evaluación sensorial..... 94

II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 96

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 99

III.1. COLOR 99

III.1.1. COLOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA: SEGUIMIENTO EN LÍNEA DE ELABORACIÓN 100

III.1.2. COLOR DE LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO 117

III.1.2.1. Color de leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses 117

III.1.2.2. Color de leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses 123

III.2. FLAVOR..... 128

III.2.1. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA: SEGUIMIENTO EN LÍNEA DE ELABORACIÓN 131

III.2.1.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo recién elaborada..... 131

III.2.1.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo recién elaborada..... 136

III.2.1.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo recién elaborada..... 137

III.2.1.4. Ácido butírico en leche entera en polvo recién elaborada..... 143

III.2.2. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO 152

III.2.2.1. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO ENVASADA EN AIRE Y ALMACENADA 6 MESES..... 153

III.2.2.1.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses 153

III.2.2.1.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses 154

III.2.2.1.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses..... 156

III.2.2.1.4. Ácido butírico en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses 166

III.2.2.2. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO ENVASADA EN ATMÓSFERA DE N₂ Y ALMACENADA 12 MESES 170

III.2.2.2.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses 170

III.2.2.2.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses 171

III.2.2.2.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses 173

III.2.2.2.4. Ácido butírico en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses.... 179

IV. CONCLUSIONES..... 182

IV.1. CONCLUSIONES PARTICULARES 182

IV.1.1. COLOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA 182

IV.1.2. EVOLUCIÓN DEL COLOR EN LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO 183

IV.1.3. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA 183

IV.1.4. EVOLUCIÓN DEL FLAVOR EN LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO 184

IV.2. CONCLUSIONES GENERALES..... 184

PERSPECTIVAS DEL MERCADO LÁCTEO 186
BIBLIOGRAFÍA 190

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción nacional de los principales lácteos en miles de toneladas.....3

Tabla 2. Producción nacional de leche entera en polvo.5

Tabla 3. Exportación nacional de leche entera en polvo.....6

Tabla 4. Producción de leche en millones de litros. Provincia de Santa Fe en relación a totales nacionales – Serie 1986/2002.....7

Tabla 5. Exportaciones lácteas totales del país y la provincia de Santa Fe...8

Tabla 6. Exportaciones de leche en polvo del país y la provincia de Santa Fe.8

Tabla 7. Requerimientos de calidad para leche entera en polvo.....9

Tabla 8. Requerimientos de calidad microbiológica para leche en polvo.... 10

Tabla 9. Clasificación de leche en polvo según el tratamiento térmico aplicado durante su elaboración. 12

Tabla 10. Esquema de muestreo del seguimiento en línea de elaboración de LEP..... 64

Tabla 11. Esquema de muestreo del almacenamiento estacional de LEP..... 65

Tabla 12. Medias y desviación estándar de los valores de L^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año. 101

Tabla 13. Medias y desviación estándar de los valores de b^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 102

Tabla 14. Medias y desviación estándar de los valores de a^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 102

Tabla 15. Medias y desviación estándar de los valores de reflectancia a 450 nm (r_{450}) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 103

Tabla 16. Medias y desviación estándar de los valores de log de HMF libre (μMl^{-1}) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 105

Tabla 17. Medias y desviación estándar de los valores de WPNI (mgg⁻¹ polvo) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año. 106

Tabla 18. Medias y desviación estándar del contenido de proteína total (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año. 107

Tabla 19. Medias y desviación estándar del contenido de caseínas (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año. 108

Tabla 20. Medias y desviación estándar del contenido de proteínas de suero (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año. 108

Tabla 21. Medias y desviación estándar del contenido de lactosa (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año..... 109

Tabla 22. Medias y desviación estándar de los valores de pH en leche cruda en las distintas estaciones del año. 110

Tabla 23. Promedios de las variables canónicas del análisis discriminante; considerando los valores de L*, a*, b* y log HMF libre; para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año. 116

Tabla 24. Medias y desviación estándar del contenido de dimetil sulfuro (µgKg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 132

Tabla 25. Medias y desviación estándar del contenido de nitrógeno no proteico (g100g⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año. 134

Tabla 26. Medias y desviación estándar del contenido de 3-CH₃ butanal (µgKg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año. ND: no detectado. 136

Tabla 27. Medias y desviación estándar del contenido de pentanal (µgKg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 138

Tabla 28. Medias y desviación estándar del contenido de pentanal (µgKg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 139

Tabla 29. Medias y desviación estándar del contenido de ácido butírico (mgg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 143

Tabla 30. Promedios de las variables canónicas del análisis discriminante; considerando dimetil sulfuro, hexanal, ácido butírico y el S₂, S₇, S₉, S₁₀, S₁₁, S₂₂, S₂₆, S₂₇; para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 152

Tabla 31. Medias y desviación estándar del % grasa libre (por cada 100 g de producto) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año..... 159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destino de la leche para industrialización.....	4
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de leche en polvo.....	15
Figura 3. Diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de leche en polvo.....	16
Figura 4. Degradación del ácido ascórbico.....	39
Figura 5. Esquema de Hodge modificado para amarronamiento no enzimático	43
Figura 6. Esquema de compuestos producidos en las diferentes fases de la oxidación	51
Figura 7. Curva de conversión de WPNI	68
Figura 8. Principio de la SPME.....	83
Figura 9. Eficiencia de extracción de la fibra CAR-PDMS para ■ 3 CH ₃ Butanal ▲ Hexanal ● Pentanal ♦ Dimetil Sulfuro * Ácido Butírico	86
Figura 10. Curvas de calibración de a: dimetil sulfuro; b: 3-CH ₃ butanal; c: pentanal; d: hexanal; e: ácido butírico	87-88
Figura 11. Determinación del tiempo "T" en la metodología de nariz electrónica	92
Figura 12. Secuencia de análisis de muestra en la metodología de nariz electrónica.....	94
Figura 13. Análisis de agrupamiento jerárquico; considerando los parámetros L*, a*, b*, r ₄₅₀ , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año	112
Figura 14. Análisis de componentes principales; considerando los parámetros L*, a*, b*, r ₄₅₀ , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.	113
Figura 15. Análisis discriminante lineal; considerando los parámetros L*, a*, b*, r ₄₅₀ , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTD en las distintas estaciones del año.	114

Figura 16. Análisis discriminante lineal; considerando los parámetros L^* , a^* , b^* , r_{450} , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI en las distintas estaciones del año.....	115
Figura 17. Valores de L^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.....	118
Figura 18. Valores de b^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.....	119
Figura 19. Valores de a^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.....	120
Figura 20. Valores de r_{450} de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.....	121
Figura 21. Valores de L^* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.	124
Figura 22. Valores de b^* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.	125
Figura 23. Valores de a^* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.	126
Figura 24. Valores de r_{450} de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.	127
Figura 25. ■ Contenido de ácidos grasos libres (AGL) mgg^{-1} grasa en leche cruda y ● ácido butírico en mgKg^{-1} en LEP a: TTI, b: TTD.	144
Figura 26. Análisis de agrupamiento jerárquico, considerando los componentes volátiles estudiados, de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.	147
Figura 27. Análisis de agrupamiento jerárquico, considerando el perfil de olor obtenido por nariz electrónica, de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.	148
Figura 28. Análisis discriminante lineal, considerando los componentes volátiles y el perfil de olor obtenido por nariz electrónica, de	

LEP recién elaboradas aplicando el TTI en las distintas estaciones del año. 149

Figura 29. Análisis discriminante lineal, considerando los componentes volátiles y el perfil de *olor* obtenido por nariz electrónica, de LEP recién elaboradas aplicando el TTD en las distintas estaciones del año. 150

Figura 30. Contenido de dimetil sulfuro (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses. 153

Figura 31. Contenido de 3-CH₃ butanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses 155

Figura 32. Contenido de pentanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses..... 157

Figura 33. Contenido de hexanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses..... 158

Figura 34. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 532 nm de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses 162

Figura 35. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 450 nm de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses 163

Figura 36. Valor peróxido (meq O₂/Kg grasa) de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses 164

Figura 37. Contenido de ácido butírico (μgg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses..... 167

Figura 38. Análisis de componentes principales, considerando el contenido de componentes volátiles, de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses 169

Figura 39. Contenido de dimetil sulfuro (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 170

Figura 40. Contenido de 3- CH_3 butanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 172

Figura 41. Contenido de pentanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 173

Figura 42. Contenido de hexanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 174

Figura 43. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 532 nm de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenada a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 176

Figura 44. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 450 nm de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenada a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 177

Figura 45. Valor peróxido (meqO_2/Kg grasa) de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenada a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 178

Figura 46. Contenido de ácido butírico (μgg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses..... 180

Figura 47. Análisis de componente principales, considerando el contenido de componentes volátiles, de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses 181

RESUMEN

La Argentina se encuentra ubicada en el extremo sur del Continente Americano pudiendo dividirse en grandes regiones geográficas que abarcan desde el clima subtropical al norte del país hasta el frío húmedo de la cordillera fueguina, pasando por los semiáridos y templados en la zona central. Es precisamente en esta última donde se ubica la Región Pampeana, formada por Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos y La Pampa, donde la producción láctea muestra toda su potencialidad, concentrándose en ella las principales cuencas lecheras y casi la totalidad de los tambos e industrias del sector. La provincia de Córdoba - que participa aproximadamente con el 34,5% de la leche total (cuatro cuencas), Santa Fe - que participa aproximadamente con el 35,5% de la leche total (dos cuencas), Buenos Aires - que participa aproximadamente con el 24,4% de la leche total (cuatro cuencas), Entre Ríos (cuatro cuencas); La Pampa (una cuenca) y Tucumán (una cuenca).

La evolución del complejo lácteo argentino estuvo asociada tradicionalmente al abastecimiento del consumo interno. La leche esta ubicada en el quinto lugar en valor de la producción agropecuaria luego de la soja, carne vacuna, trigo y maíz. Las industrias lácteas ocupan el tercer puesto en el ranking de las industrias alimentarias, generando el 11% del valor de la producción de este sector, luego de la carne y los aceites.

La participación de los lácteos en las exportaciones mundiales fue de solo el 1% del valor comercializado en el año 2000. Adicionalmente, las exportaciones están concentradas en pocas empresas lácteas que son las mayores productores. A pesar de esto, según datos del USDA, en el año 2000 la Argentina ocupó el quinto lugar del ranking de exportadores mundiales de leche entera en polvo, el noveno de quesos y el undécimo de leche en polvo descremada.

Es muy importante destacar la participación en las exportaciones de productos lácteos que tiene la provincia de Santa Fe en relación al total exportado por el país. Dicha participación fue en el año 2002 del 54,90 % del

volumen total exportado (expresado en miles de toneladas), lo que llevado a cifras en dólares representa un 63,77 %.

El desarrollo económico de un país surge del desempeño que tengan los agentes de su economía. Así lo entendieron los sistemas productivos mundiales, quienes en los últimos años llevaron adelante una importante transformación basada en la incorporación de conocimientos como insumo fundamental para agregar valor a su producción y así mejorar la competitividad. Para el logro de tales objetivos, la "Calidad" es una herramienta crítica. Dentro de calidad, la calidad organoléptica es un factor importante de aceptación por parte de los consumidores. El color y el olor, aspectos involucrados en la calidad organoléptica, son de extrema importancia como indicadores de la calidad y de conformidad en leche y productos lácteos.

El color, como uno de los aspectos de la apariencia, es uno de los mayores atributos que afectan la percepción de la calidad por parte de los consumidores. Incuestionablemente el color influencia otras características sensoriales, entre ellas el *flavor*, y por ende la elección, la aceptabilidad, y la preferencia de un alimento. Los cambios de color son deseables en algunos tipos de alimentos (café, chocolate, productos de panificación), sin embargo, en productos de leche esterilizados o productos de leche secos (leche polvo, suero en polvo) son indeseables. Tales cambios, en leche y en sistemas en base a leche, principalmente debido a la reacción de Maillard, tienen lugar durante el procesamiento (intensidad del calentamiento) y el almacenamiento. Compuestos coloreados tales como lactulosa e hidroximetilfurfural, lisina disponible y furosina pueden ser considerados indicadores de la severidad de los tratamientos térmicos. Es de resaltar que los productos de la reacción de Maillard influyen la estabilidad oxidativa y vida útil de varios alimentos, tales como leche, cereales y carne. Tradicionalmente se han determinado los cambios visuales del color por medio de análisis visuales, los cuales requieren la participación de jueces entrenados. Sin embargo, esta metodología carece de

objetividad y es poco adecuada para realizar evaluaciones rutinarias. No obstante, con la ayuda de instrumentos (fotómetros, y/o colorímetros) es posible definir, medir y comparar los colores de una manera objetiva.

El *flavor*, el resultado de la sensación combinada de sabor y aroma, es otro de los mayores criterios de la aceptación de un producto alimenticio por parte del consumidor. El análisis del *flavor*, ha sido comúnmente realizado mediante evaluación sensorial. La misma consiste en la evocación, medición, análisis e interpretación de las características de un alimento percibidas por medio de los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y la audición. Los paneles sensoriales entrenados definen los descriptores necesarios para evaluar la calidad de un producto y detectar modificaciones debido a *off-odors* o *off-flavors*. Por otro lado, el análisis instrumental del olor (la mezcla de compuestos volátiles en el espacio de cabeza de un producto) en leche ha mostrado ser una herramienta útil para caracterizar la leche y para distinguir distintos tipo de leche. El perfil de compuestos volátiles de leche y productos lácteos es llevado a cabo mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) acoplado con sistemas de extracción altamente eficientes tales como espacio de cabeza estático o dinámico, técnicas de “purga y trampa” o una de las técnicas más recientemente desarrolladas como es la microextracción en fase sólida (SPME). Sin embargo, el empleo de laboriosos métodos cromatográficos y/o paneles sensoriales para detectar cambios de calidad en alimentos está caracterizado por involucrar un alto costo en equipamiento, operadores calificados y/o tiempo de análisis prolongado. De esta manera, análisis cualitativos rápidos y tempranos podrían ser un significativo beneficio para el sector industrial. Se ha mostrado que un nuevo sistema, llamado “nariz electrónica” (NE) tiene el potencial de satisfacer esta tarea, pudiendo ser usado para el control de calidad en alimentos en algunas aplicaciones específicas. Básicamente, la NE es un instrumento basado en sensores diseñados para responder a los compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de una muestra, combinado con adecuado sistema de reconocimiento de patrones. Esta

tecnología ha sido exitosamente aplicada en el estudio de granos, carne de cordero, carne bovina fresca, carne bovina procesada, té, etc. Sin embargo, el número de estudios dedicados a productos lácteos aún es muy limitado, probablemente debido a la complejidad de sus matrices.

Considerando los antecedentes planteados y la importancia que los productos lácteos en general y la leche entera en polvo en particular tienen para la economía nacional se planteó el trabajo desarrollado en la presente tesis cuyos objetivos generales fueron:

- ✓ Contribuir al conocimiento del efecto que tienen los cambios estacionales y las condiciones de procesamiento y almacenamiento sobre el perfil de olor y la evolución de color, aspectos relevantes de la calidad organoléptica, de la leche entera en polvo.
- ✓ Promover en la industria láctea nacional la implementación de herramientas de análisis objetivas que permitan una evaluación temprana y rápida del perfil de olor de la leche entera en polvo.

Los resultados logrados en el presente trabajo mostraron que la calidad organoléptica de la leche entera en polvo, producida en la cuenca lechera santafesina, medida en cambios del color, compuestos volátiles relevantes para el *flavor* y perfil de olor determinado mediante NE, exhibió diferencias debido a la estacionalidad de la materia prima y a las condiciones comerciales de procesamiento y almacenamiento normalmente empleadas en la industria láctea Argentina. No obstante de las diferencias observadas en los parámetros de calidad estudiados, la calidad organoléptica no resultó afectada negativamente bajo las condiciones evaluadas.

En relación al empleo de herramientas objetivas, rápidas, confiables y precisas para la medición del olor de productos alimenticios, la Nariz Electrónica mostró ser una herramienta útil con potencial aplicación en la

industria láctea para el monitoreo en línea del perfil de olor de productos lácteos.

La fortaleza no se origina
en nuestras capacidades físicas,
sino en una voluntad inquebrantable.

Mahatma Gandhi

CAPÍTULO I

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

I.1. MERCADO DE PRODUCTOS LÁCTEOS

I.1.1. Mercado Nacional de Productos Lácteos

Entre 1991 y 1999 el sector lácteo protagonizó una de las expansiones más espectaculares dentro de la industria alimentaria argentina. La producción primaria creció a una tasa media anual cercana al 7%, uno de los crecimientos más significativos dentro de los principales productores mundiales. La producción industrial también creció a un ritmo vertiginoso hasta 1999. La profunda recesión económica de los años subsiguientes impactó con rigor en esta cadena que destinaba hasta entonces casi el 90% de su producción al mercado doméstico. Los números reflejaban con crudeza esta nueva realidad: entre el 2000-2002 tanto el consumo per capita, como la producción primaria, y por ende la industrialización, cayeron alrededor de un 20%, lo que significó retornar a niveles comparables con los del inicio de los años 90. Pese a la crisis, el sector primario e industrial mantuvo casi intactas su capacidad de producción e innovación. Aunque el flujo de las inversiones mermó en los últimos años, la magnitud de las realizadas principalmente entre 1993 y 1998 le otorgaron a la industria láctea argentina el potencial para cubrir con creces las necesidades de su importante mercado doméstico e incursionar en forma creciente y exitosa en un mercado internacional altamente distorsionado y caracterizado por una fuerte competencia. Como fiel reflejo de esto, basta consignar que hoy nuestras industrias colocan sus productos en casi 100 mercados alrededor del mundo, lo que ubica a la Argentina como 16° exportador mundial de lácteos (SAGPyA, Cadenas Alimentarias, Lácteos, Productos Lácteos, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>, 2005).

I.1.2. Producción de Productos Lácteos

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que en la década 1993-2002 la producción mundial de los principales productos lácteos de bajo valor

agregado experimentó un crecimiento del 24% para la leche entera en polvo, 19% para los quesos, 14% para la manteca y 2% para la leche en polvo descremada y suero. Por su parte, de acuerdo a las últimas estadísticas oficiales generadas en el marco del Convenio de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, el Centro de Industriales Lecheros y la Fundación de Investigaciones Económicas Latinoamericanas (SAGPyA-CIL-FIEL), en la década 1992-2001 la producción doméstica de "leches fluidas" (tradicionalmente denominadas "leches consumo"), se incrementó un 26%, en tanto que la correspondiente a los "productos lácteos" (conocida como "leche industria") lo hizo un 44%. Entre estos últimos, se destacan los aumentos del 185% para la leche entera en polvo, ubicando a la Argentina en el 2001 como el 4º productor mundial (con el 7,7% del total mundial).

Especialmente a partir de 1995, la creciente inserción de la Argentina en el mercado internacional de productos lácteos de bajo valor agregado determinó un cambio en la canasta de productos elaborados. En efecto, si en la década bajo análisis se comparan los promedios del trienio 1992-1994 con los del período 1995-2001 se observa que en este último se registró un alza de 8 puntos porcentuales en la participación de las leches en polvo, principalmente a expensas de los yogures (- 4 puntos) y, en menor medida, de los quesos (- 3 puntos) (**Tabla 1**) (Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA, Cadenas Alimentarias, Lácteos, Productos Lácteos, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>, 2005).

Tabla 1. Producción nacional de los principales lácteos en miles de toneladas.

Miles de Toneladas	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Leche entera en polvo	71	81	102	146	162	166	207	244	202	203
Leche descremada en polvo	23	22	27	37	36	40	38	46	45	41
Queso pasta dura	51	46	56	51	52	57	60	60	63	59
Queso Pasta semidura	118	109	120	112	114	127	127	138	133	130
Queso Pasta blanda	160	187	201	198	222	226	232	248	246	232
Manteca	37	36	43	51	52	49	49	54	47	44
Dulce de leche	87	92	102	106	106	111	108	114	105	110
Yogur	202	218	231	221	216	215	224	253	243	265
Leches fluidas	1.284	1.324	1.363	1.374	1.408	1.493	1.535	1.576	1.624	1.615
Total industrializ.	6.030	6.425	7.183	7.884	8.230	8.430	8.886	9.651	9.119	8.780
Total* producción leche cruda	6.590	7.002	7.777	8.507	8.865	9.090	9.546	10.329	9.817	9.475

*Incluye una estimación de la leche informal

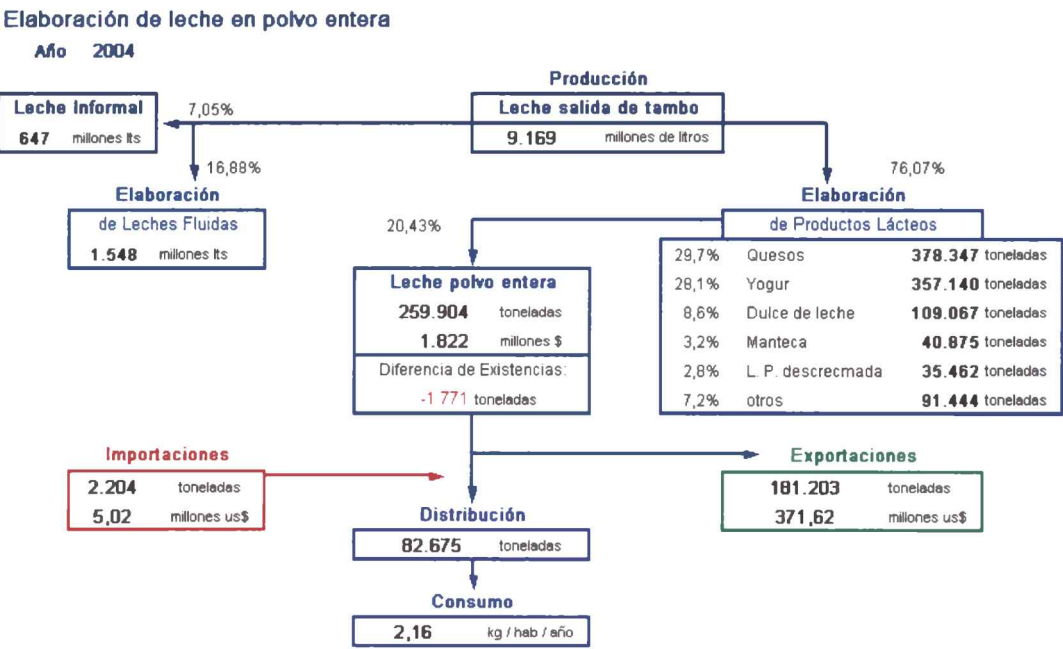
Fuente: Dirección de Industria Alimentaria sobre la base de datos del Convenio Lechería. SAGPyA-CIL-FIEL

I.1.3. Producción y Exportación Nacional de Leche Entera en Polvo

La producción mundial de leche entera en polvo es de aproximadamente 2,3 millones de toneladas; y creció fuertemente en los últimos años. Los principales países productores son: China, Nueva Zelanda, Brasil, Francia, Alemania y Argentina (SAGPyA, Cadenas Alimentarias, Lácteos, Leche en Polvo Entera, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>, 2005). Los principales países exportadores registraron incrementos cercanos al 50%, destinando más del 70% de lo elaborado al mercado internacional. El fenómeno se debe a:

- Los importadores están reemplazando la leche condensada por la leche entera en polvo por su menor precio.
- Aparecieron nuevos mercados: S.E. Asiático y Latinoamérica.

Dentro de la cadena láctea Argentina (**Figure 1**), la leche entera en polvo constituye aproximadamente un 20,43% del total del destino de leche industrializada. En la Argentina, la producción de leche entera en polvo experimentó un importante aumento (154%) en el período 1994-2004 (**Tabla 2**). El marcado aumento se explica casi exclusivamente por la mayor demanda externa ya que el consumo interno per cápita no se incrementó en el decenio 1994-2004 (SAGPyA, Cadenas Alimentarias, Leche en Polvo Entera, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>, 2005).



Fuente: SAGPyA, 2005

Figura 1. Destino de la leche para industrialización.

Tabla 2. Producción nacional de leche entera en polvo.

	Elaboración (Toneladas)	Existencias ⁽¹⁾ (Toneladas)	Consumo real ⁽²⁾ (Toneladas)	Consumo per capita (kg/hab.)
1994	102.493	-4.657	89.585	2,62
1995	146.472	5.755	95.677	2,75
1996	161.886	11.080	100.036	2,84
1997	165.761	-1.271	112.218	3,15
1998	206.760	4.887	106.107	2,95
1999	244.307	-3.063	106.619	2,93
2000	201.874	6.334	99.015	2,69
2001	203.448	20.997	99.004	2,66
2002	204.174	-30.261	94.878	2,53
2003	197.810	5.239	89.497	2,36
2004	259.904	-1.771	82.675	2,16

⁽¹⁾ Existencias = Existencia Final-Existencia Inicial

⁽²⁾ Consumo Real = Elaboración + Importación-Exportación-Existencias

Fuente: SAGPyA, 2005

Según datos del USDA, en el año 2000 la Argentina ocupó el 5º lugar del ranking de exportadores mundiales, siendo su participación en el mercado mundial de un relevante 10%. Con fluctuaciones importantes, los volúmenes exportados se incrementaron significativamente en el decenio 1994-2004 (**Tabla 3**), representando, en promedio, el 50% de la producción nacional, con un mínimo del 24% en 1994 y un record del 70 % en 2002. Las ventas al exterior pasaron de representar el 23,9% de la producción en 1994 al 69.7% en 2004. Los volúmenes exportados representaron un ingreso de US\$ 57 millones FOB para el año 1994 y US\$ 372 millones FOB para 2004, lo que representa un incremento de un 778% (SAGPyA, 2005, Cadenas Alimentarias, Leche en Polvo Entera, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>).

Los principales destinos de exportación durante el período Enero-Mayo 2004 han sido: Argelia, Brasil, México y Venezuela (SAGPyA, Cadenas Alimentarias. Lácteos. Informe sector lácteos. Análisis de coyuntura, <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>, 2005).

Tabla 3. Exportación nacional de leche entera en polvo.

	Exportación (Toneladas)	Total exportado ⁽¹⁾ (miles us\$)	Precio promedio (us\$/kg)
1994	24.475	56.716	2,32
1995	51.976	123.217	2,37
1996	57.956	142.121	2,47
1997	66.464	148.012	2,23
1998	98.038	202.332	2,06
1999	141.073	238.567	1,68
2000	97.502	187.562	1,92
2001	84.965	174.638	2,06
2002	139.886	201.291	1,44
2003	105.162	190.879	1,82
2004	181.203	371.619	2,05

⁽¹⁾ Valor FOB

Fuente: SAGPyA, 2005

I.1.4. Producción y Exportación de Productos Lácteos de la Provincia de Santa Fe

La Provincia de Santa Fe es la primer productora de leche a nivel nacional, participando en la actualidad con el 33,63 % en relación al total producido en el país (**Tabla 4**) (Alimentos de Santa Fe (Cadenas Agroalimentarias), Lácteos, <http://www.santafe.gov.ar>, 2005).

Esta producción se concentra en aproximadamente 5.000 tambos ubicados en todo el territorio provincial. De acuerdo a los datos obtenidos a partir de septiembre de 1992 por el sistema de auditorías, en la provincia de Santa Fe se cuenta con 183 industrias lácteas que industrializan la materia prima recibida, habiendo evolucionado la capacidad instalada (cantidad de litros/día que se pueden procesar) de 12 a 17 millones de litros. Solo 22 plantas instaladas en la provincia están habilitadas para la exportación (Alimentos de Santa Fe (Cadenas Agroalimentarias), Lácteos, <http://www.santafe.gov.ar>, 2005).

Tabla 4. Producción de leche en millones de litros. Provincia de Santa Fe en relación a totales nacionales – Serie 1986/2002.

	Exportación (Toneladas)	Total exportado ⁽¹⁾ (miles us\$)	Precio promedio (us\$/kg)
1986	5.720,90	1.496,40	27,90
1987	6.189,90	1.629,50	26,33
1988	6.061,00	1.557,20	25,69
1989	6.520,00	1.726,90	26,48
1990	6.093,00	1.679,40	27,56
1991	5.936,90	1.615,90	27,21
1992	6.590,50	1.708,60	25,92
1993	7.002,40	1.943,80	27,76
1994	7.606,60	2.258,30	29,68
1995	8.506,70	2.559,62	30,98
1996	8.865,00	2.549,00	28,75
1997	9.090,00	2.676,06	29,44
1998	9.450,00	2.724,82	28,80
1999	10.500,00	2.944,66	28,04
2000	9.129,00	2.756,80	30,20
2001	8.768,00	2.703,51	30,82
2002*	7.503,00	2.523,42	33,63

Fuente: Ministerio de la Producción – SAGPyA - *Cifra Estimada

Es muy importante destacar la participación en las exportaciones de productos lácteos que tiene la provincia de Santa Fe con relación al total exportado por el país. Dicha participación fue en el año 2002 del 54,90 % del volumen total exportado (expresado en miles de toneladas), lo que llevado a cifras en dólares representa un 63,77 %. Los principales rubros exportados son: leche en polvo, quesos y manteca. Una síntesis de las exportaciones totales y de leche en polvo en los últimos tres años puede observarse en las **Tablas 5 y 6** (Alimentos de Santa Fe (Cadenas Agroalimentarias), Lácteos, 2005, <http://www.santafe.gov.ar>).

Tabla 5. Exportaciones lácteas totales del país y la provincia de Santa Fe.

Exportaciones lácteas en toneladas			
	2000	2001	2002
Nación	174.383	150.811	210.406
Provincia	92.174	79.505	115.523
Provincia/Nación (%)	52,86	52,72	54,90

Exportaciones lácteas en us\$			
	2000	2001	2002
Nación	326.986	294.297.000	307.088
Provincia	199.714	178.423.000	195.829
Provincia/Nación (%)	61,10	60,63	63,77

Fuente: Datos Provisorios SENASA - Ministerio de la Producción

Tabla 6. Exportaciones de leche en polvo del país y la provincia de Santa Fe.

Leche en polvo toneladas			
	2000	2001	2002
Nación	118.523	105.563	157.815
Provincia	63.888	54.847	83.254
Provincia/Nación (%)	53,90	52,00	52,75

Fuente: Datos Provisorios SENASA - Ministerio de la Producción

1.2. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE EN POLVO

Según el código alimentario Argentino MercoSur – GMC – Res N° 082/93 (CAA, Julio 2002, <http://www.anmat.gov.ar/codigoo/caa1.htm>) se entiende por leche en polvo al producto que se obtiene por deshidratación de la leche de vaca, entera, descremada o parcialmente descremada y apta para alimentación humana, mediante procesos tecnológicamente adecuados.

De acuerdo al porcentaje de materia grasa se clasifica en:

- Entera: mayor o igual al 26%.
- Parcialmente descremada: entre 1.5 y 25.9%.
- Descremada: menor al 1.5%.

Cuando se produce leche en polvo para uso comercial es necesario cumplir con ciertos requisitos, de naturaleza sensorial, fisicoquímica y microbiológica. Los mismos se basan en la caracterización realizada por la Norma ADMI (American Dry Milk Institute) o por el CAA (Código Alimentario Argentino) Normativa MercoSur.

Los requisitos en cuanto a las características sensoriales son:

- *Aspecto:* polvo uniforme sin grumos, sin sustancias extrañas a nivel macro y micro.
- *Color:* blanco amarillento.
- *Sabor y olor:* agradable, no rancio, semejante a la leche fluida.

Los requisitos en cuanto a las características fisicoquímicas se detallan en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Requerimientos de calidad para leche entera en polvo.

Leche Entera en Polvo	Extra Grade, ADMI, 1971	Res No 82/93 GMC MercoSur, CCA
Grasa (%)	Min. 26.0	Min. 26.0
Humedad (%)	Min. 2.5	Máx. 3.5
Acidez Titulable (ml NaOH 0.1N/10g sólidos no grasos)	Máx. 15	Máx. 18
Índice de solubilidad (ml)	Máx. 0.5	Máx. 1.00
Rto. Bacteriano (por g)	Máx. 50.000	
Partículas quemadas	Disco B (15mg)	Disco B
Cobre (ppm)	Máx. 1.5	-----
Hierro (ppm)	Máx. 10	-----
Oxígeno (%)	Máx. 3	

La leche en polvo deberá contener solamente las proteínas, azúcares, grasas, y otras sustancias minerales de la leche, y en las mismas proporciones relativas, salvo por las modificaciones originadas por un proceso tecnológicamente adecuado.

Las exigencias microbiológicas establecidas en el Anexo MercoSur para leche en polvo se detallan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Requerimientos de calidad microbiológica para leche en polvo.

Microorganismos	Criterio de aceptación
Microorganismos aerobios mesófilos	n = 5, c = 2, m = 30000, M = 100000
Viables/g.	
Coliformes/g a 30°C	n = 5, c = 2, m = 10, M = 100
Coliformes/g 45°C	n = 5, c = 2, m <3, M = 10
Estafilococos coag pos./g	n = 5, c = 1, m = 10, M = 100
Salmonella spp/25g	n = 10, c = 0, m = 0

La calidad microbiológica de las leches en polvo depende de la calidad de la materia prima, de la limpieza de la planta, del equipamiento utilizado en la elaboración, del envasado, de los niveles de contaminación ambiental y de las condiciones higiénicas en todas las etapas de elaboración. Algunos países imponen especificaciones de calidad adicionales, según el uso final de este producto. Entre ellas pueden citarse el recuento de bacterias ó microorganismos termodúricos, el contenido de grasa libre superficial, la estabilidad térmica, etc. Estas exigencias adicionales se deben a que las leches en polvo son el ingrediente lácteo por excelencia para la industria de alimentos.

I.3. PROCESO DE ELABORACIÓN DE LECHE ENTERA EN POLVO

La **Figura 2.** muestra el diagrama de flujo de la elaboración de leche en polvo (Singh y Newstead, 1998) y la **Figura 3.** muestra un esquema simplificado del mismo.

Las propiedades de la leche cruda de ingreso están influenciadas por la raza del animal, el estado de lactación y la estación del año, así como por otros aspectos del manejo en el tambo, incluyendo nutrición y control de mastitis. El tiempo de almacenamiento, a través del crecimiento y la acción de microorganismos, y a través de la lipólisis y la proteólisis debido a la acción de proteasas y lipasas naturales de la leche y a enzimas secretadas por la microflora, es otro factor que afecta las propiedades de la leche. Hay también otros efectos del almacenamiento, ejemplo: disociación de la β -caseína de las miscelas de caseína a bajas temperaturas y redeposición o

reasociación de la misma con las miscelas solo suavemente luego de pasar de temperaturas bajas a temperaturas cálidas.

La calidad higiénica de la materia prima tiene una influencia significativa sobre la calidad del producto elaborado (Federación Internacional de Lechería —FIL—, 1996, Leche en Polvo, <http://www.laserenisima.com.ar>). Para la elaboración de este producto se debe partir de leche de buena calidad microbiológica, ya que cuanto mayor es la carga microbiana inicial, más posibilidades hay que algunos microorganismos sobrevivan al tratamiento térmico aplicado. Existe además el riesgo que bacterias termodúricas sobrevivan, y en consecuencia se hallen en un número importante en el polvo.

Se debe tener especial recaudo con las bacterias psicrótrofas en leche cruda, capaces de desarrollarse a bajas temperaturas (4 – 7°C) durante la conservación de la misma. Estas bacterias son destruidas durante la pasteurización, sin embargo liberan lipasas y proteasas termoestables, responsables de cambios fisicoquímicos y alteraciones del sabor en la leche en polvo. Para evitar este inconveniente Muir y col. (1978), sugieren como umbral de bacterias psicrótrofas en leche cruda 2×10^6 UFCml⁻¹.

El almacenamiento de la leche cruda durante 48 h a 4°C genera leche en polvo con mayor contenido de ácidos grasos libres y por lo tanto, con mayor predisposición a la oxidación (Celestino y col., 1997a).

La leche almacenada se separa en leche descremada y crema. Luego, la leche descremada se seca, o las corrientes de crema y la leche descremada (o leche entera y leche descremada) se mezclan para dar leche entera con un contenido de grasa estandarizado listo para secar. En este estado se pueden adicionar suplementos tales como vitaminas y minerales.

La leche descremada o leche entera estandarizada se somete a un tratamiento térmico. Las variables de este tratamiento son la temperatura y el tiempo de residencia, y podría ser afectado por la concentración de la leche. Las razones del tratamiento térmico son las de encontrar los requerimientos microbiológicos (ejemplo baja recuento de esporas), para dar las propiedades funcionales sugeridas para un uso particular, y, lo más básico, para asegurar que la leche ebulle cuando se la exponga a baja presión en la primer etapa del evaporador. Este tratamiento térmico varía el grado de desnaturalización de las proteínas de suero y por lo tanto su

estado físico y comportamiento durante el secado. Se utilizan tres condiciones de tiempo-temperatura para obtener tres tipos de leche en polvo: alto tratamiento (120 – 135°C), medio tratamiento (85 – 105°C por 1-2 min) y bajo tratamiento (74°C por 30 s).

Para clasificar las leches en polvo sobre la base del tratamiento térmico aplicado se usa el método de Harland y Ashworth (1947, citado en Singh y Newstead, 1998), el cual cuantifica las proteínas de suero no desnaturalizadas (WPNI) en leche en polvo y es el método oficial usado por el ADAMI Boletín 916 (1971). Sobre la base de este método, la leche en polvo se clasifica en leche de bajo, medio y alto tratamiento térmico (**Tabla 9**). La determinación se lleva a cabo según la técnica descrita por Sorensen y col. (1978) método N° A 21 del Manual de Análisis de Productos Lácteos de NIRO A/S. El principio de la misma se basa en separar por filtración todas las proteínas desnaturalizadas por el tratamiento térmico, después de precipitar la leche reconstituida con NaCl. El filtrado tendrá todas las proteínas del suero no desnaturalizadas, las cuales desarrollan una turbidez proporcional a la concentración. La turbidez se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. Luego, haciendo uso de una curva de calibración se convierte la absorbancia en mg de proteína de suero no desnaturalizada / g de polvo (WPNI).

Tabla 9. Clasificación de leche en polvo según el tratamiento térmico aplicado durante su elaboración.

Tratamiento	WPNI
Precalentamiento	
Alto	Menos 1.5 mg
Medio	Entre 1.5 y 5.9 mg
Bajo	Mas de 6 mg

La leche entera es normalmente sometida a un tratamiento térmico severo a fin de lograr la máxima liberación de sulfidrilos que actúan como antioxidantes de la grasa y para favorecer la completa destrucción de las enzimas oxidantes. En las plantas modernas, el equipo para el tratamiento térmico está incorporado en el evaporador y ofrece un alto grado de control y eficiencia de funcionamiento. En la actualidad se utilizan tanto

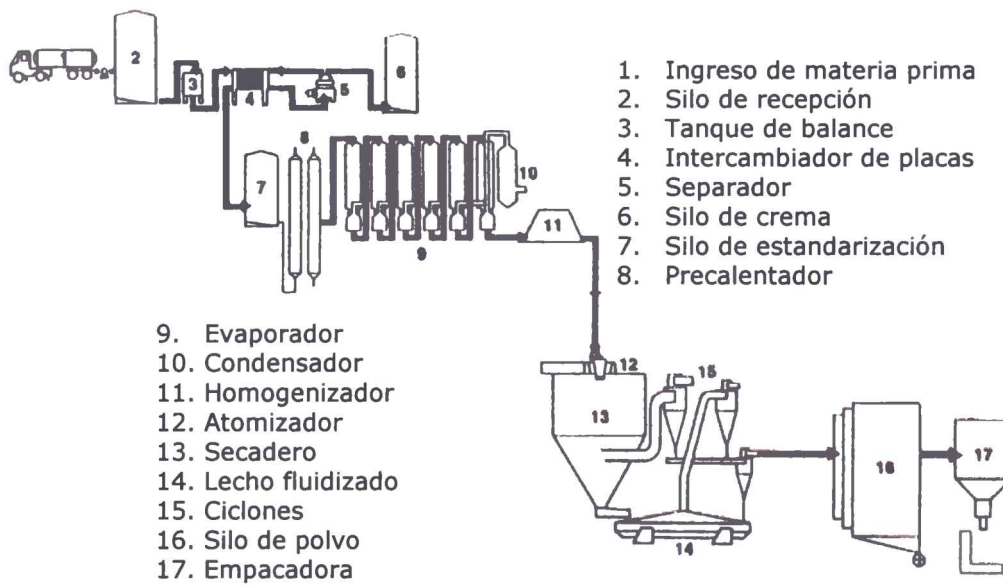
calentadores tubulares así como inyección directa de vapor. Después del calentamiento a la temperatura deseada, la leche permanece en tubos de mantenimiento el tiempo necesario. A continuación la leche se enfría en un intercambiador de calor convencional o por evaporación instantánea. Luego del tratamiento térmico, la leche pasa a la etapa de concentración. La concentración de la leche a baja temperatura por evaporación al vacío se basa en la ley física que establece que el punto de ebullición de un líquido disminuye a presiones menores que la atmosférica. La máxima temperatura de ebullición aceptada en un evaporador de última generación es de 17°C, temperatura que corresponde a una presión de 230 mm de Hg. Generalmente, la evaporación se realiza en evaporadores de película descendente. Una alta economía de vapor se obtiene por recompresión del mismo. Los dos métodos usados han dado nombre a los dos tipos de evaporadores empleados en la actualidad TVR (recompresión térmica del vapor) y MVR (recompresión mecánica del vapor). En un esfuerzo por mejorar la eficiencia global del proceso, la leche se concentra tanto como sea posible antes de ingresar al secador spray. En las plantas modernas la leche descremada y entera se concentran hasta 48 – 50% de sólidos totales. La experiencia muestra que si la leche se concentra por encima de los niveles de sólidos mencionados, la calidad del polvo se ve afectada, especialmente en la solubilidad. El concentrado se descarga desde el evaporador a una temperatura cercana a 45°C. El mismo pasa un tanque regulador para asegurar la entrada de leche a flujo constante y de allí al atomizador del desecador. En esta etapa es muy bueno realizar un precalentamiento hasta 70 – 75°C, a fin de alimentar el concentrado al atomizador a la menor viscosidad posible. Esta operación se lleva a cabo directamente antes de la atomización. También es muy importante considerar la posibilidad de sembrar el concentrado con cristales de α -lactosa monohidratada antes de la atomización para aumentar así el porcentaje de azúcar cristalizado y reducir la higroscopicidad del polvo.

La deshidratación hace referencia a la remoción de agua de los alimentos a niveles menores al 5%. Los desecadores que normalmente se usan en la industria láctea son los secadores spray. La ventaja de los mismos reside en los cortos tiempos de secado, logrando así una mejor calidad del producto. La temperatura del aire de entrada en los desecadores

es de 180 – 230°C y la de salida de 70 – 95°C. Siguiendo al secado spray en la cámara, las partículas de polvo caen en un lecho fluidizado donde el polvo se seca al contenido de humedad requerido (2,5-3%). El método de secado en dos etapas da un uso más eficiente de la energía y podría mejorar la calidad del polvo. Luego del secado, el polvo debe ser enfriado antes de ser almacenado en barriles o cajas, de otro modo, podría aglutinarse o su solubilidad podría ser afectada.

Los parámetros tecnológicos mencionados dependen del producto que se esté elaborando; así por ejemplo para la elaboración de leche entera en polvo, el concentrado se homogeneiza y normalmente el desecador se hace funcionar a temperaturas de entrada y salida del aire en los límites inferiores del rango usado para la leche descremada. La homogeneización permite la reducción del tamaño de los glóbulos grasos y la fijación de proteínas a la superficie de los glóbulos grasos reconstituidos. Este proceso permite una mayor estabilidad del polvo frente a la oxidación y una disminución de la grasa libre. Por último, la lecitinación es un proceso aplicado a la leche entera en polvo para crear mejores características de instantaneización. El proceso consiste en la pulverización de una solución lecitina – grasa sobre las partículas de polvo, bien durante el secado en el lecho fluidizado o durante el paso entre los lechos.

En contraste con la leche entera desnatada, que puede envasarse para su venta a granel en sacos de papel Kraft de varias capas con una ligera capa de polietileno, las leches en polvo enteras requieren sistemas de envasado adecuados para reducir la autooxidación de los lípidos durante el almacenamiento. El envasado en atmósfera de nitrógeno es muy efectivo pero caro e implica la necesidad de utilizar materiales de envasado con propiedades de barrera. Se emplean mucho más los envases bi y trilaminados, compuestos de varias capas, con una de aluminio y el resto películas plásticas de alta densidad.



Fuente: Singh y Newstead, 1998

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de leche en polvo.

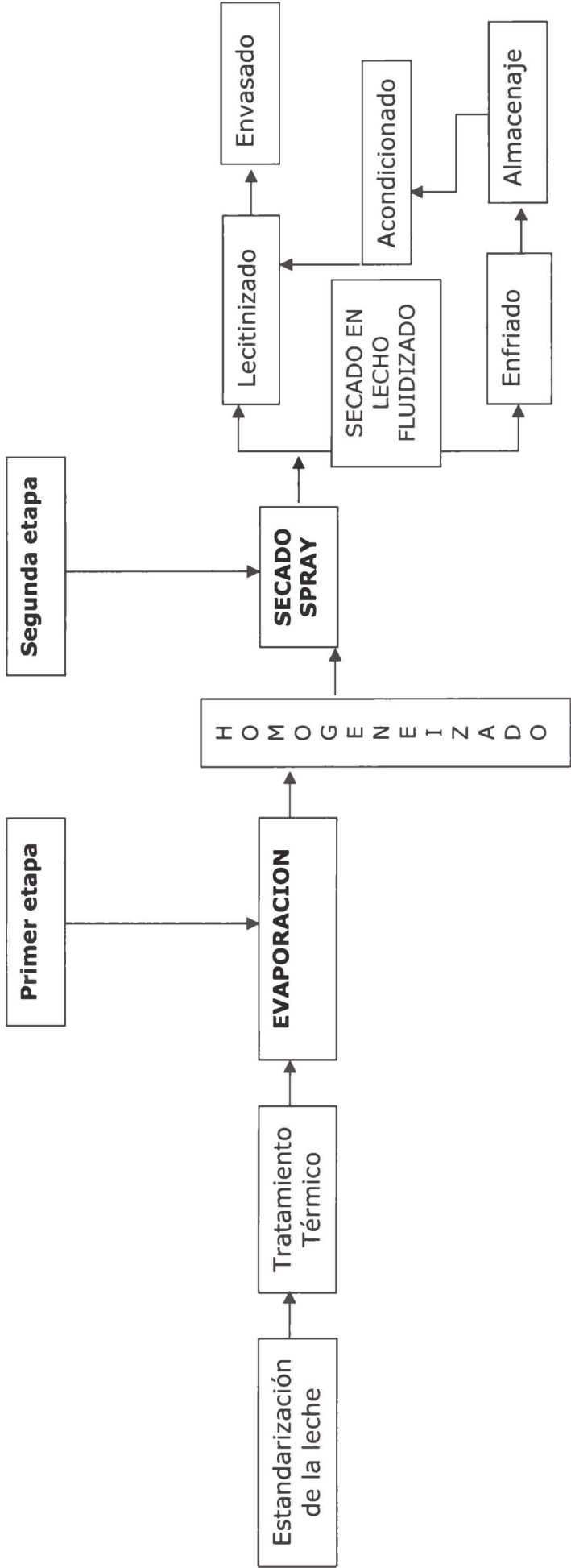


Figura 3. Diagrama de flujo simplificado del proceso de elaboración de leche en polvo.

I.4. LA CALIDAD

I.4.1. Breve historia de la calidad

La evolución de los conceptos de *Calidad* en las últimas décadas ha determinado que los preceptos que antes se aplicaban estrictamente a una tarea de control ejercida en alguna dependencia de la fábrica, empresa o taller de manufactura hoy se hayan convertido en una herramienta importante de gestión, que se aplica en todas las áreas de una organización.

Tradicionalmente, *Calidad*, en su definición básica implica *satisfacción del cliente*. Este, siempre fue visto como el consumidor final de nuestros productos o servicios y era el destinatario de nuestros esfuerzos dirigidos a interpretar y satisfacer sus necesidades.

La *Calidad* era controlada al finalizar el proceso de producción mediante inspecciones, desechando aquellos productos que considerábamos no cumplían con pautas de *Calidad* determinadas. Esto implicaba evitar el impacto de la falla en el cliente, pero a un costo muy elevado ya que el proceso estaba terminado y el gasto consumado. Sin embargo, los conceptos de *Calidad* se han desarrollado en los últimos años y han ampliado el universo de todos los involucrados en el proceso productivo. Los clientes de una organización son, además del consumidor final, los dueños de la misma, sus empleados, sus proveedores y en última instancia la sociedad. Todos estos actores esperan que las actividades de la organización, realizadas con efectividad y eficiencia, logren satisfacer sus expectativas.

Otro punto de desarrollo importante es el paso del control como único factor de determinación de la *Calidad* de un producto, al concepto de *gestión*. Todas las actividades de la empresa quedan bajo el manto del *Sistema de Gestión de Calidad*.

I.4.2. Normativas de calidad

Las necesidades del mercado mundial, el desarrollo de las comunicaciones y otras variables de los tiempos modernos, determinaron la

necesidad de establecer un grupo de normas para la implementación de un *Sistema de Gestión y Aseguramiento de la Calidad* que pudieran servir a cualquier organización, inserta en cualquier rama de la producción y localizada en cualquier lugar del mundo. Con este propósito, ISO (Organización Internacional para la Normalización) desarrolló las normas ISO 9000, cuya última versión del año 2000 nos guía en la implementación del sistema y su posterior certificación.

Según la Norma IRAM-ISO 9000:2000 (Fundamentos y Vocabulario), se define a la calidad como:

"el grado en que un conjunto de características inherentes cumplen con requisitos".

Se define al cliente como:

"la organización o persona que recibe un producto, entendiendo a éste como el comprador, consumidor, usuarios, beneficiarios o destinatarios".

En tanto el proveedor es:

"una organización o persona (por ejemplo un productor, distribuidor, minorista, prestador de un servicio) que proporciona un producto".

Por organización pública o privada, entendemos que:

"son las compañías, corporaciones, firmas, empresas, instituciones, asociaciones, o parte o combinación de las anteriores".

El concepto de *Calidad* permite hoy establecer un lenguaje en el que pueden entenderse los actores de la cadena proveedor – organización – cliente.

Es importante destacar, sin embargo, que podría no existir una correspondencia total entre la noción o expectativa acerca de la *Calidad* que podrían tener en cuenta los actores en juego en la cadena proveedor – organización – cliente. Por lo tanto debemos distinguir:

- **Calidad Esperada:** referida a la toma de conciencia por parte del cliente, consumidor de una necesidad a satisfacer. Por ende desde el punto de vista del cliente, la calidad esperada, constituye la culminación de un proceso de selección.
- **Calidad Ofrecida:** referida al ofrecimiento de un producto de un determinado grado de calidad de acuerdo a las expectativas de calidad requeridas por el cliente, consumidor que haya captado o interpretado el proveedor.
- **Calidad Percibida:** referida al grado de calidad percibido, por parte del cliente, cuando un producto es adquirido y utilizado. La calidad percibida puede o no coincidir con el grado de calidad esperado.

Por su parte, se entiende por *Calidad Integral* a la condición resultante de la innovación concurrente en aspectos de inocuidad, nutricionales, organolépticos, de procesamiento, estabilidad, gestión (calidad de productos/procesos, ambiente). De esta manera, podemos definir a la *Calidad Organoléptica* como el conjunto de sensaciones experimentadas por una persona cuando ingiere un alimento. Se relaciona con las características del producto como su color, sabor, aroma y textura. Estos atributos influyen en la decisión del consumidor en el momento de elegir un producto.

I.4.3. Dimensiones de la calidad

Las dimensiones de la *Calidad* son comúnmente categorizadas en características de investigación, experiencia y creencia (Darby y Karni, 1973) dependiendo de cuando el consumidor pueda determinar la *Calidad*: una *Calidad de Investigación* (como la apariencia de un trozo de carne) puede ser evaluada antes de la compra, una *Calidad de Experiencia* (como el sabor de la carne) puede ser evaluada después de la compra, y una *Calidad de Creencia* (como la sanidad de la carne) la que puede, bajo circunstancias normales, no ser evaluada por el promedio de los consumidores, pero es una cuestión de confianza y creencia en la información provista. Sin embargo, muchas características de los alimentos,

como el sabor, no pueden ser determinadas por los consumidores antes de la compra. Por ejemplo muchos alimentos como el caso de la leche en polvo tienen solo características de investigación en un grado limitado. Consecuentemente, el consumidor para hacer una elección de un producto desarrollará expectativas acerca de la calidad, pero solamente luego de su consumo podrá determinar la *calidad experimentada*, y aún la misma está limitada en el caso de las características de creencia como la sanidad de un producto. Enmarcado en este contexto el modelo de calidad total de un alimento propuesto por Grunert y col. en el año 1996 (Grunert, 2002) distingue entre las evaluaciones hechas por parte del consumidor antes y después de la compra de un producto. El modelo muestra como antes de la compra de un producto, el consumidor basa sus expectativas de calidad en la disponibilidad de piezas de información (Steenkamp, 1990). Así, las piezas de información respecto de la *calidad intrínseca* cubren las características físicas del producto, que están relacionadas a las especificaciones técnicas del mismo, las cuales también incluyen las características fisiológicas, por ejemplo: características que pueden ser medidas objetivamente como el color de un producto. Por su parte, las piezas de información respecto de la calidad extrínseca representan todas las características del producto, tales como marca, precio, distribución, envasado, etc. De todas las piezas de información a las que son expuestos los consumidores, solamente aquellas, que son percibidas tendrán influencia sobre la calidad esperada (Grunert y col., 2004).

De acuerdo al modelo de calidad total de un alimento, la calidad no es un objetivo en si mismo, pero es deseada ya que ayuda a satisfacer valores o motivos de compra. Consecuentemente, el modelo incluye cumplimiento del motivo o valor, por ejemplo: como los productos alimenticios contribuyen a alcanzar los valores y consecuencias deseadas. Las piezas de información extrínsecas tales como la marca y su contenido podrían, por ejemplo, generar expectativas acerca de una alta calidad comestible, dando al consumidor un sentimiento de lujo y de placer en la vida (Grunert y col., 2004).

El cumplimiento de la calidad esperada y de los motivos de compra constituyen las consecuencias positivas esperadas por los consumidores en la compra de un alimento, y son la compensación o balance respecto de las

consecuencias negativas en la forma de varios costos (Grunert y col., 2004).

Luego de la compra, el consumidor tendrá una experiencia de la calidad, la cual a menudo se desvía de la calidad esperada, especialmente cuando la misma solo está basada en piezas de calidad con bajo poder predictivo. Comúnmente se cree que la relación entre la expectativa de calidad y la experiencia de la calidad (antes y después de la compra) determina la satisfacción del producto, y consecuentemente la probabilidad de comprar el mismo producto (Oliver, 1980, 1993). La calidad experimentada está influenciada por muchos factores. El producto en sí mismo es un determinante, pero muchos otros juegan un rol importante: la forma en que el producto se prepara e integra al proceso de preparación de una comida, factores situacionales como el día y tipo de comida, el ánimo del consumidor, etc. Así, ambos calidad esperada y experimentada y de este modo la satisfacción del consumidor, son solo una parte que está bajo el control del productor, ya que ambas son afectadas por muchos otros factores (Grunert y col., 2004).

I.4.4. Calidad en la Cadena Agroalimentaria

De acuerdo a Taverna (2002):

"La calidad representa una inversión a realizar hoy para permanecer en el mercado del mañana".

Sobre esta idea se basa la reestructuración del sector de agroalimentos de numerosos países como respuesta de la transformación en el comportamiento alimentario de la población. La saturación de los mercados con poder adquisitivo, los cambios en el modo de vida, el trabajo de la mujer fuera del hogar, la sensibilidad de la población frente a los problemas que asocian la salud con la nutrición y una mayor preocupación por los aspectos ambientales, son algunos de los ejemplos de cambios de comportamiento.

Adicionalmente a estos cambios, otro aspecto no menos importante es la mayor incertidumbre sobre la calidad de los alimentos en todos los

operadores de la cadena, incluido el consumidor final. El significado de la incertidumbre toma características diferentes, no restringiéndose sólo a nivel de los peligros toxicológicos y sanitarios, sino a los riesgos asociados a prácticas y técnicas utilizadas en la producción de un alimento.

De este modo, la agroindustria pasa de un periodo de crecimiento intensivo a una fase de mayor flexibilidad donde el objetivo no es solamente producir para responder a necesidades crecientes de la demanda sino hacerlo de forma diferente.

Este proceso se materializa a través de una creciente cantidad de productos ofertados que tratan de responder a la diversidad de preferencias y a la desigualdad de poder adquisitivo de los consumidores, es decir, se enmarcan dentro de la definición de una *estrategia de calidad*.

Si bien muchos de los elementos citados en esta caracterización evolutiva corresponden a realidades de países desarrollados, se considera oportuno recordarlos puesto que, en muchos aspectos, resultan coincidente con lo que sucede u ocurrirá en nuestro mercado interno y definen, por otra parte, el mercado dentro del cual debe exportar Argentina.

I.4.5. Inserción del concepto de la calidad en la Cadena Láctea

De acuerdo a Taverna (2002):

Establecer una definición correcta de *calidad de la leche* resulta complejo. Esta complejidad radica en la diversidad de calidades requeridas por las industrias y las remitidas por los productores. La priorización de criterios de calidad de leche está influenciada por el proceso de elaboración, el tipo de producto, el mercado y la organización interna de la empresa.

Por otro lado, la calidad librada por los productores depende, entre otros aspectos, del sistema de producción, de las prácticas y técnicas empleadas, de la capacitación de la mano de obra, de ciertas decisiones tomadas con anterioridad en la selección de los reproductores y en estacionalidad en los partos.

La relación entre ambas partes (productores e industrias) integra, lógicamente, esta diversidad de enfoques y de objetivos.

El sistema de pago de la leche por su calidad materializa la intersección entre la industria y los productores. Su función es la de transferir, en el corto y mediano plazo, a través de los criterios seleccionados y el valor económico relativo otorgado a cada uno, los requerimientos de la industria y las posibilidades y restricciones que tienen los productores para cumplirlos. En este sentido, uno de los problemas que aparece frecuentemente y que dificulta el correcto accionar de la cadena, lo representa la subjetividad con la que, muchas veces se elabora, el sistema de pago. En efecto, es claro y bien documentado que para que la calidad resulte identificable y apropiable por el conjunto de actores, la misma debe ser objetiva y traducida por un conjunto de parámetros claros, concretos y concientemente negociados entre todas las partes involucradas.

Un camino de análisis posible consiste en asociar la calidad a un resultado. Esta alternativa presenta la ventaja de situar los problemas, su seguimiento y su control dentro de un contexto general que es el de construir o modelar los caminos para el logro de los resultados perseguidos. El primer paso de este proceso de elaboración es suministrar a los diferentes actores involucrados, elementos (información) para la toma de decisiones que confluyan en la elección estratégica, aspecto central de la gestión de la calidad.

Este proceso de modelización tendiente al logro de resultados concretos y prefijados implica descomponer el problema global en componentes más específicos, para posteriormente definir los factores de variación de cada uno de ellos y establecer las posibilidades de cada operador para controlarlo y/o modificarlo. Esta mecánica supone el conocimiento e interpretación de los procesos denominados biotécnicos, para lo cual se requiere de la conformación de grupos multidisciplinarios integrados por técnicos industriales, productores, investigadores, etc.

El grado de superposición entre la calidad de leche esperada (definida) y la realmente producida y puesta en fabricación determina el nivel de éxito o fracaso de la gestión de calidad. A este nivel se puede establecer que la gestión es correcta en la medida que la calidad producida resulte coincidente con la esperada. Si no fuera el caso, es necesario intervenir nuevamente sobre el proceso para redefinir lo esperado o intervenir sobre los factores que desviaron el resultado.

I.5. IMPORTANCIA DEL COLOR EN LA CALIDAD INTEGRAL DE LOS ALIMENTOS

La apariencia de un producto es la primera impresión que el consumidor tiene de un alimento. El color, como un aspecto de la apariencia, es uno de los atributos que afectan la percepción de la calidad por parte del consumidor.

El color de los alimentos es una parte integral de nuestra cultura y de la manera en que disfrutamos de la vida. Quién puede negar la atracción de un trozo de hielo color frutilla en un día de verano, o un pollo dorado adornado con perejil verde? El color es una importante propiedad de los alimentos que se suma al placer de comer. La naturaleza nos enseña desde temprano a esperar ciertos colores en ciertos alimentos, y la aceptación futura de los mismos depende en gran manera de satisfacer estas expectativas. Si el color de un dado alimento no se encuentra dentro de un rango esperado para la aceptación de ese alimento, otros dos factores importantes de la calidad, *flavor* y textura, probablemente no serán juzgados por parte del consumidor (Francis, 1995).

El color y la atracción que ejercen varios alimentos esta fuertemente relacionada. La sola visión de un alimento "activa" las neuronas en el hipotálamo. Personas a las cuales se les ha dado a comer alimentos en la oscuridad han informado de la falta de un elemento crítico para disfrutar de cualquier cocina: la apariencia del alimento. Para los que pueden ver, la visión es el primer sentido que debe ser convencido antes de probar un alimento. Esto significa que algunos productos alimenticios fracasan en el mercado no debido a su mal sabor, textura o aroma, sino porque el consumidor nunca llegó al punto de probarlos. De un modo general, podríamos decir que el sistema visual actúa en concordancia con casi todos los sistemas sensoriales, aunque los mecanismos que posibilitan estas interacciones son muy pocos conocidos (Guirao, 1980).

En general, los consumidores no son personas que tienen conocimiento de la naturaleza del fenómeno del color. Ellos actúan según lo que ven en el momento que miran y no prestan atención a la calidad cromática de la luz que ilumina el objeto, sino al color del comestible que

observan, y sólo lo juzgan por él, como si ese color fuera constante en todas las situaciones posibles (Lozano, 1978).

Dada la importancia del color como atributo determinante de elección de un producto, controlar el mismo en los productos alimenticios, entre ellos los productos lácteos, de forma tal de cumplir determinados estándares de calidad permitirá mejorar no solo la competitividad sino también el ingreso a nuevos mercados.

I.5.1. Medición del color en los alimentos

Diversas metodologías analíticas, la cuales se dividen de acuerdo al peso molecular de los compuestos, se han estado utilizando para el análisis y el aislamiento de compuestos coloreados.

Tradicionalmente, la cromatografía en papel, en capa delgada, en columna y la cromatografía de alta presión se emplearon para compuestos coloreados de bajo peso molecular (<500 Da), pero precipitación, diálisis, filtración por membrana y cromatografía de permeación por gel y de intercambio iónico se aplicaron ampliamente para compuestos de alto peso molecular (Rizzi, 1997). Así, por ejemplo, cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) se aplicó para separar pigmentos asociados con el amarronamiento en jugo de pomelo (Rouseff y col., 1989) y compuestos coloreados de bajo peso molecular de Maillard en un sistema lisina/xilosa usando detección por arreglo de diodos (Ames y col., 1993). Además, cromatografía de intercambio iónico (IE-HPLC) se aplicó en un sistema glucosa/glicina, focalizando isoelectricamente (IEF) en sistemas xilosa/glicina (Morales y van Boekel, 1998) y melanoidinas se analizaron por electroforesis capilar (Tomlinson y col., 1994). Sin embargo, estas metodologías no permiten describir cambios visuales del color en términos de los pigmentos marrones y por lo tanto no tienen en cuenta la percepción del color por parte del consumidor (Petriella y col., 1985).

El grado de aceptación por parte de los consumidores y el valor nutritivo de los alimentos, también como cambios indeseables en las propiedades físicas, frecuentemente acompañan el amarronamiento de los productos lácteos (Rhim y col., 1988). El color de un alimento es el resultado de los productos naturales asociados con la materia prima del cual

partió y/o compuestos coloreados generados como resultado del procesamiento (Rizzi, 1997). En este sentido, podría ser útil expresar el amarronamiento en términos de cambios visuales del color. Tradicionalmente se han determinado los cambios visuales del color por medio de análisis visuales, los cuales requieren la participación de jueces entrenados (Pérez-Alvarez y col., 1999). Sin embargo, esta metodología carece de objetividad y es poco adecuada para realizar evaluaciones rutinarias (Heredia y col., 1986). No obstante, con la ayuda de instrumentos (fotómetros, y/o colorímetros) es posible definir, medir y comparar los colores de una manera objetiva.

Los procedimientos que se usan para describir los cambios visuales del color se basan en el principio de la *especificación de los tres estímulos*. Este principio expresa que cualquier color puede reproducirse mezclando tres colores espectrales en cantidades adecuadas (Lozano, 1978).

En el año 1931, el Comité Internacional de Iluminancia (ICI), conocido también por las siglas CIE (Comisión Internationale de l'Eclairage) sentó las bases para la estandarización de las técnicas de especificación del color.

Diversos autores (Buera y col., 1987; Pagliarini y col., 1990; Morales y van Boekel, 1998; Rampilli y Andreini, 1992; Celestino y col., 1997b; Kwok y col. 1999; Kristensen y col., 2001; Schebor y col., 1999) emplearon un colorímetro triestímulo el cual provee los valores de tres componentes de color; L^* (componente negro-blanco, luminosidad), y las coordenadas de cromaticidad a^* (componente rojo-verde) y b^* (componente amarillo-azul), para estudiar cambios de color en sistemas modelo como en diversas matrices alimentarias.

Las mediciones del color se hacen generalmente sobre soluciones transparentes, claras, en las que se mide la absorbancia o la transmitancia. Por el contrario, la determinación del color por reflectancia se realiza cuando se trata de objetos con superficies planas, mates o brillantes, es decir cuando la superficie del objeto es perfectamente regular (reflexión de la luz es especular = aspecto brillante, reflexión difusa = aspecto mate), opacas, no traslúcidas y de pigmentación homogénea. Los alimentos muy pocas veces corresponden a uno u otro de estos modelos ideales. La homogeneización seguida de una ligera compresión, facilita la obtención de

superficies sensiblemente planas y homogéneas. Cuando el alimento es translúcido, las capas situadas bajo la superficie, también reflejan la luz de modo dificultoso y en este caso, pueden resultar falseadas las medidas de reflectancia porque se escapa (al aparato de medida) una parte de la luz reflejada. Puede disminuirse el error, reduciendo la superficie iluminada, pero captando sobre una gran superficie la luz reflejada y/o midiendo la reflectancia de una pequeña capa de alimento, dispuesta sobre un fondo blanco o negro según el método descrito por Kubleka y Munk (1931).

El color o color aparente de un objeto, depende de cuatro factores:

- ◆ La iluminación (luz incidente).
- ◆ El objeto (soporte que refleja o transmite la luz).
- ◆ El observador (visión).
- ◆ El entorno del objeto.

I.5.1.1. La iluminación

La luz solar es la más recomendable para iluminar los objetos; solamente cuando no se dispone de ella, debe recurrirse a la luz artificial, la cual se seleccionará de acuerdo al producto al que esté destinada.

Para medir “el color de un objeto”, es necesario establecer con exactitud las condiciones de iluminación. Muchos de los objetos que pensamos que son fuentes de luz, emiten luz que es blanca o cercana a la blanca (el sol, metales como los filamentos de las bombillas, lámparas fluorescentes, etc.). La luz de cualquier fuente puede ser descrita en términos de potencia relativa (o cantidad de luz) emitida a cada longitud de onda (la energía es simplemente potencia por tiempo, de ahí, que algunas veces sea usada en vez de fuentes de potencia). Un importante grupo de fuentes de luz son los llamados cuerpos negros, los cuales representan falsamente su nombre, ya que ellos no se ven negros, excepto cuando están fríos. Los filamentos de tungsteno, tales como los presentes en las bombillas normales, son una excelente aproximación a los cuerpos negros (Lozano, 1978).

La CIE definió los iluminantes utilizados en la descripción del color, pero resulta conveniente definir y diferenciar una fuente de un iluminante:

- Fuente: es una luz realizable físicamente, cuya potencia espectral relativa puede ser experimentalmente determinada. Cuando la determinación está efectuada y especificada, la fuente viene a denominarse una fuente estándar. Según la CIE, una fuente es una luz física real usada en los experimentos de color.
- Iluminante: es una luz definida por una potencia espectral relativa la cual puede ser físicamente disponible o no como una fuente. Si ésta se puede obtener en forma física, entonces pasa a ser una fuente estándar (Lozano, 1978).

Las fuentes típicas se denominan A, B y C. La A se obtiene de la lámpara de filamento de tungsteno operando a una temperatura de color de 2854 K. Las fuentes B (4800K) y C (6500K) derivan de la fuente A por el paso de la luz a través de filtros líquidos. La fuente B, es una aproximación a la luz de medio día, mientras que la fuente C es una aproximación a la luz promedio del día actual (Billmeyer y Saltzman, 1981).

Las serie de la CIE de iluminantes "D" (luz de día) son iluminantes por definición, representando el promedio de la luz natural de día, pero hasta ahora no hay fuentes artificiales disponibles que las duplique.

Una fuente puede ser también iluminante, como son la A, B y C porque sus potencias espectrales relativas son conocidas, y en tales casos es correcto hablar de iluminantes. Todas las fuentes estándar tienen hoy sus correspondientes iluminantes, pero no todos los iluminantes estándar tienen sus fuentes correspondientes.

En 1931 la CIE recomendó el uso de fuentes estándar A, B y C. El aumento en el uso de los agentes de blanqueamiento fluorescente hizo necesario especificar otros iluminantes conteniendo potencias en la región ultravioleta. En 1965 la CIE recomendó una serie de iluminantes para suplementar los A, B y C, basados en los estudios de la potencia espectral relativa de la luz natural de día. Estos, representan promedios de la luz de día sobre el rango del espectro de 300-830 nm y tienen correlacionadas las temperaturas de color entre 4000 y 25000K. El más importante de ellos es el D65 con una temperatura de color de 6500K. Las recomendaciones establecidas son: para uso general en colorimetría los iluminantes A y D65 deben ser suficientes.

La iluminación tiene aspectos prácticos en los alimentos ya que se puede mejorar su aspecto por el uso de iluminantes adecuados; por ejemplo, la luz de tungsteno o los tubos con una temperatura de color de 3200K, son recomendable en los casos donde debe realizarse el rojo, naranja y amarillo (carnes, tomates, cítricos). Las verduras son mejor vistas con tubos de 5500K de temperatura de color (realzando los verdes). Para otros productos como los lácteos el público prefiere la luz más parecida a la natural, optándose por tubos fluorescentes de 6500 o 7500K, con un alto rendimiento de color (Lozano, 1978).

I.5.1.2. Objeto

El objeto puede absorber, o por el contrario reflejar o transmitir, una parte o la totalidad de la luz que recibe. La proporción de luz que refleja o transmite puede variar según la longitud de onda de la luz incidente (Swatland, 1995), debido a que los pigmentos absorben más a unas determinadas longitudes de onda que a otras. Así, el objeto resulta caracterizado por un espectro de reflexión. Un objeto blanco refleja el 100% (en la práctica entre 90 y 100%) de la energía a todas las longitudes de onda, por el contrario, uno negro absorbe el 100% de la energía incidente a cada longitud de onda. Cuando el objeto refleja el mismo porcentaje de energía a todas las longitudes de onda se ve de color gris, mientras que si solo refleja la luz incidente blanca entre 500 y 600 nm aparece verde.

Al comparar entre sí dos objetos que tengan el mismo espectro de reflexión, se observa que producen siempre el mismo estímulo fisiológico, cualquiera que sea la luz incidente (Lozano, 1978).

La estructura física del objeto, al igual que la naturaleza química de sus componentes, afectan a la reflectancia (Swatland, 1994; Swatland, 1995). Si la luz incide sobre un objeto transparente o translúcido (líquido o gel) una porción de ésta pasa a través de él, otra porción de luz puede ser transmitida directamente, y la restante refractada en varios grados. De aquí que la luz transmitida no tendrá la misma composición espectral e intensidad que la luz reflejada de la superficie del objeto. La luz reflejada o transmitida que proviene del objeto es el estímulo visual. Esta luz también

es la que se emplea para efectuar la medición objetiva del color (Jacobson, 1972).

Cuando la luz incide sobre un determinado cuerpo (sólido, líquido o gas) se producen diferentes fenómenos ópticos (difracción, dispersión, transmisión, reflexión) (Swatland, 1994). Estos fenómenos son difíciles de separar, pero son selectivos en mayor o menor grado, según la naturaleza del medio y la posición del observador. De todos ellos, la absorción de la luz es la que más influye en el color, aunque en determinados casos los otros tengan una importancia relativa.

Según su forma de interacción óptica con la luz, podemos clasificar los cuerpos en transparentes (dejan ver perfectamente a través suyo), translúcidos (no dejan ver pero dejan pasar la luz) y opacos (no dejan pasar la luz). A su vez los cuerpos opacos pueden ser brillantes o mates (Mabon, 1993). El fenómeno óptico que se forma predominante determina el color para cada uno de estos cuerpos y constituye lo que es percibido por el ojo (Szczesniak, 1983). De esta manera, en los cuerpos que dejan pasar la luz a través suyo, el análisis de la luz transmitida para cada longitud de onda (espectro de transmisión) constituye la descripción del color físico. En los cuerpos opacos la radiación es absorbida parcialmente por la superficie del producto; el porcentaje de la luz que es reflejada por el cuerpo, para cada longitud de onda, constituye el espectro de reflexión. Cuando la superficie del cuerpo es perfectamente pulida, la mayor parte de los rayos reflejados salen de la superficie con el mismo ángulo (igual al de incidencia de la luz), con lo que se puede analizar la luz reflejada con un determinado ángulo de observación (en general 45°) esto se denomina análisis de la reflexión especular. Para los casos en que la transmisión, así como la reflexión de luz en la muestra, se produce en diferentes ángulos (debido a la presencia de partículas en suspensión en los cuerpos translúcidos, o a superficies rugosas en los cuerpos opacos) es necesario el uso de esferas integradoras para analizar la luz transmitida o reflejada difusamente. Estos dispositivos permiten sumar físicamente la intensidad de todos los rayos de luz procedentes de la muestra y obtener el % de luz reflejada o transmitida difusamente para cada longitud de onda. En cualquier caso se puede obtener el espectro visible de la muestra que será su color físico. Para la obtención del mismo, se utilizarán los espectrofotómetros, con o sin esfera

integradora y con o sin diferente ángulo de observación para la medición de la reflexión especular (Lozano, 1978).

1.5.1.3. Observador

Cuando el ojo humano mira un objeto expuesto a una luz incidente, la intensidad energética de la luz que percibe el ojo no es la de la luz reflejada por el objeto, sino la que resulta de multiplicar, para cada longitud de onda, la energía del espectro de reflexión del objeto por el valor de la visibilidad relativa a la misma longitud de onda. La intensidad luminosa de un objeto, tal como la percibe el ojo, se llama claridad del objeto. En la práctica, el problema es todavía mucho más complejo, debido al hecho de que normalmente el ojo percibe al mismo tiempo la luz incidente y la reflejada.

El ojo presenta, como instrumento de medida, características muy particulares, pues no es sensible de igual forma a iluminaciones de diferentes longitudes de onda.

Existen distintos fenómenos, de naturaleza psicofisiológica, que afectan nuestra visión. Por una parte, la adaptación a la luz o a la oscuridad modifica los umbrales de percepción, por otro lado los efectos de contraste afectan nuestra percepción de los colores. No obstante, nuestra experiencia y memoria visual evitan que consideremos como diferencias de colores las modificaciones de apariencia debidas únicamente a diferencias de iluminación o a las irregularidades de la superficie o de las capas internas del objeto. Con los observadores se permite evaluar la luminancia de una luz dada desde el punto de vista perceptivo (no fotométrico) (Lozano, 1978).

En 1931 la CIE estableció la segunda recomendación más importante en la medida del color, que fue la del observador estándar cuya visión del color es representativa del promedio de la población humana con una visión normal del color. En 1964 la CIE estableció el observador estándar suplementario (Gilabert, 1992). El observador de 2° es usualmente denominado observador estándar 2°, y el observador suplementario se denomina observador 10° (UNE, 1984). El observador 10° es el más ampliamente utilizado. Strocka y Brockes (1970) señalaron que había una

escasa concordancia entre la estimación visual usualmente llevada a cabo en la práctica (gran campo de visión) y la de los 2° del observador estándar. Una mejor concordancia con el promedio de la estimación visual puede obtenerse por el uso del observador 10°. Si de otra forma el observador 2° se usa adecuadamente (pequeño campo de visión) se obtiene una muy buena concordancia con el observador actual (Billmeyer y Saltzman, 1981). El observador 2° también se le denomina observador patrón de colorimetría para un campo focal (UNE, 1982), mientras que al observador patrón para campo visual amplio

El observador estándar 2° y el 10° satisfacen bien las necesidades de la colorimetría, aunque éstas sean ligeramente inexactas si se comparan con las propiedades del ojo. El uso del observador de 2° es bueno cuando se necesita una función más exacta de juego de colores para la investigación del color y la visión. Es interesante saber que la edad juega un papel importante en la determinación del observador, ya que con los años los lentes del ojo se tornan más amarillos y ocasionan diferentes interpretaciones de la luz del día, incluso al extremo de no poder diferenciarla con la luz del sol en el horizonte (Billmeyer y Saltzman, 1981).

I.5.1.4. Entorno

La forma, el tamaño y el color del fondo sobre el cual está el alimento, modifican la sensación que sobre el observador produce un determinado color (Giese, 1995).

I.6. IMPORTANCIA DEL FLAVOR EN LA CALIDAD INTEGRAL DE LOS ALIMENTOS

Para los seres humanos, los alimentos son más que una necesidad biológica para sobrevivir. Las comidas son el primer nexo para la mayoría de las interacciones: familia, negocios, cortejo, aflicción, etc. Los alimentos pueden otorgar funciones fisiológicas variadas tales como: un afrodisíaco, un estímulo estético o antiestético, un estímulo narcótico y un consuelo. Excepto durante el trabajo extremo y la privación, la habilidad de los

alimentos para otorgar estas sutiles necesidades humanas esta unido a los valores sensoriales del sabor, olor y textura. El *flavor*, el resultado de la sensación combinada de sabor y aroma (Kataoka y col., 2000), es otro de los mayores criterios de la aceptación de un producto alimenticio por parte del consumidor. Consecuentemente, el monitoreo del *flavor*, en cualquier forma, es parte de la investigación, desarrollo, producción y control de calidad de productos alimenticios. Más aún, la falla de los alimentos para satisfacer expectativas en el *flavor* podría a menudo señalar un peligro a la salud asociado con contaminación o daños posterior a su elaboración (Whitfield, 1998). Por estas razones, también como por razones comerciales, los que producen, embarcan, compran, venden y especialmente los consumidores de alimentos necesitan medios confiables para determinar la calidad del *flavor* de un alimento.

I.6.1. Medición del *flavor* en alimentos

El monitoreo del *flavor* comúnmente se realiza a través de la evaluación sensorial. Los paneles conformados por evaluadores entrenados pueden identificar descriptores para determinar mejor la calidad de un cierto producto y detectar modificaciones debido a *off-odors* y *off-flavors*. Sin embargo, los paneles entrenados consumen tiempo, tienen un alto costo y limitaciones relacionadas a la susceptibilidad y variabilidad humana, ambos dentro y entre panelistas (Pearce y Gardner, 1998). De esta manera algún método alternativo para medir el *flavor* de los alimentos en forma rápida, cuantitativa, reproducible e instrumental sería bienvenido por la industria alimenticia y sus facilidades para la investigación.

El *flavor* de un alimento es el resultado del efecto combinado de compuestos con diversas estructuras químicas, presentes en un amplio rango de concentraciones, con importantes contribuciones a concentraciones tan bajas como partes por billón (Nursten, 1997, Kataoka y col., 2000).

El análisis de compuestos volátiles del *flavor* ha cambiado para los investigadores en el transcurso de los últimos 40 años. En la segunda mitad del último siglo la investigación analítica realizó grandes avances en la dirección de obtener métodos altamente sensibles y selectivos para aislar y

caracterizar los compuestos responsables del *flavor* en alimentos y bebidas. Ejemplos de estos avances son el café con 800 y la carne cocida con 670 constituyentes volátiles identificados. En el caso de productos lácteos en una investigación desarrollada por Shiratsuchi y col. (1994a) fueron identificados en leche descremada en polvo 187 componentes volátiles. Estos ejemplos muestran el problema de la investigación actual del *flavor*; la gran cantidad de constituyentes que se identificaron (500 en 1960 y ahora más de 6000), o pueden ser identificados, está incrementando todo el tiempo, mientras que establecer su importancia para el *flavor* del producto resulta una tarea muy compleja (Nursten, 1997).

El objetivo de la investigación del *flavor* no es identificar tantas sustancias individuales como sea posible, sino introducir métodos que permitan conocer el impacto de éstas sobre el *flavor*, y así dirigir la investigación hacia los constituyentes más relevantes (Stevenson y col., 1996). Aunque varios métodos, empleando instrumental altamente eficiente tales como cromatografía gaseosa (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y su combinación con espectrometría de masas (MS), se desarrollaron para el análisis de alimentos, la mayoría de los métodos instrumentales no pueden manejar las matrices directamente.

Los métodos analíticos, en general, involucran procesos tales como muestreo, preparación de muestra, separación, detección y análisis de los datos. Más del 80% del tiempo del análisis se utiliza en las etapas de muestreo y preparación de la muestra tales como concentración, fraccionamiento y aislamiento de los analitos. De allí, la importancia que la elección de un método apropiado de preparación de muestra tiene sobre la confiabilidad y exactitud del análisis de un alimento (Kataoka y col., 2000). Con el objetivo de lograr métodos confiables y prácticos para el análisis de compuestos volátiles en matrices complejas tales como las muestras de alimentos, un número considerable de métodos (Majors, 1991, 1992) se desarrollaron incluyendo destilación por corriente, extracción con solventes orgánicos, surfactantes y fluidos supercríticos, y extracción en fase sólida. Métodos como estos se aplicaron a leche y productos lácteos por muchos años. Adda, 1986; Hammond, 1989; Badings, 1991; Bosset y Lavanchy, 1991; Calvo y de la Hoz, 1992; Imhof y Bosset, 1994; McSweeney y col., 1997 realizaron revisiones útiles de los resultados obtenidos. Sin embargo,

los métodos previamente mencionados presentan algunas desventajas, tales como: requerir etapas exhaustivas de concentración, consumir gran cantidad de tiempo y requerir grandes volúmenes de muestras y solventes. Por ejemplo, un tiempo de preparación de muestra largo limita el número de muestras y los procedimientos multi-etapas son propensos a la pérdida de analitos. Además, el uso de grandes volúmenes de solvente afecta el análisis de trazas, y provoca contaminación ambiental, riesgo para la salud del personal de laboratorio, y costos operacionales extras para el tratamiento de efluentes. Por otro lado, los métodos de análisis de espacio de cabeza y purga y trampa son simples, menos laboriosos, más rápidos y son técnicas libres de solventes. Estos métodos tienen algunas desventajas, tales como el riesgo de contaminación cruzada y fugas (Kataoka y col., 2000). De allí, es evidente que hay una necesidad de disponer de técnicas más rápidas y simples que reduzcan o eliminen estos problemas.

La microextracción en fase sólida (SPME) desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990 (Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y col., 1994) es una técnica analítica que puede resolver las dificultades mencionadas previamente y puede ser aplicada a la detección de compuestos volátiles del *flavor* en productos lácteos. SPME es un método libre de solvente que extrae y concentra analitos desde una variedad de matrices particionando a ellos desde una fase líquida o gaseosa a una fase estacionaria apropiada inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida. El método ahorra tiempo de preparación de muestra, compra de solventes, disminuye costos, y puede mejorar los límites de detección (Zhang y col., 1994). SPME se emplea rutinariamente en combinación con GC y GC-MS, y se aplicó, obteniéndose resultados satisfactorios, a una amplia variedad de compuestos de muestras ambientales, biológicas y de alimentos (Zhang y col., 1994; Eisert y Levsen, 1996; Mariaca y Bosset, 1997; Harmon, 1997; Louter y col., 1999). Además, SPME mostró ser un método muy sensible para el análisis de espacio de cabeza (Hawthorne y Miller, 1992; Zhang y Pawliszyn, 1993). Sin embargo, es de destacar que todos los métodos previamente mencionados, aún SPME, presenta la desventaja de que los componentes volátiles a ser determinados no se encuentran embebidos en la matriz original, la cual juega un rol clave en la percepción del *flavor* (Mariaca y Bosset, 1997). Debido a esta razón hay un gran interés en el área de

análisis de aromas en alimentos, en el uso de un nuevo tipo de instrumento llamado “nariz electrónica” (NE), el cual permite investigar los componentes volátiles responsables del *flavor* directamente en la matriz original.

Los últimos avances tecnológicos en dispositivos de sensores de gas, junto con el gran desarrollo de la industria electrónica y la inteligencia artificial, permitieron el desarrollo de la NE que, a semejanza del sistema olfativo humano, permite identificar olores. Esta nueva instrumentación, significó un importante desarrollo para el estudio de *flavors* y *off-flavors* en alimentos. Este nuevo concepto de instrumentación se enmarca en el campo de la digitalización, la simulación y la ampliación de los sentidos humanos como ya se hizo con la visión y la audición.

La NE es un instrumento que, puesto en contacto con una sustancia gaseosa, puede identificar la presencia de compuestos químicos o combinaciones de ellos y categorizarlos en un número acotado de clases previamente definidas. La sustancia gaseosa se fuerza a ponerse en contacto con un sistema sensor constituido por varios dispositivos o sensores, basados en distintas tecnologías, como son los sensores de óxido de metal, cristales de cuarzo, celdas electroquímicas y polímeros conductores que cambian algunas propiedades, como su conductividad eléctrica, frecuencia de oscilación, etc., ante la presencia de ciertos compuestos químicos dentro de una mezcla gaseosa. Es de destacar que cada uno de los sensores no responde de igual manera a las diversas especies químicas presentes. El conjunto de señales, que se conoce como vector respuesta, permite obtener una “huella digital” de la sustancia gaseosa, la cual se transmite automáticamente a un sistema de reconocimiento que asocia el conjunto de señales con una categoría previamente aprendida. Este proceso es, en líneas generales, el empleado por el sistema olfativo de los mamíferos. El aire se fuerza a entrar en contacto con la mucosa olfativa donde hay numerosas células específicas (sistema sensor). Las señales nerviosas se procesan, aunque en diversas etapas, por el sistema nervioso central (sistema de reconocimiento). Los olores, resultados de la combinación de múltiples impulsos eléctricos, se asocian en categorías previamente aprendidas (olores específico, desagradables, etc.). En los últimos años se publicaron una gran cantidad de artículos sobre la aplicación de la NE, principalmente en relación a la

industria de los alimentos y de las bebidas (Hudon y col., 2000), y también en tópicos relacionados al ambiente, agricultura, medicina e industria automotriz. Sin embargo, el número de estudios dedicados a los productos lácteos es aún limitado, probablemente debido a la complejidad de sus matrices.

De acuerdo a lo expuesto previamente no hay un método universal para el análisis simultáneo de todos los componentes volátiles responsables del *flavor* de un alimento. Cada método presenta ventajas y desventajas, de allí que haya varios caminos para resolver un problema. Así, el uso combinado de la NE y de SPME-GC podría constituir una herramienta valiosa en investigación para el estudio del *perfil de flavor* de leche entera en polvo. Además, la aplicación de SPME-GC en paralelo a la de NE podría ser el punto de partida para la calibración de la NE en sí misma, lo cual es una importante fase de este instrumento.

Por otro lado, es importante hacer notar que en la industria de los alimentos el monitoreo de productos en términos de control de calidad del proceso de producción (ejemplo: mezclado, calentamiento, secado, cocido, fermentación, extrudado, etc.) se realiza, en general, vía mediciones físico-químicas, por ejemplo: pH, color, concentración de determinados compuestos químicos o biomoléculas generalmente determinados por espectroscopia (FTIR, NIR, UV-Vis, etc.) (Ampuero y Bosset, 2003) y esto no tiene en cuenta la extrema importancia del *flavor* como indicador de calidad y conformidad del producto. Esto se debe principalmente a la ausencia de instrumentos confiables para la medición del *flavor* y la complejidad de emplear paneles sensoriales para el registro continuo del *flavor*. La NE tiene el potencial para cumplir esta tarea. La principal ventaja de la NE respecto a los paneles sensoriales es que, una vez calibrada, ella puede realizar determinaciones en forma continua con un mínimo costo. De esta manera, la posibilidad de emplear una instrumentación confiable para el control de las propiedades de los alimentos puede encontrar aplicaciones importantes en la industria de los alimentos, en particular en aquellas relacionadas con la elaboración de productos lácteos. Más aún, la necesidad incrementada en proteger la salud de los consumidores puede promover el uso de la NE en muchas etapas del procesamiento de estos productos.

I.7. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LOS CAMBIOS DE COLOR DE LOS ALIMENTOS

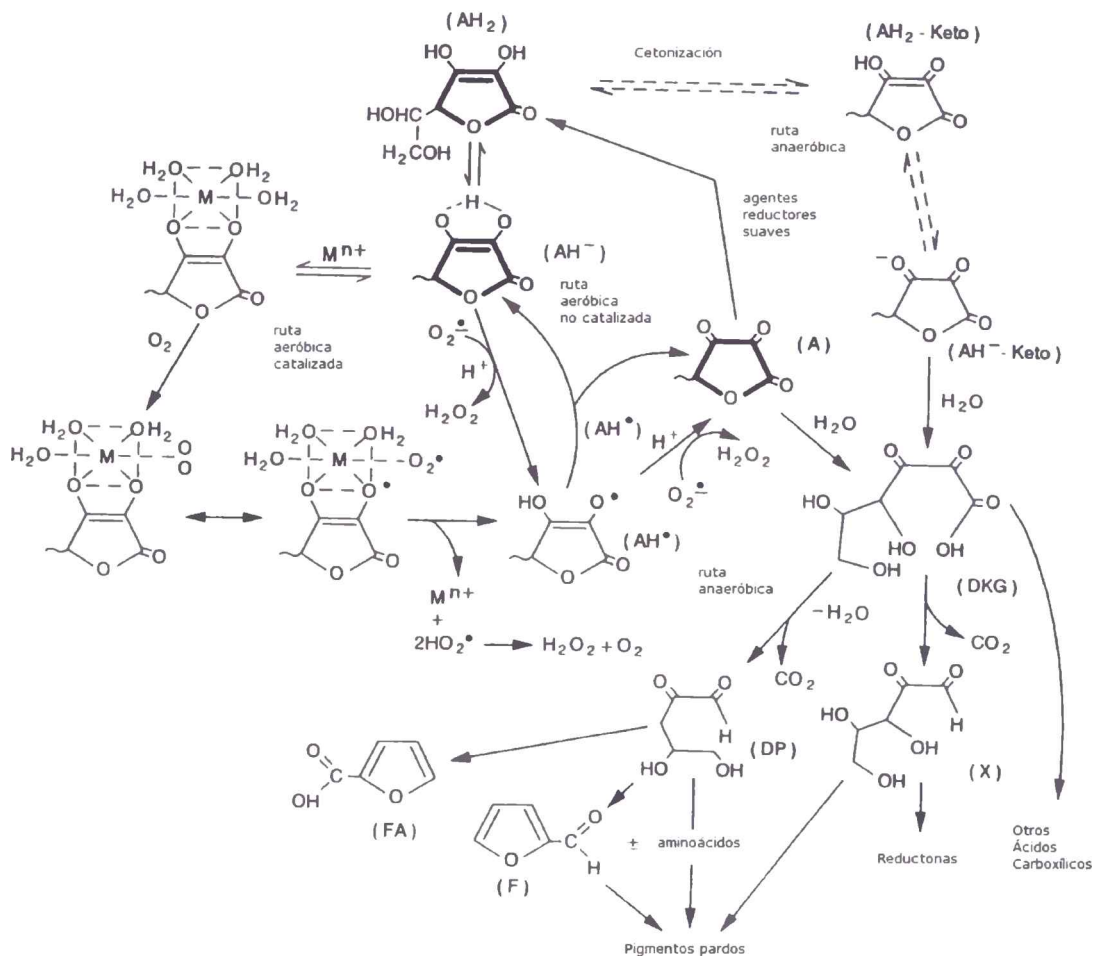
I.7.1. Reacciones de amarronamiento no enzimático

La reacción de Maillard es una de las cuatro reacciones de amarronamiento no enzimáticas que ocurren en alimentos. Las otras tres son:

1. La degradación del ácido ascórbico,
2. Peróxidación lipídica,
3. Caramelización

La química de estas reacciones está relacionada a la reacción de Maillard.

El ácido ascórbico sufre una reacción química similar a la de los azúcares excepto que, en este caso, los aminoácidos no son necesarios para el amarronamiento. El ácido ascórbico es muy reactivo y se degrada por dos caminos, ambos de los cuales conducen a la formación de intermediarios dicarbonilos y subsecuentemente a la formación de compuestos marrones (Davies y Wedzicha, 1992). La **Figura 4** demuestra la influencia del oxígeno y los metales pesados en las rutas degradativas del ácido ascórbico y en los productos resultantes de la reacción (Gregory III, 1996).



Fuente: Gregory III, 1996

Figura 4. Degradación del ácido ascórbico.

En presencia de oxígeno, el ácido ascórbico se degrada fundamentalmente vía su monoanión (HA^-) produciéndose ácido dehidroascórbico (A); la ruta precisa y la velocidad global depende de la concentración de catalizadores metálicos (M^{n+}) presentes en el sistema. La velocidad de la reacción no catalizada no es proporcional a la concentración de oxígeno si la presión parcial de esta es baja. A presiones parciales inferiores a 0,40 atm, la velocidad de la reacción parece estabilizarse, lo que indica una ruta oxidativa distinta; posiblemente se trata de una oxidación directa mediada por radicales hidropéroxilo ($\text{HO}_2^\cdot$) o peróxido de hidrógeno.

Por el contrario, la velocidad, en la ruta catalizada, es proporcional a las presiones parciales de oxígeno por encima de 0,19 atm. La ruta que se

ha postulado implica la formación de un complejo metal-anión, $\text{MHA}^{(n-1)+}$ que se combina con el oxígeno rindiendo un complejo metal-oxígeno-ligando, $\text{MHAO}_2^{(n-1)+}$. Este último complejo tiene la forma de resonancia de un dirradical que se descompone rápidamente para dar el radical anión ascorbato (A^-), el ion metálico original (M^{n+}) y ($\text{HO}_2^\cdot$). El radical anión (A^-) reacciona después rápidamente con el O_2 para originar ácido dehidroascórbico (A).

En la ruta oxidativa no catalizada, el anión ascorbato (HA^-) sufre el ataque directo del oxígeno molecular en una fase limitante de la velocidad, produciéndose primero los radicales aniónicos ($\text{A}^\cdot$) y ($\text{HO}_2^\cdot$) que rápidamente se transforman en (A) y H_2O_2 .

El esquema de la degradación anaeróbica, que se muestra en la **Figura 4** es especulativo. El ácido ascórbico reaccionaría vía su cetotautómero ($\text{H}_2\text{A-ceto}$). El tautómero estaría en equilibrio con su anión ($\text{HA}^- \text{ceto}$) que sufriría una deslactonización a 2,3-dicetoglucónico (DKG). Aunque la ruta anaeróbica puede operar en presencia de oxígeno, su contribución al proceso global es muy baja, ya que incluso la velocidad del proceso oxidativo no catalizado es mucho mayor que la del anaeróbico a temperatura ambiente. Por lo tanto, ambas rutas pueden ser operativas en presencia de oxígeno pero dominan claramente las oxidativas. En ausencia de oxígeno, los catalizadores metálicos no influyen en el proceso; sin embargo, ciertos quelatos de Cu^{2+} y Fe^{3+} se comportan como catalizadores independientemente de la concentración de oxígeno, siendo la eficacia catalítica dependiente de la estabilidad del quelato metálico.

En la **Figura 4** se muestra también la degradación más allá del DKG. Aunque desde el punto de vista nutricional estas reacciones no tienen importancia (el valor nutritivo se ha perdido ya), si la tienen desde el punto de vista organoléptico, ya que la descomposición del ácido ascórbico va estrechamente unida al pardeamiento no enzimático de algunos productos.

La xilosona (X) puede formarse por simple descarboxilación del DKG, mientras que la 3-desoxipentosona (DP) se origina por β -eliminación en el C_4 del DKG, seguida de descarboxilación. Puede que sea la velocidad de acúmulo de DKG lo que influye en la forma de descomposición de dicho

ácido o que puede que dependa de una interacción más específica con A. En cualquier caso, la reacción en esta fase empieza a comportarse como las reacciones de pardeamiento no enzimático que afectan a otros carbohidratos. La xilosona se transforma posteriormente en reductonas y etilglioxal, mientras que el DP se degrada a furfural (F) y ácido 2-furancarboxílico. Cualquiera de estos compuestos puede combinarse con aminoácidos y contribuir al pardeamiento de los alimentos.

En presencia de otras sustancias (por ejemplo, proteínas y antioxidantes), las reacciones de oxidación (tanto enzimáticas como no enzimáticas) pueden finalizar al combinarse los productos con otras sustancias distintas a las obtenidas mediante la oxidación del substrato lipídico, lo que puede influir en la velocidad de reacción. Por ejemplo, se sabe que algunos productos del pardeamiento no enzimático actúan como antioxidantes. También los grupos básicos de las proteínas pueden catalizar la condensación aldólica de los carbonilos producidos en la oxidación de los lípidos y dando lugar a la formación de pigmentos oscuros. Además, los hidroperóxidos lipídicos pueden inducir la oxidación de proteínas ricas en azufre, dando lugar a pérdidas nutritivas significativas (Nawar, 1996). Por su parte, los productos secundarios de oxidación de los lípidos pueden iniciar reacciones con las proteínas por medio de radicales libres o formar productos de adición del tipo de bases de Schiff con los grupos amino de la lisina dando lugar a la formación de pigmentos coloreados (Hermosin y col., 1992; Nawar, 1996). También se ha demostrado que en las emulsiones los carbohidratos libres pueden aumentar la velocidad de oxidación de los lípidos (Nawar, 1996).

El calentamiento directo de los carbohidratos (temperaturas > 80°C), particularmente de azúcares y jarabes, da a lugar a un complejo grupo de reacciones denominadas en conjunto "caramelización". La reacción es favorecida por pequeñas cantidades de ácidos y ciertas sales. La termólisis inicial o suave provoca cambios anoméricos, alteraciones del tamaño del anillo y ruptura de los enlaces glicosídicos nuevos. En la mayor parte de los casos, sin embargo, la termólisis provoca reacciones de deshidratación con formación de anillos. Estos últimos constituyen formas intermediarias en la formación de anillos insaturados como los furanos. Los dobles enlaces

conjugados absorben luz y poseen por tanto color. A menudo, en estos sistemas de anillos insaturados se producen condensaciones que dan lugar a sistemas poliméricos, los cuales poseen color y aroma (Bemiller y Whistler, 1996).

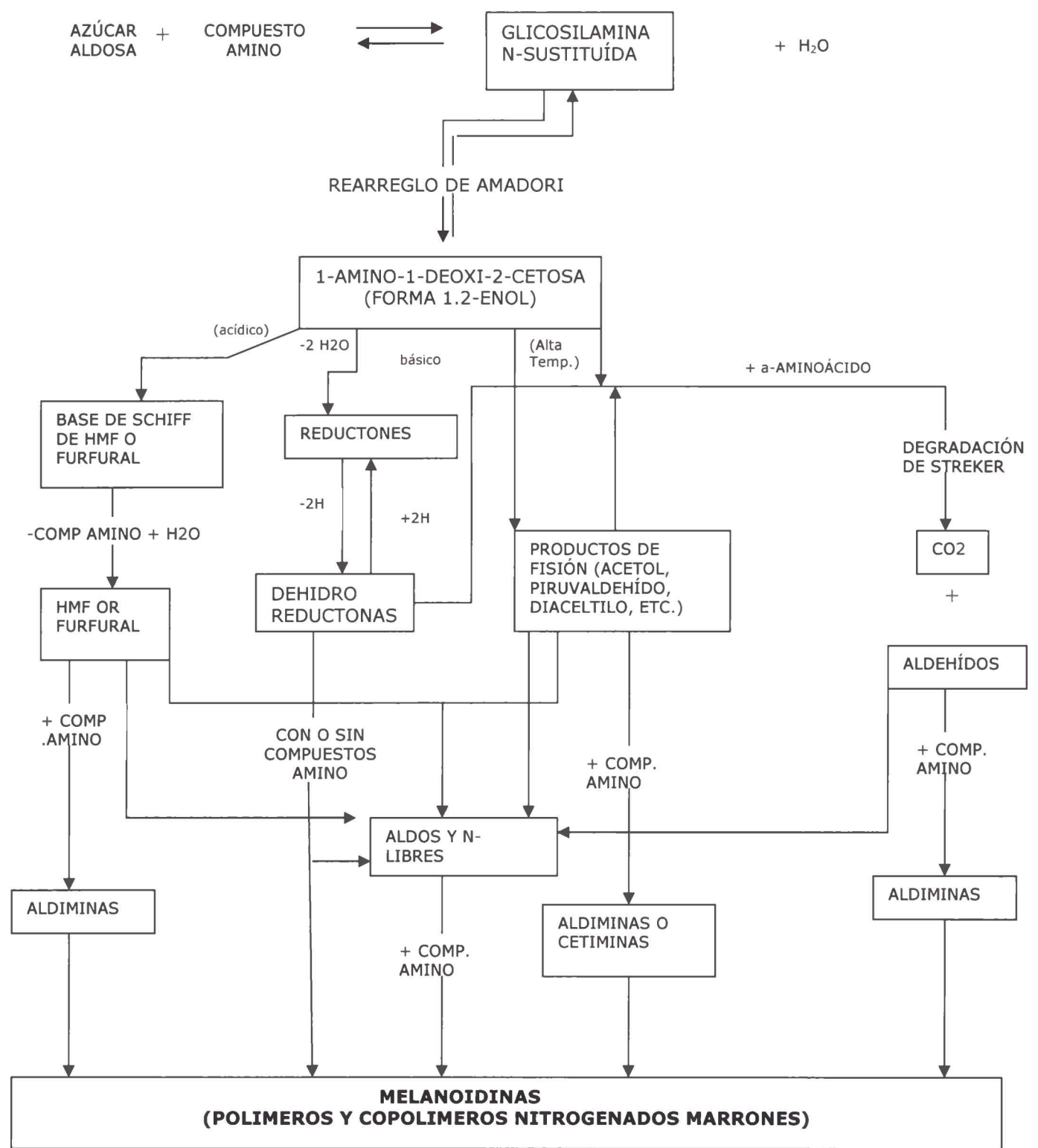
I.7.2. Reacción de Maillard

La química de la reacción de Maillard es conocida como una serie de reacciones complejas que conducen a una variedad de productos, incluyendo compuestos de *flavors*, aromas y compuestos coloreados considerados importantes en la ciencia de los alimentos.

El esquema clásico de la reacción es aquel mostrado en la **Figura 5** (Hodge, 1953). La reacción de Maillard fue primero descrita como una reacción entre un azúcar reductor y un aminoácido, pero ahora incluye muchos otros carbohidratos y grupos amino.

El mecanismo de la reacción de Maillard se muestra en la **Figura 5**. El mismo, generalmente, se divide, en tres estados (Lee y Nagy, 1983; Mauron, 1981):

1. El primer estado involucra una condensación del azúcar con el grupo amino y reordenamiento de Amadori. En este estado no ocurre amarronamiento.
2. El segundo estado involucra la deshidratación, fragmentación, y degradación del aminoácido vía la reacción de Strecker especialmente a temperaturas altas. Al final de este estado hay un comienzo de formación del *flavor*
3. Formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos. En este estado ocurre amarronamiento.



Fuente: Hodge, 1953

Figura 5. Esquema de Hodge modificado para amarronamiento no enzimático.

Los mayores factores que afectan la velocidad de desarrollo del color y el *flavor* son la secuencia tiempo-temperatura, el perfil contenido de agua-actividad acuosa, perfil tiempo vs. concentración, tipo de reactantes, estado de la solución (solución diluída a supersaturada).

La mayor importancia de la reacción de Maillard es la formación de color, aroma y sabor, principalmente durante el procesamiento. De esta manera, la reacción de Maillard da lugar a compuestos coloreados y compuestos del *flavor* los cuales son parte de la aceptación de un alimento en el caso del dulce de leche. Sin embargo, algunos cambios causados por la reacción de Maillard no son deseados y alteran la calidad de un producto alimenticio, haciéndolo desagradable en apariencia y para comer, ejemplo: el amarronamiento de leche en polvo (Ames, 1990).

Un aspecto a considerar de la reacción de Maillard es que a medida que la proteína reacciona con los compuestos reductores para formar los productos de Amadori y otros intermediarios, estos luego sufren reacción y polimerización, reduciendo la solubilidad de la proteína. El sitio reactivo más probable sobre una proteína para la reacción de Maillard es el grupo ϵ -amino del aminoácido esencial L-lisina. De esta manera se produce un pérdida del valor nutricional.

Cuando los lípidos están presentes en un sistema alimentario, ejemplo: leche en polvo, es posible que la presencia de tocoferol (vitamina E) reduzca la velocidad de la reacción de Maillard (Hermosin y col., 1992). Sin embargo, si los lípidos se oxidan los productos de la oxidación podrían reaccionar con los aminoácidos, formando compuestos los cuales son similares a los intermediarios de la reacción Maillard. Asimismo, los radicales libres y productos formados durante la peroxidación lipídica podrían reaccionar con los intermediarios de la reacción de Maillard, incrementando la velocidad de la reacción.

Otro factor a considerar es la temperatura de procesamiento. Temperaturas altas provocan la formación de más intermediarios, causando la formación de más productos de reacción durante el almacenamiento. El 3-CH₃-1 butanal, un producto de la degradación de Strecker, es un ejemplo de *off-flavor* formado durante el almacenamiento de zanahorias deshidratadas (Eichner y Wolf, 1983).

I.8. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LOS CAMBIOS DE FLAVOR DE LOS ALIMENTOS

Los defectos en el *flavor* de un alimento aparecen en general cuando la concentración de un constituyente varía considerablemente comparado a su contenido promedio usual. En el caso de leche cruda estas variaciones en la composición pueden tener diferentes causas. Ellas pueden deberse a la fisiología del animal como en el caso de las llamadas leches anormales, o a las variaciones resultantes de transformaciones químicas, físicas o microbiológicas de los componentes de la leche. Los defectos, además, pueden responder a la presencia de *flavors* transmitidos externamente para lo cual la leche actúa como un vector. De este modo, la calidad del *flavor* de la leche en polvo está altamente influenciada por la calidad de la leche cruda. Además, los procesos involucrados durante la elaboración de leche en polvo (tratamientos de calor, concentración y secado spray) provocan cambios en el sabor natural de la leche y la aparición de sabores anormales (Shiratsuchi y col., 1994a,b).

A continuación se describen distintas fuentes de generación de *off-flavors* descritas en "Off-tastes in raw and reconstituted milk" (Kim y col., 2004, FAO Animal Production and Health, paper 35, <http://www.fao.org>).

I.8.1. Producción microbiológica de *off-flavors*

Muchos *off-flavors* y *off-odors* en alimentos se deben al desarrollo de microorganismos que producen una variedad de compuestos (Whitfield, 1998; Beutling, 1996).

En particular, la leche es un medio de cultivo altamente favorable para la vida de los microorganismos debido a su composición química, la cual es rica en varios nutrientes, y a su contenido de agua. De este modo es muy susceptible a alguna contaminación que pueda ocurrir en la producción, procesamiento y comercialización (Kim y col., 2004). Defectos serios del sabor y el olor pueden aparecer debido a la acumulación de

productos que provienen del metabolismo celular o del efecto de sistemas enzimáticos complejos sobre los constituyentes de la leche. Además, muchos cambios indeseables en la calidad organoléptica son posibles cuando las condiciones ambientales conducen a la proliferación de microorganismos y promueven la actividad enzimática. Frecuentemente se habla de leche agria, amarga, frutal, rancia, malteada, con un gusto de *off-flavor* y también de leche sucia, etc., estas formas de daño están asociadas con el crecimiento de levaduras, hongos y bacterias. De esta manera, la calidad microbiológica de la leche entera en polvo es determinada por el número inicial y tipo de microorganismos presentes en la leche cruda a partir de la cual es manufacturada y el grado de contaminación post-proceso (Celestino y col., 1997a).

La leche y los productos lácteos son un excelente medio de crecimiento para muchos tipos de bacterias psicrótrofas, tales como *Pseudomonas fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* y *aeruginosa* (Wilkes y col., 2000) generadoras de *off-flavors*. Por ejemplo: *Pseudomonas fragi* produce butirato de etilo y hexanoato de etilo en leche refrigerada. En vista de sus características ecológicas, la contaminación bacteriana es la más frecuente y la más grande, y su potencial desarrollo debería ser el más temido de todos. Esta contaminación es responsable por dos principales tipos de defectos: el sabor agrio y la lipólisis (Kim y col., 2004).

Los defectos debido a la acidificación son los más frecuentes ya que la flora láctica es uno de los principales contaminantes naturales de la leche, siendo predominantemente de carácter mesofílico. La presencia de esta flora se demuestra por una mayor o menor rapidez de la acidificación, dependiendo de las condiciones de temperatura en la producción, procesamiento, y distribución. La forma de daño es aparente en el sabor agrio, debido no al ácido láctico (el cual es poco volátil, ya que su presión de vapor es baja), sino a la presencia de cantidades más pequeñas de otros ácidos orgánicos (ácido acético, propiónico, o dióxido de carbono). Además, el carácter heterofermentativo de la flora láctica da lugar a una liberación más o menos marcada, en el ambiente, de numerosos compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, alcoholes), aparte de los ácidos mencionados anteriormente. Estos compuestos, cuando se producen en cantidades

limitadas, son algunas veces deseables debido a que ayudan a proporcionar el flavor típico de muchos productos lácteos. Sin embargo, cuando estos compuestos están en altas concentraciones producen un sabor y olor desagradable. Un ejemplo clásico es el diacetilo, el cual en un estado altamente diluido es responsable del sabor a nuez y en un estado más concentrado resulta en un sabor amargo. Además, otros sabores designados como malta, uva o caramelo, se atribuyeron a la proliferación de *Streptococcus lactis maltigenes* (Kim y col., 2004). Las bacterias lácticas no son generalmente resistentes al calor y la mayoría de ellas son destruídas por la pasteurización. Sin embargo, la sobrevivencia o recontaminación de bacterias puede ser responsable por el posterior enranciamiento si las condiciones de temperatura son favorables para su desarrollo. Debido a que la flora láctica predominante en la leche es mesofílica, las condiciones ambientales naturales en regiones de clima templado a cálido son a menudo favorables para su proliferación. El uso de tratamientos de frío en diferentes estadios del procesamiento y la comercialización hacen posible, en la práctica, decrecer considerablemente los peligros de deterioro debido a una proliferación no controlada de estas bacterias lácticas. Sin embargo, debería ser notado que en estas condiciones aún cuando se empleen técnicas de refrigeración la multiplicación de los microorganismos y los cambios provocados por reacciones enzimáticas no son completamente bloqueados y por lo tanto, aún pueden ocurrir cambios irreversibles en la calidad organoléptica del producto (Kim y col., 2004).

Los defectos debido a proteólisis no controlada tienen su origen en la flora bacteriana, la cual contamina a la leche en el tambo y puede inducir proteólisis de variada intensidad dependiendo de las especies en juego, temperaturas y períodos de tiempo. En la práctica, bacterias mesófilas en leche enfriada y bacterias psicrótrofas en leche refrigerada pueden ser la causa de la intensidad variada en la solubilidad de las proteínas de la leche, debido a sus proteasas extra-celulares. Las fracciones de proteínas liberadas (péptidos, aminoácidos, y amino-amonia) pueden ser responsables por el desarrollo de un sabor anormal amargo, pútrido y a amonio. Más aún, aunque la mayoría de las proteasas son sensibles al calor, algunas enzimas provenientes de las bacterias psicrótrofas son

termoestables y sus efectos perjudiciales pueden aparecer aún en productos esterilizados. De allí, los productos lácteos, aunque estériles, pueden deteriorarse durante el almacenamiento debido a las enzimas residuales que no han sido inactivadas (Kim y col., 2004).

La susceptibilidad de la leche a la lipólisis depende de las enzimas lipolíticas y también del estado de la grasa (Kim y col., 2004). Las enzimas responsables de la lipólisis tienen dos orígenes diferentes. Un origen es la leche fresca, la cual contiene varias enzimas lipolíticas (lipasa de membrana, plasma, etc.). Aunque el aislamiento y características de las enzimas originarias de la leche no se elucidaron totalmente, generalmente se reconoce que estas enzimas tienen poco efecto sobre la leche cruda cuando la misma esta en estado de reposo y los glóbulos grasos están intactos. En productos lácteos los cuales se someten a tratamientos de calor por pasteurización (72°C por 15 s) o esterilización (clásica o UHT), se presume que la actividad de estas enzimas es despreciable ya que las mismas se desactivan por el tratamiento de calor. Sin embargo, estudios recientes revelaron casos de reactivación de enzimas causando defectos al producto (Kim y col., 2004). El segundo origen de las lipasas se asocia a la calidad higiénico-sanitaria de la leche en el tambo. Muchas especies de bacterias pueden producir lipasas. Las bacterias psicrótrofas son las de mayor amenaza debido a su habilidad para desarrollar a baja temperatura y a su actividad extra-celular. Los microorganismos más activos y frecuentemente encontrados y las especies de bacterias tienen un período de multiplicación relativamente corto (4 a 24 h) a temperaturas comúnmente aplicadas (0-46°C), aumentando la velocidad de crecimiento en un factor de 5,8 por cada 10°C de aumento de temperatura. En leche, cuando la concentración de microorganismos excede 10^6 UFCml⁻¹ pueden ser detectados sabores desagradables. Cuando el contenido de grasa está parcialmente concentrado (ejemplo: polvos, crema, queso, manteca) los defectos pueden aparecer a niveles más bajos, especialmente durante el almacenamiento prolongado. Muchas lipasas extra-celulares de las bacterias psicrótrofas están caracterizadas por tener una resistencia extremadamente alta al calor, por lo cual ellas solo se desactivan parcialmente por el tratamiento de calor usado en la pasteurización UHT (Cogan, 1980),

esterilización y secado spray (Shamsuzzaman, 1987), aunque las bacterias en sí mismas pueden ser destruidas. De esta manera, los defectos podrían aparecer aún en un medio libre de microorganismos correctamente tratados por calor.

Para obtener un beneficio completo del tratamiento de frío, este se debe aplicar en ambientes donde pocas bacterias psicrótrofas estén presentes. La mejora en la calidad de la leche en el estado de producción, donde el objetivo es inhibir la contaminación con microorganismos observando reglas de higiene estrictas, es de esta manera inseparable de la utilización racional del tratamiento en frío.

1.8.2. Producción de *off-flavors* de fuentes ambientales

Cientos y miles de químicos ambientales son contaminantes potenciales para los alimentos a través de rutas ambientales. La leche, debido a su alto contenido de agua, es uno de los mayores vectores de sustancias extrañas solubles en grasa y agua las cuales causan sabores desagradables. Estas sustancias pueden provenir de la alimentación del animal, también como del ambiente antes y después del proceso de ordeño. Ellas pueden ser transmitidas indirectamente a través del sistema respiratorio y/o digestivo, o directamente por contacto con el producto después del ordeño. La transmisión a través del sistema respiratorio se debe principalmente a compuestos volátiles contenidos en la atmósfera de establecimientos mal ventilados (gases de la alimentación o estiércol; gases eructados por animales saludables o enfermos y la presencia de sustancias extrañas, por ejemplo: combustible fósil, desinfectantes). De este modo resulto posible comprobar el origen de varios olores y sabores tal como: col, ensilaje, vaca y tambo.

La alimentación consumida por el animal es otra causa conocida de sabores y olores desagradables (Urbach y Stark, 1978, Dumont y Adda, 1979). Cuando la vaca se alimenta con forraje fresco o forraje preservado fuertemente saborizado (ensilaje, *cabbaje*, tubérculos silvestres, plantas,

etc.) dos a cuatro horas previas al ordeño, sus características de sabor y olor aparecen en la leche y pueden persistir hasta la eliminación o metabolización del alimento, o algunas veces 12 horas después de la ingestión.

Otra clase de defectos designados como "*flavors* químicos" puede ocurrir por la contaminación de la leche por agentes químicos incluidos en la formulación de detergentes y desinfectantes usados para la limpieza de recipientes y equipamientos.

La mayoría de los tratamientos térmicos tienen poco efecto sobre la eliminación de sabores y olores transmitidos. Solamente tratamientos bajo vacío pueden decrecer el grado de estos defectos, pero su efectividad esta unida al tipo de volatilidad de las sustancias agresoras en las condiciones físicas del tratamiento aplicado.

Otra fuente ambiental de *off-flavors* es el material de empaque de los alimentos.

I.8.3. Producción oxidativa de *off-flavors*

La oxidación lipídica es una de las mayores causas de *off-flavors* y de la pérdida de nutrientes en alimentos que contienen grasa, ocurriendo aún durante el almacenamiento congelado (Wilkes y col., 2000). Esta oxidación provoca, por lo general, una pérdida de calidad comercial y organoléptica del alimento.

El deterioro oxidativo de la grasa involucra una reacción entre el oxígeno y los ácidos grasos de los triglicéridos, especialmente los insaturados. La velocidad de desarrollo de la misma depende del número de insaturaciones de los ácidos grasos, de la superficie de intercambio entre los lípidos y el oxígeno, de la luz, la temperatura, el equilibrio de prooxidantes y antioxidantes naturales, y de la actividad acuosa para los productos deshidratados (Andersson, 1998). Este deterioro causa el desarrollo de varios *flavors*- acartonado, metálico, pescado o aceite.

La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfátidos de la membrana globular, desencadenada por medio de radicales libres, induce a la formación de hidroperóxidos, como productos primarios de los procesos de oxidación, cuya aparición es concurrente con aquella de dienos y trienos conjugados. Los productos secundarios de la reacción son la formación de alcoholes, ácidos, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables por los defectos previamente mencionados (**Figura 6**). Por ejemplo: propanal, un conocido *off-flavor*, puede servir como indicador confiable del deterioro del *flavor* para pescados, mientras que el hexanal puede tener la misma función para carnes (Wilkes y col., 2000). Ulberth y Roubicek (1995), encontraron una buena correlación entre hexanal y el valor peróxido en leche en polvo.



Fuente: Sánchez-Moreno y Larrauri (1998)

Figura 6. Esquema de compuestos producidos en las diferentes fases de la oxidación.

La leche es un sistema biológico complejo que contiene factores que pueden actuar como antioxidantes o prooxidantes. Las cantidades relativas de estos factores, están a su vez influenciados por la raza, la salud, el estado nutricional y el período de lactancia de los animales. Agentes tales como el oxígeno, la radiación energética (luz o radiactiva), la presencia de trazas de metales contaminantes especialmente el cobre y hierro actúan como pro-oxidantes. En el caso de productos lácteos como la leche tratada a ultra alta temperatura (UHT) abusadas por luz se detectaron pentanal, hexanal y heptanal (Marsili, 1999a). En la práctica, con el objeto de reducir estos defectos de oxidación es aconsejable decrecer la contaminación por metales usando materiales realizados en vidrio o acero inoxidable y efectuar el manejo de la leche en recipientes que la protejan de la luz solar y artificial. En el caso específico de la reconstitución de productos lácteos el uso de agua contaminada con hierro o cobre debería prohibirse y la adición de aire durante las operaciones de mezcla y transferencia deberían prevenirse.

Agentes antioxidantes tales como los tocoferoles, el ácido ascórbico, los productos de la reacción de Maillard, y los grupos sulfidrilos ($-SH$) provenientes de la aplicación de tratamientos térmicos a la leche, previenen la formación de sabores desagradables ya que son inhibidores efectivos de la oxidación lipídica (Wilkes y col., 2000).

Las variables de procesamiento y almacenamiento de la leche también ejercen una fuerte influencia en el desarrollo de la oxidación lipídica. Ejemplos de ello, son la actividad acuosa (a_w) y la temperatura de almacenamiento del producto lácteo. Labuza (1971) describió la relación existente entre la actividad acuosa (a_w) y la oxidación lipídica, estableciendo un mínimo en los alimentos cuya a_w este comprendida entre 0.2 y 0.3 y, un incremento en la velocidad de oxidación en alimentos con a_w por debajo y por encima de ese rango. La leche en polvo tiene por lo general, una a_w comprendida en el rango de mínima velocidad de oxidación. Sin embargo, los productos de la reacción de Maillard se forman simultáneamente durante el almacenamiento de la LEP y actúan como antioxidantes. Este hecho dificulta el poder establecer una clara relación entre la velocidad de oxidación y la a_w . Además, la homogeneización provee una efectiva

protección contra la oxidación. Cambios significantes en la superficie y la composición del glóbulo graso y en las estructuras de las proteínas de membranas son probablemente responsables por esta mejora en la estabilidad del flavor. En el caso específico de los productos lácteos preparados con leche recombinada, es esencial obtener una emulsión estable de la materia grasa con el objeto de prevenir un daño rápido.

Una recomendación para el manejo de productos con contenido de grasa como lo es la LEP, la cual debe ser almacenada por largos períodos a temperatura ambiente, es reemplazar el aire atrapado en el producto y en el espacio de cabeza del envase por una atmósfera inerte (CO_2 ó N_2).

En todos los casos el almacenamiento a bajas temperaturas provee una garantía adicional contra el daño por oxidación.

I.8.4. Producción de *off-flavors* debido a los tratamientos por calor

La mayoría de los constituyentes de la leche pueden ser físicamente y químicamente alterados por el tratamiento de calor usado para su preservación. Los cambios resultantes de la aplicación de tratamientos térmicos dependerán de la duración y la temperatura empleada en los mismos, pero también de la sensibilidad específica al calor de los respectivos componentes de la leche. La sensibilidad específica al calor puede ser listada en orden de importancia decreciente, como enzimas libres, lactoproteínas de suero, enzimas, complejos de fosfo y caseinocalcio, lactosa y lípidos.

El tratamiento térmico inactiva completamente las enzimas y destruye la mayoría de los microorganismos resistentes, pero causa grandes cambios en las características del producto, lo cual generalmente decrece la aceptabilidad. Por ejemplo, la alteración será suave para productos pasteurizados, ligeramente intensificada para productos esterilizados por UHT, y más marcada para productos que han sido sujetos a la esterilización convencional larga mediante autoclave.

Como regla, la inactivación de enzimas se obtiene a través de tratamientos de calor normales y pasteurización (60-100°C) la cual da una mejor estabilidad a los productos tratados por calor, y elimina en particular defectos organolépticos debido al desarrollo de proteólisis y lipólisis no controlada en productos larga vida tratados por UHT. Sin embargo, enzimas particularmente resistentes al calor podrían no ser completamente inactivadas. Este es el caso, por ejemplo, de lipasas y fosfatasas termolábiles cuando están protegidas por la fase grasa y/o la fase proteica durante el calentamiento, las cuales son reactivadas en el almacenamiento. Propiedades organolépticas anormales debido a este tipo de lipólisis y proteólisis se informaron, especialmente en productos lácteos derivados de leches que poseen una carga inicial alta de bacterias psicrótrofas.

Muchos cambios en las características de la leche calentada son el resultado directo del daño de las proteínas del lactosuero o interacciones que involucran a las proteínas solubles de la leche siguiendo al tratamiento térmico. El desarrollo de sulfidrilo (-SH) y sulfuro de hidrógeno (H₂S) a partir de la β -lactoglobulina, así como la formación de pequeñas cantidades de sulfuros y mercaptanos libres son modificaciones directas. Estos compuestos imparten un sabor a quemado, decrecen el potencial de oxidoreducción y otorgan una mejor protección de los lípidos contra la oxidación (Nursten, 1997).

Los tratamientos de pasteurización, esterilización y UHT no afectan significativamente a la lactosa pero el daño es mayor cuando más drástico es el tratamiento térmico usado. Bajo estas condiciones se produce una descomposición de la lactosa y se forman ácidos, en particular ácido fórmico, láctico, acético, pirúvico, propiónico, y butírico; así como hidroximetilfurfural y furfuraldehído. Todos estos componentes ayudan a establecer el sabor, olor y color de la leche pero sus respectivos roles aún no se determinaron claramente.

El principal cambio que ocurre en productos lácteos que contienen lactosa es el amarronamiento no enzimático o reacción de Maillard. Esta reacción como se detalló anteriormente requiere poca energía de activación, es autocatalítica y ocurre entre un grupo amino libre de la caseína en su

fase inicial de condensación, especialmente lisina, y un grupo aldehído de la lactosa (Swaisgood, 1996). Esto conduce a la formación de bases de Schiff seguida por el reordenamiento de Amadori y degradación en pigmentos marrones (melanoidinas). El amarronamiento no siempre aparece durante el tratamiento térmico ya que las bases de Schiff formadas pueden degradarse suavemente durante el almacenamiento de productos lácteos secos, líquidos o de humedad media, dando lugar al desarrollo de sabor a caramelo. En términos prácticos, con el objeto de minimizar la reacción de amarronamiento la extensión del tratamiento térmico debe ser limitada y los tiempos y temperaturas de almacenamiento reducidos.

I.8.5. Reacción de Maillard

La producción de *flavor* no es importante en la reacción de Maillard ya que la vasta mayoría de reacciones forman dióxido de carbono, melanoidinas (color) o numerosos compuestos intermediarios. Los aromas derivados de la reacción de Maillard son extremadamente complejos y muchos de los compuestos se forman en cantidades trazas por un sistema complejo de reacciones (Baltes y col., 1989).

I.8.6. Lipólisis

Por lipólisis se entiende a la hidrólisis enzimática de la grasa presente en la leche (triglicéridos) en glicerol y ácidos grasos libres (AGL) (Nawar, 1996). En la leche recién ordeñada aparecen trazas de AGL, mientras que el 98% de los ácidos grasos se presentan esterificados con glicerol, en forma de triglicéridos en los glóbulos grasos (Ferraro, 2004).

Los AGL, particularmente los que tienen entre 4 y 12 átomos de carbono, son los responsables en ciertos productos lácteos de la aparición de gustos anormales (rancio, jabón, etc.). Del mismo modo, los di- y monoglicéridos que también aparecen como resultado de este proceso,

provocan sabores amargos. Es de resaltar que, como los AGL son más sensibles a la oxidación que los ácidos grasos esterificados, los productos que sufrieron un proceso lipolítico presentan menor tiempo de conservación y vida útil (Taverna y Páez, 2002; Martín Hernández, 1991).

La lipólisis no constituye uno de los principales criterios de calidad de la materia prima requeridos por la industria lechera. Sin embargo, en determinados tipos de fabricaciones (manteca, cremas, leche entera en polvo, etc.) esta alteración puede resultar determinante sobre la calidad final de los productos. Lo manifestado queda reflejado en la decisión tomada por las empresas lácteas de numerosos países que incluyen a la concentración de AGL como indicador de la calidad de la leche para su pago. En Argentina, la lipólisis en la leche aparece como un problema reciente, pero de creciente preocupación por parte del sector. La intensificación del sistema de producción asociado al uso de equipamiento de ordeño cada vez más complejo, el enfriamiento y almacenamiento de la leche por períodos de tiempo prolongados, el transporte en cisternas y los numerosos bombeos a los que se somete a la leche son algunos de los factores que explican el incremento de esta problemática (Taverna y Páez, 2002).

Las modificaciones lipolíticas pueden ocurrir por la acción de lipasas propias de la leche y/o lipasas microbianas. La leche tiene una importante actividad lipolítica potencial, dada por la enzima natural de la leche, la lipoproteínlipasa (LPL) (Olivecrona, 1980). Usualmente, la leche fresca contiene entre 1 – 2 mg LPL litro^{-1} (Olivecrona, 1980). La mayor parte de esta enzima está asociada con las micelas de caseína. Hay que tener en cuenta que a pesar que en la leche casi siempre hay suficiente cantidad de enzima para generar lipólisis, esta actividad sólo se expresa bajo ciertas condiciones, tales como: excesiva agitación, adición de aire, shock térmico repetido, y homogeneización, todos los cuales pueden ocurrir en diferentes estados de producción y procesamiento afectando adversamente a la integridad de la membrana del glóbulo graso. Este hecho explicaría la falta de correlación entre la actividad lipásica potencial de la leche y su susceptibilidad a la lipólisis. Los AGL también son generados por lipasas bacterianas termoresistentes. Los defectos de *flavor* aparecen en productos lácteos provenientes de leches cuyos recuentos de bacterias psicrótrofas superan 2×10^6 UFC ml^{-1} (Muir y col., 1978). Sin embargo, esto no es

absoluto ya que pueden existir problemas cuando el recuento de microorganismos no excede de 10^3 UFCml⁻¹, demostrando así que el tipo de bacteria presente es más importante que el número. Además, solo una proporción de bacterias psicrótrofas produce cantidades apreciables de enzimas lipolíticas. Por lo tanto, no necesariamente existe una buena correlación entre el número de bacterias psicrótrofas y los AGL ó el flavor rancio (Muir y col., 1978). De esta manera la concentración de AGL en la leche resulta de la suma de los AGL iniciales más los generados por los 3 tipos de lipólisis: la lipólisis producida por la enzima láctea originaria, en forma espontánea e inducida y la lipólisis microbiana (FIL-IDF N°265, 1991). Los tres tipos de lipólisis no son estrictamente independientes entre sí, ya que a veces el desarrollo de una promueve o complementa otra, por lo que no es sencillo establecer una diferencia clara entre ellas.

I.8.6.1. Lipólisis espontánea

Como lipólisis espontánea se entiende aquellas alteraciones que aparecen sin mayor tratamiento de la leche. El desarrollo e intensidad de la alteración se encuentra directamente asociado al potencial lipolítico natural que presenta la leche. Este es un fenómeno complejo, en el que interactúan en parte factores endógenos individuales de las vacas, tales como estado de lactancia, rendimiento lácteo, metabolismo hormonal, salud de ubre, y factores exógenos, tales como la alimentación, la estación del año y el intervalo entre ordeños (Ferraro, 2004).

I.8.6.2. Lipólisis inducida

La lipólisis inducida aparece como consecuencia de exigencias físicas. En condiciones normales existen dos factores que limitan y evitan el ataque y la degradación de la materia grasa por lipasas:

- La membrana del glóbulo de la materia grasa que aísla y protege a los triglicéridos.

- Las uniones que adhieren las enzimas a las caseínas en la fase acuosa y que impiden el contacto con la fase grasa.

Sin embargo, a partir del momento en que la leche se extrae de la ubre se la somete a diversos factores que afectan la velocidad de la lipólisis inducida. Entre dichos factores se encuentran:

- Tiempo, intensidad y duración de la exigencia mecánica (incorporación de aire, bombeo, agitación).
- Método de refrigeración de la leche.
- Agregado de leches calostrales.
- Contaminación bacteriana.
- Temperatura de la leche.
- Concentración existente de lipasa.
- Contenido y dureza de la grasa.
- Sensibilidad de los glóbulos de grasa.

La lipólisis inducida depende, entonces, de las condiciones en que se desarrolló el ordeño, de condiciones de conservaciones de la leche y del potencial lipolítico que presenta inicialmente o naturalmente la leche (lipólisis espontánea) (Ferraro, 2004).

I.8.6.3. Lipólisis microbiana

Según Ferraro (2004) la lipólisis microbiana tiene una importancia relativa en aquellos tambos en que la leche se extrae y almacena en forma adecuada e higiénica, dado que recién aparecen aumentos de AGL cuando los contenidos de gérmenes se encuentran por encima de 1×10^6 UFCml⁻¹ hasta 10×10^6 UFCml⁻¹.

Las lipasas microbianas de gérmenes psicrotróficos tienen un significado más amplio, dado que en parte son extremadamente resistentes al calor y hasta sobrellevan el calentamiento de UHT. Esto significa que los propios microorganismos son destruidos por el tratamiento térmico, sin embargo sus enzimas todavía pueden ser activas en el producto termizado (Ferraro, 2004).

El significado de la contaminación microbiana para la lipólisis debe ser considerado además bajo el siguiente punto de vista: numerosos microorganismos (***Bacillus sp***, ***Pseudomonas sp***, ***Alcalígenes sp***, ***Enterobacter sp***) poseen la enzima fosfolipasa C, que ataca la capa fosfatídica de las membranas de los glóbulos de grasa y contribuye con ello, a que los triglicéridos estén a disposición tanto de la lipasa láctea como de la microbiana (Ferraro, 2004).

I.8.6.4. Importancia de la lipólisis en el proceso industrial

La concentración total de AGL encontrada en un producto es la suma de aquellos producidos por la lipólisis existente:

- En la leche cruda antes del procesamiento
- Durante el proceso de elaboración
- Durante el almacenamiento del producto.

La principal razón por la cual la lipólisis se origina en la leche y en los productos lácteos es el daño que se causa en los glóbulos grasos debido a la agitación y presión mecánica.

El mayor riesgo de lipólisis está asociado a la actividad de la lipasa normal de la leche que actúa antes de la pasteurización que produce su inactivación. Los procesos térmicos previos al proceso, destruyen la carga bacteriana de la leche, pero no a las enzimas lipolíticas (exógenas termoresistentes). Estas enzimas son especialmente importantes en los productos que tienen una vida útil prolongada y que se almacenan a temperatura ambiente (Stead, 1986; Singh y Newstead, 1998).

Las alteraciones lipolíticas de la leche tienen importancia en muchos sentidos; afectan el resultado de la determinación de grasa, de pérdidas de grasa y la calidad del producto, especialmente las propiedades sensoriales de productos ricos en grasa. La aparición de sabores anormales, por ejemplo de naturaleza rancia o jabonosa en leche en polvo pueden

presentarse si la concentración de AGL se eleva por encima de un nivel crítico cuyo valor depende del producto.

Un grupo de expertos de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF N° 265, 1991) propuso una estimación del riesgo de aumento en la concentración de AGL asociado a cada una de las etapas del proceso productivo y de almacenamiento. El resultado de este estudio indicó que la etapa de producción (bomba de descarga de la industria, silo, tanque balanceador) representa el 60% del riesgo del proceso. De lo expuesto surge claramente que la aplicación de medidas preventivas y correctivas a nivel del tambo constituye un aspecto a privilegiar si se pretende limitar la concentración de AGL en productos sensibles al problema.

I.9. MARCO DEL TRABAJO A DESARROLLAR

El desarrollo económico de un país surge del desempeño que tengan los agentes de su economía. Así lo entendieron los sistemas productivos mundiales, quienes en los últimos años llevaron adelante una importante transformación basada en la incorporación de conocimientos como insumo fundamental para agregar valor a su producción y así mejorar la competitividad. Para el logro de tales objetivos, la "Calidad" es una herramienta crítica. Enmarcada en este contexto, la "calidad" se entiende como aquella que debe acercarse lo más posible a las expectativas que tiene el consumidor de un producto, y en particular la "calidad integral" de los alimentos es un concepto asociado a los aspectos de inocuidad, nutrición, características sensoriales, estabilidad, procesos de preservación y gestión de la calidad, incluyendo la trazabilidad y el cuidado del medio ambiente. La demanda creciente de productos con estas características por los mercados internacionales y la necesidad de asegurar la transparencia del comercio interno y la inocuidad de los productos, crean la demanda de un sistema efectivo de estándares, ensayos, normalización y gestión de calidad. Para ello es necesario contar con capacidades para identificar y evaluar propiedades fisicoquímicas relevantes y validar la caracterización de los productos. Considerando los antecedentes planteados y la importancia que los productos lácteos en general y la leche entera en polvo en particular tienen para la economía nacional se planteo el trabajo desarrollado en la presente tesis cuyos objetivos se plantean a continuación.

I.10. HIPÓTESIS

El perfil de compuestos relevantes en el olor y la evolución del color en leche entera en polvo, bajo prácticas comerciales de procesamiento y almacenamiento, es dependiente de la estación del año.

I.11. OBJETIVOS

I.11.1. Objetivos Generales

- ✓ Contribuir al conocimiento del efecto que tienen los cambios estacionales sobre aspectos relevantes de la calidad organoléptica de la leche entera en polvo.
- ✓ Promover en la industria láctea nacional la implementación de herramientas de análisis objetivas que permitan una evaluación temprana y rápida del perfil de olor de la leche entera en polvo.

I.11.2. Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar el efecto de los cambios estacionales sobre el perfil de olor y la evolución de color en leche entera en polvo recién elaborada y luego de su almacenamiento.
- ✓ Evaluar el efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento sobre el perfil de olor y la evolución de color de leche entera en polvo.
- ✓ Correlacionar el perfil de olor y la evolución del color con parámetros físico-químico.
- ✓ Estudiar la factibilidad del uso de la "nariz electrónica" como herramienta de análisis aplicable a escala industrial.
- ✓ Difundir la información y las conclusiones obtenidas en el sector científico y transferir los resultados obtenidos al medio regional y nacional.

Los cuatro pasos para alcanzar la meta:
planificar con cuidado, organizar con fe,
proceder con seguridad y proseguir con constancia.

William Arthur Ward

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MUESTREO Y ALMACENAMIENTO

Las muestras de leche entera en polvo (LEP) instantánea utilizadas en la presente investigación se obtuvieron a partir de leche cruda proveniente de la Cuenca Lechera Central Argentina. Una vez completado un silo de 250 m³, se procedió a la elaboración de LEP instantánea mediante la aplicación de procesos térmicos de alta temperatura a partir de leche estandarizada. Las condiciones de los tratamientos térmicos usados, previo al proceso de secado de la leche, fueron de 90-93°C durante 3 min (proceso indirecto) y de 105°C durante 30 s (proceso directo). Las condiciones del Secador Spray fueron las mismas para ambos tratamientos térmicos empleados, siendo la temperatura de aire de ingreso 185°C y temperatura de aire de salida de 73°C y garantizando un control estricto de las mismas durante el período de investigación.

Las LEP correspondientes al proceso indirecto se envasaron en bolsas de polietileno de 400 g en caja de cartón en aire y las LEP manufacturadas bajo el proceso directo se envasaron en latas de aluminio de 800 g en atmósfera inerte de N₂.

En el presente trabajo se efectuaron dos tipos de seguimientos:

- **Seguimiento en línea de elaboración:** se colectaron quincenalmente muestras de LEP recién elaboradas durante las distintas estaciones del año (otoño, invierno, primavera y verano) (**Tabla 10**).
- **Almacenamiento estacional:** se colectaron muestras de LEP recién elaboradas en cada una de las estaciones del año. Se envasaron en aire y N₂, almacenándose a 20±0,5°C durante 6 meses y 12 meses respectivamente. Las determinaciones se efectuaron en las LEP recientemente elaboradas, hacia la mitad y final del almacenamiento (**Tabla 11**).

Las muestras se almacenaron a -20±0,5°C inmediatamente después de la elaboración y hasta el análisis.

Tabla 10. Esquema de muestreo del seguimiento en línea de elaboración de LEP.

Estacion	Mes de Elaboracion	N° elaboración por mes		N° muestras por elaboracion	
		TTI ¹	TTD ²	TTI ¹	TTD ²
Otoño	Abril	1	1	3	3
	Mayo	2	2	6	6
Invierno	Junio	1	2	3	6
	Julio	3	2	9	6
Primavera	Agosto	2	2	6	6
	Septiembre	2	2	6	6
	Octubre	2	2	6	6
Verano	Noviembre	1	2	3	6
	Diciembre	3	2	9	6
	Enero	2	2	6	6
	Febrero	1	2	3	6

¹TTI:Tratamiento térmico indirecto: 90-93°C- 3 min

²TTD: tratamiento térmico directo:105°C-30 s

Tabla 11. Esquema de muestreo del almacenamiento estacional de LEP.

Estacion	Mes de elaboración	Tiempo de almacenamiento (mes) ¹	
		TTI ¹	TTD ²
Otoño	Abril	0	0
		3	6
		6	12
Invierno	Julio	0	
		3	
		6	
	Agosto		0
			6
			12
Primavera	Octubre	0	
		3	
		6	
	Noviembre		0
			6
			12
Verano	Febrero	0	
		3	
		6	
	Marzo		0
			6
			12

¹TTI:Tratamiento térmico indirecto: 90-93°C-3 min

²TTD: tratamiento térmico directo:105°C-30 s

³En cada tiempo de almacenamiento se evaluaron 3 muestras de LEP.

II.2. METODOLOGÍAS

Al comienzo del ensayo se realizaron sobre la leche cruda empleada para la elaboración de la LEP determinaciones de composición química y calidad microbiológica.

En la LEP recién elaborada y almacenada durante diferentes tiempos, en función del tipo de envasado, se determinó la composición química (grasa, proteínas, lactosa, sólidos totales), humedad, índice de proteínas de suero no desnaturalizadas (WPNI), índice de insolubilidad, contenido de cobre (Cu⁺⁺), oxígeno residual, valor peróxido (VP), sustancias reactivas al

ácido tiobarbitúrico (SRTBA), grasa libre, lipólisis, ácidos grasos libres, hidroximetilfurfural (HMF), color objetivo, compuestos volátiles, perfil de olor mediante nariz electrónica (NE) y análisis sensorial.

El desarrollo de las metodologías se llevó a cabo conjuntamente con la Estación Experimental Agropecuaria, INTA-Rafaela (EEA-INTA Rafaela)-Grupo de Calidad de Leche y Agroindustria; el Instituto de Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Litoral (ITA-UNL) y el Laboratorio Central de Servicios Analíticos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (LCSA-FIQ-UNL).

II.2.1. Composición química

Este aspecto de la LEP es función tanto de la materia prima como de las condiciones de procesado.

En el análisis químico tanto de la materia prima como de las LEP se determinó: materia grasa, proteína total, lactosa y sólidos totales.

La determinación se realizó por absorción en el infrarrojo con un equipo MilkoScan Ft 120 (Foss Electric; Hillerod, DK – 3400, Denmark, International Dairy Federation, 1996), previamente calibrado contra métodos de referencia.

Para la determinación se reconstituyó la leche en polvo al 13% y se realizó la lectura como si fuese fluida.

II.2.2. Humedad

El contenido de humedad de un polvo es la pérdida en peso expresada en por ciento después de 3 hs de secado a 102°C. Se determinó según la Norma FIL – IDF 26 A (1993).

Protocolo de la medición de humedad

Fuente: Norma FIL-IDF 26 A (1993).

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Secar y enfriar un pesafiltro.
2. Pesar el pesafiltro vacío y luego con 1 g de polvo aproximadamente.
3. Secar en estufa a 102 – 104°C durante 3 hs.
4. Enfriar en desecador hasta temperatura ambiente.
5. Pesar el pesafiltro con la muestra seca y fría.

Expresión de resultados

Se calcula la pérdida de peso y la humedad se determina como porcentaje del peso del polvo.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_2 - P_3}{P_2 - P_1} \times 100$$

donde:

P₁: Peso pesafiltro vacío.

P₂: Peso pesafiltro con polvo.

P₃: Peso pesafiltro con polvo seco.

La precisión del método se evalúa con la repetibilidad, que no debe ser mayor a 0,2%, y con la reproducibilidad que no debe ser mayor a 0,4% (g agua/100 g polvo).

II.2.3. Proteínas de suero no desnaturalizadas (WPNI)

El WPNI puede considerarse como una propiedad química y de hecho lo es, no obstante tiene gran influencia sobre las propiedades funcionales, especialmente en lo que respecta a la utilización de la leche en polvo para productos lácteos recombinados.

La determinación se llevó a cabo según la técnica descrita por Sorensen y col. (1978) método N° A 21 del Manual de Análisis de productos lácteos de la NIRO A/S.

El principio de la misma se basa en quitar por filtración todas las proteínas desnaturalizadas por el tratamiento térmico, después que la leche reconstituida es precipitada con cloruro de sodio.

El filtrado tendrá todas las proteínas del suero NO desnaturalizadas, las cuales desarrollan una turbidez proporcional a la concentración. La

turbidez se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm. Luego, con una curva de calibración se convierte la absorbancia a mg de proteína de suero no desnaturalizada/g de polvo (WPNI) (**Figura7**).

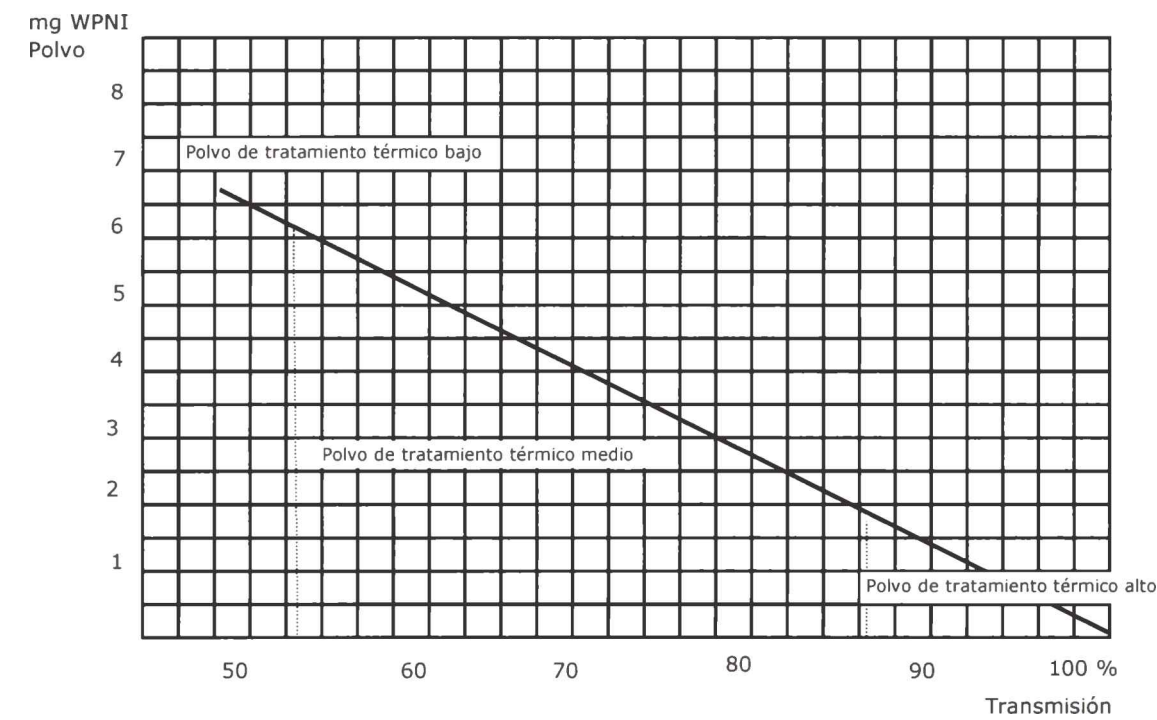


Figura 7. Curva de conversión de WPNI.

Protocolo de medición de WPNI

Fuente: ADMI Boletín 916 (1971).

Definición

La proteína de suero no-desnaturalizada, es una medida del efecto del tratamiento aplicado a la leche, durante el proceso de elaboración de leche en polvo.

Procedimiento

1. Reconstituir 2,6 g de leche en polvo en 20 ml de agua destilada en un erlenmeyer. Añadir 8 g de cloruro de sodio.
2. Tapar y colocar en baño a 37°C durante 30 min.
3. Agitar durante los primeros 15 min cada minuto y medio.
4. Luego filtrar a través de papel de filtro banda azul.
5. Colectar todo el filtrado.

6. Pipetear 5 ml de filtrado en un erlenmeyer de 100 ml, agregar 50 ml de solución saturada de cloruro de sodio y enrasar con agua destilada.
7. Llenar dos cubetas con 3,5 ml del filtrado diluido.
8. A una de las cubetas añadir una gota de ácido clorhídrico.
9. Tapar la cubeta y mezclar invirtiendo el contenido. La otra se utiliza para ajustar el espectrofotómetro.
10. Leer la transmitancia a una longitud de onda de 420 nm.
11. Realizar las lecturas por duplicado.

II.2.4. Índice de insolubilidad

El índice de insolubilidad se determina evaluando el volumen de sedimento que queda al disolver la leche en polvo bajo ciertas condiciones. Normalmente es inferior a 0,1 ml para un polvo producido partiendo de leche de buena calidad y obtenida en secaderos modernos.

El índice de insolubilidad se determinó según describe el método de ADMI (1971).

Protocolo de medición del índice de insolubilidad

Fuente: ADMI Boletín 916 (1971).

Definición

El índice de insolubilidad es el sedimento que permanece sin disolverse luego de que un polvo se disuelve en agua. Se expresa el volumen de sedimento en ml que se obtiene por el procedimiento descrito a continuación.

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Pesar 13 g de leche entera en polvo y agregarlos a 100 ml de agua a 24°C en el vaso mezclador.
2. Mezclar en vortex durante 90 s a 3800 – 4000 rpm.
3. Esperar 15 min y transferir la solución al tubo de centrífuga a la marca de 50 ml.

4. Centrifugar durante 5 min a 100 g a 4°C.
5. Extraer el líquido sobrenadante que se encuentre sobre los 5 ml de la capa de sedimento. Enrasar con agua hasta 50 ml dispersar el sedimento en la fase acuosa con algún instrumento punzante.
6. Centrifugar durante 5 min a 100 g a 4°C y registrar el volumen de sedimento, en ml.

Expresión de resultados

Índice de solubilidad = ml de sedimento en el tubo de centrífuga proveniente de 50 ml de leche reconstituida.

Reproducibilidad: +/- 0,1 ml para IS < 1 ml
 +/- 0,2 ml para IS < 1 ml

II.2.5. Cobre

Debido a la importancia de este metal como pro-oxidante en la leche en polvo, se cuantificó el mismo mediante absorción atómica.

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Pesar la muestra.
2. Llevar a mufla y mantener durante 10 hs.
3. Disolver las cenizas en ácido clorhídrico.
4. Realizar lectura en equipo de Absorción Atómica en las siguientes condiciones: lámpara de cátodo hueco, corriente de lámpara: 15 miliamper, longitud de onda: 324,8 nm; ancho de banda: 0,7 nm; llama utilizada: aire – acetileno, rango de curva de calibrado de cobre: 0 – 10 (mg l⁻¹).

II.2.6. Concentración de oxígeno residual en el espacio de cabeza

La concentración de oxígeno se determinó con el analizador de gases MAP test 4000 de Hitech Instrument Limited Software versión FF1.0 calibrado con gases específicos. Sobre el envase se selló una septa a través de la cual se efectuaron las mediciones por duplicado.

II.2.7. Valor peróxido (VP)

Este indicador químico se utilizó para seguir la evolución de la oxidación mediante la formación de hidroperóxidos en la leche en polvo. Para la extracción de la materia grasa se aplicó el procedimiento de de-emulsificación descrito por Allen y Hamilton (1994). La determinación del VP de la grasa se llevó a cabo siguiendo la Norma FIL – IDF 74 A (1991). La misma se basa en la disolución de una porción de la grasa en mezcla cloroformo-metanol y la adición de cloruro ferroso y tiocianato de amonio. Luego del tiempo de reacción, se realiza la determinación espectrofotométrica del complejo rojo férrico. Los resultados se expresaron como meq O₂/kg grasa.

Protocolo de medición de VP

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

Etapas 1: Extracción de la grasa – De-emulsificación

Fuente: Allen y Hamilton (1994).

1. Colocar en un erlenmeyer con boca esmerilada con tapón de vidrio 10 g de citrato de sodio, 10 g de salicilato de sodio, 18 ml de butanol de grado analítico
2. Agregar 72 ml de agua y los reactivos.
3. Mezclar agitándose vigorosamente. Este reactivo denominado "Reactivo De-Emulsificante" debe usarse dentro de los 45 min de preparación.

4. Mezclar en otro erlenmeyer 30 ml de agua y 10 g de leche en polvo.
5. Agitar vigorosamente.
6. Agregar 15 ml del reactivo de-emulsificante y agitar el erlenmeyer nuevamente.
7. Colocar en baño de agua a 65-70°C por 10 min, centrifugar por 5 min a 6000 g a 4°C y colocar nuevamente en el baño 5 min más.
8. Extraer la grasa con micropipeta y directamente pesar en el frasco donde de determinará el valor peróxido.

Etapas 2: Determinación VP

Fuente: Norma FIL – IDF 74 A (1991).

Curva de calibración

1. Transferir a cuatro tubos de ensayo 0,15; 0,60; 1,5 y 2,0 ml de solución standard de tricloruro férrico, a fin de tener las siguientes concentraciones de Fe^{+++} : 1,5; 6; 15 y 20 μg .
2. Agregar en el mismo orden 9,75; 9,3; 8,4 y 7,9 ml de la mezcla cloroformo-metanol.
3. Agregar a cada uno de los cuatro tubos 0,05 ml de tiocianato de amonio y 0,05 de solución de ácido clorhídrico 0,2 M. Mezclar. Luego de 5 min de reacción para cada celda medir la extinción a 500 nm contra una mezcla de cloroformo – metanol contenido en una celda similar.
4. Graficar la extinción medida contra la masa de Fe^{+++} expresada en μg .

Procedimiento con las muestras

1. Pesar 0,3 g de grasa.
2. Sin demora, agregar 9,6 ml de mezcla cloroformo – metanol. Mezclar hasta disolver la muestra.
3. Agregar 0,05 ml de tiocianato de amonio y mezclar.
4. Medir la extinción a 500 nm (E_0) contra un blanco de cloroformo – metanol contenido en una celda similar.
5. Agregar 0,05 ml de solución de cloruro ferroso, mezclar y dejar reaccionar 5 min.
6. Medir E_2 contra mezcla cloroformo – metanol.

7. Llevar a cabo un blanco de reactivo poniendo 9,9 ml de mezcla cloroformo – metanol y proceder como se describe desde 3 a 5. La extinción de este blanco de reactivo es E_1 .

Precauciones

El VP se determina en un frasco protegido de la luz con papel de aluminio. Se debe evitar exponer la muestra a la luz, llevando a cabo el test con luz indirecta.

Expresión de resultados

$$E_2 = (E_0 + E_1)$$

Con este valor se ingresa a la curva de calibración y se obtiene el contenido de Fe^{+++} (μg) = m

$$\text{VP} = \frac{m}{55,84 \times m_0}$$

El resultado normalmente se expresa en meq / 100 g ó kg de grasa.

Repetibilidad

La diferencia entre duplicados no debe exceder a 0,05 unidades de VP.

II.2.8. Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (SRTBA)

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico permiten cuantificar los productos secundarios de la oxidación lipídica, que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico forman productos coloreados. Tradicionalmente, los pigmentos rojos formados en la reacción se miden a una longitud de onda 532 nm. Sin embargo, en los productos lácteos, debido a la baja cantidad de grasas poliinsaturadas, se forma muy poca cantidad de estos pigmentos rojos. Stapelfeldt y col. (1997) proponen medir también la absorbancia a 450 nm cuantificando de este modo los compuestos amarillos.

Las SRTBA se midieron siguiendo el método desarrollado por King (1962). Los resultados se expresaron en absorbancia a 450 nm y 532 nm medida con un espectrofotómetro Shimadzu UV 1203 (Tokio 101, Japan).

Protocolo de medición de SRTBA

Fuente: King (1962).

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

Etap a 1: Defecación

1. Pipetear 17,6 ml de leche en erlenmeyer con tapón de vidrio.
2. Calentar a 30°C.
3. Agregar 2 ml de TCA al 100% (ácido tricloroacético de 1 gml⁻¹).
4. Agregar luego 2 ml de etanol al 95%.
5. Tapar y agitar vigorosamente por 20 s.
6. Esperar 5 min, filtrar con papel Whatman N° 42 (banda azul).

Etap a 2: Reacción colorimétrica

1. Agregar 1 ml de solución TBA¹ a 4 ml del filtrado claro.
2. Tapar, mezclar y colocar en baño de agua a 60°C por 1 h.
3. Enfriar y determinar la densidad óptica a 450 nm y a 532 nm con espectrofotómetro usando agua como referencia.

II.2.9. Grasa libre

La grasa libre son los glóbulos cuya membrana ha sido total o parcialmente removida. La grasa libre se evaluó según un método descrito por Sorensen y col. (1978) método N° A10 del Manual de Análisis de productos lácteos de NIRO A/S.

¹ **Solución TBA:** se disuelve 1.4 g de ácido tiobarbitúrico en alcohol al 95% hasta 100 ml. La preparación del reactivo se facilita calentando en baño de agua a 60°C. El reactivo se deteriora y no debe ser almacenado más de tres días.

Protocolo de la medición de grasa libre**Fuente:** Sorensen y col. (1978) – Niro Atomizer Nº A 10a*Definición*

El contenido de grasa libre en la superficie de las partículas de leche en polvo, se define como el residuo que se obtiene después de aplicar el método descrito a continuación.

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Pesar 10 g del polvo problema en un erlenmeyer
2. Poner en un agitador y agregar exactamente 50 ml de tetracloruro de carbono. Agitar durante 15 min.
3. Pasado el tiempo de agitación, filtrar la solución.
4. Recibir el filtrado en un erlenmeyer de 100 ml.
5. Transferir 25 ml del filtrado en un erlenmeyer de 50 ml, previamente pesado.
6. Evaporar el tetracloruro de carbono en placa de calentamiento.
7. Secar 1 h en estufa a 105°C.
8. Enfriar en desecador y pesar.

Expresión de resultados

Se calcula el porcentaje de grasa libre como el residuo de evaporación en el erlenmeyer sobre el peso del polvo.

$$\% \text{ Grasa Libre en el polvo} = \frac{a \times 25 \times 10}{\left(\frac{25-a}{0.94} \right)} \times b$$

donde:

a: residuo de evaporación de 25 ml de solvente.

b: g de polvo usado.

Reproducibilidad: $\pm 0,1 \%$

II.2.10. Lipólisis

La determinación de lipólisis por titulación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Deeth y Fitz Gerald (1975).

La elección de la misma se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en trabajos previos por Páez y col. (1999), entre los cuales figura una muy buena reproducibilidad de la técnica (CV = 3,05%), valor que está de acuerdo con lo informado por otros autores (Collomb y Spahni 1995; Chilliard y col., 1983).

Protocolo para la medición de lipólisis en leche – método de extracción – titulación

Fuente: Deeth y Fitz Gerald (1975).

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Mezclar 3 ml de leche con 10 ml de mezcla de extracción (isopropanol/éter de petróleo/H₂SO₄ 4 N, 40/10/1) en tubos de 35 ml.
2. Agregar 6 ml de éter de petróleo y 4 ml de agua. Parar el tubo y agitar vigorosamente durante 15 s. Se formaran dos fases en 5 – 10 min. Transferir una alícuota de 7,5 ml de la fase superior a un erlenmeyer de 50 ml.
3. Adicionar 6 gotas de fenolftaleína metanólica al 1% y titular la solución con hidróxido de potasio metanólico 0,02 N estandarizado. Preparar un blanco, en el cual la leche se desplazara con agua, para obtener el blanco de la titulación.

Expresión de resultados

El contenido de ácidos grasos libres expresados en µeq/ml de leche se obtiene a partir de la fórmula

$$\frac{T \times N}{P \times 3} \times 10^3$$

donde

T: volumen neto de la titulación (ml).

N: Normalidad del hidróxido de potasio metanólico².

P: Proporción de la fase superior titulada (volumen de la alícuota sin marca / volumen total de la fase superior).

3: volumen (ml) de leche.

II.2.11. Perfil de ácidos grasos libres (AGL)

Protocolo de medición de AGL por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID)

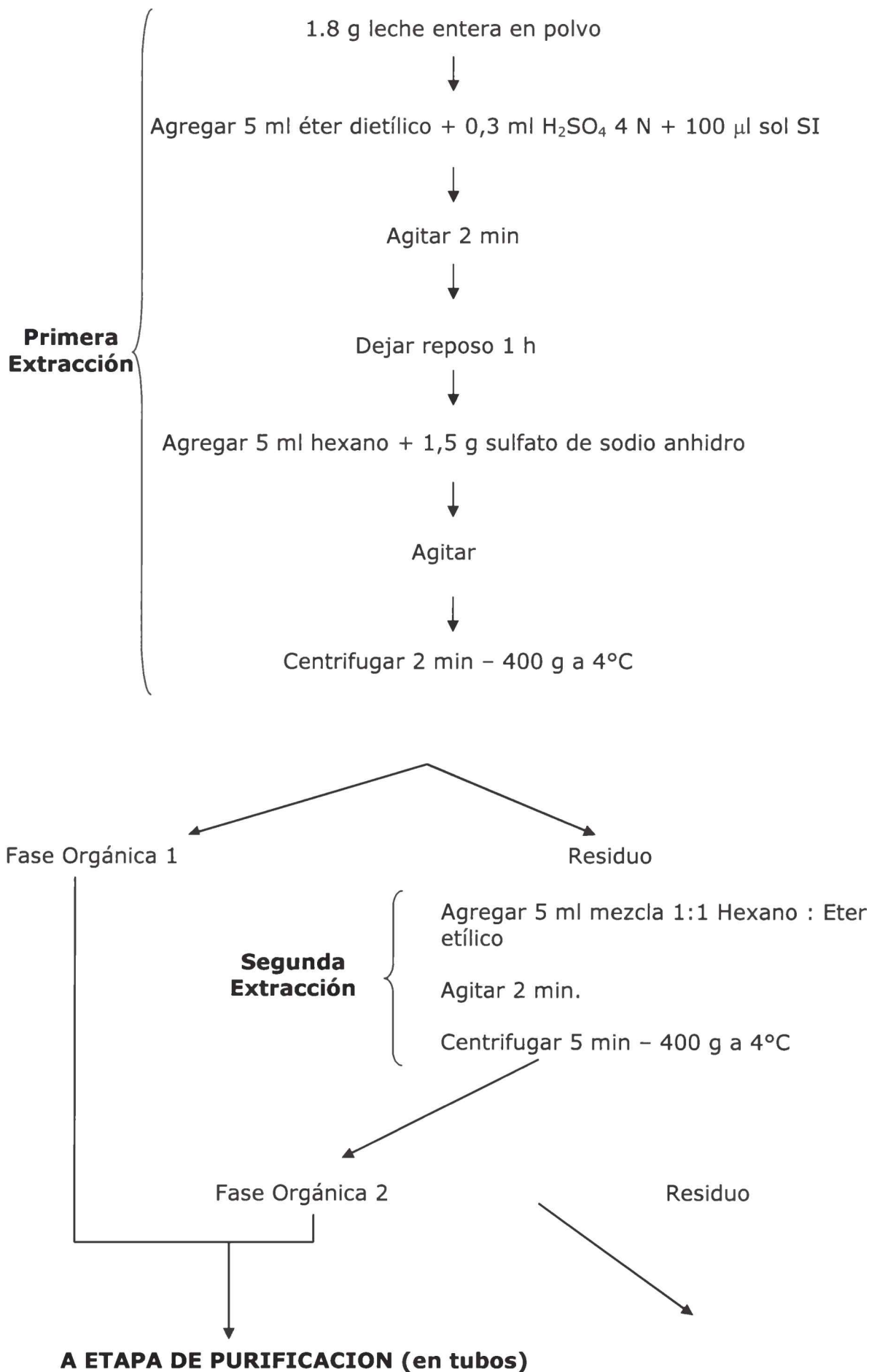
Fuente: Deeth y col. (1983).

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

Etap a I: Extracción de ácidos grasos libres.

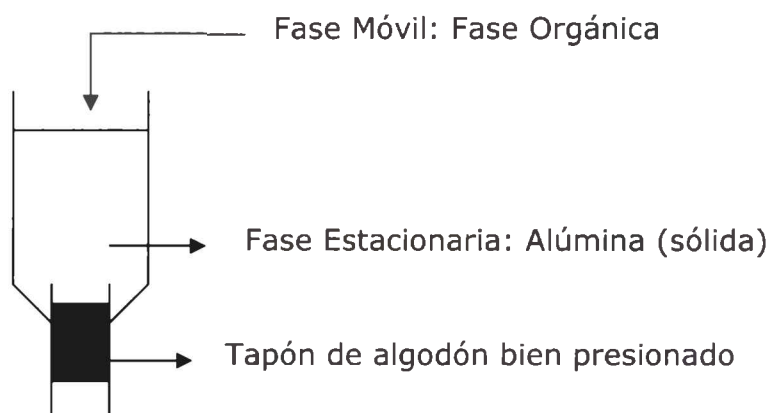
²El hidróxido de potasio metanólico debe ser protegido del dióxido carbónico atmosférico tanto como sea posible. La solución indicadora da claros puntos finales cuando es fresca y no está almacenada por más de un mes.



Etapas II: Purificación de ácidos grasos libres.**Preparación de la alúmina neutra desactivada al 4%**

Para activar la alúmina totalmente (0% de agua) se seca en estufa a 102°C durante 2 hs. La alúmina se desactiva el día de trabajo. Para desactivar la alúmina al 4% (peso en peso) se procede de la siguiente manera:

1. Pesar 1 g de alúmina/muestra a procesar. Por ejemplo se pesan 5 g de alúmina en un balón o vaso de precipitado y se agregan 0,2 g de agua (4% de 5 g).
2. Mezclar muy bien con varilla de vidrio.
3. Poner la misma en frasco tapado hasta uso. Una vez desactivada, recién usarla a las 2 hs.



Los sitios de la alúmina absorben los AGL y permite la elusión de los triglicéridos. Lo que se usa como columna es una jeringa de vidrio de 5 ml, siendo la velocidad de elusión de 3 mlmin⁻¹.

Para esta etapa se pueden usar cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) con alúmina como absorbente.

Para la purificación de los AGL se procede de la siguiente manera:

1. Tomar con pipeta Pasteur la fase orgánica y pasar la misma a través de la columna de alúmina.
2. Recoger y pasar nuevamente.

3. Pasar 2 veces 5 ml de la mezcla hexano: éter etílico antes de finalizar el pasaje de toda la fase orgánica.
4. Descartar todo lo recogido.
5. Secar al vacío la columna con una bomba de vacío o con trampa de agua, hasta que la alúmina este completamente seca y móvil.
6. Colocar la alúmina en tubos de centrifuga de vidrio con tapa a rosca de 5 o 10 ml y agregar 1 ml de éter isopropílico con 4% ácido fórmico.
7. Centrifugar durante 5 min a 2000 g a 4°C.
8. Inyectar en el cromatógrafo de gases.

Parámetros operacionales del GC-FID

La separación de los AGL se realizó empleando una columna capilar de 30 m x 0,25 mm id x 0,32 mm PE-FFAP (J & W Scientific, Folson, CA). Se usó el siguiente programa de temperatura: inicial de 120°C, incrementada hasta 220°C a una velocidad de calentamiento de 20°Cmin⁻¹, temperatura que se mantuvo durante 22 min, y luego se llevó a cabo una segunda rampa de calentamiento a una velocidad 10°Cmin⁻¹ hasta 240°C, temperatura a la cual se mantuvo por 3 min. La presión de gas nitrógeno en la cabeza de la columna se estableció en 65kPa. La temperatura del inyector se fijó en 325°C y la del FID en 350°C. El rango del FID se fijó en su máxima sensibilidad. El inyector se operó en el modo *splitless*.

Identificación y cuantificación de los AGL

Los diferentes componentes se identificaron por comparación de los tiempos de retención con estándares puros bajo idénticas condiciones experimentales. Las determinaciones cuantitativas se realizaron mediante el método de estándar interno, haciendo uso del software TurboChrom v.4,0 del cromatógrafo de gases. El análisis de las muestras se llevó a cabo por triplicado.

Repetibilidad

Durante su implementación en el laboratorio se evaluó la repetibilidad de la técnica inyectando una mezcla de estándares y muestras de LEP. Los CV obtenidos fueron de 4,14 y 3,67% en los estándares y en las muestras de LEP respectivamente.

II.2.12. Hidroximetil furfural libre (HMF)

El HMF es un intermediario de reacción del pardeamiento no enzimático ó amarronamiento ("browning"), que ocurre entre el grupo $-NH_2$ de las proteínas y el $-COH$ de los azúcares reductores. Esta reacción puede ocurrir durante el procesamiento y almacenamiento del producto, y su velocidad depende de la composición y humedad del producto y del tiempo y temperatura del tratamiento térmico. La concentración de HMF se determinó siguiendo el método descrito por Keeney y Bassette (1959). Los resultados se expresan en μmol HMF/litro de leche.

Protocolo de la medición de HMF libre

Fuente: Keeney y Bassette (1959).

Procedimiento

El procedimiento se lleva a cabo por duplicado.

1. Reconstitución de la muestra: 13 g de leche entera en polvo se disuelven con agua destilada a 45°C , agitar 3 min y llevar a volumen con 100 ml.
2. Digestión de la muestra: colocar 10 ml de leche reconstituida en un erlenmeyer de 50 ml. Agregar 5 ml de ácido oxálico 0,3 N. Hacer lo mismo con agua en lugar de leche (blanco de reactivo).
3. Reacción de color: a cada tubo agregar 5 ml de ácido tricloroacético al 40%. Mezclar y filtrar con papel banda azul. Tomar 4 ml del filtrado y agregar 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,05 M. Incubar entre 30 – 40 min en baño de agua a 40°C . Sacar los tubos y enfriarlos a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a 443 nm.

Expresión de los resultados

HMF libre = muestra acidificada, sin calentar a ebullición

$$\mu\text{M HMF/l leche} = \text{ABS} - 0,015081$$

II.2.13. Color objetivo

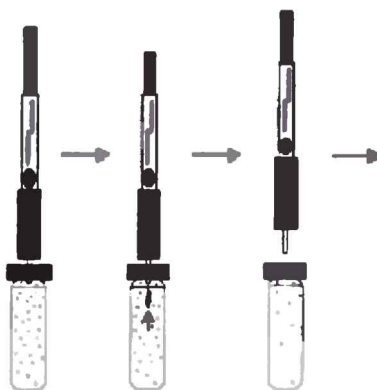
El color medido instrumentalmente es un indicador objetivo de calidad de leche en polvo (Nielsen y col., 1997a). El mismo permite evaluar la uniformidad del proceso y del producto final. Las variaciones de color se asocian principalmente a diferencias en la materia prima y en los tratamientos térmicos utilizados durante el proceso.

El color objetivo se midió con el equipo ByK Gardner Color View model 9000 bajo las siguientes condiciones experimentales: área grande de visión, observador 10° e iluminante D65. Se colocaron 25 g de LEP en cubetas estandarizadas (BYK Gardner). Se determinaron las coordenadas de color en el sistema CIELab; L^* (componente negro-blanco, luminosidad), a^* (componente -verde a + rojo) y b^* (componente -azul a +amarillo) y el valor de la reflectancia a 450 nm. Las mediciones se realizaron por duplicado.

II.2.14. Compuestos Volátiles

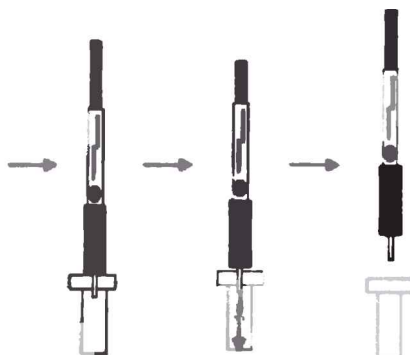
Para el análisis de alimentos se han desarrollado métodos analíticos tales como Cromatografía de Gases (GC), y su combinación con Espectrometría de Masas (MS). La Microextracción en Fase Sólida (SPME) (Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y col., 1994) es una técnica de preparación de muestra que emplea una fibra de sílice fundida cubierta con una fase estacionaria apropiada. Los analitos en la muestra son extraídos y concentrados directamente en la fase de la fibra. Los analitos absorbidos son luego desorbidos térmicamente desde la fibra a una columna de cromatografía de gases a través del puerto de inyección del cromatógrafo de gases (**Figura 8**). Este método se caracteriza por mejorar los límites de detección y ahorrar tiempo en la preparación de la muestra y el costo en la compra de solventes (Zhang y col., 1994). Se ha empleado satisfactoriamente en combinación con GC y GC-MS para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de muestras ambientales, biológicas y alimenticias (Kataoka y col., 2000).

Proceso de Absorción y/o Adsorción



1. Se perfora la septa del vial que contiene la muestra.
2. Se expone la fibra para extraer los analitos del espacio de cabeza.
3. Se retrae la fibra al interior de la aguja.

Proceso de Desorción



1. Se perfora la septa del GC.
2. Se expone la fibra en el interior del inyector para desorber los analitos.
3. Se retrae la fibra al interior de la aguja.

Figura 8. Principio de la SPME.

Los compuestos volátiles estudiados fueron:

- ❖ Dimetil Sulfuro: indicador de contaminación microbiológica, e indicador de degradación de proteínas.

- ❖ 3-CH₃-Butanal: indicador de contaminación microbiológica, indicador de reacciones de amarronamiento no enzimático.
- ❖ Pentanal, hexanal: indicadores de oxidación lipídica.
- ❖ Ácido Butírico: indicador de rancidez hidrolítica.

Desarrollo de la metodología de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME)-cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Equipos

Cromatógrafo de gases SHIMADZU Modelo SERIE 14B con detector de ionización de llama (FID).

Optimización de los parámetros operacionales de SPME

Selección de fibra: se selecciono una fibra cubierta con carboxen-polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de acuerdo a los resultados hallados por Marsili y col. (1999b).

Condiciones de la fibra: en SPME se pueden emplear dos tipos de técnicas de muestreo para extraer los analitos: exponiendo la fibra al espacio de cabeza de la matriz a analizar (HS-SPME) y por inmersión directa de la fibra en la matriz (DI-SPME). En la técnica de HS-SPME, la fibra se expone en la fase vapor que se encuentra sobre una muestra sólida, líquida o gaseosa. En el técnica de DI-SPME, la fibra se sumerge directamente en la muestra líquida. La eficiencia en la extracción con cada una de las técnicas depende de las propiedades de los analitos y de la matriz. De esta manera, la técnica de extracción deber ser seleccionada en función de la naturaleza de la matriz. En general, la técnica de DI-SPME es adecuada para la extracción de analitos de baja volatilidad presentes en matrices líquidas. Por su parte, la técnica de HS-SPME es apropiada para la extracción de analitos de mayor volatilidad en la mayoría de las muestras gaseosa, líquidas y sólidas (Kataoka y col., 2000). En el presente trabajo, debido a las características de los analitos a extraer y de la matriz a analizar se empleó la técnica de HS-SPME. Para seleccionar las condiciones de la fibra se prepararon soluciones estándar conteniendo 5000 mgkg⁻¹ de cada uno de los componentes en leche entera en polvo reconstituida. Luego, se obtuvieron

soluciones a varias concentraciones mediante la dilución con leche en polvo entera reconstituida. La fibra de CAR-PDMS se mantuvo en el espacio de cabeza de una mezcla estándar a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo agitación magnética durante 15, 30 y 45 min. Después del tiempo de exposición, la fibra se desorbió inmediatamente en el inyector del cromatógrafo de gases por 5 min a 280°C . Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado. Los resultados mostraron que las áreas de los picos de los compuestos estudiados se incrementaron en función del tiempo de extracción, indicando que el equilibrio había sido alcanzado, en general, a los 45 min de muestreo (**Figura 9**). Aun cuando SPME tiene una sensibilidad máxima en el punto de equilibrio, no es necesario alcanzar el equilibrio para un análisis exacto y preciso. La razón de esto está basada en la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbido y su concentración inicial en la muestra (Kataoka y col., 2000). El ácido butírico mostró una baja eficiencia en la extracción. Si bien, la adición a las muestras de sales solubles (cloruro de sodio, potasio, etc.) habría mejorado la eficiencia de la extracción del ácido butírico, debido al efecto de "salting-out" (Kataoka y col., 2000), en el presente estudio no fue adicionada sal para reproducir la metodología de la nariz electrónica (NE). Teniendo en cuenta que el tiempo de análisis cromatográfico es de 48.38 min, se seleccionó un tiempo de extracción de 45 min. Este tiempo aseguró límites de detección suficientemente bajos, sin afectar el tiempo total de análisis.

Límites de detección: generalmente la sensibilidad depende del compuesto analizado, por ejemplo: los compuestos no polares son fácilmente detectados a niveles de ppb (partes por billón), mientras que algunas veces es difícil detectar los compuestos polares a dicho nivel (Roberts y col., 2000). El límite de detección (LD) se define como la cantidad o concentración de la muestra en el detector al máximo del pico, cuando la relación señal/ruido es igual a 2 (Lorraine, 1995). Para los componentes bajo estudio los LD se estimaron como la concentración del analito que produce una señal 5 veces más grande que la señal de ruido. Los valores de LD fueron: $1,2 \mu\text{gkg}^{-1}$ para dimetil sulfuro; $0,9 \mu\text{gkg}^{-1}$ para 3-CH₃ butanal; $0,7 \mu\text{gkg}^{-1}$ para ventanal; $0,6 \mu\text{gkg}^{-1}$ para hexanal; y $400 \mu\text{gkg}^{-1}$ para ácido butírico.

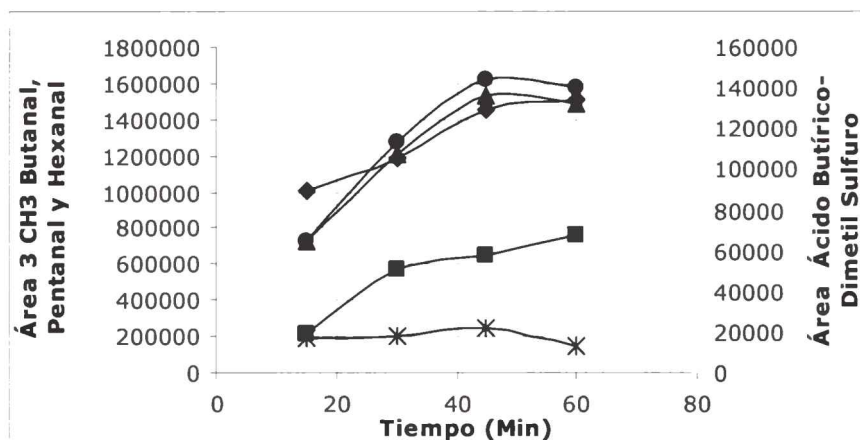
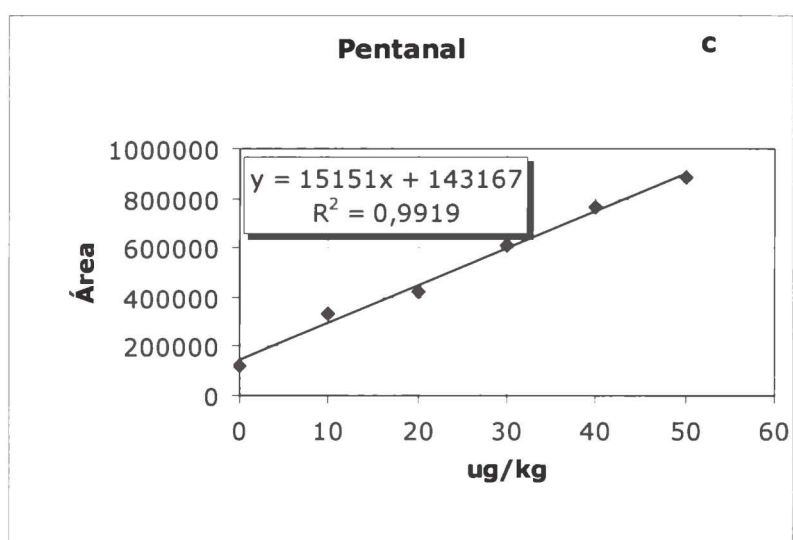
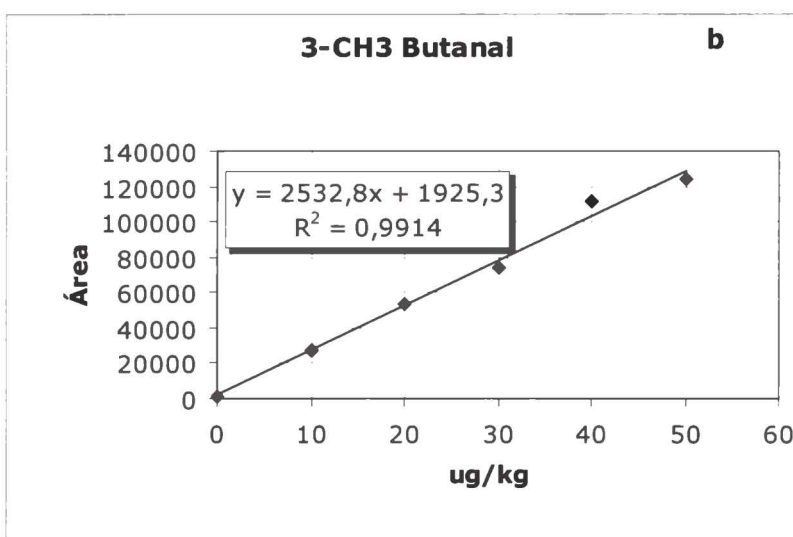
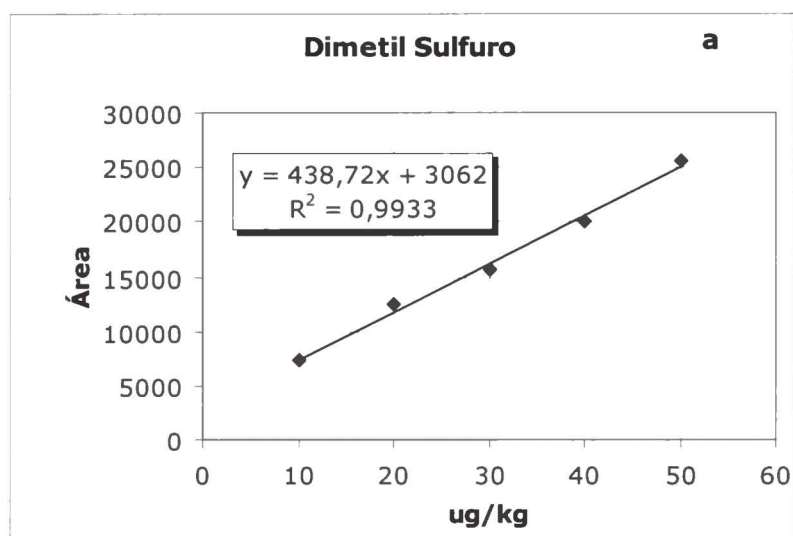


Figura 9. Eficiencia de extracción de la fibra CAR-PDMS para
 ■ 3 CH3 Butanal ▲ Hexanal ● Pentanal ◆ Dimetil Sulfuro * Ácido Butírico

Repetibilidad: la repetibilidad (promedio de cinco repeticiones) se expresó como la desviación estándar relativa para el área de pico a una concentración de $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ para la mezcla estándar de dimetil sulfuro, 3-CH₃ butanal, pentanal, hexanal, y de $1000 \mu\text{gkg}^{-1}$ para el estándar de ácido butírico. Estos valores estuvieron debajo de 10% para 3-CH₃ butanal, pentanal, hexanal, y arriba del 15% para dimetil sulfuro, y ácido butírico.

Linealidad: la alta sensibilidad de las fibras de SPME conduce a un rango lineal que usualmente está por debajo de $1 \mu\text{gkg}^{-1}$ (Roberts y col., 2000). En la presente metodología las curvas de calibración se prepararon en el rango de 10 a $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ para dimetil sulfuro, 3-CH₃ butanal, pentanal, hexanal, y en el rango de 500 a $2500 \mu\text{gkg}^{-1}$ para ácido butírico. La linealidad de estas curvas se caracterizaron por los valores R^2 de 0,993 para dimetil sulfuro, 0,991 para 3-CH₃ butanal, 0,992 para pentanal, 0,997 para hexanal, y 0,964 para ácido butírico (**Figuras 10 a-e**).

Factores de respuestas: a partir de las curvas de calibración se obtuvieron los factores de respuesta absolutos de cada uno de los componentes como las pendientes de las regresiones lineales obtenidas de la relación de área de pico en función de la concentración. Los factores de respuesta relativos se calcularon como la relación del factor de respuesta absoluto de cada componente a aquel del estándar interno (4-CH₃-2 pentanona) calculado a la concentración adicionada a la leche en polvo reconstituída.



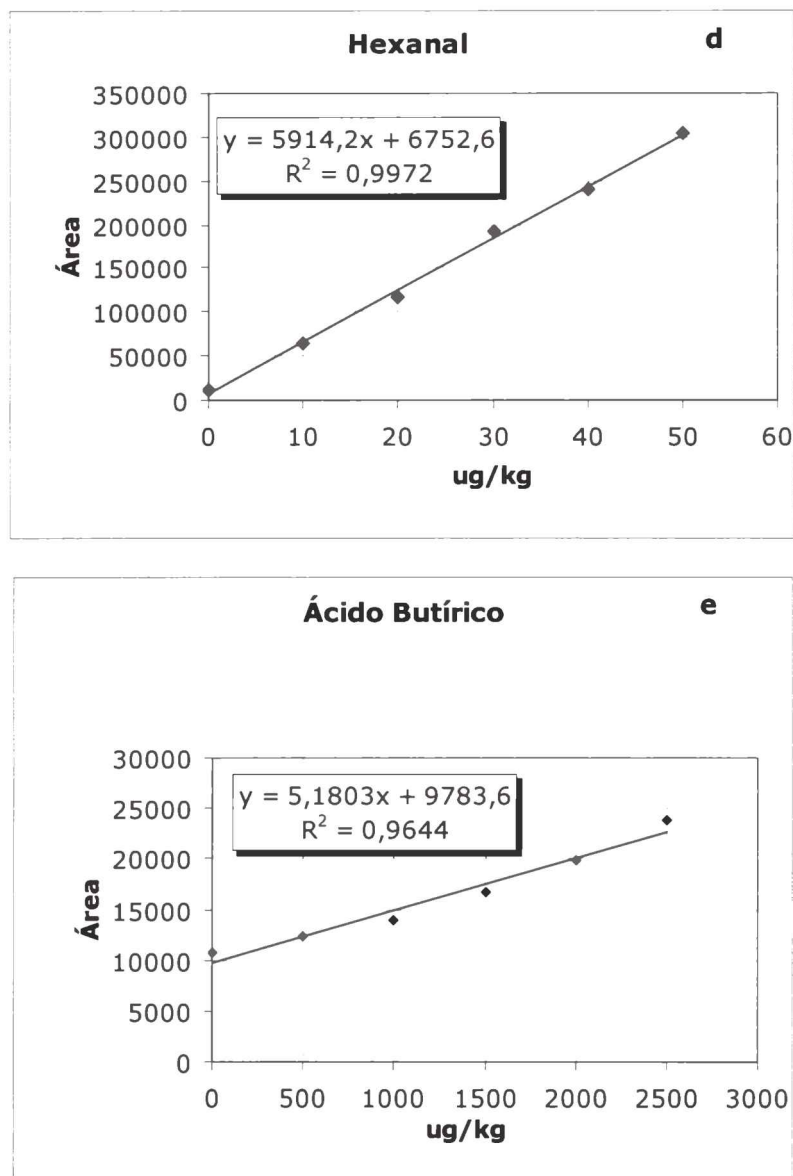


Figura 10. Curvas de calibración de los componentes volátiles estudiados.

Optimización de parámetros operacionales del GC-FID

Selección de la columna cromatográfica: la selección se basó en la característica de la fase estacionaria de la columna y en la característica química de los compuestos a estudiar. La separación de los compuestos se realizó empleando una columna capilar DB FFAP de 30 m x 0,25 mm di x 0,25 μm (J & W Scientific, Folsom, CA).

Selección del programa de temperatura de columna: en la selección del programa de temperatura de columna se evaluaron múltiples combinaciones de temperaturas iniciales (40 y 50°C), finales (150°C, 180°C, 220°C y 235°C), velocidades de calentamiento (2, 3, 4, 6 y

10°Cmin⁻¹) y distintos tiempos de mantenimiento de las temperaturas iniciales y finales (2, 5, 6, 10 y 15 min). Finalmente se seleccionó, de acuerdo a la eficiencia en la separación de los componentes, el siguiente programa de temperatura: una temperatura inicial de 40°C la cual se mantuvo por 2 min, para luego ser incrementada a 180°C a una velocidad de 4°Cmin⁻¹, luego se elevó la temperatura hasta 235°C a 40°Cmin⁻¹ y se mantuvo a 235°C por 10 min.

Selección del flujo de gas de transporte (N₂): la selección se basó en lograr la mejor separación de los componentes en estudio evitando aumentar excesivamente el tiempo de corrida cromatográfico. Se seleccionó un flujo de 1 mlmin⁻¹.

Temperatura del inyector y modo de operación: El inyector se operó en el modo *splitless* durante 2 min y la temperatura se fijó en 280°C.

Temperatura del detector: La temperatura del FID se fijó a 280°C.

Protocolo de medición de componentes volátiles mediante HS-SPME-GC-FID

Procedimiento

Preparación de muestra

La LEP se reconstituyó al 13% de sólidos totales con agua destilada a 40°C y agitación durante 4 min. Luego, 10 ml de la leche reconstituida con 10 µl de estándar interno (50 mgkg⁻¹ 4-CH₃-2-pentanona) y una barra magnética se colocaron en un vial de vidrio de 27 ml. El vial se tapó con septa especial para SPME y se selló con precinto de aluminio. La septa se perforó con la aguja de SPME y la fibra se expuso al espacio de cabeza de la LEP reconstituida por 45 min a 45°C. Luego, la fibra se retrajo al interior de la aguja de SPME e inmediatamente se transfirió al cromatógrafo de gases. La fibra se desorbió en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases por 5 min.

Caracterización y cuantificación de componentes volátiles de la muestra

Para los análisis de SPME, se empleó un GC SHIMADZU Modelo SERIE 14B con FID. Los compuestos se resolvieron bajo las condiciones previamente mencionadas.

Los compuestos investigados se identificaron por comparación del tiempo de retención con el correspondiente a compuestos estándares. Las determinaciones cuantitativas se realizaron mediante el método de estándar interno, haciendo uso del software Class VP del cromatógrafo de gases. El análisis de las muestras se llevó a cabo por triplicado.

II.2.15. Perfil de olor

Uno de los mayores criterios de la aceptación de un alimentos por parte del consumidor es su *flavor*, del cual el aroma u olor es una parte integral.

En el análisis de alimentos, la Nariz Electrónica (NE) ha probado ser un método poderoso para analizar productos de la agricultura tales como granos, carne de cordero, carne vacuna procesada, etc. (Grigioni y col., 2000; Grigioni y col., 2004). Sin embargo el número de estudios dedicados a productos lácteos es aún muy limitado, probablemente debido a la complejidad de sus matrices (Ampuero y Bosset, 2003). El sistema de NE consiste en un arreglo multi sensor que permite monitorear la interacción con diferentes grupos de moléculas. La señal respuesta de cada sensor da un patrón ("fingerprint") que identifica el perfil de olor de la muestra. La NE reconoce patrones de olor en vez de compuestos de olor específicos, en forma similar al sistema olfativo de los animales. Estos patrones son recopilados en una base de datos para análisis posteriores usando rutinas estadísticas como métodos de reconocimiento de patrón, análisis de agrupamiento y redes neuronales. La NE ofrece algunas ventajas tales como procedimiento de operación simple y análisis rápido apropiado para el monitoreo en la línea de proceso. Sin embargo, la misma tiene limitaciones respecto de la información química del olor del sistema alimentario que se analiza.

Desarrollo de la metodología de NE

Equipo

Nariz electrónica AromaScan A32S (OSMETECH PLC, Electra House, Electra Way, Crewe, UK) con un arreglo de 28 sensores de polímeros conductores como sistema de detección.

Optimización de parámetros operacionales de la NE

Diferentes parámetros operacionales afectan el funcionamiento de la NE. Con el objeto de definir el protocolo de análisis se utiliza una rutina previamente asignada que permite generar cambios incrementales en parámetros seleccionados. Este procedimiento permite variar un parámetro por vez, incluyendo el tiempo, la presión y la temperatura para que se alcance el equilibrio en el espacio de cabeza de la muestra, el tiempo de llenado del bobinado, el tiempo de equilibrio en el bobinado y el tiempo de inyección.

Tiempo de llenado del bobinado: se fija en 25 s.

Tiempo de equilibrio del bobinado: se fija en 20 s.

Tiempo de inyección: se fija en 1 s.

Temperatura del bobinado y de la línea de transferencia: 45°C.

Adquisición de datos

En el análisis de espacio de cabeza, la concentración del analito en la fase gaseosa debe ser maximizada para lograr una sensibilidad adecuada. La sensibilidad depende de la naturaleza de las muestras, incluyendo ambos analito y matriz, y la temperatura.

Previo de la definición de los parámetros de adquisición de datos se deben fijar las condiciones para la preparación de muestras y el Tiempo T.

Preparación y acondicionamiento de muestra: se eligió trabajar con la muestra de leche en polvo debido a la naturaleza de los sensores siendo los

mismos del tipo polímeros conductores. Esta clase de sensores absorben el vapor de agua, y como resultado, la concentración de sitios de enlace disponibles para otros componentes volátiles disminuye drásticamente (Visser y Taylor, 1998). Previamente a la adquisición de datos, las muestras se mantuvieron a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 10 min y a una presión de 3 psi en el vial, para estabilizar las condiciones de espacio de cabeza.

La temperatura de trabajo se seleccionó para reproducir las condiciones de análisis de SPME-GC.

La presión del vial, denominada presión estática del vial, se midió según el procedimiento establecido para este equipamiento. Se fijó su valor en 3 psi. Para poder establecer la presión estática del vial es necesario definir otros parámetros operacionales. Los mismos son: presurización del vial, el cual se fija en 2-4 psi por arriba de la presión estática del vial y la presión del regulador de inyección, la misma se fija en 2-3 psi mas bajo que el valor de presurización del vial.

Tiempo "T": es el tiempo en el cual la concentración del espacio de cabeza de la muestra sobre el sensor es máxima (**Figura 11**). El tiempo "T" debe ser establecido para cada tipo de muestras a ser analizadas. Luego, es posible determinar un valor promedio para la aplicación en cuestión. Al tiempo "T" se corta el flujo de gas de transporte para permitir el inicio de una respuesta estable. Para el análisis de las muestras se fijo un tiempo "T" de 27 s.

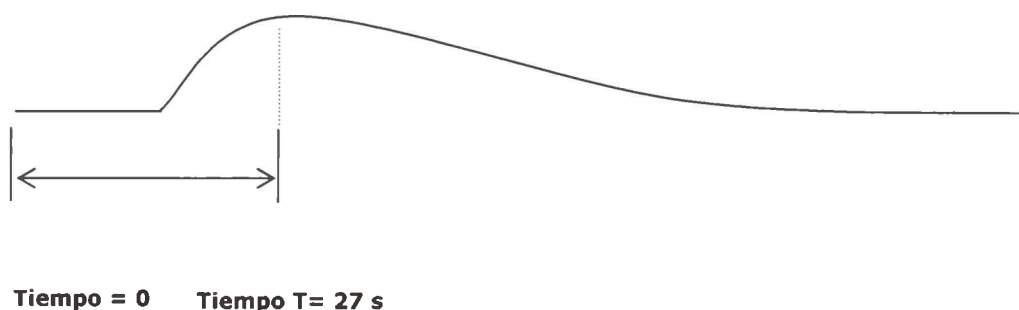


Figura 11. Determinación del tiempo "T" en la metodología de nariz electrónica.

Una vez definido estos parámetros se fijan los relacionados a la adquisición.

Período de muestreo: durante la adquisición se pueden seleccionar diferentes períodos de muestreo. Los datos pueden ser analizados en el equilibrio o fuera del equilibrio de la respuesta de los sensores. Con el objeto de seleccionar el período de muestreo para coleccionar los datos, se consideraron dos lapsos de tiempo 30-40 s (zona de incremento de la curva) y 50-70 s (plato de la curva).

Tiempo de recuperación de los sensores: luego del análisis de cada muestra, se procede al lavado de la superficie de los sensores con solución de butanol al 2%. De esta manera se preparan los sensores para el subsiguiente análisis. Se fijó un tiempo de 10 s.

Tiempo entre muestras: se determinó un intervalo de 120 s como suficiente para permitir que los sensores recuperen su señal inicial (línea de base) entre mediciones sucesivas.

Capacidad discriminativa de la NE

Para determinar la capacidad discriminativa de la NE, se evaluaron LEP comerciales sometidas a la luz, producidas bajos diferentes procesos térmicos, y muestras con características sensoriales definidas, por ej.: oxidación por luz. Las muestras oxidadas por luz se prepararon de acuerdo a Classen y Lawless (1992). Los resultados obtenidos indicaron una buena capacidad de discriminación de las distintas muestras por lo que se considera que el método seleccionado es apto.

Protocolo para la medición del perfil de aroma mediante NE

Procedimiento

Preparación de muestra

Una alícuota de 3 g de leche entera en polvo se colocó en un vial de 22 ml y se selló.

Parámetros operacionales de la NE

El método de adquisición se fijó con un período de referencia inicial de 27 s (tiempo, "T"), un período de muestra de 60 s, un tiempo de lavado con 2% de solución de butanol de 10 s y un intervalo de referencia de 120 s. Se usó nitrógeno (libre de O₂) como gas de transporte con una humedad de referencia de 50% (30°C) (**Figura 12**). Se empleó como procedimiento de muestreo el método de equilibrio, con un tiempo de llenado del bobinado de 25 s y un tiempo de equilibrio de 20 s. Previamente a la adquisición de datos, las muestras se mantuvieron a 45±1°C por 10 min para estabilizar las condiciones del espacio de cabeza. Para el análisis de datos se usó 50 s y 70 s como lapso de tiempo. Las condiciones experimentales empleadas aseguraron una correcta línea de base permitiendo a los sensores recuperarse entre muestra y muestra. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

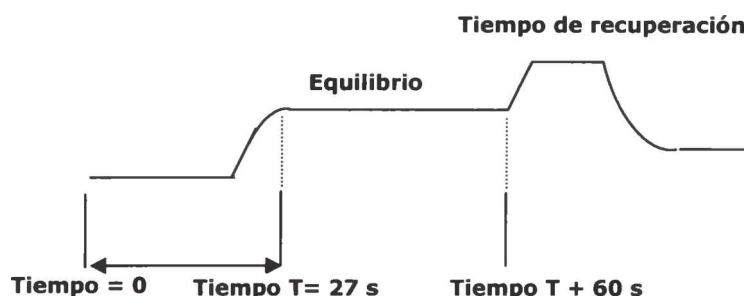


Figura 12. Secuencia de análisis de muestra en la metodología de nariz electrónica.

II.2.16. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de las muestras, siguiendo la Norma IRAM 14067-3 (1993), se llevó a cabo con un panel integrado por siete evaluadores seleccionados y entrenados. Los análisis se ejecutaron en una sala ambientada con diez cubículos individuales. Se aplicó Análisis Descriptivo Cuantitativo utilizando una escala no estructurada de 10 cm anclada en los extremos (1 = Apenas perceptible; 9 = Muy perceptible).

Se realizó una familiarización de los evaluadores con los *descriptores rancio, oxidado, forraje, quemado y cocido* llegando a un consenso de términos que caracterizan estos defectos sensoriales.

También se realizó una determinación del *umbral promedio del panel* para estos descriptores (Hough y col., 1992; Harper y Hall, 1976), para lo cual se prepararon soluciones para cada uno de los mismos de la siguiente manera:

- Rancio: se homogenizó leche cruda a 32°C, durante aproximadamente 30 minutos. Seguidamente, la leche se pasteurizó y enfrió.
- Oxidado: se expuso leche pasteurizada a la luz solar durante una hora.
- Forraje: se preparó una infusión con forraje y leche cruda.
- Quemado: se calentó leche cruda a ebullición durante 30 minutos.
- Cocido: se calentó leche cruda a 80°C durante 10 minutos.

En todos los casos, las muestras se refrigeraron durante 24 hs y luego se prepararon las sucesivas diluciones en progresión geométrica, en las que se evaluó el flavor (aroma+gusto) para encontrar el umbral del panel, es decir, la mínima concentración del defecto que corresponde al 50 % de aciertos. Una vez hallada dicha concentración, se pidió a los evaluadores que ubicaran la misma en la escala no estructurada a utilizar en el trabajo. Esto permitió contar con un puntaje promedio, de la concentración umbral, asignado por el panel. Los valores umbrales encontrados para los distintos descriptores de defecto fueron los siguientes:

- Rancio: 1,21
- Oxidado: 0,74
- Quemado: 1,80
- Cocido: 0,84

A cada tiempo de muestreo se abrió un paquete almacenado a la temperatura correspondiente. La evaluación sensorial se realizó sobre muestras de leche en polvo reconstituidas al 13% de sólidos totales,

tratándose posteriormente como leche fluida. Para ello se utilizó agua destilada hervida, enfriada y aireada. Las muestras fueron presentadas al panel a temperatura ambiente (20 – 24°C). Cada muestra de leche en polvo se analizó por duplicado, presentando las réplicas separadas por intervalos de 30 minutos. Finalizada la evaluación, se determinó el puntaje asignado por cada uno de los evaluadores, y se obtuvo el valor promedio del panel para cada muestra analizada.

II.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las distintas variables estudiadas en la presente tesis se analizaron estadísticamente mediante procedimientos estadísticos de modelos lineales con efectos fijos (Ec. 1 y 2) (Weber y Skillings, 2000) empleando el software estadístico SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Illinois). Previamente se analizaron las variables respuesta para probar el supuesto de normalidad y homogeneidad de los residuos en el análisis de varianza (ANOVA). En las variables que no cumplieron con el supuesto de homogeneidad, se buscó aquella transformación que lograra la homogeneidad de las variancias (Weber y Skillings, 2000).

Las variables transformadas fueron: hidroximetil furfural libre a Log de hidroximetil furfural libre, reflectancia a 450 nm a $\ln 1/r_{450}$.

El test de Bonferroni se usó como método de comparación de medias a un nivel de significación del 5% ($P < 0,05$) para determinar el efecto de los efectos principales e interacciones sobre la diferentes variables estudiadas.

Los modelos de ANOVA empleados fueron los siguientes:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha*\gamma)_{ij} + \varepsilon_{ijk};$$

$$i = 1, \dots, 2$$

$$j = 1, \dots, 4$$

$$k = \text{número de replicas}$$

Donde:

Y_{ijk} = variable respuesta.

μ = media general.

α_i = efecto del tratamiento térmico con 2 niveles (indirecto, directo).

β_j = efecto de la estación de elaboración con 4 niveles (otoño, invierno, primavera y verano).

$(\alpha*\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción entre el tratamiento térmico con i niveles y la estación con j niveles.

ε_{ijk} = término de error

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_j;$$

$$i = 1, \dots, 3$$

$$j = \text{número de replicas}$$

Donde:

Y_i = variable respuesta.

μ = media general.

α_i = efecto del tiempo de almacenamiento con 3 niveles.

ε_j = término de error

Además, se aplicaron herramientas estadísticas de análisis multivariado tales como análisis de agrupamiento jerárquico (AAJ), análisis de componentes principales (ACP) y análisis discriminante lineal (ADL). Previamente, todas las variables se transformaron en sus

valores estandarizados, donde $z_i = \frac{x_i - \bar{x}}{\sigma^2}$ es la variable estandarizada. Esta transformación permite dar el mismo peso a todas las variables.

El AAJ se empleó para individualizar aquellas medidas similares a ser interpretadas como miembros de un grupo. Para tal fin, se empleo el Método de Ward como método de agrupamiento.

El ACP se utilizó como herramienta para detectar posibles agrupamientos de las observaciones y también para hallar las variables responsables de la dispersión de las mismas. Por su parte, el ADL se aplicó

como procedimiento de clasificación para obtener una ecuación por la cual las muestras de leche entera en polvo pudieran ser clasificadas. Este método maximiza las varianzas entre categorías y minimiza la varianza dentro de las categorías.

Para la aplicación de las herramientas estadísticas de AAJ, ACP y ADL se utilizó el software estadístico SPSS versión 12.0 (SPSS Inc., Illinois).

Confía en tus capacidades. Saca el mayor provecho de ti mismo transformando ese abanico de pequeñas chispas que son tus posibilidades en una fogata de resultados.

Foster C. McClellan

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. COLOR

El color es uno de los atributos que afecta la percepción de la calidad de un alimento por parte del consumidor. En los productos lácteos los cambios de color están asociados principalmente a la reacción de Maillard, siendo una importante característica de su grado de avance. Tal reacción ocurre principalmente durante el procesamiento y el almacenamiento de los alimentos, dando lugar, como se indicó previamente, a la formación de un conjunto de productos incluyendo compuestos volátiles de bajo peso molecular, compuestos no volátiles coloreados de peso molecular intermedio y sustancias marrones de alto peso molecular (Carpenter y Booth, 1973; Finot y col., 1981). Los productos lácteos en polvo son susceptibles a la reacción de Maillard debido a las altas concentraciones de lactosa y proteínas con alto nivel de lisina. Además, muchos factores influyen en el grado de avance de la reacción de Maillard, tales como la temperatura (Labuza, 1979; Fox y col., 1983), la actividad de agua (Eichner y Karel, 1972), el pH (Ashoor y Zent, 1984; O'Beirne, 1986), el contenido de humedad (Singh y Newstead, 1998; Franzen y col., 1990; Yeo y Shibamoto, 1991) y la composición química del alimento (Buera y col., 1987).

Los productos de la reacción de Maillard afectan procesos fisiológicos en el cuerpo humano (De Block y col., 1998) provocando:

- ⇒ disminución de la digestibilidad de las proteínas y excreción de fragmentos de péptidos en las heces;
- ⇒ excreción de varios péptidos hidrolizados no resorbidos a través de la orina;
- ⇒ retardo en la liberación de aminoácidos desde las proteínas condensadas por la reacción de Maillard, dando así lugar a un mayor tiempo de suministro de aminoácidos por anabolismo, resultando finalmente en valores biológicos más bajos;

- ⇒ reducción en la actividad de varias enzimas (ej.: dipeptidasas) debido a la interferencia con péptidos no digeridos.

El amarronamiento es deseado en algunos tipos de alimentos (productos panaderos, chocolate, café), sin embargo, es indeseable en productos lácteos como la leche en polvo (Morales y van Boekel, 1998).

Además, debido a que la lisina está presente en cereales en cantidades limitadas, los productos lácteos son de gran importancia como fuente de aminoácidos esenciales. La reacción de Maillard causa la pérdida de la lisina disponible y reduce la calidad de la proteína.

Kwok y col. (1999) informaron que el grado de amarronamiento medido mediante el valor L de Hunter se puede utilizar como un índice confiable para medir la calidad de la proteína de leche de soja procesada.

De allí, que la evaluación del color podría ser considerada como una estimación directa de la calidad de la leche en polvo.

III.1.1. COLOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA: SEGUIMIENTO EN LÍNEA DE ELABORACIÓN

Las **Tablas 12 a 15** muestran los promedios, la desviación estándar y los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para los parámetros de color (L^* , a^* , b^* y r_{450}) de leche entera en polvo (LEP) recién elaborada en las distintas estaciones del año.

En la **Tabla 12**, se puede observar que las LEP procesadas bajo el tratamiento térmico indirecto (TTI: 90-93°C; 3 min) presentaron los valores de L^* más bajos ($P < 0,05$) comparadas a las LEP del tratamiento térmico directo (TTD: 105°C; 30 s). Paralelamente, las LEP elaboradas en la estación de verano mostraron los valores de L^* más bajos ($P < 0,05$) comparado a las LEP elaboradas en las estaciones de otoño e invierno. El parámetro L^* indica la luminosidad de las muestras. El decrecimiento de la luminosidad es el resultado de la formación de pigmentos marrones en las mezclas caseínas-azúcares como consecuencia de la reacción de Maillard (Morales y van Boekel, 1998). Por otro lado, un comportamiento inverso se observó en el parámetro b^* comparado a la componente L^* (**Tabla 13**),

mostrando las LEP del TTI de la estación de primavera un valor mas alto ($P < 0,05$) que el de las LEP del TTD correspondientes a las estaciones de otoño, invierno y primavera. Por su parte, la componente a^* , mostrada en la **Tabla 14**, evidenció los mayores valores ($P < 0,05$) en las LEP elaboradas en la estación de verano.

Tabla 12. Medias y desviación estándar de los valores de L^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico Indirecto	92,63 ± 0,44 bA	93,09 ± 0.173 bA	92,56 ± 0,35 bAB	92,19 ± 0,32 bB
Tratamiento				
Térmico Directo	93,38 ± 0,083 aA	93,19 ± 0,30 aA	93,22 ± 0,18 aAB	92,90 ± 0,48 aB
Nivel de Significancia del ANOVA ^b				
Modelo		Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	****	***	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas al TT y medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo.

Tabla 13. Medias y desviación estándar de los valores de b^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otono	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	19,61 ± 0,57 abc	20,30 ± 0,66 bc	21,11 ± 0,61 c	20,37 ± 0,58 bc
Tratamiento Térmico Directo	18,62 ± 0,42 ad	18,55 ± 0,54 a	19,12 ± 0,66 ab	20,05 ± 0,92 bcd
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento Térmico (TT)	Estación (E)	TT*E
	****	****	**	*

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la interacción TT*E.

^b **** $P < 0,0001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

Tabla 14. Medias y desviación estándar de los valores de a^* para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otono	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	-0,49 ± 0,11 ac	-0,53 ± 0,13 bc	-0,65 ± 0,20 bc	-0,74 ± 0,10 a
Tratamiento Térmico Directo	-0,73 ± 0,10 ac	-0,65 ± 0,17 bc	-0,50 ± 0,19 bc	-0,85 ± 0,16 a
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento Térmico (TT)	Estación (E)	TT*E
	****	NS	**	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; ** $P < 0,01$; NS: no significativo.

El color de un alimento es el resultado de los productos naturales asociados con la materia prima empleada para su elaboración y/o de los compuestos coloreados generados como resultado del procesamiento (Morales y van Boekel, 1998).

Es interesante hacer notar que las LEP producidas en nuestro país son más amarillas que las producidas en otros países. Por ejemplo, la leche entera en polvo producida en Dinamarca tiene un valor promedio de b^* de 13 (Nielsen y col., 1997b) versus el valor promedio de 20 para la producida en Argentina. Esta característica podría deberse al efecto combinado del tratamiento térmico aplicado, durante la elaboración de la leche en polvo, y a los distintos programas de alimentación empleados a lo largo del año.

La reflectancia (r) es la cantidad de luz que refleja una superficie (Guirao, 1980). Esta medida se puede utilizar para indicar la concentración de pigmentos marrones (Kwok y col., 1999). En la **Tabla 15** se puede observar que las LEP manufacturadas bajo el TTD presentaron valores de r_{450} significativamente mayores que aquellos obtenidos para las LEP del TTI. El valor de r_{450} más grande estaría asociado a una mayor claridad de las muestras (Jung y col., 2003).

Tabla 15. Medias y desviación estándar de los valores de reflectancia a 450 nm (r_{450}) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico				
Indirecto	56,09 ± 1,65 b	57,15 ± 0,98 b	57,24 ± 2,74 b	57,36 ± 1,73 b
Tratamiento				
Térmico				
Directo	59,71 ± 0,55 a	59,54 ± 1,12 a	58,99 ± 1,10 a	58,42 ± 1,66 a
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	****	NS	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas al TT.

^b **** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

Un mayor grado de desarrollo de la reacción de Maillard puede ocurrir como resultado del calentamiento durante el procesamiento y/o almacenamiento de la leche en polvo y esto conduce a un cambio de color más grande (Celestino y col., 1997b). Cabe resaltar que el tratamiento térmico indirecto aplicado en la elaboración de las LEP bajo estudio, podría haber contribuido a un cambio del color más pronunciado debido a un mayor desarrollo de la reacción de Maillard, como consecuencia de la acción combinada de temperatura-tiempo empleada en dicho tratamiento térmico.

La acción combinada de temperatura-tiempo de un proceso térmico es determinante de la eficacia microbiológica y del efecto sobre los cambios químicos de un alimento. El objetivo de cualquier tratamiento térmico es la destrucción de los microorganismos presentes esporulados o no, o al menos aquellos que puedan multiplicarse en el producto final. Se conoce que cuanto más severo es el tratamiento térmico aplicado a un alimento menor será la alteración microbiológica que sufrirá el mismo. Sin embargo, cuanto mayor sea la intensidad del tratamiento térmico aplicado, mayor serán los cambios químicos ocasionados, sobre todo en lo referente a la calidad organoléptica y al valor nutritivo (Ordóñez y col., 1998).

Además, se conoce que en general los procesos de calentamiento directos causan menor amarronamiento que el calentamiento indirecto. Esto se debe a que en los procesos indirectos se necesita un tiempo de residencia mayor para llegar a la temperatura de trabajo, siendo por lo tanto la dosis de calor impartida a la leche mayor en este tipo de tratamientos (Celestino y col., 1997b).

La suposición de la mayor severidad del tratamiento térmico indirecto se puede sustentar, además, por el contenido de hidroximetilfurfural (HMF) libre, indicador de etapas avanzadas de la reacción de Maillard (van Boekel, 1998), hallado en las diferentes LEP estudiadas. El HMF es uno de los intermediarios de la reacción de Maillard, y se usa para evaluar el desarrollo de la misma y por lo tanto como indicador de daño térmico (Burton, 1984; Pellegrino y col., 1995; Ferrer y col., 1999). El contenido de HMF se considera un índice útil para discriminar entre los distintos tratamientos térmicos (pasteurización, UHT, esterilización, etc.) a los que se somete la leche (Ferrer y col., 1999).

Entre los factores que influyen el desarrollo de la reacción de Maillard se encuentran la temperatura y el tiempo empleado en el tratamiento térmico (Singh y Newstead, 1998). De esta manera los valores observados de HMF libre (**Tabla 16**) nos estarían indicando que el TTD resultó menos severo que el TTI y por lo tanto explicarían, en parte, las diferencias halladas en los parámetros de color.

Tabla 16. Medias y desviación estándar de los valores de log de HMF libre (μMl^{-1}) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otono	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	0,44 ± 0,005 aB	0,31 ± 0.049 aC	0,70 ± 0,058 aA	0,84 ± 0,066 aA
Tratamiento Térmico Directo	0,48 ± 0,078 bB	0,25 ± 0,077 bC	0,63 ± 0,066 bA	0,69 ± 0,12 bA
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento Térmico (TT)	Estación (E)	TT*E
	****	*	****	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas al TT y medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; * $P < 0,05$; NS: no significativo.

Otro parámetro que nos permite explicar las diferencias en los parámetros de color en relación a los tratamientos térmicos aplicados es el contenido de proteínas de suero no desnaturalizadas (WPNI). El American Dry Milk Institute (ADMI) utiliza el contenido de WPNI (método de Harland y Ashworth, 1947, citado en Singh y Newstead, 1998; Celestino y col., 1997a) para clasificar las leches en polvo sobre la base del tratamiento térmico aplicado. Sobre la base de este método, como se describió previamente, la leche en polvo se clasifica en leche de bajo, medio y alto tratamiento térmico. Así, en la **Tabla 17** se puede observar que las LEP del

TTD mostraron mayores valores de WPNI respecto de las LEP del TTI. Este resultado nos permitiría concluir también que el TTD resultó menos severo que el TTI.

Tabla 17. Medias y desviación estándar de los valores de WPNI (mgg⁻¹ polvo) para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otono	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico				
Indirecto	0,25±0,10 bC	0,52±0,23 bBC	0,80±0,14 bA	0,69±0,29 bAB
Tratamiento				
Térmico				
Directo	0,96±0,17 aC	1,01±0,23 aBC	1,32±0,20 aA	1,36±0,35 aAB
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	****	**	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (*P* < 0,05) relacionadas al TT y medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas (*P* < 0,05) relacionadas a la E.

^b **** *P* < 0,0001; ** *P* < 0,01; NS: no significativo.

En relación a las diferencias halladas en los parámetros de color L* y b* en las distintas estaciones del año estas podrían deberse a diferencias composicionales de la leche cruda de la cual partieron. Debido a ello, en el presente estudio se evaluaron parámetros composicionales de la materia prima como así también el pH para conocer su efecto sobre el grado de desarrollo de la reacción de Maillard y como consecuencia del color en las LEP evaluadas. A continuación se presentan los resultados del ANOVA para las variables de proteína total, caseínas, proteínas de suero, lactosa y pH de la leche cruda (**Tablas 18 a 22**).

Como se puede observar en la **Tabla 18**, no se evidenciaron diferencias significativas en los valores de proteína total respecto del origen de la leche cruda. En relación a la variación estacional, se observó una

disminución progresiva del contenido de proteína total a través de las estaciones del año, siendo el valor de otoño estadísticamente diferente al de primavera y verano y el valor de invierno estadísticamente diferente al de verano.

Tabla 18. Medias y desviación estándar del contenido de proteína total (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

Leche cruda destinada a:	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	3,35±0,06 a	3,31±0,05 ac	3,23±0,06 bc	3,14±0,07 b
Tratamiento Térmico Directo	3,32±0,04 a	3,28±0,06 ac	3,25±0,06 bc	3,18±0,05 b
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Origen (O)	Estación (E)	O*E
	****	NS	****	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

En el caso del contenido de caseínas, proteínas mayoritarias de la leche, el comportamiento fue similar al de la proteína total, siendo la leche cruda de verano la que menor valor ($P < 0,05$) presentó de las citadas proteínas (**Tabla 19**). Un comportamiento opuesto mostró el contenido de proteínas de suero (**Tabla 20**), siendo la leche cruda de verano la que presentó el valor más alto comparado al resto de las estaciones ($P < 0,05$). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que la alimentación, dada al ganado en las distintas estaciones del año, tiene sobre la composición de proteínas en la leche. En los meses de otoño e invierno la alimentación es a base de una ración mezcla que contiene concentrados proteicos a diferencia de la alimentación de primavera y verano basada en pastura (Castillo, 2002).

Tabla 19. Medias y desviación estándar del contenido de caseínas (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

Leche cruda destinada a:	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	2,46±0,06 ab	2,51±0,06 a	2,42±0,04 b	2,28±0,13 c
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	2,40±0,05 ab	2,47±0,07 a	2,39±0,02 b	2,32±0,07 c
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Origen	Estación (E)	O*E
	****	NS	****	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

Tabla 20. Medias y desviación estándar del contenido de proteínas de suero (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

Leche cruda destinada a:	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	0,60±0,002 bc	0,58±0,05 c	0,62±0,02 b	0,69±0,02 a
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	0,61±0,03 bc	0,58±0,03 c	0,63±0,01 b	0,69±0,09 a
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Origen	Estación (E)	O*E
	****	NS	****	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

En relación al contenido de lactosa (**Tabla 21**), se observó que las leches crudas destinadas a la elaboración de las LEP mediante el TTI tenían menor contenido ($P < 0,05$) comparado a las leches crudas destinadas a las

LEP del TTD. Además, se observó que la leche cruda correspondiente a la estación de otoño presentaba los valores más bajos ($P < 0,05$) de lactosa comparado al resto de las estaciones. Estas diferencias estacionales pueden deberse a una diversidad de factores entre los cuales la salud del animal (conteo de células somáticas) y el aguado aparecen como los más importantes (Castillo, 2002).

Tabla 21. Medias y desviación estándar del contenido de lactosa (g100ml⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

Leche cruda destinada a:	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	4,60±0,02 Bb	4,71±0,04 bA	4,72±0,08 bA	4,70±0,04 bA
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	4,61±0,02 AB	4,74±0,04 aA	4,77±0,01 aA	4,77±0,04 aA
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Origen	Estación (E)	O*E
	****	*	****	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas al O y medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; * $P < 0,05$; NS: no significativo.

La velocidad relativa de la reacción de Maillard muestra un incremento por arriba de pH 8 y por debajo de pH 3, siendo la velocidad de la misma minina en el rango de pH 3-8 (Hutchings, 1999).

En la **Tabla 22** se puede observar que los valores de pH de la leche cruda utilizada en este estudio se encuentran en el rango de minina velocidad relativa de la reacción de Maillard.

Tabla 22. Medias y desviación estándar de los valores de pH en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

Leche cruda destinada a:	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	6,72±0,03 a	6,70±0,03 b	6,68±0,03 b	6,71±0,01 a
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	6,72±0,03 a	6,70±0,02 b	6,71±0,02 b	6,72±0,02 a
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Origen	Estación (E)	O*E
	****	NS	*	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$; NS: no significativo.

El comportamiento estacional observado en los parámetros L^* y b^* de las leches en polvo (**Tablas 12 y 13**) se podría explicar en parte por los datos composicionales de la materia prima. Así, los menores valores de L^* y los mayores b^* , en general, observados en las LEP de verano podrían ser debido al mayor contenido de proteínas de suero. Además, otros factores no estudiados en la presente investigación podrían explicar el comportamiento en los parámetros de color. Así, los carotenoides, pigmentos de las plantas que los animales no sintetizan, se pueden encontrar en el tejido animal. Los mismos le confieren un color amarillo a la grasa de oveja (Kirton y col., 1975; Kruggel y col., 1982) y a la leche bobina y a los quesos (Knight y Death, 1999; Coulon y Priolo, 2002). Priolo y col. (2003) mostraron que el color de la leche proveniente de oveja alimentada a pasto fue mas claro comparado al de la leche de las ovejas controles, alimentadas con una ración mezcla basada en silaje de maíz, (L^* : 76,42 versus 72,80; $P < 0,01$). Paralelamente, dichos autores observaron que las leches provenientes de animales alimentados con pastura tuvieron un valor de b^* mayor, indicativo de un color más amarillo, que el de las leches controles (5,13 versus 2,70; $P < 0,01$).

En el presente estudio las LEP elaboradas a partir de leche cruda obtenida en las estaciones de primavera y verano, en general, mostraron los valores más bajos de L^* y los más altos de b^* (**Tabla 12 y 13**). Estos resultados, de acuerdo a los estudios realizados por Priolo y col. (2003), podrían ser explicados por el programa de alimentación empleado. En la provincia de Santa Fe, cuenca lechera más importante de la Argentina, en las estaciones de primavera y verano se introduce en el programa de alimentación la pastura de alfalfa sin límites, mientras que el grano y el forraje de heno son rápidamente reducidos de la dieta. De esta manera, el comportamiento estacional evidenciado en el color de las LEP del presente estudio podría deberse a un mayor contenido de carotenoides de la leche cruda proveniente de las estaciones de primavera y verano comparado al contenido de las estaciones de otoño e invierno, sumado al efecto del tratamiento térmico aplicado.

Posteriormente al ANOVA, se aplicaron a los parámetros de color, el contenido de HMF libre y el WPNI de las LEP bajo estudio técnicas de análisis multivariado tales como análisis de componentes principales (ACP), análisis de agrupamiento jerárquico (AAJ) y análisis discriminante lineal (ADL). Este procedimiento se considera más apropiado para la interpretación de las diferencias halladas entre las variables bajo estudio y para conocer cuales contribuyen en mayor medida a la variación en los datos. De esta manera, se procedió a efectuar un AAJ para conocer el tipo de agrupamiento que presentaban las LEP manufacturadas bajo los dos tratamientos térmicos estudiados en las diferentes estaciones del año.

El AAJ (**Figura 13**) mostró dos grupos mayoritarios, reuniendo uno de los grupos el 85,0% de las muestras provenientes del TTD y un segundo grupo el 15% restante de las LEP del TTD y el 100% de las LEP del TTI. Estos resultados confirmarían el efecto diferencial del tratamiento térmico aplicado en la elaboración de las LEP. Además, para ambos tratamientos térmicos se observó, en general, un agrupamiento de las estaciones de otoño e invierno por un lado y primavera y verano conformando otro agrupamiento.

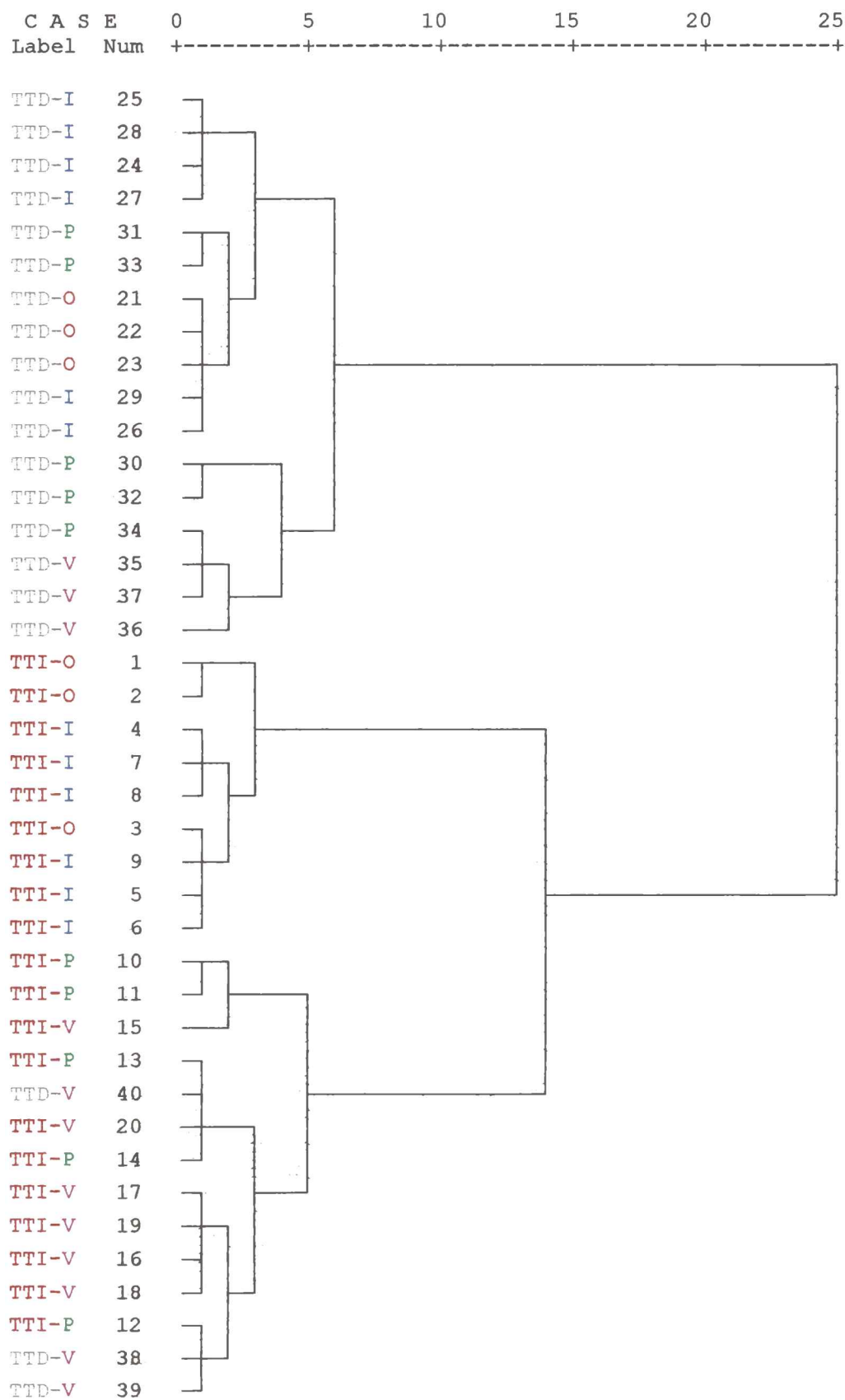


Figura 13. Análisis de agrupamiento jerárquico; considerando los parámetros L^* , a^* , b^* , r_{450} , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.

Además, se realizó un ACP, el cual permite verificar los resultados de los programas de agrupación. El ACP mostró dos componentes principales (CP) que explicaron el 78,1% de la variancia total. La CP₁ explicó el 51,1% y la CP₂ explicó el 27,0% (**Figura 14**). Como se puede observar en la **Figura 14** hay una separación de las LEP provenientes de los distintos tratamientos térmicos dada por la CP₁. Esta componente tiene una alta correlación positiva con el parámetro L^* ($r=0,806$), el WPNI ($r=0,890$) y r_{450} ($r=0,889$) y una correlación negativa con el parámetro b^* ($r=-0,779$) y en menor medida con el parámetro a^* ($r=-0,268$) y el log de HMF libre ($r=-0,395$). Por otro lado, la CP₂ está altamente correlacionada con a^* ($r=-0,778$) y con el log HMF libre ($r=0,801$). Así, podemos observar que las muestras de LEP provenientes del TTD tendrían mayores valores de L^* , WPNI y r_{450} y menores valores de b^* , a^* y HMF libre. Lo contrario se daría para las LEP del TTI. Nuevamente, se confirma lo evidenciado en el ANOVA, con relación al efecto del tratamiento térmico aplicado en la elaboración de las LEP. Al igual que en el AAJ, para ambos tratamientos térmicos se observó, en general, un agrupamiento de las estaciones de otoño e invierno por un lado y primavera y verano por otro.

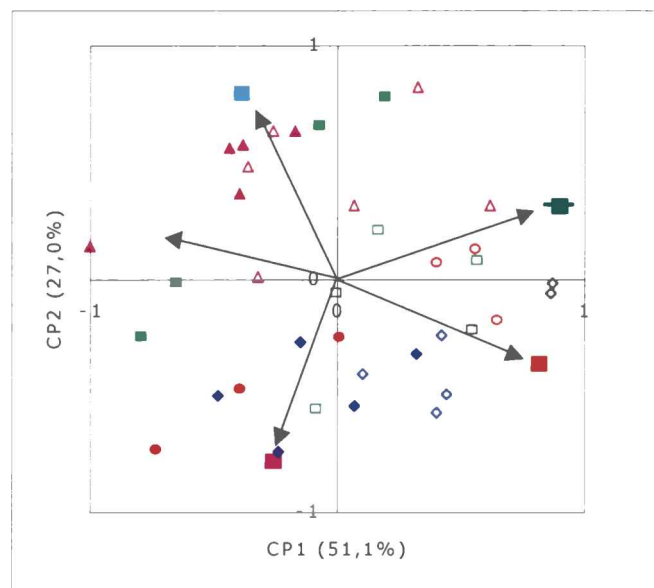


Figura 14. Análisis de componentes principales; considerando los parámetros L^* , a^* , b^* , r_{450} , Log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.

● TTI-Otoño ◆ TTI-Invierno ■ TTI-Primavera ▲ TTI-Verano □ TTD-Otoño ◇ TTD-Invierno □ TTD-Primavera ▲ TTD-Verano ■ L^* ■ b^* ■ a^* ■ log HMF libre ■ WPNI — r_{450}

Sobre la base del agrupamiento observado en las **Figuras 13 y 14** se realizó un ADL para cada uno de los tratamientos térmicos considerando las estaciones como variable de clasificación.

En el ADL para las LEP del TTD se obtuvieron dos funciones discriminantes (FD) que explicaron el 96,7% de la varianza total, con el 90% de clasificación correcta de cada muestra a su grupo de pertenencia en los casos originales y el 60% después de la validación cruzada. Cuando el ADL se llevó a cabo empleando el método de selección por pasos (método Lambda de Wilks) (**Figura 15**) se obtuvieron dos funciones que explicaron el 99,2% de la varianza total, con 95% de clasificación correcta de cada muestra a su grupo de pertenencia en los casos originales y un 85% después de la validación cruzada. En este caso las variables seleccionadas como responsables de la mayor discriminación fueron: a^* , b^* y log HMF libre.

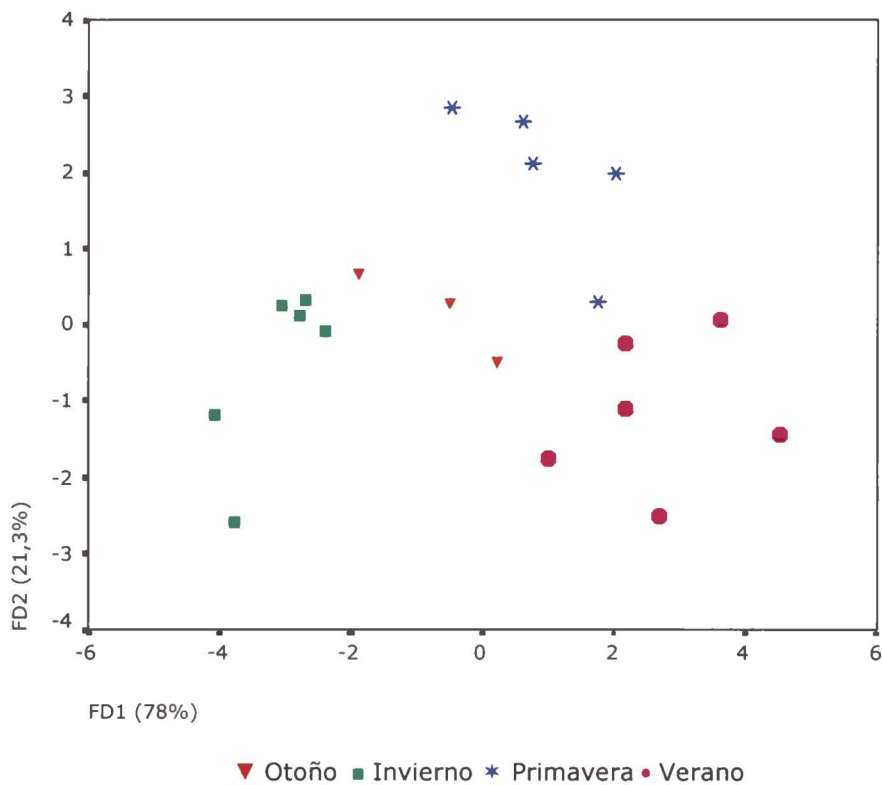


Figura 15. Análisis discriminante lineal; considerando los parámetros L^* , a^* , b^* , r_{450} , log HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTD en las distintas estaciones del año.

donde:

$$FD_1 = -0,174*a^* + 0,548*b^* + 0,884*Log\ HMF\ libre$$

$$FD_2 = 1,128*a^* + 0,797*b^* + 0,501*Log\ HMF\ libre$$

En el caso de las LEP elaboradas mediante el TTI, el ADL mostró dos funciones que explicaron el 99,8% de la varianza total, con un suceso de clasificación de cada muestra en su respectivo grupo del 100% de los casos originales y un 95% después de la validación cruzada. El ADL mediante el método de selección por pasos (método Lambda de Wilks) (**Figura 16**), mostró dos funciones que explicaron el 100% de la varianza total, con un suceso de clasificación de cada muestra en su respectivo grupo del 100% de los casos originales y un 95% después de la validación cruzada. Las variables seleccionadas, responsables de lograr una mejor discriminación entre las muestras, fueron: L^* , b^* y $\log$ HMF libre.

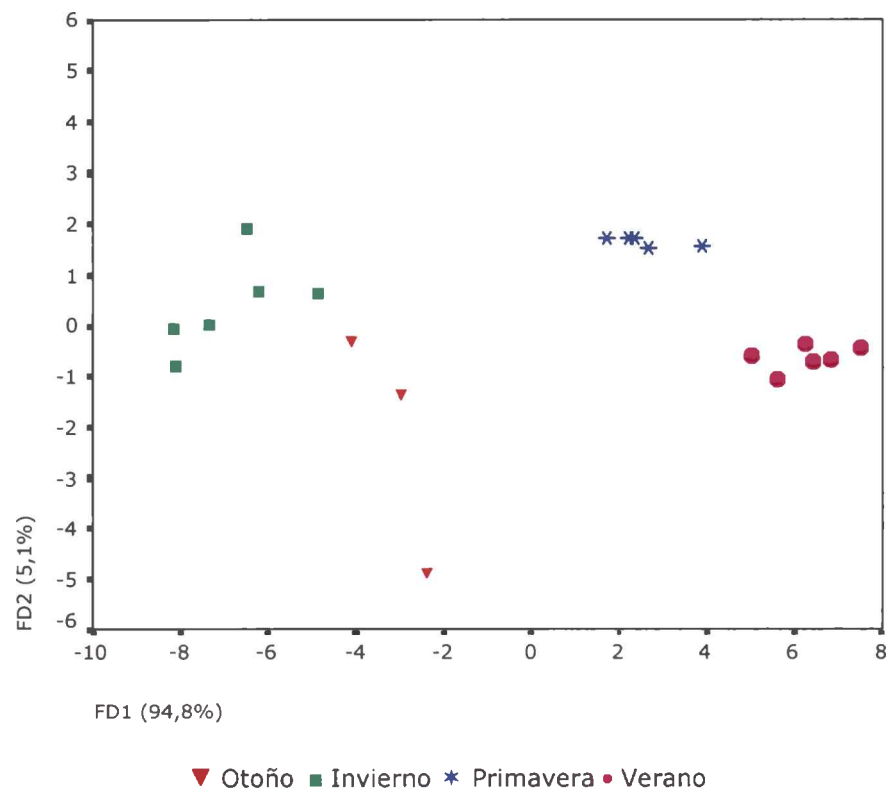


Figura 16. Análisis discriminante lineal; considerando los parámetros L^* , a^* , b^* , r_{450} , $\log$ HMF libre y WPNI; de LEP recién elaboradas aplicando el TTI en las distintas estaciones del año.

donde:

$$FD_1 = -0,689 \cdot L^* + 0,076 \cdot b^* + 1,111 \cdot \text{Log HMF libre}$$

$$FD_2 = 1,023 \cdot L^* + 1,316 \cdot b^* + 0,174 \cdot \text{Log HMF libre}$$

Los modelos planteados tanto para las LEP del TTD como del TTI se pueden considerar como una primera aproximación para identificar la procedencia de las LEP respecto de las estaciones del año. Cuando una nueva muestra se evalúa, deberían calcularse las dos funciones DF_1 y DF_2 . Luego los valores calculados se deberían comparar con los valores presentados en la **Tabla 23** que muestra la posición de cada estación en el sistema de 2 coordenadas.

Tabla 23. Promedios de las variables canónicas del análisis discriminante; considerando los valores de L^* , a^* , b^* y log HMF libre; para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.

	Tratamiento térmico indirecto		Tratamiento térmico directo	
	DF ₁	DF ₂	DF ₁	DF ₂
Otoño	-0,717	0,156	-3,133	-2,181
Invierno	-3,126	-0,540	-6,853	0,395
Primavera	0,945	1,970	2,576	1,645
Verano	2,698	-1,180	6,273	-0,676

Es importante señalar que las variables dadas en las funciones discriminantes no requieren de equipamiento de alto costo y son sencillas de medir. Consecuentemente, sería razonable pensar que los modelos planteados podrían ser aplicados en las empresas de elaboración de leche en polvo.

Finalmente, cabe destacar que se determinó la diferencia de color $\Delta E^2 = \Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2$ entre las muestras de LEP de las distintas estaciones, obteniéndose de todas las posibles comparaciones valores menores a 1, a excepción del ΔE de la comparación otoño-primavera de las LEP del TTI, cuyo valor fue de 1,5; y el ΔE otoño-verano de 1,57 y el ΔE invierno-verano de 1,61 de las LEP del TTD. Kessler y Fink (1986) indicaron un ΔE de 5 como valor umbral para que el amarronamiento en leche se vuelva

perceptible visualmente. Por su parte, Pagliarini y col. (1990) indicaron que ese ΔE debía alcanzar un valor de 3,8. Dichos autores propusieron al ΔE como un índice simple y reproducible para determinar la calidad comercial de leche desde el punto de vista de cambios de color. Comparando los valores de ΔE obtenidos en el presente estudio con aquellos citados en bibliografía se podría concluir que los cambios de color ocurridos en las LEP estudiadas no serían perceptibles visualmente.

III.1.2. COLOR DE LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

III.1.2.1. Color de leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses

Los resultados mostrados corresponden al estudio de la evolución del color de leches enteras en polvo elaboradas bajo el tratamiento térmico indirecto, envasadas en bolsas de polietileno de 400 g en caja de cartón en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

En la **Figura 17** se muestra el comportamiento del parámetro L^* durante el almacenamiento de las LEP elaboradas en las distintas estaciones del año. En dicha figura se puede observar que las LEP de las estaciones de otoño e invierno mostraron el valor mayor de L^* hacia el final del almacenamiento, sin embargo, las diferencias entre el inicio y el final del almacenamiento no resultaron estadísticamente significativas.

En relación a las LEP de verano el parámetro L^* no mostró diferencias significativas entre el final y el comienzo del almacenamiento. Por el contrario, las LEP elaboradas en la estación de primavera evidenciaron una disminución significativa (92,74 vs. 91,43; $P < 0,05$) del parámetro L^* durante el almacenamiento.

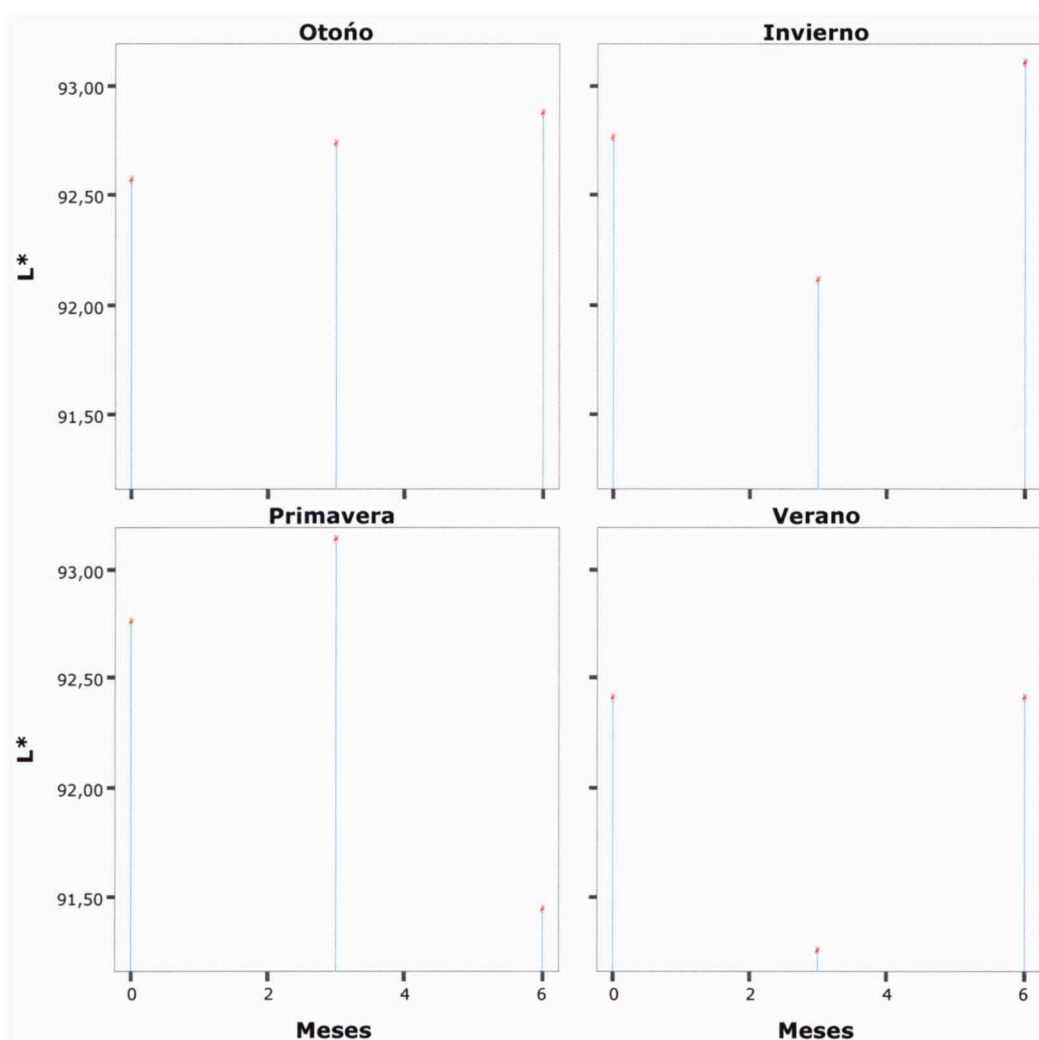


Figura 17. Valores de L^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

El parámetro b^* (**Figura 18**) evidenció en las LEP de otoño e invierno el valor mas bajo hacia el final del almacenamiento. En las LEP de invierno la diferencia entre el inicio y el final del almacenamiento resultó estadísticamente significativa. Las LEP de primavera y verano mostraron un comportamiento opuesto a las de otoño e invierno, siendo la diferencia en el valor de b^* entre el inicio y el final del almacenamiento estadísticamente significativa en las LEP de verano.

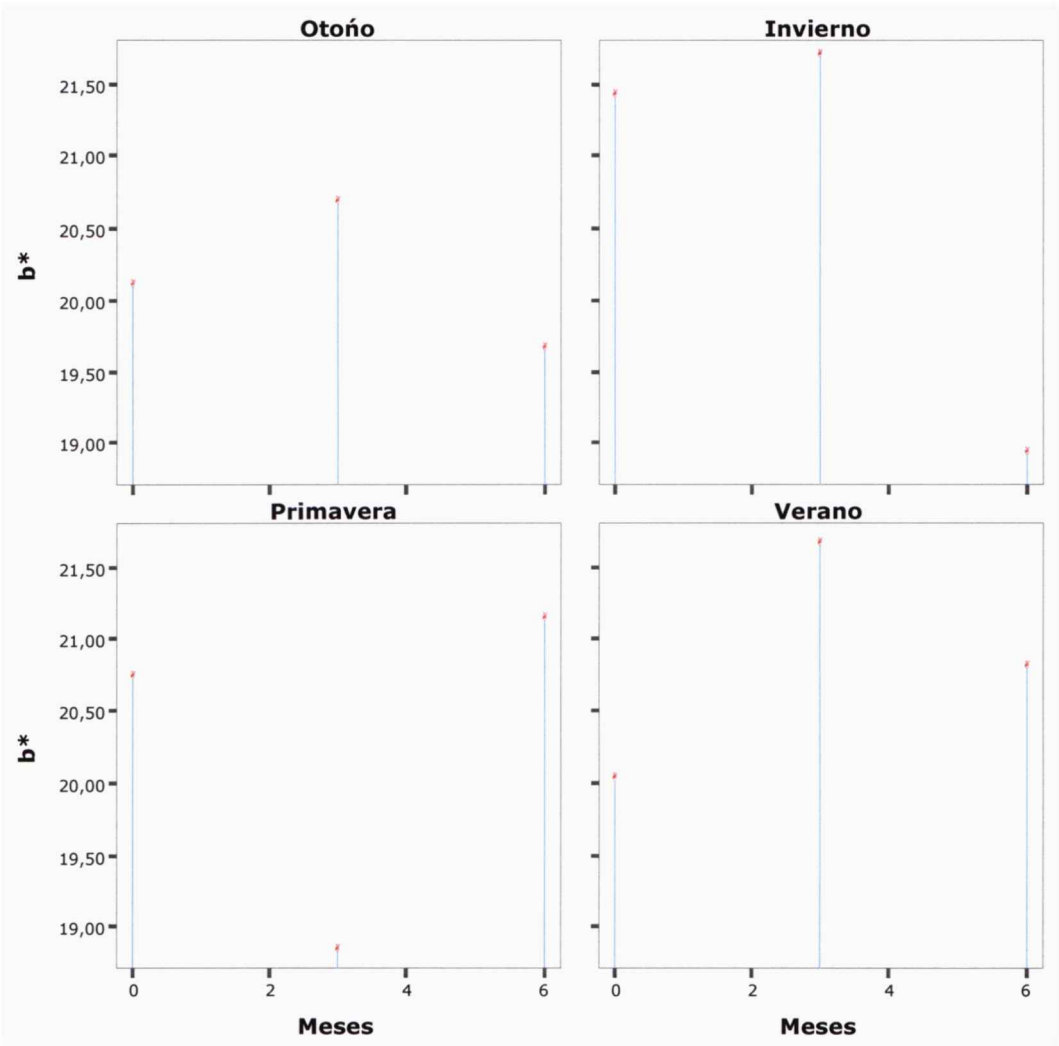


Figura 18. Valores de b^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

El parámetro a^* (**Figura 19**) mostró un valor estadísticamente menor hacia el final del almacenamiento respecto del comienzo del mismo en las estaciones de otoño, invierno y verano. En la estación de primavera dicho parámetro evidenció un incremento significativo (-0,89 vs. 0,16; $P < 0,05$).

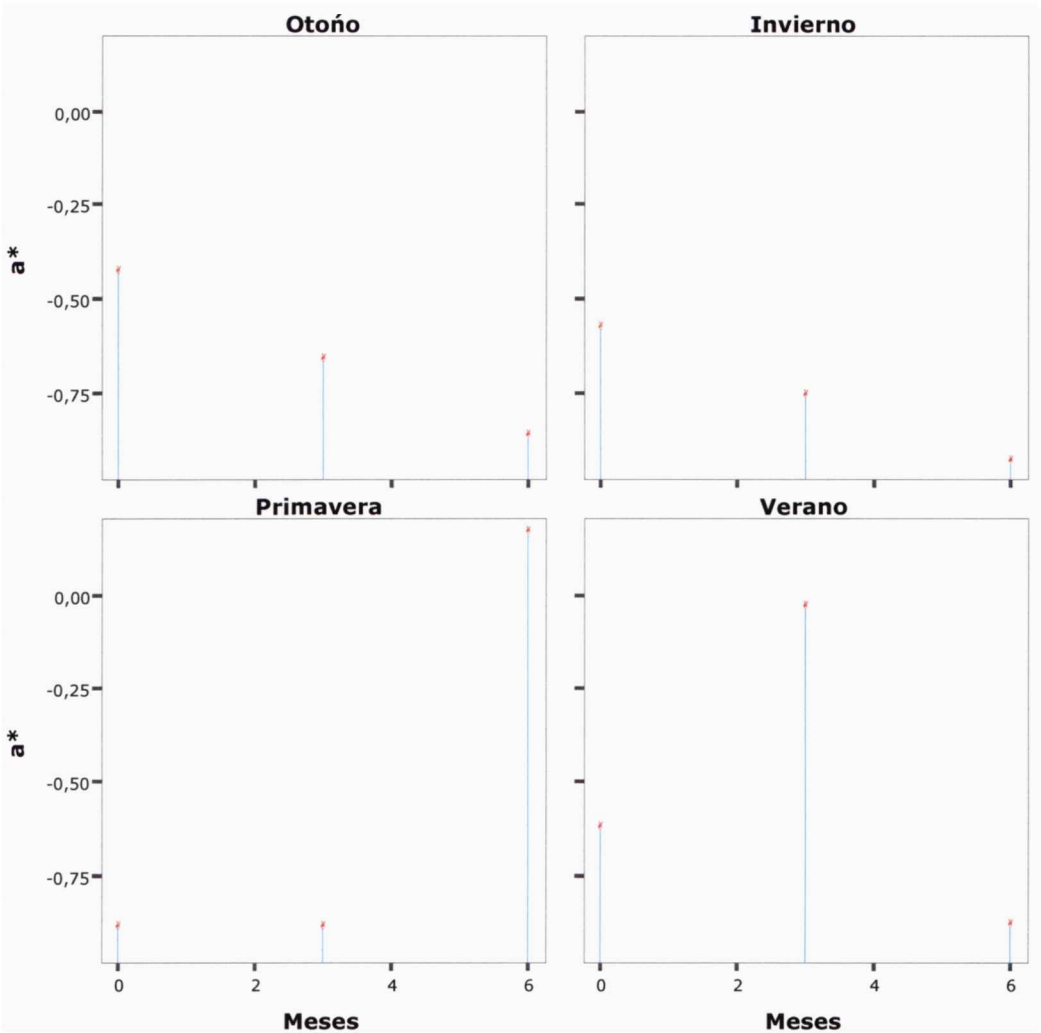


Figura 19. Valores de a^* de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

En relación al valor de reflectancia (r_{450}) se puede observar (**Figura 20**) que las LEP de otoño e invierno mostraron un valor estadísticamente más alto hacia el final del almacenamiento comparado al inicio del mismo. El aumento en el valor de r_{450} nos estaría indicando una mayor reflectancia asociado a una mayor luminosidad (L^*) de las muestras.

Para las LEP de primavera y verano el valor de r_{450} fue menor al final de almacenamiento respecto del inicio del mismo, siendo la diferencia entre el inicio y el final del almacenamiento estadísticamente significativo en las LEP de primavera. De acuerdo a Kwok y col. (1999) la medida de r_{450} puede ser empleada para indicar la concentración de pigmentos marrones.

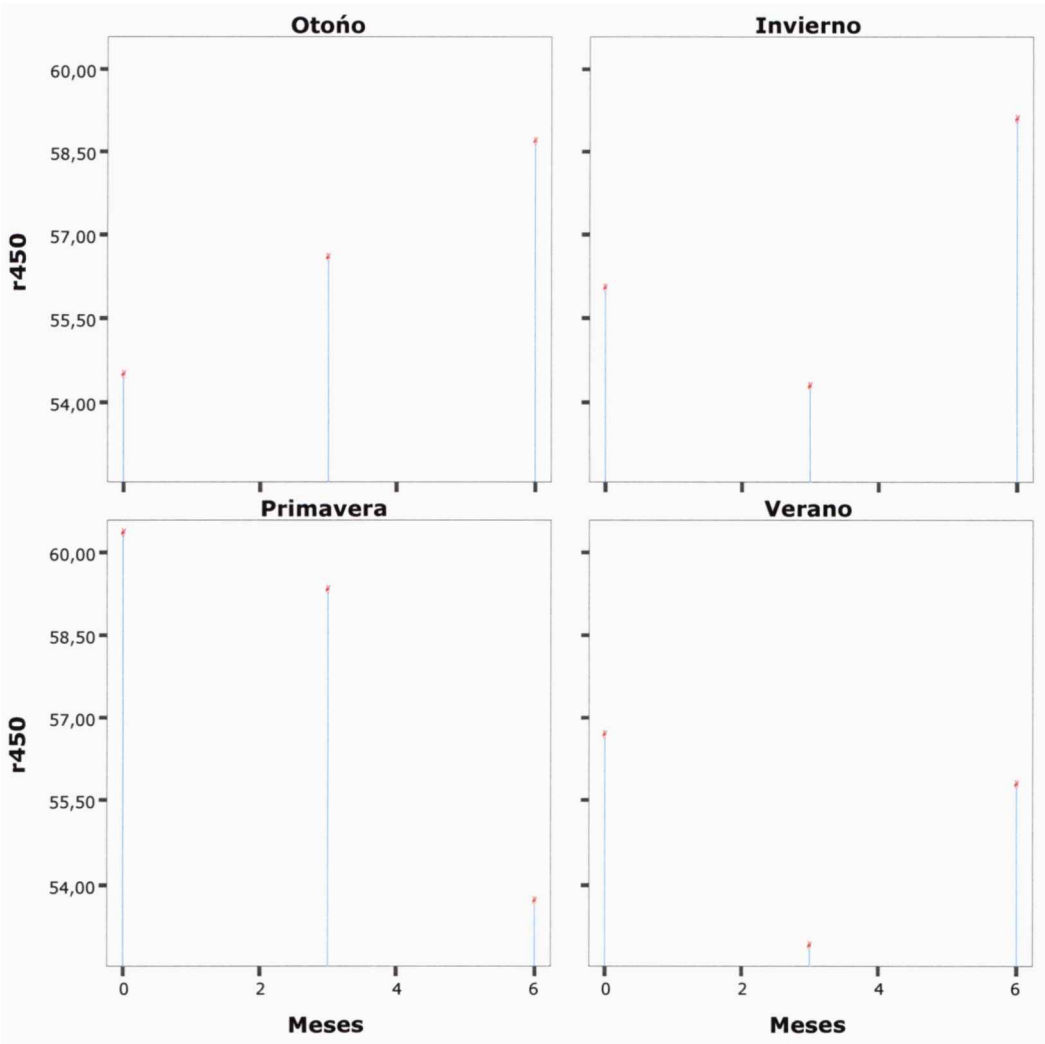


Figura 20. Valores de r_{450} de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

Nielsen y col. (1997b) realizaron un estudio sobre leche entera en polvo envasada en atmósfera modificada (70% N_2 y 30% CO_2) y sobre su leche reconstituida, ambas almacenadas a 50°C durante 7 semanas. En dicha investigación los autores hallaron que la leche en polvo se tornaba más oscura, amarilla y roja, indicado por el decrecimiento en el valor de L y el incremento en el valor de a y b durante el período bajo análisis. Por su parte, la leche reconstituida exhibía los mismos cambios cualitativos que la leche en polvo para los parámetros L y b, pero opuesto en el caso del parámetro a. Los autores atribuyeron el incremento en el valor de b en ambas leches, en polvo y reconstituida, a la reacción de Maillard, la cual

esta promovida por alta actividad de agua y alta temperatura de almacenamiento. Además, Celestino y col. (1997b), en un estudio realizado sobre leche UHT elaborada a partir de leche entera en polvo, mostraron un decrecimiento en el valor de L e incrementos en el valor de a y b durante 6 meses de almacenamiento. Los autores asociaron los cambios de color durante el almacenamiento también a la reacción de Maillard.

Por su parte, Kneifel y col. (1992) mostraron una buena correlación entre el parámetro b^* y el grado de amarronamiento no enzimático en suero en polvo.

En el presente estudio, la disminución en el parámetro L^* , y el incremento en los parámetros a^* y b^* de las LEP de primavera concuerdan con las evidencias de Nielsen y col. (1997b) en leche entera en polvo y con las de Celestino y col. (1997b) en leche UHT. Por su parte, el decrecimiento de L^* y a^* y el incremento en b^* observado para las LEP de verano responden al comportamiento observado por Nielsen y col. (1997b) en leche entera en polvo reconstituida. De acuerdo a lo expuesto por Nielsen y col. (1997b) y Celestino y col. (1997b) los cambios observados en los parámetros de color en las LEP de primavera y verano de la presente tesis podrían estar asociados a la reacción de Maillard promovida por las condiciones temperatura-tiempo empleadas en el tratamiento térmico.

Además, se conoce que la reacción de Maillard es uno de los factores que puede contribuir al decrecimiento en la solubilidad del polvo (Kudo y col., 1990). En la presente tesis el índice de insolubilidad de las LEP provenientes de las estaciones de otoño, invierno y verano no superaron el valor de 0,1 ml recomendado para el proceso de reconstitución de leche en polvo (Celestino y col., 1997a). Sin embargo, las LEP de primavera mostraron un incremento en el índice de insolubilidad durante el período de almacenamiento (tiempo inicial < 0,1 ml vs. tiempo final = 0,3 ml), lo cual podría estar indicando un efecto mas importante de la reacción de Maillard en las citadas LEP.

Por su parte, los cambios observados, aunque no todos significativos, en los parámetros de color de las LEP de otoño e invierno (incremento de L^* , y disminución de a^* y b^*) fueron opuestos a los de las LEP de primavera y verano. Este comportamiento evidencia las diferencias fisiológicas y

nutricionales de las vacas lecheras durante las diferentes estaciones del año.

Se conoce además que durante el almacenamiento de la leche en polvo en una atmósfera húmeda se inicia la cristalización de la α -lactosa con una migración de la grasa libre hacia la superficie del polvo (Saito, 1985). Este fenómeno podría incrementar la concentración de β -caroteno en la superficie del polvo y de esta forma dar lugar a valores de a y b más altos y a un decrecimiento del valor de L (Nielsen y col., 1997b). El aumento de β -caroteno en leche cruda está asociado al consumo de pasturas frescas, alimentación característica de primavera y verano.

De la misma forma que para el seguimiento en línea de elaboración se calcularon los valores de $\Delta E^2 = \Delta a^2 + \Delta b^2 + \Delta L^2$ entre el comienzo y el final del almacenamiento para las LEP de cada una de las estaciones. Los valores ΔE^2 calculados estuvieron por debajo del valor umbral de 3,8 dado por Pagliarini y col. (1990), indicando de esta manera que los cambios observados en los parámetros de color de las LEP envasadas en aire y almacenadas durante 6 meses a 20°C no darían lugar a cambios visuales perceptibles.

Renner (1988) indicó que durante el almacenamiento prolongado la reacción de Maillard tiene lugar en un grado apreciable solo cuando la temperatura de almacenamiento se encuentra por encima de 20°C. Los resultados aquí mostrados, están en acuerdo con lo señalado por Renner (1988), ya que las condiciones usadas para el almacenamiento de las LEP fueron de 20°C $\pm$ 0,5°C y no se observaron cambios apreciables en el color de las mismas.

Finalmente, es importante hacer notar que Celestino y col. (1997a) informaron que la leche entera en polvo envasada en aire tiene un máximo de vida útil de 6 meses a temperatura ambiente.

III.1.2.2. Color de leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses

Los resultados mostrados corresponden al estudio de la evolución del color de leches enteras en polvo elaboradas bajo el tratamiento térmico

directo, envasadas en latas de aluminio de 800 g en atmósfera inerte de N₂ y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

En la **Figura 21** se puede observar que si bien se observó un valor menor del parámetro L*, en todas las estaciones, hacia el final del almacenamiento respecto del comienzo del mismo, las diferencias entre el inicio y el final del almacenamiento no resultaron estadísticamente significativas.

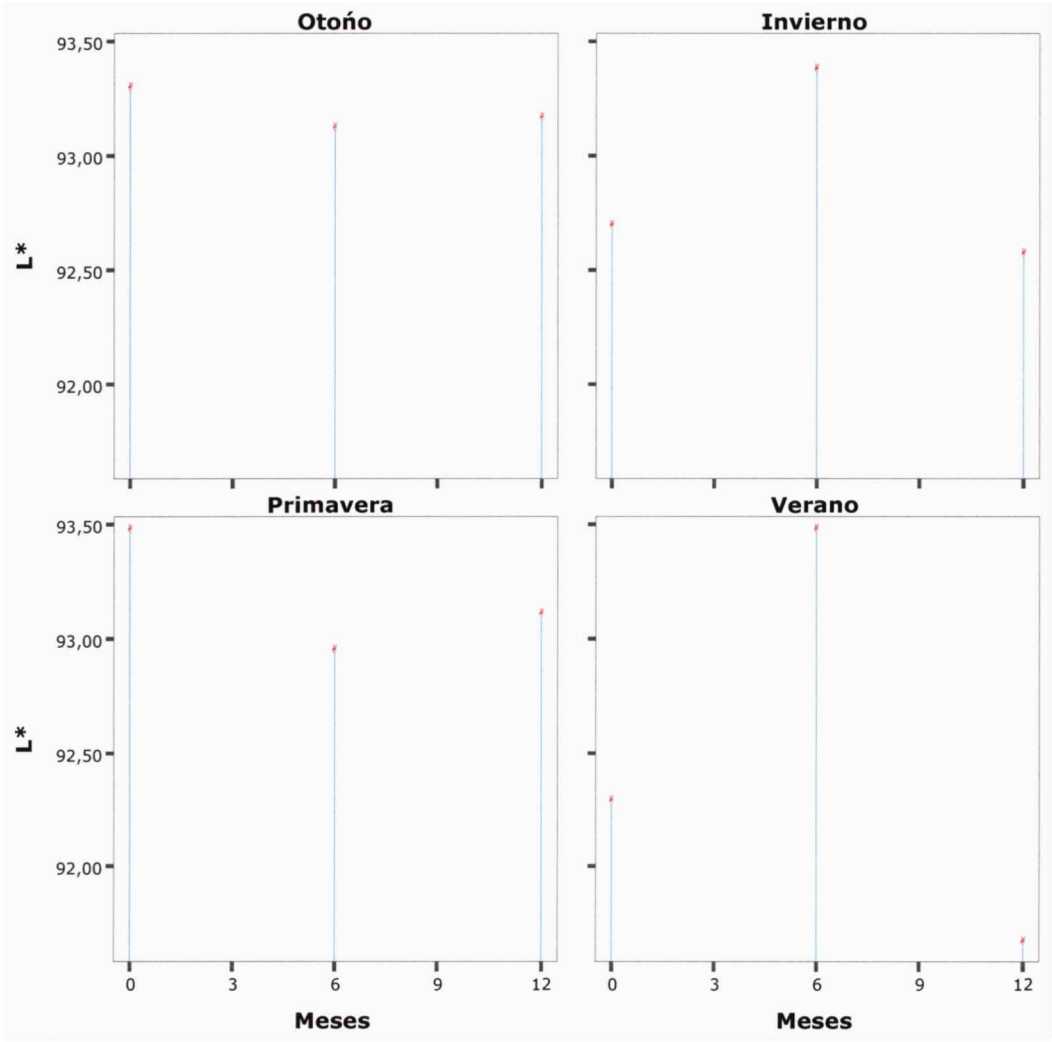


Figura 21. Valores de L* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

En relación al parámetro b*, si bien los valores hacia el final del almacenamiento fueron mayores que al inicio para las LEP de otoño, invierno y primavera tales diferencias no resultaron estadísticamente

significativas (**Figura 22**). Por su parte, las LEP de verano evidenciaron un decrecimiento significativo ($P < 0,05$) del parámetro b^* hacia el final del almacenamiento.

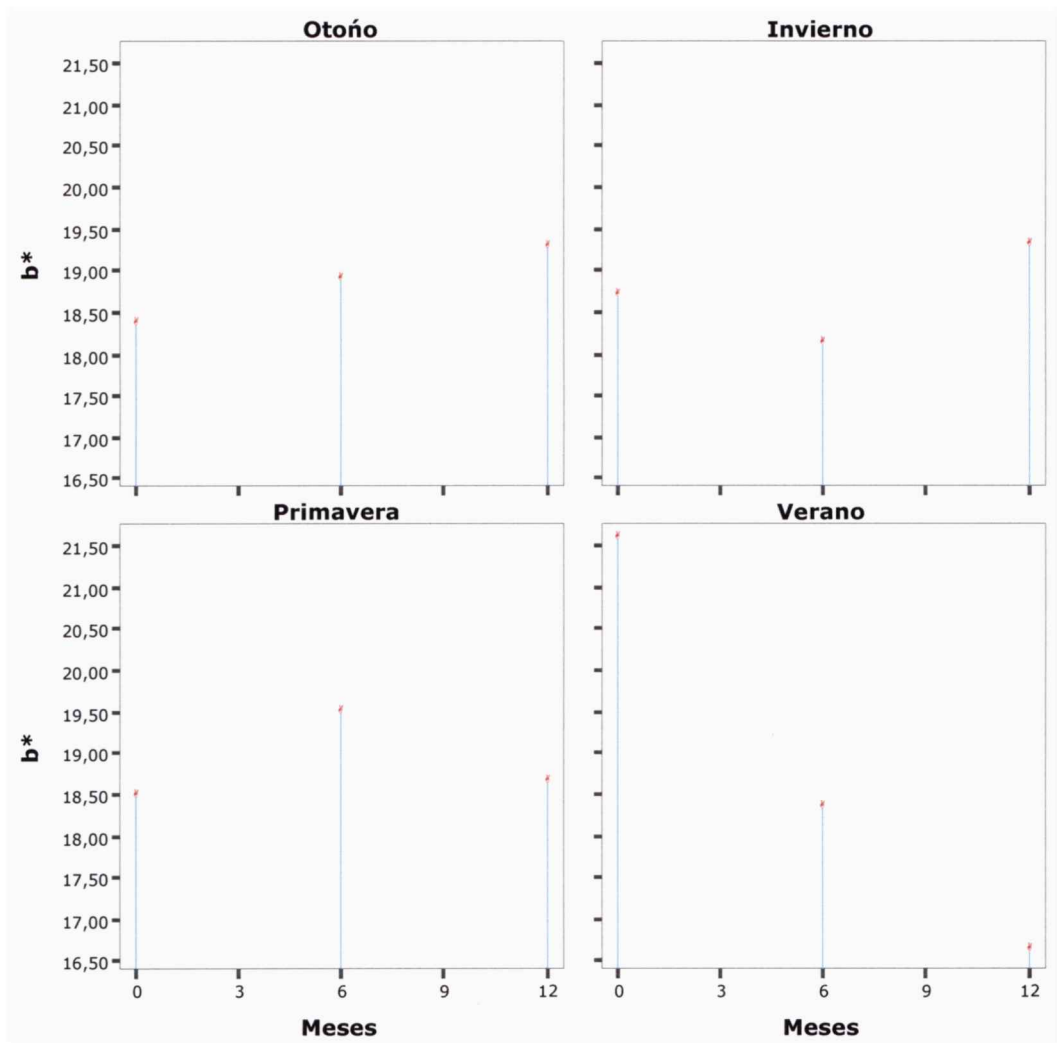


Figura 22. Valores de b^* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ durante 12 meses.

Por su parte, sin bien el parámetro a^* , en general, mostró un decrecimiento significativo durante el almacenamiento en cada una las estaciones (**Figura 23**), tal comportamiento no respondería a cambios asociados al desarrollo de la reacción de Maillard de acuerdo a lo expuesto, entre otros, por Celestino y col. (1997b); Kwok y col. (1999). Dichos autores indicaron que el decrecimiento en el valor de L^* y el incremento en

el valor de a^* y b^* podrían ser utilizados como indicadores de pardeamiento no enzimático.

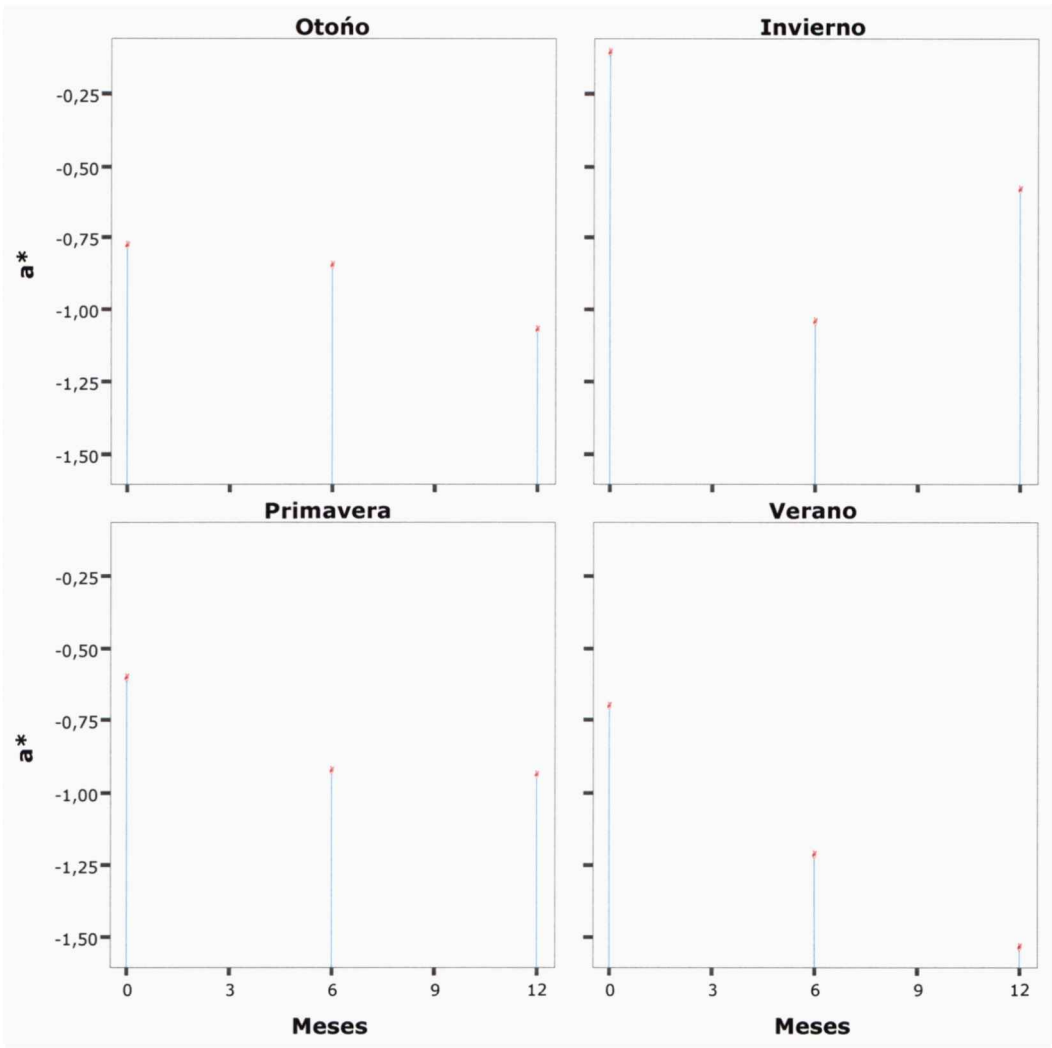


Figura 23. Valores de a^* de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ durante 12 meses.

El valor de r_{450} en las distintas estaciones (**Figura 24**) mostró una disminución cuando se comparó el tiempo inicial con el final del almacenamiento en cada una de las estaciones, sin embargo, tal disminución no resultó estadísticamente significativa.

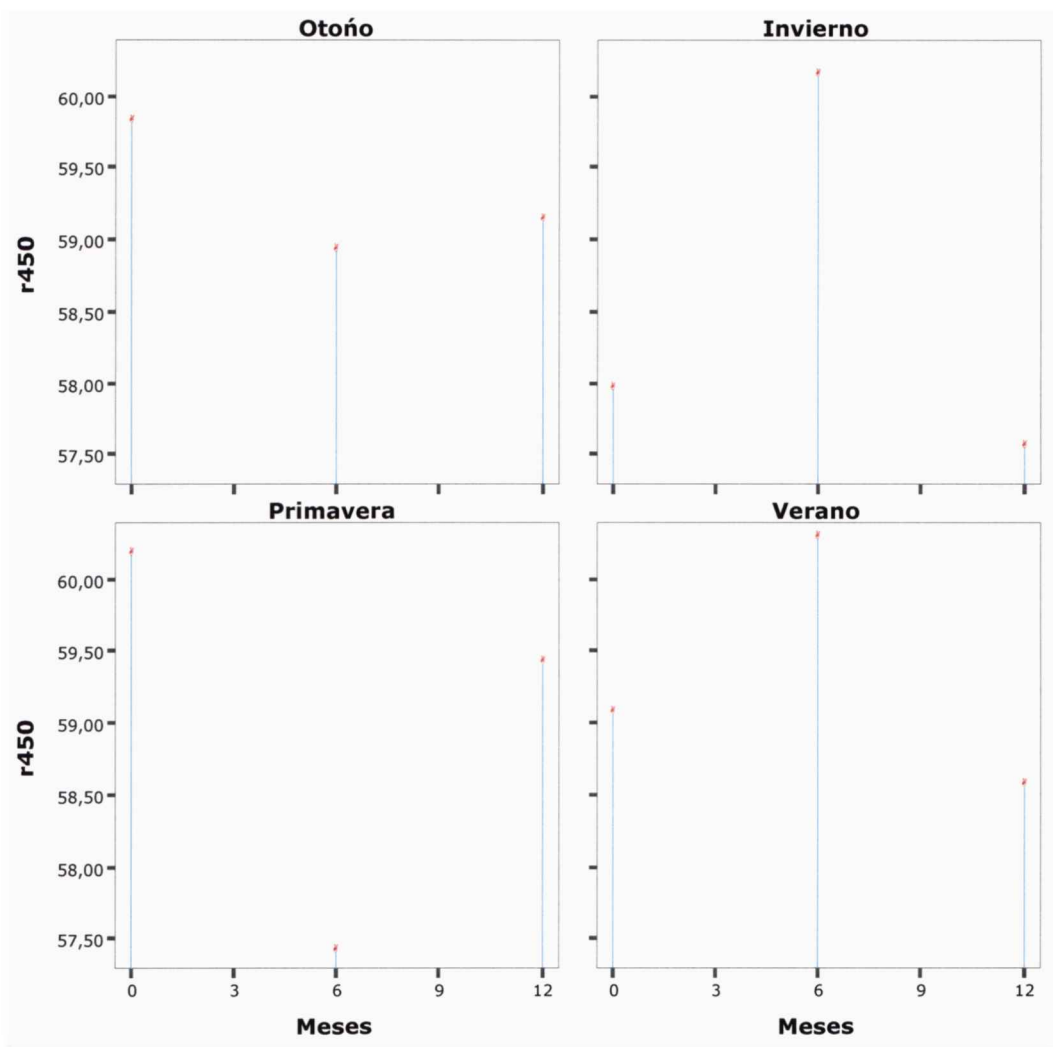


Figura 24. Valores de r_{450} de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ durante 12 meses.

A juzgar por la evolución general de los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) y de la reflectancia (r_{450}), las LEP provenientes del TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas durante 12 meses parecieran no haber sufrido cambios sustanciales en el color, indicando que la combinación de un tratamiento térmico menos intenso y la atmósfera de N_2 habría contribuido a preservar las características del color de las LEP durante el período de almacenamiento. Además, de acuerdo a Celestino y col. (1997a), la leche entera en polvo envasada bajo vacío o en atmósfera inerte, tal como N_2 , puede extender su vida útil más de 12 meses. Sin embargo, las LEP de verano mostraron un decrecimiento significativo del

color b^* . Este resultado podría ser explicado a través del contenido de oxígeno residual de estas leches (4,03% para el comienzo del almacenamiento, 5,88% a los 6 meses y 6,20% al final del almacenamiento) que fueron mas altos que los correspondientes a las LEP de las otras estaciones que en promedio no superaron el 3%. Este nivel de oxígeno residual podría contribuir al deterioro de pigmentos (β -caroteno) responsables en parte del aumento en el parámetro b^* en las LEP de verano.

Finalmente, es importante mencionar que los ΔE^2 calculados entre el comienzo y el final del almacenamiento para las LEP de las estaciones de otoño, invierno y primavera resultaron menores al umbral de 3,8 (Pagliarini y col., 1990). Por su parte las LEP de verano evidenciaron un ΔE^2 de 5,05; superando de esta manera al valor umbral de 5 informado por Kessler y Fink (1986) y consecuentemente indicando que los cambios de color en dichas LEP podrían ser perceptibles visualmente.

III.2. FLAVOR

La calidad sensorial está definida por un conjunto complejo de atributos incluyendo apariencia, *flavor* y propiedades texturales. Como fue establecido por Piggot (1994), cada atributo del carácter sensorial se puede ver como una única e importante pieza en el conjunto de parámetros sensoriales.

Uno de los mayores criterios de la aceptación de un alimento por parte del consumidor es el *flavor*. El *flavor* tiene impacto sobre el sentido del olfato y del sabor (Mariaca y Bosset, 1997).

Los productos lácteos cuando se consumen proveen una sensación de placer debido a su *flavor* y a sus características de gusto suave. En la leche fresca, los compuestos del *flavor* y *off-flavor* probablemente provengan del metabolismo del bovino y luego se transfieran desde el sistema de alimentación a la leche a través del rumen (Badings, 1991). Además, en la leche los compuestos de *off-flavors* ocurren a través de una variedad de mecanismos tales como la acción de enzimas nativas de la leche o enzimas bacterianas y cambios químicos catalizados por luz o metales pesados (Badings, 1991; Vallejo-Cordoba y Nakai, 1993).

Las características sensoriales de la leche cruda dependen de la composición de la misma y están relacionadas con el manejo genético del ganado, la salud del mismo, y los programas de nutrición y alimentación. La suplementación con lípidos y las modificaciones nutricionales provocan cambios significativos de la grasa, una importante fuente de *flavors*. Las vitaminas solubles en grasa, los contenidos de proteína y lactosa están sujetos a modificaciones estacionales debido a cambios en la disponibilidad de la alimentación. En el caso del contenido de minerales, hay diferentes resultados publicados acerca de la influencia de la alimentación (Badings, 1991; Grummer, 1991; O'Brien y col., 1999; Christian y col., 1999; Smit y col., 2000; Måsson y col., 2003).

La leche en polvo se emplea ampliamente como materia prima en la formulación de alimentos. De esta manera, los *flavors* deseables o defectos podrían aparecer en los productos finales (Shiratsuchi y col., 1994a). Consecuentemente, el monitoreo del *flavor* es parte de la investigación, desarrollo, producción y control de calidad de materias primas y productos procesados (Visser y Taylor, 1998).

En la industria alimentaria, el monitoreo de la calidad de los productos y de los procesos de producción se realizan mediante medidas fisicoquímicas (pH, concentración de un dado compuesto químico, etc.) y esto no tiene en cuenta la extrema importancia del *flavor* como indicador de calidad y conformidad del producto. Esto se debe a la ausencia de determinaciones instrumentales confiables y a la imposibilidad práctica de emplear paneles sensoriales para un monitoreo continuo del *flavor* (Ampuero y Bosset, 2003). Los paneles sensoriales se caracterizan por ser costosos, consumir mucho tiempo ya que requieren jueces entrenados y tener limitaciones relacionadas a la susceptibilidad y variabilidad humana, ambos dentro y entre sujetos (Pearce y Gardner, 1998). Como consecuencia, algún método para medir el *flavor* de los alimentos en forma rápida, cuantitativa, reproducible e instrumental será bienvenido en la industria de los alimentos y sus facilidades asociadas a la investigación.

El desarrollo de herramientas analíticas eficientes, tales como cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) y técnicas relacionadas, ha contribuido en gran manera al progreso en esta área. Se han publicado algunos artículos de revisión excelentes sobre

determinaciones instrumentales y diferentes metodologías analíticas incluyendo varias técnicas de preparación de muestras para aislar y concentrar componentes volátiles (*flavor*), tales como: Weurman, 1969; Evans, 1972; Lacampre y col., 1975; Jenings y Filsoof, 1977; Bemelmans, 1979; Benkler y Reineccius, 1980; Maarse y Belz, 1981; Cronin, 1982; Chialva y col., 1982; Manning y Price, 1983; Jennings y Rapp, 1983; Werkhoff y Bretschneider, 1987; Klein y col., 1990; Careri y col., 1994; Xanthopoulos y col., 1994; Nickerson y Likens, 1996; Marsili y col., 1994; Marsili, 1996; Marsili, 1999a; Grimm y col., 1997. Entre las metodologías para aislar y concentrar los componentes volátiles (*flavor*), la microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de extracción que mostró ser simple, y efectiva para detectar bajos niveles de compuestos del *flavor* (Arthur y Pawliszyn, 1990; Yang y Peppard 1994; Harmon, 1997). Sin embargo, en estos métodos de extracción los componentes volátiles no se encuentran embebidos en la matriz original. Los cambios ocurridos en la matriz juegan un rol clave en la percepción del *flavor* (Mariaca y Bosset, 1997). Debido a ello hay un gran interés en el uso de metodologías como la Nariz Electrónica (NE) para el análisis de olor en alimentos, la cual permite investigar los componentes volátiles (*flavor*) directamente en la matriz original. Básicamente, la NE es un instrumento diseñado a base de sensores que responden a compuestos volátiles en el espacio de cabeza de una muestra, combinado con una adecuada rutina de reconocimiento de patrones. La NE se empleo satisfactoriamente para clasificar muestras, con características de olor similares, de productos agrícolas (Persaud y col., 1996), granos (Börjesson y col., 1996), carne de cordero (Braggins y Frost, 1997), carne bobina picada (Spanier y Braggins, 1999), carne bobina procesada (Grigioni y col., 2000), leche (Brudzewski y col., 2004), etc. Sin embargo, es aún limitado el número de estudios dedicados a los productos lácteos, probablemente debido a la complejidad de sus matrices (Ampuero y Bosset, 2003). Además, la NE comparada a los paneles sensoriales tiene la ventaja de que una vez calibrada la misma puede hacer el monitoreo continuo del olor con un mínimo costo; no requiere de personal entrenado como los paneles sensoriales, no esta sujeta a variaciones de la sensibilidad, no se sobrecarga bajo condiciones de operación normal y las determinaciones consumen poco tiempo.

En vista del importante progreso de las técnicas instrumentales, no hay un método universal para el análisis simultáneo de todos los compuestos volátiles (*flavor*) (Mariaca y Bosset, 1997). Cada método presenta ventajas y desventajas, existiendo de este modo varios caminos para resolver un problema. Así, en la presente investigación se consideró apropiado complementar el método secuencial mediante análisis por CG-SPME y el método global directo mediante NE para monitorear los cambios estacionales en las características del olor en leche entera en polvo.

III.2.1. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA: SEGUIMIENTO EN LINEA DE ELABORACIÓN

El perfil de *flavor* de la leche es el resultado de una mezcla compleja de componentes volátiles en diferentes cantidades, el que podría afectarse por el proceso de elaboración. Varios de estos componentes pueden manifestarse en mayor o menor medida en diferentes tipos de leche dependiendo de la presencia de pro-oxidantes, antioxidantes, condiciones de almacenamiento, etc.

Los resultados mostrados en esta sección corresponden a leche entera en polvo sin almacenamiento. De esta manera, el comportamiento observado en los resultados podría asociarse a las características de la materia prima, leche cruda.

En el presente trabajo se estudiaron componentes volátiles representativos de diferentes reacciones químicas, los cuales contribuyen al perfil de *flavor* de leche en polvo, a saber: dimetil sulfuro, 3-CH₃ butanal, pentanal, hexanal, y ácido butírico (Badings, 1991).

III.2.1.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo recién elaborada

En la **Tabla 24** se muestran los valores promedios y la desviación estándar y el resultado del ANOVA del dimetil sulfuro.

Tabla 24. Medias y desviación estándar del contenido de dimetil sulfuro (μgKg^{-1}) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico Indirecto	2,31 ± 0,69 bc	2,84 ± 1,11 bc	4,78 ± 1,26 b	5,13 ± 1,58 ab
Tratamiento				
Térmico Directo	3,88 ± 1,53 bc	1,47 ± 0,79 c	1,32 ± 0,37 c	7,56 ± 1,96 a
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	NS	****	****

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la interacción TT*E.

^b **** $P < 0,0001$; NS: no significativo.

En la **Tabla 24** se puede observar que tanto el efecto de la estación como de la interacción TT*E fueron altamente significativos ($P < 0,0001$).

En el presente trabajo los niveles más altos de dimetil sulfuro se hallaron en la LEP de verano para ambos tratamientos térmicos, siendo el nivel del citado componente en las LEP de verano proveniente del TTD estadísticamente diferente de otoño, invierno y primavera de las LEP elaboradas bajo ambos tratamientos térmicos. Además, en la primavera las LEP elaboradas bajo el TTI mostraron un nivel promedio de dimetil sulfuro cercano al hallado en la estación de verano de ambas LEP (**Tabla 24**).

Badings (1991) relacionó el contenido de dimetil sulfuro en leche al *flavor* ocasionado por la alimentación dada al ganado. De acuerdo a lo expuesto por el citado autor la transferencia de componentes de la pastura, silaje, etc., incrementarían el contenido de dimetil sulfuro en la leche, el cual estaría asociado a descriptores de forraje o ensilaje. Por otro lado, Reddy y colaboradores en 1967 (Urbach, 1990) mostraron que cuando el

ganado consume pastura de alfalfa aumenta el contenido de dimetil sulfuro en los productos lácteos.

Lane y col. (2002), en un estudio realizado en leche fresca, mostraron diferencias en el contenido de dimetil sulfuro de las leches provenientes del ganado alimentado con una dieta basada en una ración mezcla (silaje de maíz, heno, silaje de pasto y concentrados), respecto del ganado alimentado a pasto. Según este autor bajo las condiciones ensayadas, aminoácidos como la metionina sufren degradación microbiológica en el rumen, y esto da lugar a concentraciones más altas de dimetil sulfuro en las leches provenientes del ganado alimentado a pasto.

En la cuenca lechera santafesina, en otoño e invierno los sistemas de alimentación están basados en una ración mezcla basada en silaje, grano y heno de alfalfa (*Medicago sativa L.*). En primavera y verano, la pastura de alfalfa es introducida sin límite en el programa de alimentación, mientras que grano y heno de alfalfa se reducen rápidamente de la dieta. Es importante hacer notar que los mayores niveles de dimetil sulfuro, en general, se observaron en las estaciones de primavera y verano.

Si el dimetil sulfuro deriva principalmente de la degradación ruminal de metionina, se debería esperar una asociación positiva con el contenido de proteína, incluyendo variaciones en el contenido de proteína en las estaciones. También se debería encontrar una asociación positiva con el contenido de nitrógeno no proteico (NNP) ya que la degradación de aminoácidos en el rumen está asociada con la generación de amonio en exceso, el cual es metabolizado a urea en el animal (Lane y col., 2002).

Si la proteína es de alta degradabilidad ruminal es probable que se forme mayor cantidad de dimetil sulfuro ya que habrá mayor liberación de aminoácidos en el rumen los cuales se degradaran para formar productos de reducción (ejemplo: dimetil sulfuro a partir de metionina), permitiendo la generación de ATP por los microorganismos del rumen (Schreurs y col., 2004).

En la presente investigación, la leche cruda proveniente de las estaciones de primavera y verano mostraron los menores contenidos de proteína total (**Tabla 18**, sección **III.1.1.**) y los mayores valores de NNP (**Tabla 25**). Aún cuando no se observó, en general, una asociación positiva entre el contenido de dimetil sulfuro y el nivel de proteína total de cada una

de las estaciones, si se evidenció una asociación positiva con el NNP. Este resultado puede ser explicado ya que la proteína de la leche cruda proveniente de una alimentación del ganado a pasto es altamente degradable (Gallardo, 2002) dando lugar de esta manera al mayor contenido de dimetil sulfuro, en general, observado en las LEP de primavera y verano.

Tabla 25. Medias y desviación estándar del contenido de nitrógeno no proteico (g100g⁻¹) en leche cruda en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Nitrógeno no proteico				
Tratamiento				
Térmico	0,034 ± 0,003 ab	0,032 ± 0,004 b	0,036 ± 0,004 a	0,039 ± 0,002 a
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	0,034 ± 0,003 ab	0,032 ± 0,003 b	0,036 ± 0,003 a	0,037 ± 0,003 a
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	NS	****	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas (*P* < 0,05) relacionadas a la interacción E.

^b **** *P* < 0,0001; NS: no significativo.

Por otro lado, componentes tales como dimetil sulfuro y dimetil disulfuro se han asociado a la intensidad del tratamiento térmico aplicado (Hall y col., 1985; Bosset y col., 1994). Dumont y Adda (1979) encontraron que el dimetil sulfuro probablemente provenga de la degradación de metionina y tenga una fuerte contribución, junto a otros componentes, al aroma de la leche UHT.

En la presente investigación las condiciones empleadas en los tratamientos térmicos aplicados sumado a las diferencias en la alimentación dada al ganado podrían explicar, en parte, los niveles de dimetil sulfuro

hallados (**Tabla 24**). Así, los resultados del WPNI (**Tabla 17**, sección **III.1.1.**) indicativos de la severidad del tratamiento aplicado podrían explicar en parte las diferencias en los niveles de dimetil sulfuro hallados para las LEP de los distintos tratamientos térmicos.

Otro factor asociado al incremento del nivel de dimetil sulfuro es el contenido de bacterias psicrótrofas de la leche. Estas bacterias son destruidas durante la pasteurización, sin embargo liberan lipasas y proteasas termoestables, responsables de cambios fisicoquímicos y alteraciones del sabor en la leche en polvo. Para evitar este inconveniente Muir y col. (1978) sugieren un recuento de 2×10^6 UFCml⁻¹ como umbral de bacterias psicrótrofas en leche cruda. Por su parte, Badings (1991) mostró que el crecimiento de bacterias psicrótrofas en leche a temperaturas por encima de 4°C ocasiona un incremento en el contenido de dimetil sulfuro, siendo niveles mayores de 14 µgKg⁻¹ responsables de la aparición de *off-flavor* en leche en polvo. Sin embargo, en el presente trabajo no se superó el nivel umbral de bacterias psicrótrofas recomendados por Muir y col. (1978). Los recuentos hallados de bacterias psicrótrofas en la materia prima fueron los siguientes:

- leche cruda destinada a la elaboración del LEP mediante el TTI:
otoño: 1074 UFCml⁻¹, invierno: 934000 UFCml⁻¹, primavera 404200 y verano: 431833 UFCml⁻¹.
- leche cruda destinada a la elaboración del LEP mediante el TTD:
otoño: 2137 UFCml⁻¹, invierno: 87400 UFCml⁻¹, primavera 48000 y verano: 35097 UFCml⁻¹.

Es importante resaltar que los niveles de dimetil sulfuro encontrados en las distintas estaciones (**Tabla 24**), aún cuando se encuentran por encima del nivel umbral de olor informado en agua de 1,2 µgKg⁻¹ (<http://www.leffing.com/odorback.htm>), no se asociaron a niveles detectables del descriptor forraje, mediante evaluación de jueces entrenados. La causa de este comportamiento podría deberse a las interacciones que existen entre las matrices alimentarias y los componentes que otorgan el olor. Numerosas investigaciones señalaron la influencia que los componentes mayoritarios de los alimentos (proteínas, carbohidratos y lípidos) tienen sobre el *flavor* global de un alimento (De Roos, 1997; Fischer

y Widder, 1997; Godshall, 1997; King y Duineveld, 1997). Los lípidos son el ingrediente de los alimentos que más efecto tienen sobre los coeficientes de partición de los componentes del *flavor* entre el producto y la fase vapor. En general, un incremento en el contenido de lípidos en los alimentos resulta en un decrecimiento de la fuerza del *flavor* (Stephan y col., 2000). Debido a que en la presente investigación se trabajó con leche entera, el contenido de lípidos probablemente afectó el nivel umbral de dimetil sulfuro respecto de aquel informado en agua, modificando así la percepción del descriptor forraje. Sin embargo, hay que resaltar que los niveles de dimetil sulfuro hallados en la presente investigación se encuentran, en general, por debajo de 7 µgKg⁻¹, nivel el cual se asoció a una contribución positiva al aroma de leche fresca (Badigns, 1991).

En conclusión los resultados aquí mostrados para dimetil sulfuro no podrían explicarse a través de un único factor, sino por la acción combinada de un conjunto de factores todos los cuales serían determinantes de su síntesis.

III.2.1.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo recién elaborada

En la **Tabla 26** se muestran los valores promedios y la desviación estándar de 3-CH₃ butanal.

Tabla 26. Medias y desviación estándar del contenido de 3-CH₃ butanal (µgKg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año. ND: no detectado.

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	0,99 ± 0,13	ND	1,15 ± 0,38	0,98 ± 0,50
Tratamiento Térmico Directo	ND	ND	ND	ND

En la **Tabla 26** se puede observar que las LEP elaboradas bajo el TTI dieron lugar, en general, a cantidades detectables de 3-CH₃ butanal a diferencia de las LEP provenientes del TTD.

Los diferentes tipos de tratamientos térmicos (pasteurización, esterilización, secado, etc.) a los que se somete la leche conducen a diferentes estadios de la reacción de Maillard (Singh y Newstead, 1998).

Una de las etapas más importantes en la formación térmica del aroma a través de la reacción de Maillard es la reacción de dicarbonilos con aminoácidos que da lugar a la formación de los aldehídos de Strecker, entre otros. El 3-CH₃ butanal es uno de los aldehídos de cadena ramificada resultante de la degradación de Strecker (Hall y col., 1985).

Los resultados observados para el 3-CH₃ butanal en el presente estudio podrían deberse al efecto diferencial de los tratamientos térmicos aplicados, siendo las LEP elaboradas bajo el TTI las que desarrollaron en mayor grado la reacción de Maillard comparadas con las LEP manufacturadas con el TTD. Esta explicación se encuentra sustentada en las diferencias significativas de HMF libre (**Tabla 16**, sección **III.1.1.**) halladas entre las LEP elaboradas bajo el TTD y el TTI, siendo estas últimas las que manifestaron mayor cantidad del citado componente. Estos resultados podrían explicar las cantidades detectables de 3-CH₃ butanal observado en las LEP del TTI.

Si bien, los valores informados aquí son superiores a 0,64 µgKg⁻¹ hallado en leche entera UHT recién elaborada (Valero y col., 2001), el panel de jueces entrenados no percibió el *flavor* a cocido y quemado (datos no mostrados), los cuales son asociados a un grado de desarrollo avanzado de la reacción de Maillard. Además, es importante resaltar que los niveles de 3-CH₃ butanal encontrados en las distintas estaciones (**Tabla 26**), se encuentran por debajo del nivel umbral de *flavor* reportado en agua de 0,2-2 mgKg⁻¹ (<http://www.leffing.com/odorback.htm>).

III.2.1.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo recién elaborada

En las **Tablas 27 y 28** se muestran los valores promedios y la desviación estándar y el resultado del ANOVA para pentanal y hexanal.

Hall y Andersson (1985) determinaron, mediante análisis de regresión múltiple, que los aldehídos de cadena lineal (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal) contribuyen significativamente a la descripción de *flavor* de aceptación de leche entera en polvo. Otros autores (Ulberth y Roubicek, 1995; Marsili, 1999a) han también identificado este grupo de compuestos en productos lácteos. Entre estos volátiles pentanal y hexanal son los más abundantes (Fenaille y col., 2003).

En las Tablas 27 y 28 se puede observar como cada uno de los tratamientos térmicos provoco un desarrollo diferencial ($P < 0,05$) de pentanal y hexanal, compuestos que se encuentran asociados a procesos oxidativos. Por otro lado los datos obtenidos a partir de los ensayos de SRATB, permitieron arribar a la misma conclusión.

Tabla 27. Medias y desviación estándar del contenido de pentanal (μgKg^{-1}) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	9,50 ± 2,66 bB	11,65 ± 3,31 bB	13,29 ± 2,89 bB	16,24 ± 2,34 bA
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	15,82 ± 5,24 aB	19,19 ± 5,82 aB	17,05 ± 6,67 aB	29,62 ± 5,04 aA
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	**	***	NS

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas al TT y medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la E.

^b **** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; NS: no significativo.

Tabla 28. Medias y desviación estándar del contenido de hexanal (μgKg^{-1}) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otoño	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	2,33 ± 0,35 cd	2,44 ± 1,08 c	3,13 ± 0,53 cdf	5,19 ± 1,32 bf
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	5,75 ± 1,21 b	8,89 ± 2,05 a	5,55 ± 1,05 bd	6,70 ± 1,31 b
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	****	**	***

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) relacionadas a la interacción TT*E.

^b **** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

El método del ácido 2-tiobarbitúrico se basa en la reacción del malondialdehído con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (ATB), el cual luego de una incubación da un compuesto en la gama del color rojo que se determina a 530 nm. Este método es utilizado para medir el deterioro lipídico en su reacción de terminación de la oxidación (Hoyland y Taylor, 1991). Sin embargo, el malondialdehído no es el único producto de oxidación que reacciona con el ATB, también otros aldehídos pueden generar compuestos coloreados con el ATB. Esta es la razón por la cual se prefiere hablar de sustancias reactivas al ATB (SRATB) (Berset y Cuvellier, 1996). Hoyland y Taylor (1991) mencionan que la reacción con el ATB puede dar lugar a la formación de compuestos amarillos (450 nm), anaranjados (495 nm) o rosados (532 nm), dependiendo de las condiciones de la misma y de las sustancias reactivas presentes. Los autores mencionan que la generación de compuestos amarillos se debe a la presencia de aldehídos monoinsaturados, los cuales no necesariamente se generan como resultado de un proceso oxidativo y los rosados a los diinsaturados. Sin embargo, su aumento en el transcurso de un determinado tratamiento sí

puede estar indicando oxidación lipídica. Por ello los autores concluyen que ambos cromógenos (rojo y amarillo) se deben cuantificar para medir la oxidación. En el presente trabajo los valores de SRATB (unidades de absorbancia) fueron: a 532 nm (TTI: $0,019 \pm 0,005$ versus TTD: $0,023 \pm 0,004$) y a 450 nm (TTI: $0,059 \pm 0,013$ versus TTD: $0,068 \pm 0,009$), siendo estas diferencias entre tratamientos estadísticamente significativas. Es posible apreciar que las LEP elaboradas bajo el TTI, el cual sería más severo que el TTD de acuerdo a los valores de HMF libre y de WPNI obtenidos (**Tablas 16 y 17**, respectivamente), mostraron valores menores de SRATB así como de pentanal y hexanal. Esto podría estar indicando que las LEP provenientes del TTI sufrieron un mayor grado de la reacción de Maillard y menor oxidación lipídica.

El desarrollo de sustancias reductoras es otra función importante del tratamiento térmico aplicado en la elaboración de leches en polvo. Diversos estudios mostraron que la formación de grupos sulfidrilos activos (-SH), resultantes del tratamiento térmico aplicado a la leche, son responsables de prevenir el desarrollo de *flavor* oxidado (Singh y Newstead, 1998). Otros compuestos con características reductoras se pueden formar también a partir de la reacción de Maillard durante el tratamiento térmico (Lingnert, 1980; Hansen y Hemphill, 1984). De hecho, Nielsen y col. (1997a) encontraron que la leche en polvo con altos valores del parámetro "b" tenía una vida útil prolongada con relación al desarrollo de procesos oxidativos, indicando de esta manera el rol protector de los productos de la reacción de Maillard (Hall y col., 1985). Los resultados obtenidos para pentanal y hexanal, como los valores de SRATB estarían indicando que los productos generados por la acción del tratamiento térmico tendrían un rol importante sobre la estabilidad oxidativa de las LEP bajo estudio.

Por otro lado, en la **Tabla 27** se puede observar que el contenido de pentanal mostró un comportamiento estacional similar al hallado para dimetil sulfuro en las LEP elaboradas bajo ambos tratamientos térmicos (**Tabla 24**), evidenciándose el valor más alto ($P < 0,05$) en la estación de verano.

Por su parte, si bien el comportamiento de hexanal en las LEP del TTI siguió la misma tendencia estacional que el dimetil sulfuro y el pentanal, en

las LEP del TTD mostró el nivel mayor ($P < 0,05$) en la estación de invierno (**Tabla 28**).

Como ya fuera explicado para dimetil sulfuro, este comportamiento estacional observado en los niveles de pentanal y hexanal, podría deberse a los cambios en la composición de la dieta de los animales, la cual influye directamente sobre las propiedades de la leche (Bugaud y col., 2001; Ramaswamy y col., 2001).

En cuanto a la presencia de compuestos antioxidantes y prooxidantes en leche, Barrefors y col. (1995); Focant y col. (1998) y Granelli y col. (1998) mostraron la existencia de antioxidantes como tocoferoles y carotenoides que son transferidos a los alimentos.

Gatellier y col. (2004) y Descalzo y col. (2005) señalaron que una dieta a base de pastura suministra vitamina E además de otros antioxidantes naturales. Por otro lado, diferentes trabajos (Melton y col., 1982; Larick y Turner, 1989; García y col., 1999; Yang y col., 2002) demostraron que la alimentación con pasturas conduce a valores incrementados de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales por su alto número de insaturaciones resultan más vulnerables a los procesos de oxidación. Los ensayos realizados en leches de cuencas lecheras locales, mostraron mayores concentraciones de ácidos grasos linoleico (n-6) y ácido linolénico (n-3) en animales alimentados con pasturas frescas, respecto de aquellos alimentados con dietas en base a grano Páez y col. (2002a). Estos ácidos grasos, n-6 y n-3, son precursores de compuestos aldehídos tales como pentanal y hexanal. De esta manera, se pone de manifiesto que la estabilidad oxidativa de la leche y los productos lácteos, y por ende su vida útil, es el resultado de un delicado balance entre procesos pro-oxidantes/antioxidantes influenciado por factores tales como el contenido de: ácidos grasos poliinsaturados, metales de transición, y antioxidantes como tocoferoles y carotenoides (Barrefors y col., 1995; Jensen y col., 1998; Morales y col., 2000). Consecuentemente, los valores de pentanal y hexanal obtenidos podrían ser una respuesta de dicho balance.

Es importante destacar los mayores valores observados, en general, de pentanal y hexanal en las LEP del TTD respecto de las LEP del TTI. Este resultado podría no solamente estar indicando un efecto diferencial del tratamiento térmico, sino también, teniendo en cuenta lo discutido

previamente, diferencias en la composición de la materia prima. Aún cuando, el contenido de ácido grasos poliinsaturados es uno de los factores determinantes del grado de oxidación ocurrido en las LEP, se debe destacar que el contenido de grasa total en % fue mayor ($P < 0,05$) en la leche cruda destinada a la elaboración de LEP bajo el TTD ($3,61 \pm 0,13$) respecto de aquellas destinada a la LEP del TTI ($3,30 \pm 0,09$). Este resultado podría explicar, en parte, el mayor contenido de pentanal y hexanal en las LEP del TTD respecto del TTI.

Finalmente se debe resaltar que los niveles hallados de pentanal y hexanal en las LEP de ambos tratamientos térmicos no provocaron cambios en el *flavor* asociados a la oxidación. Esto se puso de manifiesto en la evaluación realizada por panel de jueces entrenados, quienes no percibieron el *flavor* oxidado en las LEP evaluadas. Más aún, tanto para pentanal como hexanal, en general, los niveles hallados estuvieron por debajo de los niveles umbrales de olor y *flavor* informados para el agua, a saber:

- ⇒ **Pentanal:** umbral de olor de $12-42 \mu\text{gKg}^{-1}$ y umbral de *flavor* de $31 \mu\text{gKg}^{-1}$ (<http://www.leffing.com/odorback.htm>; Guadagni y col., 1963; Buttery y col., 1988)
- ⇒ **Hexanal:** umbral de olor de $4,5-5 \mu\text{gKg}^{-1}$ para hexanal (Guadagni y col., 1963; Buttery y col., 1971 y 1988) y umbral de *flavor* de $10-50 \mu\text{gKg}^{-1}$ (Ampuero y Bosset, 2003).

Aún cuando los umbrales de olor en agua no reflejan los umbrales de percepción en el producto en sí mismo, ya los componentes mayoritarios de la matriz alimenticia afectan la percepción del *flavor*, tales valores nos dan una información útil respecto de la actividad relativa del aroma de componentes volátiles con similares propiedades fisicoquímicas (Fenaille y col., 2003). Por ejemplo, los umbrales de olor en agua de pentanal y hexanal de $12 \mu\text{gKg}^{-1}$ y $4,5 \mu\text{gKg}^{-1}$ (Buttery y col., 1988), respectivamente, se incrementan a $130 \mu\text{gKg}^{-1}$ y $50 \mu\text{gKg}^{-1}$ en leche homogeneizada con un 3,8% de grasa (Day y col., 1963), respectivamente.

Los valores presentados en este estudio para hexanal son similares a los hallados por Ulberth y Roubicek (1995), quienes en muestras de leche en polvo recién elaboradas, hallaron niveles de hexanal $< 10 \mu\text{gkg}^{-1}$. Sin embargo, Boon y col. (1976) detectaron $90 \mu\text{gKg}^{-1}$ de hexanal en leche en

polvo fresca. En el caso de pentanal Ulberth y Roubicek (1995) informaron niveles de 70 µgKg⁻¹ en leche en polvo recién elaborada. Las diferencias entre los valores de bibliografía y los informados en el presente trabajo podrían deberse a las condiciones de producción de la LEP como así también de la metodología analítica empleada para la extracción de los componentes bajo estudio.

III.2.1.4. Ácido butírico en leche entera en polvo recién elaborada.

Los ácidos grasos de cadena corta, tal como el ácido butírico (C_{4:0}) otorgan un *flavor* agudo y rancio. Este compuesto, derivado de la hidrólisis de los triglicéridos, contribuye a ambos *flavor* y *off-flavor* en productos lácteos.

En las **Tablas 29** se muestran los promedios y la desviación estándar y el resultado del ANOVA de ácido butírico.

Tabla 29. Medias y desviación estándar del contenido de ácido butírico (mgg⁻¹) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.^a

	Otono	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento				
Térmico	7,34 ± 2,38 B	5,43 ± 1,44 B	3,90 ± 0,46 B	4,96 ± 1,69 B
Indirecto				
Tratamiento				
Térmico	9,78 ± 2,90 A	8,32± 2,86 A	7,23 ± 2,73 A	9,21± 2,89 A
Directo				
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento	Estación (E)	TT*E
		Térmico (TT)		
	****	****	NS	NS

^a Medias con diferentes letras indican diferencias significativas (*P* < 0,05) relacionadas al efecto principal TT.

^b **** *P* < 0,0001; NS: no significativo.

En la **Tabla 29** se puede observar que, si bien el efecto de la estación no fue estadísticamente significativo ($P > 0.05$), el ácido butírico mostró el mayor nivel en la estación de otoño y el menor en la estación de primavera, para las LEP elaboradas bajo ambos tratamientos térmicos

Aún cuando las etapas de evaporación y secado, durante el proceso de elaboración de leche en polvo, podrían remover algunos ácidos grasos volátiles de cadena corta (Norma FIL-IDF N° 265, 1991; Páez y col., 2002b), el resultado observado para el contenido de ácido butírico en las LEP evaluadas guarda relación con el contenido de ácido grasos libres totales en leche cruda (**Figuras 25.a y 25.b**). Este comportamiento evidencia como el perfil de ácidos grasos libres (AGL) está asociado a la estación del año, lo que a su vez podría tener una relación con los cambios en las características de la materia grasa relacionados a la estación y a la alimentación.

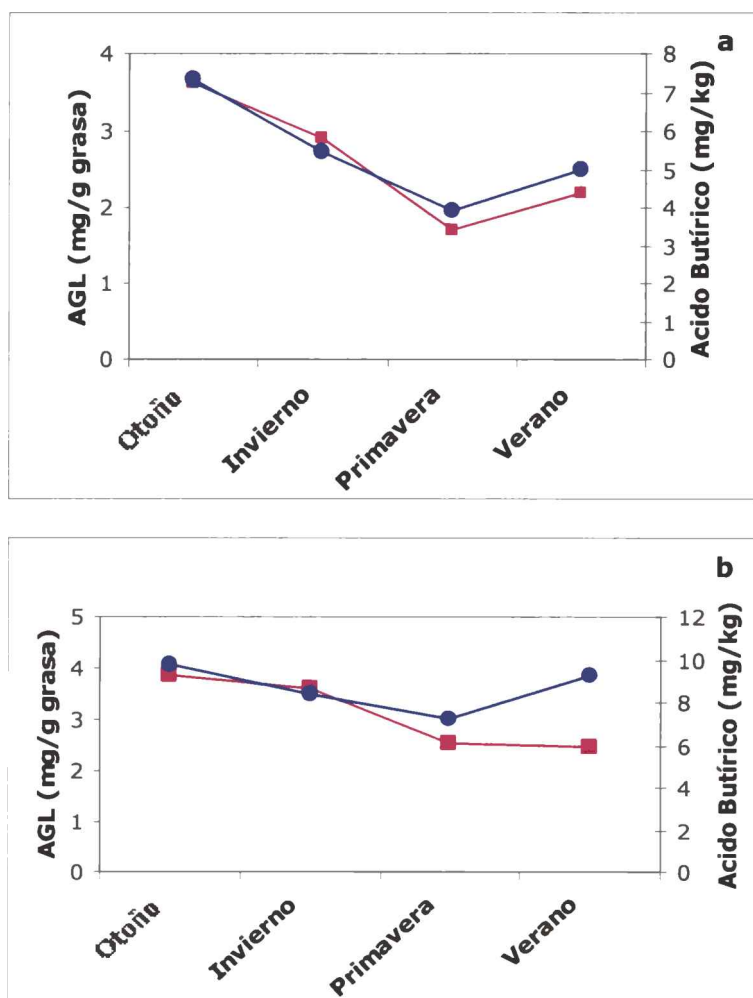


Figura 25. ■ Contenido de ácidos grasos libres (AGL) mgg^{-1} grasa en leche cruda y ● ácido butírico en mgKg^{-1} en LEP **a:** TTI, **b:** TTD.

La concentración total de AGL encontrada en un producto es la suma de aquellos producidos por lipólisis de la leche cruda antes del procesamiento, durante el proceso de elaboración y durante el almacenamiento del producto. Además, los AGL se pueden formar como subproductos de las reacciones de oxidación (Celestino y col., 1997a).

Los métodos utilizados para la determinación de AGL en leche y productos lácteos se pueden dividir en aquellos que permiten la cuantificación global de AGL libres y aquellos que permiten además estimar cuantitativamente el perfil de AGL. Los métodos de dosaje global de AGL son determinaciones rápidas con técnicas de titulación, colorimétricas o enzimáticas y permiten cuantificar el grado de lipólisis. En cuanto a los métodos de dosaje de AGL individuales, son las técnicas cromatográficas las que permiten una determinación directa del grado de lipólisis (suma de concentración de AGL C₄ a C₂₀) y de la rancidez (concentración de cada AGL C₄ a C₁₂) (Páez, 2002). En el presente trabajo se determinó lipólisis en la leche cruda mediante el método de titulación (Deeth y Fitz Gerald, 1975). Sin embargo, cuando se compararon los niveles de ácido butírico medido por SPME-GC de la LEP de las distintas estaciones con los valores de lipólisis por titulación de la leche cruda, los mismos no guardaban una relación tan evidente como la mostrada con la medición de AGL totales por cromatografía. Estas diferencias podrían deberse a las diferencias existentes entre las metodologías.

Si el objetivo es conocer el grado de lipólisis es suficiente la determinación del contenido de ácidos grasos libres totales. Sin embargo, si el objetivo es conocer si existe un defecto organoléptico en el alimento bajo estudio, es necesario realizar una determinación de las cantidades respectivas de ácidos grasos libres, y en particular de los ácidos grasos libres de cadena corta (C₄-C₆) (Norma FIL-IDF N° 265, 1991; Chen y col., 2003).

La bibliografía indica los siguientes valores umbrales para el ácido butírico (C₄) en leche: 25 mgKg⁻¹, 46,1 mgKg⁻¹ (Norma FIL-IDF N° 265, 1991), 24,6 mgKg⁻¹ (Chen y col., 2003).

En el presente estudio el máximo valor de ácido butírico obtenido correspondió a la estación de otoño de las LEP del TTD (9,8 mgKg⁻¹). Por lo tanto, las LEP evaluadas no deberían presentar defectos apreciables en el

flavor asociados a rancidez. Esta inferencia se encuentra avalada por los resultados obtenidos mediante el panel de jueces entrenados, quienes no hallaron defectos en el *flavor* rancio de las LEP evaluadas.

Los resultados mostrados estarían de acuerdo con los rangos de ácido butírico hallados en leche rancia de 27,5-85 mgkg⁻¹ (Deeth y Gerald, 1994) y de 22,3-69,8 mgKg⁻¹ (Chen y col., 2003).

Por otro lado, como fuera mencionado (sección **III.1.1.**) los defectos de *flavor* aparecen en productos lácteos con leches cuyos recuentos de psicrótrofas superan 2x10⁶ UFCml⁻¹ (Muir y col., 1978), nivel que no ha sido superado en la materia prima del presente trabajo.

Diversos métodos estadísticos son usados generalmente para determinar ecuaciones que puedan ser empleadas para predecir las propiedades del olor y *flavor* en muestras de alimentos o para clasificar muestras de alimentos en grupos que tengan ciertas características de olor y *flavor*. De esta manera, y al igual que para el estudio del desarrollo de color en LEP, se aplicaron técnicas de análisis multivariado tales como: AAJ y ADL.

En la **Figura 26** se muestra el gráfico de AAJ para las muestras de LEP provenientes de ambos tratamientos térmicos, teniendo en cuenta los componentes volátiles. En la citada figura se pueden observar dos grandes grupos: uno formado por el 85% de las LEP elaboradas con el TTI y el otro en el que están incluidas el 95% de las LEP provenientes del TTD.

Si bien, no de forma tan evidente como lo observado para los compuestos volátiles, el AAJ aplicado a los datos de NE (**Figura 27**) mostró un agrupamiento de las LEP según el tratamiento térmico aplicado. Este tipo de patrón se repitió cuando se analizaron en forma conjunta los datos de componentes volátiles y la nariz electrónica.

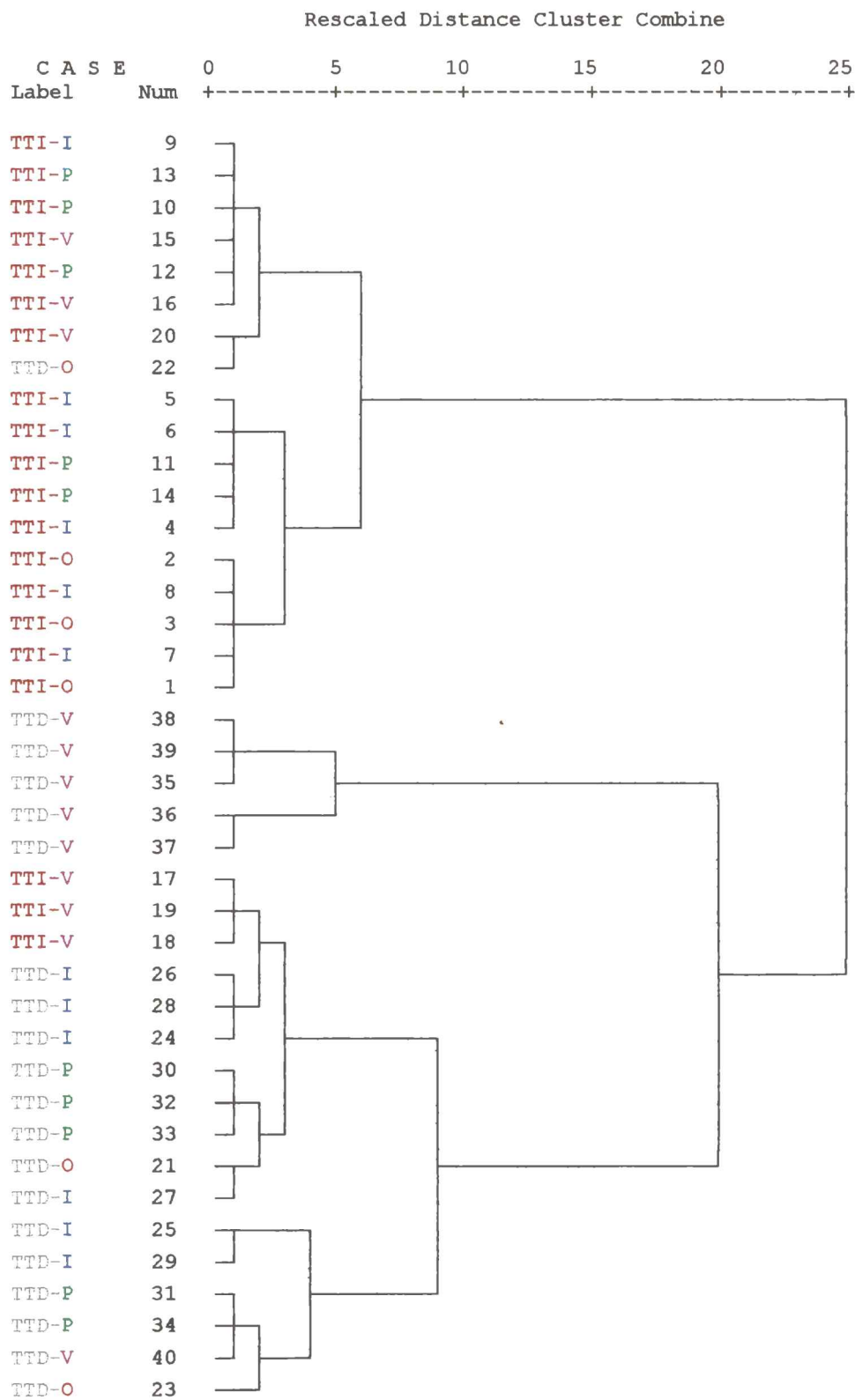


Figura 26. Análisis de agrupamiento jerárquico, considerando los componentes volátiles estudiados, de LEP recién elaboradas aplicando el TTI y el TTD en las distintas estaciones del año.

Los resultados observados en las **Figuras 26 y 27**, observado en parte en el ANOVA de los componentes volátiles, nos llevó a decidir analizar estadísticamente los datos de las LEP provenientes de los distintos tratamientos térmicos en forma separada. De esta manera, los datos de componentes volátiles y nariz electrónica se analizaron aplicando ADL para investigar el agrupamiento de las LEP como una función de la estación de elaboración.

Se empleó el ADL para investigar el agrupamiento de los perfiles de olor obtenidos mediante NE de las LEP provenientes del TTI como una función de la estación de elaboración. Se obtuvieron tres funciones discriminantes (FD) que explicaron 45,9%, 35,9% y 18,1% del total de la varianza explicada respectivamente, con el 74,4% de clasificación correcta de cada muestra en su respectivo grupo de pertenencia (estación) y el 55,7% después de la validación cruzada. En este análisis, se consideraron todos los sensores. El hecho de incorporar los datos de componentes volátiles incrementó al 89,5% la clasificación correcta de cada muestra en su respectivo grupo de pertenencia (estación) y al 70,7% después de la validación cruzada (**Figura 28**).

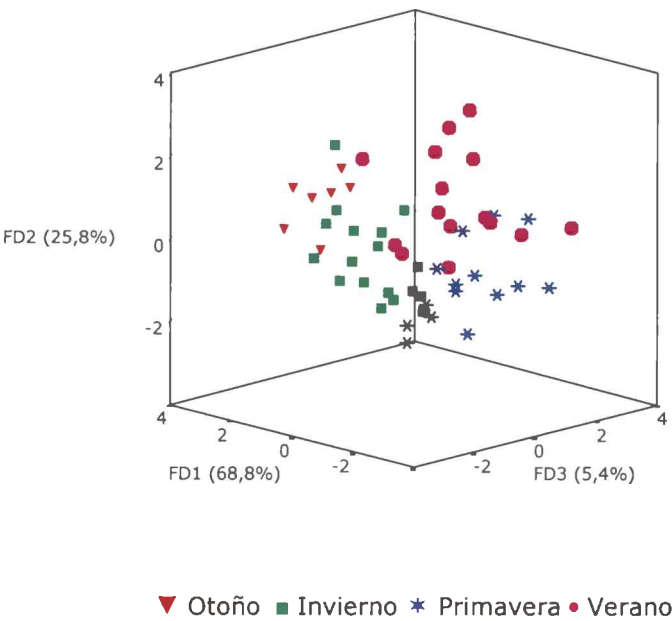


Figura 28: Análisis discriminante lineal, considerando los componentes volátiles y el perfil de *olor* obtenido por nariz electrónica, de LEP recién elaboradas aplicando el TTI en las distintas estaciones del año.

En el ADL de las LEP del TTD correspondiente al perfil de olor por NE, se obtuvieron dos FD que explicaron 58,7% y 30,3% del total de la varianza explicada respectivamente, con un 88,3% de clasificación correcta de cada muestra en su respectivo grupo de pertenencia (estación) y el 51,7% después de la validación cruzada. Una mejora en la clasificación se obtuvo con la incorporación de los datos de componentes volátiles. Se obtuvieron tres FD que explicaron 55,6%, 32,1% y 12,3% del total de la varianza explicada respectivamente, con un 96,7% de clasificación correcta de cada muestra en su respectivo grupo de pertenencia (estación) y el 88,3% después de la validación cruzada (**Figura 29**).

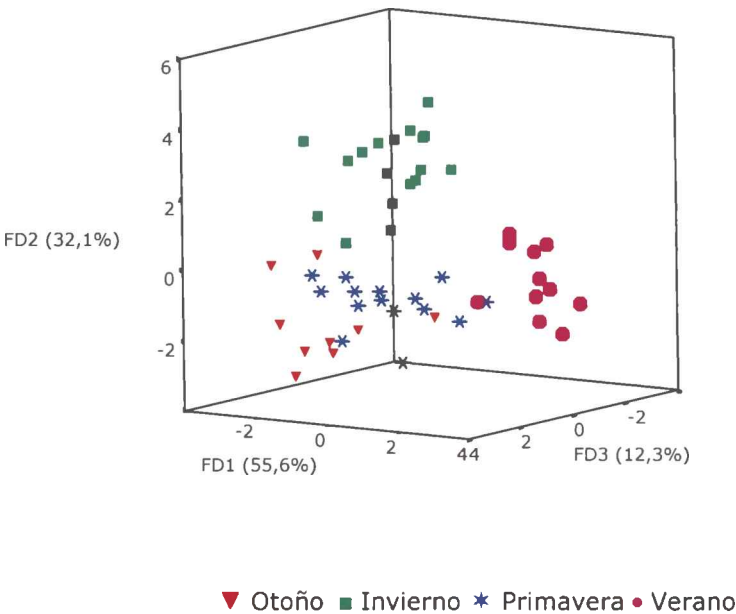


Figura 29: Análisis discriminante lineal, considerando los componentes volátiles y el perfil de *olor* obtenido por nariz electrónica, de LEP recién elaboradas aplicando el TTD en las distintas estaciones del año.

El análisis discriminante reveló que la complementación de ambas técnicas resultó en una mejor discriminación entre las LEP de acuerdo a la estación de elaboración.

El ADL aplicado a los datos de componentes volátiles por SPME-GC y perfil de olor por NE incluyó el cálculo de tres variables canónicas (**Tabla 29**) y sus coeficientes, que mostraron la posición de cada estación en los

sistemas de las tres coordenadas. Las variables canónicas forman las siguientes ecuaciones de las funciones discriminantes lineales:

Tratamiento Térmico Indirecto:

$$DF_1 = -0,358*S_2 - 0,558*S_7 + 0,131*S_{22} + 0,777*\text{hexanal} + 0,878*\text{dimetil sulfuro} - 0,584*\text{ácido butírico}$$

$$DF_2 = -0,694*S_2 + 0,725*S_7 + 0,859*S_{22} + 0,490*\text{hexanal} - 0,021*\text{dimetil sulfuro} + 0,668*\text{ácido butírico}$$

$$DF_3 = 0,401*S_2 + 0,340*S_7 - 0,736*S_{22} + 0,102*\text{hexanal} + 0,232*\text{dimetil sulfuro} + 0,306*\text{ácido butírico}$$

Tratamiento Térmico Directo:

$$DF_1 = -0,972*\text{dimetil sulfuro} + 0,382*\text{hexanal} - 0,094*\text{ácido butírico} + 0,366*S_9 - 0,203*S_{10} - 0,365*S_{11} + 0,366*S_{26} - 0,005*S_{27}$$

$$DF_2 = -0,003*\text{dimetil sulfuro} + 1,460*\text{hexanal} - 0,584*\text{ácido butírico} + 0,475*S_9 + 0,387*S_{10} - 0,446*S_{11} + 0,208*S_{26} - 0,592*S_{27}$$

$$DF_3 = -0,329*\text{dimetil sulfuro} - 0,061*\text{hexanal} + 0,438*\text{ácido butírico} - 0,292*S_9 + 0,770*S_{10} - 0,071*S_{11} - 0,703*S_{26} - 0,267*S_{27}$$

donde S_j representa el número de sensor ($j = 1$ a 28)

Los modelos aquí presentados se podrían considerar como una primera aproximación para identificar las LEP de diferentes estaciones del año. Es importante remarcar que el uso complementario de las metodologías de SPME-GC y NE mostró ser útil para mejorar la capacidad de la clasificación. Sin embargo, la NE mostró ser una herramienta útil para conocer la clasificación de las LEP estudiadas.

Cuando una muestra nueva es considerada, las tres funciones discriminantes DF_1 , DF_2 y DF_3 deberían ser calculadas. Luego, los valores calculados deberían ser comparados con aquellos presentados en la **Tabla 30**. Es importante remarcar que los modelos presentados deberían ser validados por otro conjunto de muestras de LEP.

Tabla 30. Promedios de las variables canónicas del análisis discriminante; considerando dimetil sulfuro, hexanal, ácido butírico y el S₂, S₇, S₉, S₁₀, S₁₁, S₂₂, S₂₆, S₂₇; para LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.

	Tratamiento Térmico Indirecto			Tratamiento Térmico Directo		
	DF ₁	DF ₂	DF ₃	DF ₁	DF ₂	DF ₃
Otoño	-2,933	0,783	0,675	-1,259	-1,528	2,286
Invierno	-1,007	-0,125	-0,656	-1,081	2,505	0,011
Primavera	0,819	-1,562	0,316	-2,058	-1,687	-1,182
Verano	2,016	1,165	0,063	3,426	-0,335	-0,169

Es importante resaltar que las ventajas de la NE sobre el método clásico de SPME-GC es su manejo más simple y mayor rapidez en términos de generación e interpretación de datos. Estas características convierten a la NE en una herramienta muy adecuada para el monitoreo del olor en una línea producción de alimentos.

III.2.2. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Seguidamente se presenta la evolución de los componentes volátiles seleccionados en leche entera en polvo almacenada en las condiciones normalmente empleadas en la industria láctea, a saber:

- ⇒ Leches enteras en polvo elaboradas bajo el proceso indirecto, envasadas en bolsas de polietileno de 400 g en caja de cartón en aire y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 6 meses.
- ⇒ Leches enteras en polvo elaboradas bajo el proceso directo, envasadas en latas de aluminio de 800 g en atmósfera inerte de N₂ y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

III.2.2.1. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO ENVASADA EN AIRE y ALMACENADA 6 MESES

III.2.2.1.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses

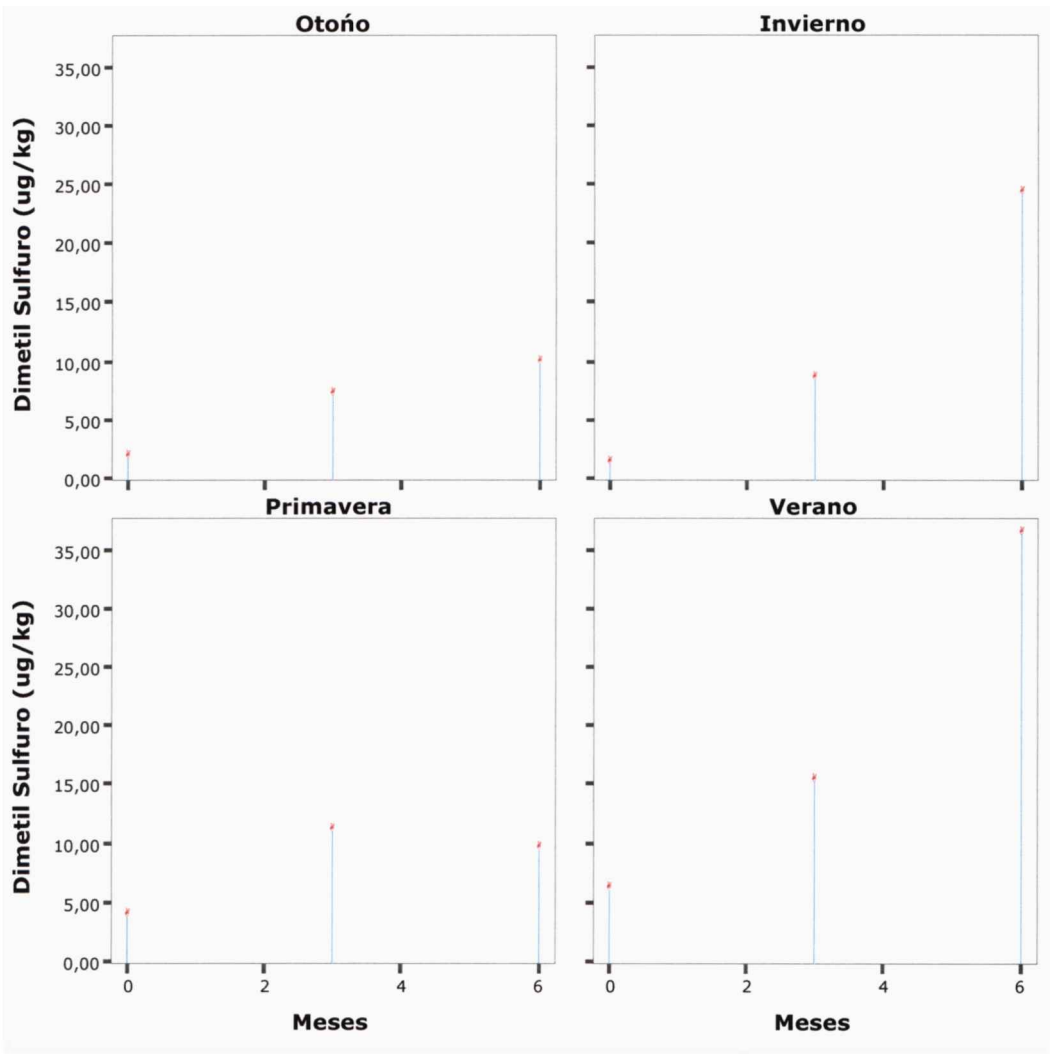


Figura 30. Contenido de dimetil sulfuro (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

En la **Figura 30** se puede observar que el contenido de dimetil sulfuro aumentó, en general para todas las estaciones, durante el período de almacenamiento de las LEP. Cabe resaltar que las diferencias halladas en

el nivel de dimetil sulfuro entre el final y el comienzo del almacenamiento para cada una de las estaciones resultaron estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Estos resultados concuerdan con los hallados por Hall y col. (1985), quienes observaron un incremento en el contenido dimetil sulfuro en muestras de leche entera en polvo almacenadas en aire a la oscuridad durante 84 semanas a 25°C. Asimismo, Marsili (2000) observó un incremento en el contenido de dimetil sulfuro de leche pasteurizada durante 7 meses de almacenamiento. Sin embargo, dichos autores no informaron los niveles hallados.

Por otra parte, los niveles de dimetil sulfuro obtenidos para el tiempo inicial en las estaciones de otoño e invierno se encuentran dentro del rango de $1,25 \mu\text{gKg}^{-1}$ a $1,83 \mu\text{gKg}^{-1}$ informado por Valero y col. (2001) durante 120 días de almacenamiento de leche entera UHT. Sin embargo, los niveles de dimetil sulfuro hallados en las LEP del presente estudio superaron dicho rango a los 3 y 6 meses de almacenamiento. Como fue mencionado en el apartado **III.2.1.1.**, los niveles encontrados de dimetil sulfuro en este trabajo serían el resultado del efecto combinado de un conjunto de factores implicados en la formación de este componente tales como diferencias en la alimentación dada al ganado en las distintas estaciones y el tratamiento térmico aplicado a la leche cruda en el proceso de elaboración de leche en polvo.

Es de remarcar que los niveles de dimetil sulfuro obtenidos hacia el final del almacenamiento para las estaciones de otoño y primavera son inferiores a $14 \mu\text{gKg}^{-1}$ valor asociado con la aparición de *off-flavor* en leche (Badings, 1991). Si bien los niveles de dimetil sulfuro hacia el final de almacenamiento de las LEP de invierno y verano superaron los $14 \mu\text{gKg}^{-1}$ (Badings, 1991), el panel de jueces entrenados no percibió el descriptor forraje en dichas muestras.

III.2.2.1.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses

En la **Figura 31** se muestran los niveles de 3-CH₃ butanal obtenidos durante el período de almacenamiento en las LEP de las estaciones de

primavera y verano. Dichos niveles resultaron diferentes ($P < 0,05$) entre el final y el comienzo del almacenamiento.

Cabe aclarar, que las LEP elaboradas en las estaciones de otoño e invierno no mostraron cantidades detectables de 3-CH₃ butanal durante el tiempo de almacenamiento evaluado.

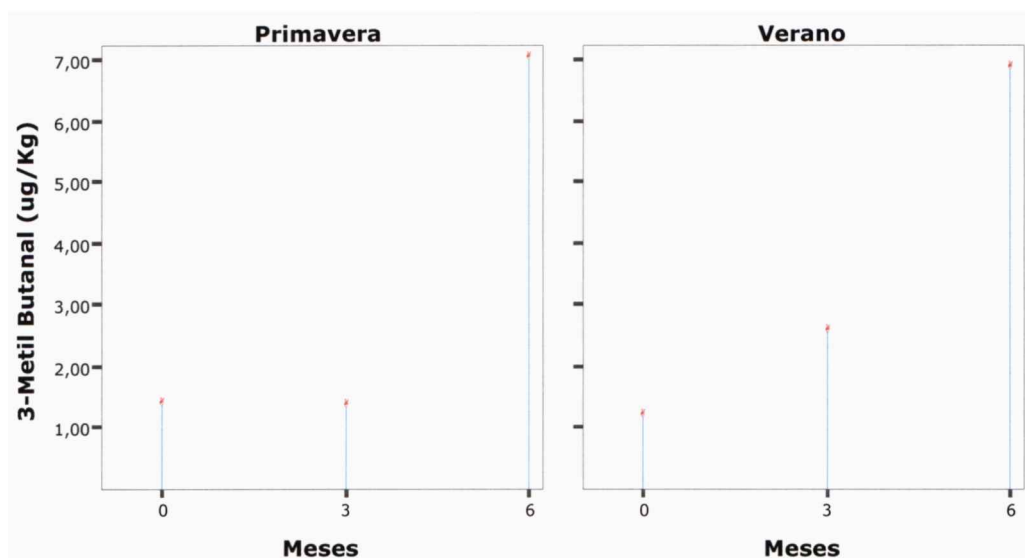


Figura 31. Contenido de 3-CH₃ butanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

De acuerdo a lo expuesto en el apartado **III.2.1.2.** el 3-CH₃ butanal es uno de los aldehídos de cadena ramificada resultante de la degradación de Strecker (Hall y col., 1985), una de las etapas importantes en la formación térmica del aroma a través de la reacción de Maillard (Davies y Labuza, 2005 http://faculty.che.umn.edu/fscn/Ted_Labuza/cv/tplcv.htm). El hidroximetilfurfural es uno de los intermediarios de la formación de pigmentos en las etapas más avanzadas de la reacción de Maillard (Ferrer y col., 1999). En la sección **III.1.1.** (Tabla 16) se mostró como se modificaba el contenido de HMF libre en las distintas estaciones del año. En dicha tabla se observó como los niveles de HMF libre eran significativamente más altos en las LEP manufacturadas en las estaciones de primavera y verano comparados a los niveles de las LEP elaboradas en las estaciones de otoño e invierno. Los resultados observados para HMF libre nos indicarían que las LEP de primavera y verano habrían sufrido un

mayor grado de la reacción de Maillard, resultando en la formación de más intermediarios y causando de esta manera la formación de más productos de reacción durante el almacenamiento. Esto explicaría los mayores niveles de 3-CH₃ butanal hallados durante el almacenamiento de las LEP de primavera y verano.

Eichner y Wolf (1983) hallaron incrementos del contenido de 3-CH₃ butanal durante el almacenamiento de zanahorias deshidratadas y que tal incremento dependía de las temperaturas empleadas en el procesamiento. Así, las zanahorias sometidas a una deshidratación a alta temperatura superaban en gran medida el umbral de sabor del 3-CH₃ butanal de 2 mgKg⁻¹, mientras que sometidas a una deshidratación a baja temperatura apenas superaban aquel umbral. Las zanahorias sometidas a una deshidratación por congelación contenían un nivel de 3-CH₃ butanal cercano al umbral de olor del mismo de 0,5 mgKg⁻¹.

Por otro lado, Valero y col. (2001) informaron un rango de 0,498 µgKg⁻¹ a 1,82 µgKg⁻¹ en el nivel de 3-CH₃ butanal de leche entera UHT almacenada durante 120 días.

Al igual que para dimetil sulfuro, los resultados mostrados aquí para 3-CH₃ butanal concuerdan con los hallados por Hall y col. (1985), quienes detectaron un incremento en el contenido de 3-CH₃ butanal en muestras de leche entera en polvo almacenadas en aire a la oscuridad durante 84 semanas a 25°C.

Es de destacar que el panel de jueces entrenados, no percibió en las muestras de LEP evaluadas *flavor* a cocido y quemado los que podrían ser asociados a un estadio avanzado de la reacción de Maillard.

III.2.2.1.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses

En las **Figuras 32 y 33** se muestra el nivel de pentanal y hexanal, respectivamente. En dichas figuras se puede observar que, en general, el contenido de pentanal y hexanal aumentó durante el almacenamiento.

Aún cuando las concentraciones de pentanal de las diferentes estaciones al inicio del almacenamiento no resultaron estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (**Tabla 27**), se puede observar que el incremento

en la concentración del citado compuesto resultó mayor en las LEP elaboradas en las estaciones de primavera y verano (**Figura 32**). Además, se observa que el nivel pentanal durante los 6 meses de almacenamiento aumentó 3 veces ($P < 0,05$) en la estación de primavera, 5 veces en verano ($P < 0,05$), y 2,5 y 2 veces ($P < 0,05$) en otoño e invierno respectivamente.

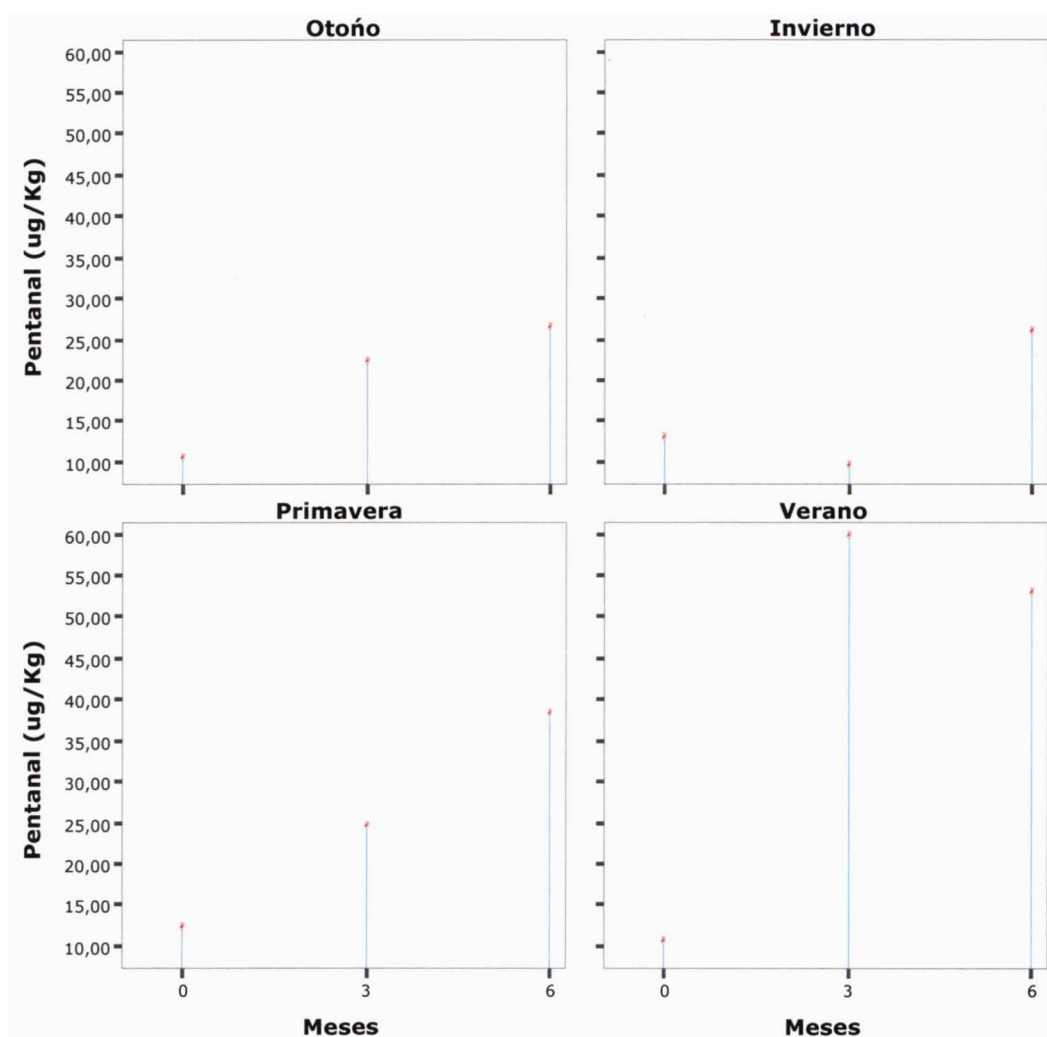


Figura 32. Contenido de pentanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

El comportamiento del hexanal (**Figura 33**) hacia el final del almacenamiento fue similar al observado para el pentanal. Además, la concentración inicial de hexanal aumentó 3,1 veces ($P < 0,05$) en las LEP de primavera; 2,5 en las LEP verano ($P < 0,05$); 1,5 en las de otoño ($P > 0,05$) y 1,3 en las de invierno ($P > 0,05$).

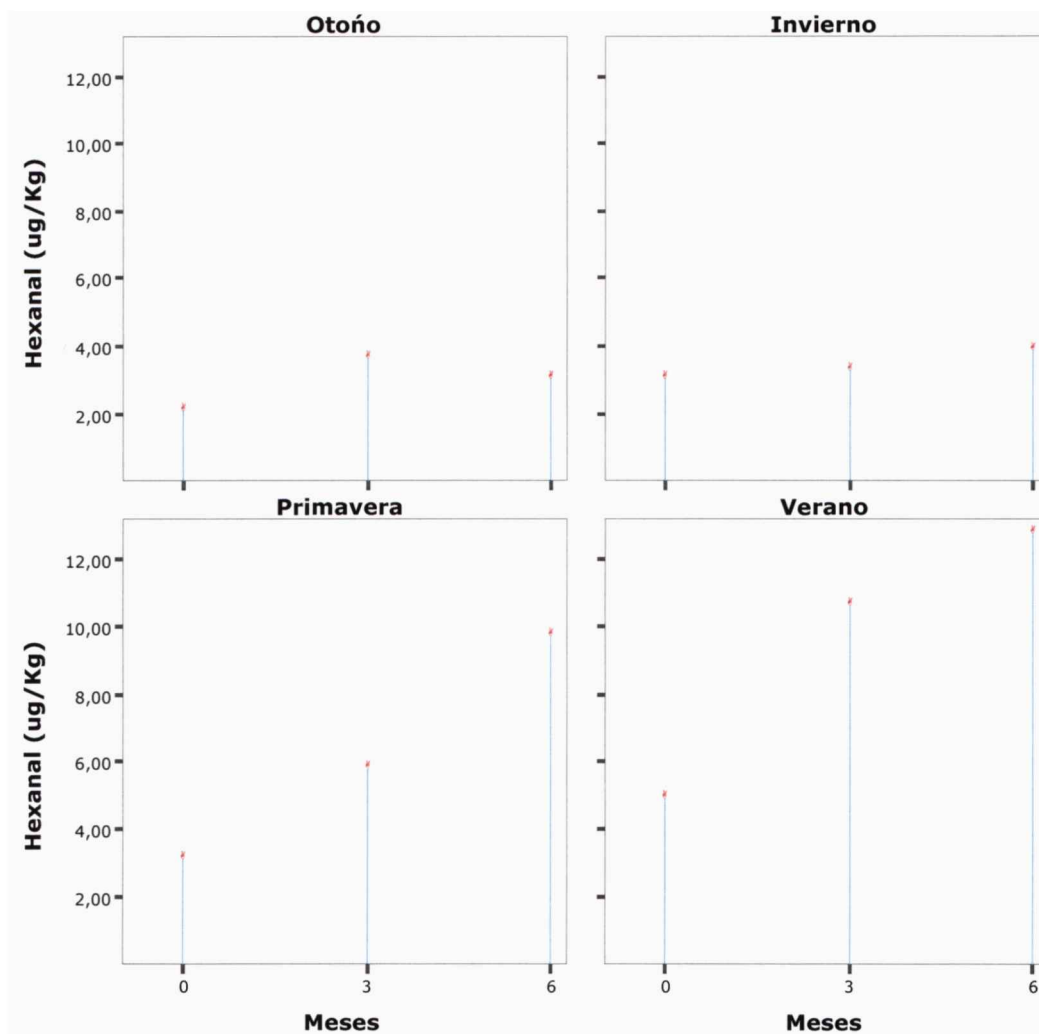


Figura 33. Contenido de hexanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

La leche es un sistema biológico complejo en el cual numerosos compuestos antioxidantes y prooxidantes actúan en forma combinada determinando su estabilidad oxidativa. Además, las variables empleadas durante el procesamiento y posterior almacenamiento de un producto lácteo ejercen una notable influencia en su estabilidad oxidativa. Ejemplo de ello, es la combinación tiempo y temperatura empleada en las distintas etapas de elaboración de leche en polvo, la humedad del polvo y la temperatura durante su almacenamiento.

La oxidación de la grasa involucra la reacción entre el oxígeno y los ácidos grasos, como libres, o bajo la forma de triglicéridos (Celestino y col., 1997a). La grasa libre es la grasa que escapa de los glóbulos cuya membrana ha sido total o parcialmente dañada. La cantidad de grasa libre depende del tipo de proceso aplicado, de las condiciones de almacenamiento y del contenido de grasa de la leche (Páez, 2002). Es de destacar que el contenido típico de grasa libre en leche en polvo obtenida mediante la tecnología de secado Spray es de 3,3-20% (por cada 100 g de grasa) y de 0,92-5,6% (por cada 100 g de producto). La grasa libre en el polvo es inevitable, pero puede reducirse: evitando excesivo bombeo y agitación de la leche cruda; homogeneizando el concentrado, previo al secado; evitando los tratamientos mecánicos del polvo, etc.

La presencia de grasa libre sobre la superficie de las partículas de leche en polvo tiende a aumentar la susceptibilidad a la oxidación (Páez, 2002). En el presente trabajo las LEP provenientes de la estación de verano mostraron el mayor % de grasa libre (**Tabla 31**).

Tabla 31. Medias y desviación estándar del % grasa libre (por cada 100 g de producto) en LEP recién elaboradas, aplicando el TTI y el TTD, en las distintas estaciones del año.

	Ototo	Invierno	Primavera	Verano
Tratamiento Térmico Indirecto	0,96 ± 0,13 b	1,01 ± 0.11 b	1,00 ± 0,08 b	1,57 ± 0,32 a
Tratamiento Térmico Directo	1,03 ± 0,06 b	1,05 ± 0,12 b	1,21 ± 0,25 b	1,32 ± 0,12 ab
Nivel de Significancia de ANOVA ^b				
	Modelo	Tratamiento Térmico (TT)	Estación (E)	TT*E
	****	NS	****	*

^a Medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (*P* < 0,05) relacionadas al TT *E.

^b **** *P* < 0,0001; * *P* < 0,05; NS: no significativo.

De acuerdo a Singh y Newstead (1998) para prolongar la conservación de la leche entera en polvo es recomendable no superar un 2% de grasa libre (por 100 g de producto). Como es posible observar en la **Tabla 31**, los valores de grasa libre de las LEP de las distintas estaciones no superaron el 2% de grasa libre recomendado por Singh y Newstead (1998) para prolongar la conservación de la LEP.

Páez (2002) mostró que las LEP, elaboradas bajo las mismas condiciones que las LEP del presente trabajo pero envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a 40°C, alcanzaron un valor de 2% de grasa libre (por 100 g de producto) a los 60 y 120 días de almacenamiento en muestras elaboradas en verano e invierno, respectivamente. La citada autora observó además un nivel de 30 µgKg⁻¹ de hexanal en las LEP de verano a los 60 días de almacenamiento en tanto que las LEP de invierno no superaron el nivel de 14 µgKg⁻¹ durante los 180 días de almacenamiento. Los resultados mostrados por Páez (2002) y los obtenidos en la presente tesis en relación al contenido de hexanal y pentanal muestran como tanto el % de grasa libre como las condiciones de almacenamiento son factores que afectan al grado de desarrollo de los procesos oxidativos.

Por otro lado, los cambios oxidativos en la grasa de la leche están indirectamente asociados a los cambios lipolíticos. De esta manera, cuanto mayor sea el grado de lipólisis, mayor debería ser la formación de ácidos grasos libres y esto consecuentemente debería dar lugar a un mayor grado de oxidación (Deeth y Fitz-Gerald, 1975).

El contenido de ácidos grasos libres (AGL) totales, expresado como mgg⁻¹ de grasa, mostró que las LEP de la estación de primavera tenían el mayor contenido de AGL totales (4,0±0,8) respecto de las otras estaciones (otoño: 3,2±0,6; invierno: 3,1±0,3; verano: 2,7±1,0). Es importante destacar que la determinación de AGL totales incluyó la caracterización y cuantificación de los siguientes ácidos grasos saturados: ácido butírico (C_{4:0}), caproico (C_{6:0}), caprílico (C_{8:0}), cáprico (C_{10:0}), láurico (C_{12:0}), mirístico (C_{14:0}), palmítico (C_{16:0}), esteárico (C_{18:0}) y oléico (C_{18:1}), pero no así la de ácidos grasos poliinsaturados. De acuerdo a Chen y col. (2003) los ácidos grasos insaturados liberados durante la lipólisis son susceptibles a la oxidación y a la formación de aldehídos y cetonas, los cuales dan lugar a la aparición de *off-flavors* descriptos como oxidado, acartonado, o metálico.

Como fuera discutido en el apartado **III.2.1.3.**, pentanal y hexanal son componentes volátiles resultantes de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Descalzo y col., 2005). Además, se conoce que si bien una dieta basada en pastura suministra vitamina E además de otros antioxidantes naturales (Descalzo y col., 2005), la misma conduce a valores incrementados de ácidos grasos poliinsaturados, volviendo a la leche más vulnerable a la oxidación (Melton y col., 1982; Larick y Turner, 1989; García y col., 1999; Yang y col., 2002). Consecuentemente, es razonable pensar que los mayores niveles de pentanal y hexanal observados en las estaciones de primavera y verano se deban al consumo de pastura de alfalfa, programa de alimentación característico de la cuenca lechera santafesina en las citadas estaciones.

Como fuera expuesto en el apartado **III.2.1.3** los umbrales de olor en agua de pentanal y hexanal de $12 \mu\text{gKg}^{-1}$ y $4,5 \mu\text{gKg}^{-1}$ (Buttery y col., 1988), respectivamente, se incrementan a $130 \mu\text{gKg}^{-1}$ y $50 \mu\text{gKg}^{-1}$ en leche homogeneizada con un 3,8% de grasa (Day y col., 1963), respectivamente. En el presente trabajo el contenido de grasa promedio de la leche en polvo fue de 26,9% la cual partió de una leche fluida con un contenido de grasa promedio del 3,5%. Es de resaltar que el mismo panel de jueces entrenados que evaluaron las muestras del presente estudio, determinó que una concentración de $30 \mu\text{gKg}^{-1}$ de hexanal en leche entera en polvo podría ser tomado como valor umbral de aparición del *flavor* oxidado (Páez, 2002).

De acuerdo a los umbrales de olor para pentanal y hexanal indicados por Day y col. (1963) y Páez (2002) advertimos, lo ya discutido en el apartado **III.2.1.3.**, acerca de la importancia que tienen los componentes de los alimentos sobre la percepción de los componentes responsables del *flavor*. Como se observó en las **Figuras 32** y **33**, los niveles de pentanal y hexanal alcanzados durante el período de almacenamiento ensayado se encuentran por debajo del umbral olor reportado por Day y col. (1963) y Páez (2002) para los citados componentes. Coincidiendo con los valores umbrales de hexanal y pentanal informado por los citados autores, es importante recalcar que el panel de jueces entrenados no percibió el *flavor* oxidado durante el almacenamiento en las LEP bajo estudio, a excepción de las LEP del verano hacia los 6 meses de almacenamiento. El resultado observado para las LEP de verano podría ser el resultado de la síntesis de

otro/s componentes producto de la oxidación de lípidos, no caracterizados en el presente trabajo, los que podrían jugar un rol importante en la percepción de *flavor* oxidado.

Es importante recalcar que se ensayaron otras dos metodologías que miden el grado de oxidación en alimentos tales como SRATB y el valor peróxido (VP).

En las **Figuras 34** y **35** se puede observar que, en general, tanto las medidas de SRATB a 532 nm como 450 nm muestran un comportamiento no definido.

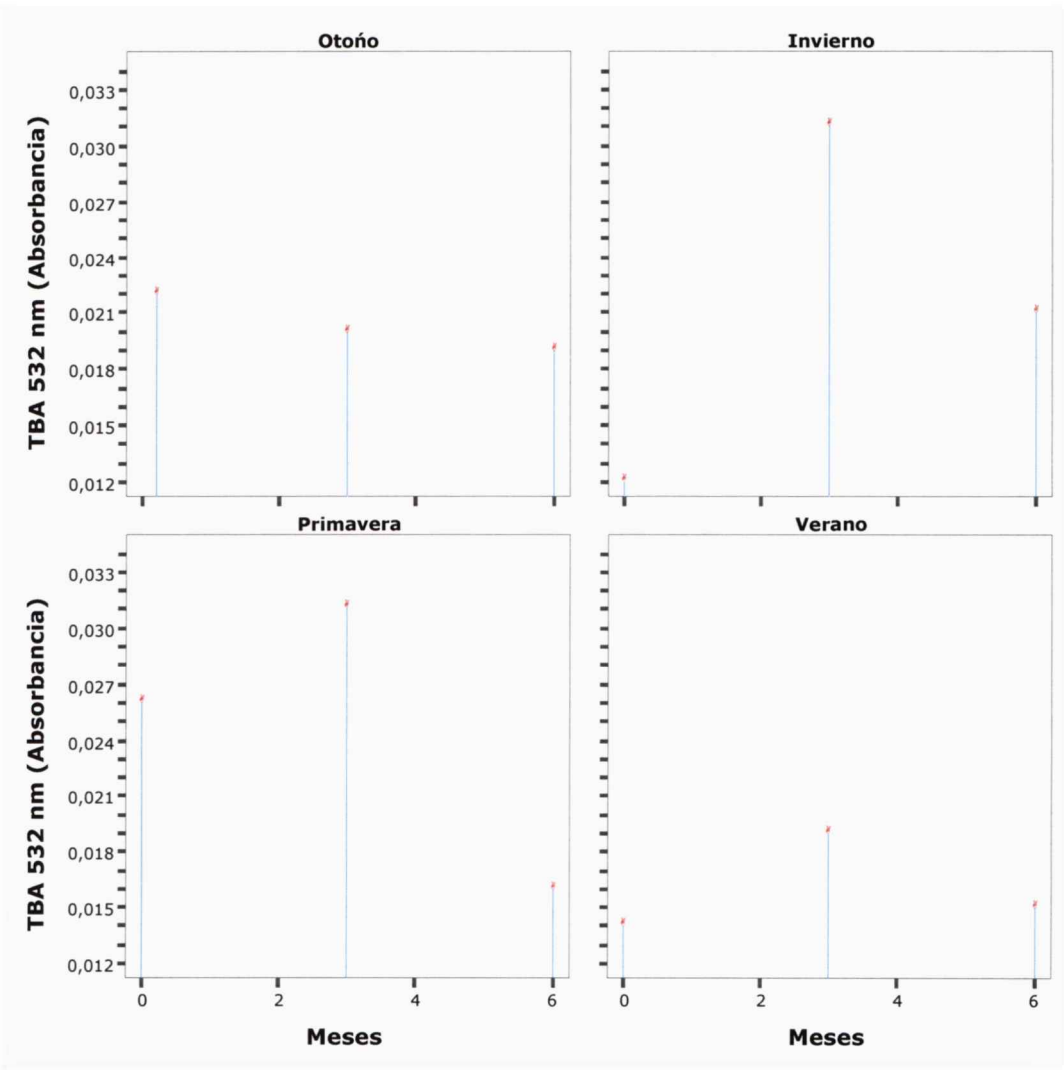


Figura 34. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 532 nm de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 6 meses.

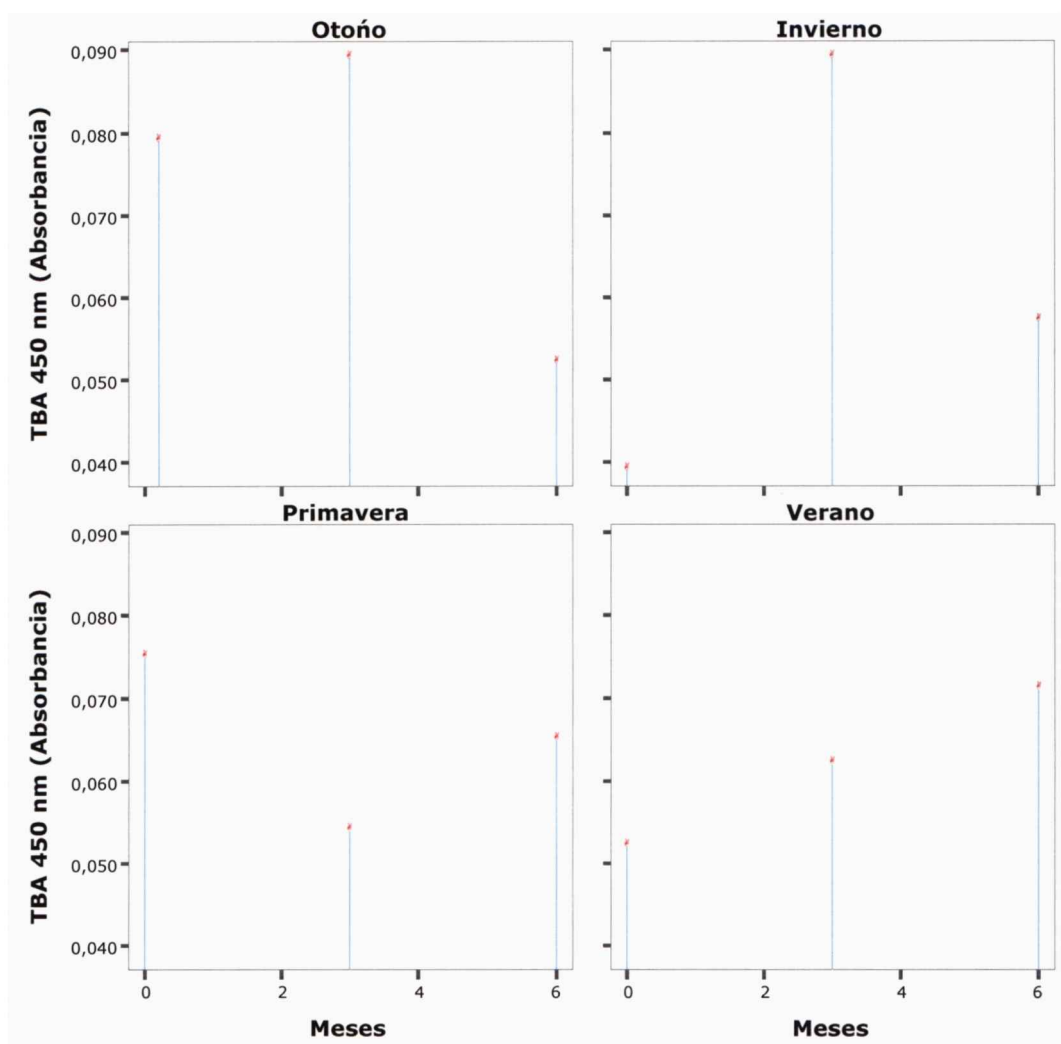


Figura 35. Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 450 nm de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

King (1962) correlacionó valores de SRATB medido a 532 nm con el *flavor* oxidado en muestras de leche fluida. El citado autor informó un rango de absorbancia a 532 nm de 0,031-0,040 a partir del cual se comienza a detectar el *flavor* oxidado. Como se puede apreciar en las LEP bajo estudio no se alcanzó durante los 6 meses de almacenamiento el rango de absorbancia informado por King (1962).

El valor peróxido (VP) es otro indicador químico que se utiliza frecuentemente para medir oxidación en grasas. Los peróxidos son productos primarios de oxidación, intermediarios transitorios inestables,

sobre todo a temperaturas elevadas o en presencia de metales (Páez, 2002).

Sidwell y col. (1955) y Van Mils y Jans (1991) señalaron el valor de 2 meqO₂/Kg grasa como valor a partir del cual se podrían detectar defectos en el *flavor* asociados a procesos oxidativos. Como se puede observar en la **Figura 36**, las muestras de LEP estudiadas no alcanzaron el citado VP durante el período de almacenamiento.

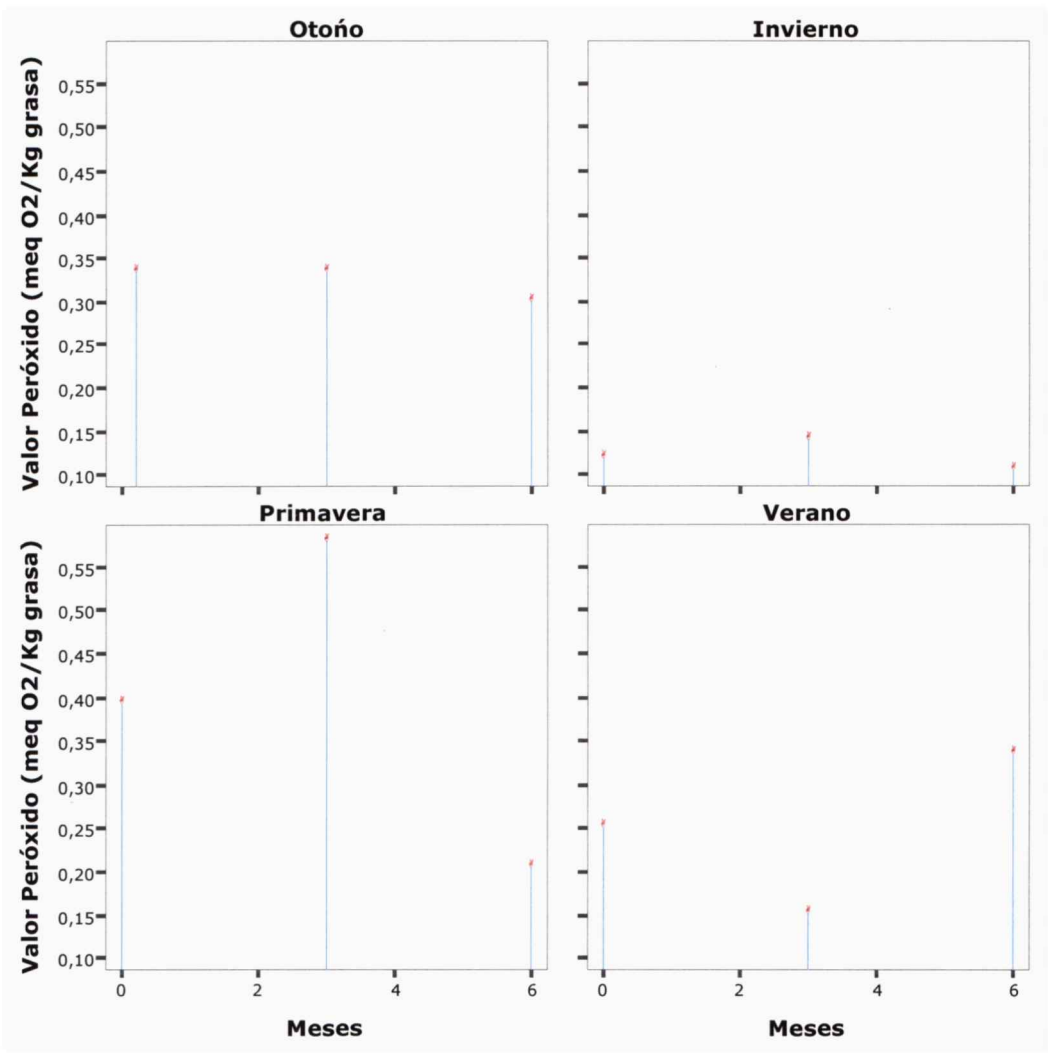


Figura 36: Valor peróxido (meq O₂/Kg grasa) de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a 20°C±0,5°C durante 6 meses.

Van Mils y Jans (1991) indicaron que independientemente del envase, el valor de 2 meqO₂/Kg grasa de VP se alcanza aproximadamente a los 18 meses de almacenamiento en polvos elaborados en invierno y primavera y

que, aún alcanzando este umbral no se alteran organolépticamente. Por otro lado, según resultados mostrados por Páez (2002) las muestras de leche en polvo, envasadas en atmósfera de N₂ a 21°C, alcanzaron valores de 0,4 meqO₂/Kg grasa a los 6 meses de almacenamiento y de 2,3 meqO₂/Kg grasa a los 15 meses con cambios importantes desde el punto de vista sensorial.

Los resultados de VP obtenidos en este trabajo estarían en parte de acuerdo con los resultados observados por Páez (2002) aún cuando difieran las condiciones de almacenamiento ensayadas.

Desde la mitad del siglo XX se observó que el tratamiento térmico a alta temperatura aplicado a la leche fluida antes del proceso de secado mejoraba la calidad de la leche en polvo en presencia de aire, sugiriendo que el pretratamiento térmico provocaba el desarrollo de sustancias reductoras (Shipstead y Tarassuk, 1953). Como fue mencionado en el apartado **III.2.1.3.**, diversos estudios mostraron que la formación de grupos -SH reactivos, resultantes del tratamiento térmico aplicado a la leche, son responsables de prevenir el desarrollo de *flavor* oxidado (Celestino y col., 1997b; Singh y Newstead, 1998). Además, se mostró que los productos de la reacción de Maillard, formados durante el calentamiento y almacenamiento, pueden influenciar la estabilidad oxidativa y la vida útil de varios alimentos, tales como cereales (Lingnert, 1980), leche (Hansen y Hemphill, 1984; Hall y col., 1985; Singh y Newstead, 1998) y carne (Bedinghaus y Ockerman, 1995). De esta manera, es probable que estos componentes contribuyeran a la estabilidad oxidativa de la leche en polvo bajo estudio.

Los resultados mostrados aquí para pentanal y hexanal están de acuerdo con lo hallado por Marsili (2000) quién realizó un estudio para predecir la vida útil de leche pasteurizada reducida en grasa. En dicha investigación el autor observó un incremento en el contenido de pentanal y hexanal durante 7 meses de almacenamiento de la leche pasteurizada. Sin embargo, el citado autor no citó los niveles hallados. Por otro lado, Fenaille y col. (2003) estudiaron la estabilidad oxidativa de leches en polvo formula para infantes almacenadas en aire durante 4 semanas a 37°C. El estudio se realizó sobre leches adicionadas con distintos niveles de antioxidantes comparándose el comportamiento de las mismas con una leche en polvo

almacenada bajo las mismas condiciones pero sin el agregado de antioxidante y con una leche en polvo almacenada en atmósfera de N_2 a $20^\circ C$. Los autores observaron un incremento en los niveles de pentanal y hexanal durante 4 semanas de almacenamiento en todas las muestras estudiadas, siendo dicho incremento de 7-20 veces para la leche sin el agregado de antioxidante (almacenadas en aire- $37^\circ C$), de 2-3 veces para las muestras con el agregado de distintos niveles de antioxidante (almacenadas en aire- $37^\circ C$) y de 1,5 veces para la muestra en atmósfera de N_2 a $20^\circ C$. Los autores hallaron un contenido de $500 \mu g Kg^{-1}$ y $3500 \mu g Kg^{-1}$ para formulas infantiles no-oxidadas y oxidadas, respectivamente, pero no indicaron el nivel de la leche en polvo almacenada en atmósfera de N_2 a $20^\circ C$ hacia el final del almacenamiento. A pesar de las diferencias en las condiciones de almacenamiento del presente estudio y de aquel realizado por Fenaille y col. (2003), podemos remarcar los bajos niveles encontrados en este estudio. Otros trabajos, como el realizado por Valero y col. (2001) informaron niveles de hexanal de $0,77 \mu g Kg^{-1}$ a $2,01 \mu g Kg^{-1}$ durante 120 días de almacenamiento de leche entera UHT. Páez (2002) en su trabajo realizado en leche entera en polvo envasada en atmósfera inerte de N_2 y almacenada durante 180 días a $40^\circ C$ encontró niveles de hexanal cercanos a $50 \mu g Kg^{-1}$ hacia el final del almacenamiento.

Un punto a destacar es que el contenido de cobre, importante pro-oxidante (Marsili, 2000), no se detectó en las LEP evaluadas.

III.2.2.1.4. Ácido butírico en leche entera en polvo envasada en aire y almacenada 6 meses

En la **Figura 37** se observa que el ácido butírico en las estaciones de invierno y verano mostró una disminución hacia los 3 meses de almacenamiento y luego un leve incremento hacia los 6 meses de almacenamiento. Un comportamiento opuesto se observó en las LEP de las estaciones de otoño y primavera. Sin embargo, es de destacar que en general los niveles de ácido butírico entre el comienzo y el final de almacenamiento no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$).

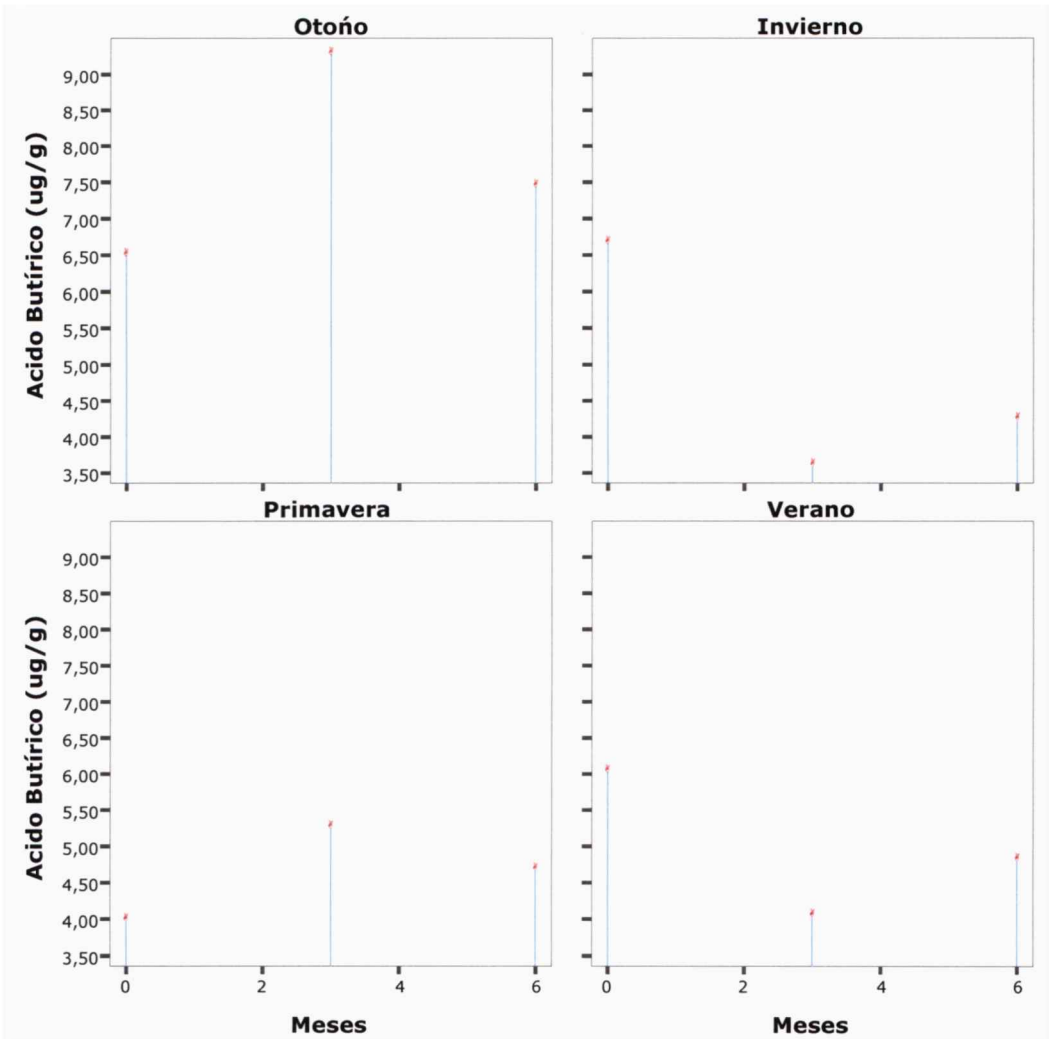


Figura 37. Contenido de ácido butírico ($\mu\text{g g}^{-1}$) en LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

Como fuera ya mencionado en el punto **III.2.1.4.**, los ácidos grasos libres pueden provenir de la acción de lipasas propias de la leche y/o lipasas microbianas termoresistentes. En el presente trabajo la leche cruda, destinada a la elaboración de LEP mediante el TTI, no superó el recuento de $2 \times 10^6 \text{ UFC ml}^{-1}$ asociado a la aparición de defectos en el *flavor* de productos lácteos (Muir y col., 1978), por lo que sería de esperar que no se manifestaran cambios apreciables durante el almacenamiento del polvo.

Renner (1988) informó que en leche en polvo la actividad enzimática cesa a una $a_w < 0,6$ o cuando el polvo tiene una humedad de aproximadamente 4%. Cabe destacar que el nivel de humedad de las LEP

estudiadas estuvieron por debajo del 4% durante el período completo de almacenamiento. Muir (1996) sugirió que aún cuando una leche tuviera una actividad enzimática microbiana extracelular alta, la degradación de la leche en polvo proveniente de dicha materia prima debería ser baja debido al bajo contenido de agua del polvo. Por el contrario, Chen y col. (2003) mostraron que puede ocurrir lipólisis en leche entera en polvo con un contenido de humedad menor a 3%. Los citados autores mostraron que el contenido de ácidos grasos totales de leche entera en polvo conteniendo lipasas termoestables se incrementó durante el almacenamiento a 37°C.

De acuerdo a lo mencionado en el apartado **III.2.1.4.** acerca de la importancia que tienen los ácidos grasos de cadena corta sobre la contribución de ambos *flavors* y *off-flavors* de productos lácteos, podemos observar que los niveles alcanzados de ácido butírico no superaron durante el almacenamiento, los niveles umbrales de *flavor* ya mencionados. Más aún, el panel de jueces entrenados no percibió defectos debidos a la aparición de *flavor* rancio durante el período de almacenamiento de las LEP bajo estudio (datos no mostrados).

Finalmente, se puede concluir que los niveles de ácido butírico hallados podrían corresponder a los niveles que se encuentran naturalmente en la leche (NORMA FIL-IDF N°265, 1991).

Marsili (2000) en un estudio para predecir la vida útil de leche pasteurizada reducida en grasa observó un incremento en el contenido de ácido butírico durante 7 meses de almacenamiento de la leche pasteurizada, pero el autor no informó los niveles hallados del citado componente.

Finalmente, se presenta en la **Figura 38** un ACP de los componentes volátiles. El ACP comprende un procedimiento matemático que transforma un grupo de variables correlacionadas en un conjunto de variables no correlacionadas llamadas componentes principales. Estas nuevas variables son una combinación lineal de las variables originales y explican el máximo de la inercia o variabilidad total. Con esta reducción de dimensión se simplifica el análisis de la dispersión de las observaciones poniéndose en evidencia posibles agrupamientos y también permite detectar las variables responsables de dicha dispersión y analizar las relaciones existentes entre ellas. Como se puede observar en la **Figura 38** se obtuvo una sola componente que explico el 66,5% de la variabilidad total. Esta componente

tiene una alta correlación positiva con el dimetil sulfuro ($r=0,849$), pentanal ($r=0,913$) y hexanal ($r=0,931$) y una correlación negativa con el ácido butírico ($r=-0,487$). En dicha figura se observa que, a excepción de las LEP de invierno a los 6 meses de almacenamiento, las LEP elaboradas en otoño e invierno, en general fueron las que presentaron la menor cantidad de pentanal, hexanal y dimetil sulfuro. En contraposición las LEP elaboradas en primavera y verano son las que presentaron los mayores niveles de pentanal, hexanal y dimetil sulfuro hacia los 3 y 6 meses de almacenamiento. Además, es interesante notar que las LEP de otoño e invierno evidenciaron al comienzo del almacenamiento el mayor nivel de ácido butírico.

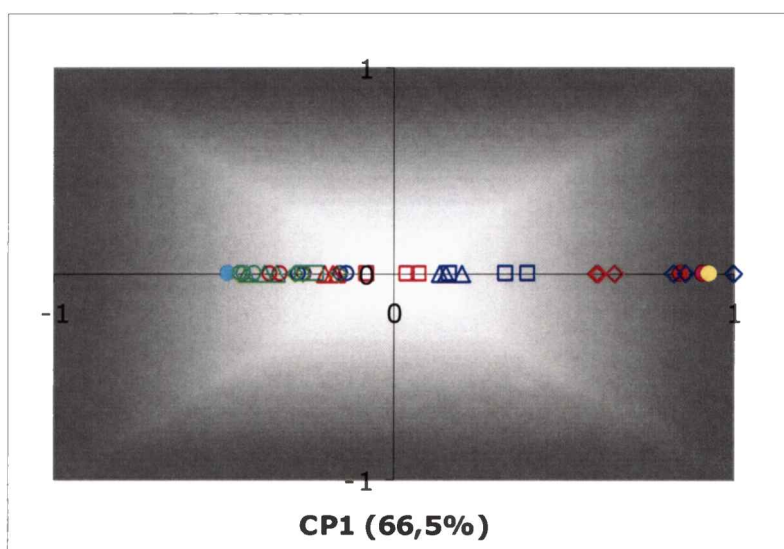


Figura 38. Análisis de componentes principales, considerando el contenido de componentes volátiles, de LEP elaboradas aplicando el TTI, envasadas en aire y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 6 meses.

● Dimetil sulfuro ● Ácido Butírico ● Pentanal Hexanal ○ Otoño-0 ○ Otoño-3 ○ Otoño-6
 △ Invierno-0 △ Invierno-3 △ Invierno-6 □ Primavera-0 □ Primavera-3 □ Primavera-6 ◇
 Verano-0 ◇ Verano-3 ◇ Verano-6

III.2.2.2. FLAVOR DE LECHE ENTERA EN POLVO ENVASADA EN ATMÓSFERA DE N₂ Y ALMACENADA 12 MESES

III.2.2.2.1. Dimetil sulfuro en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses

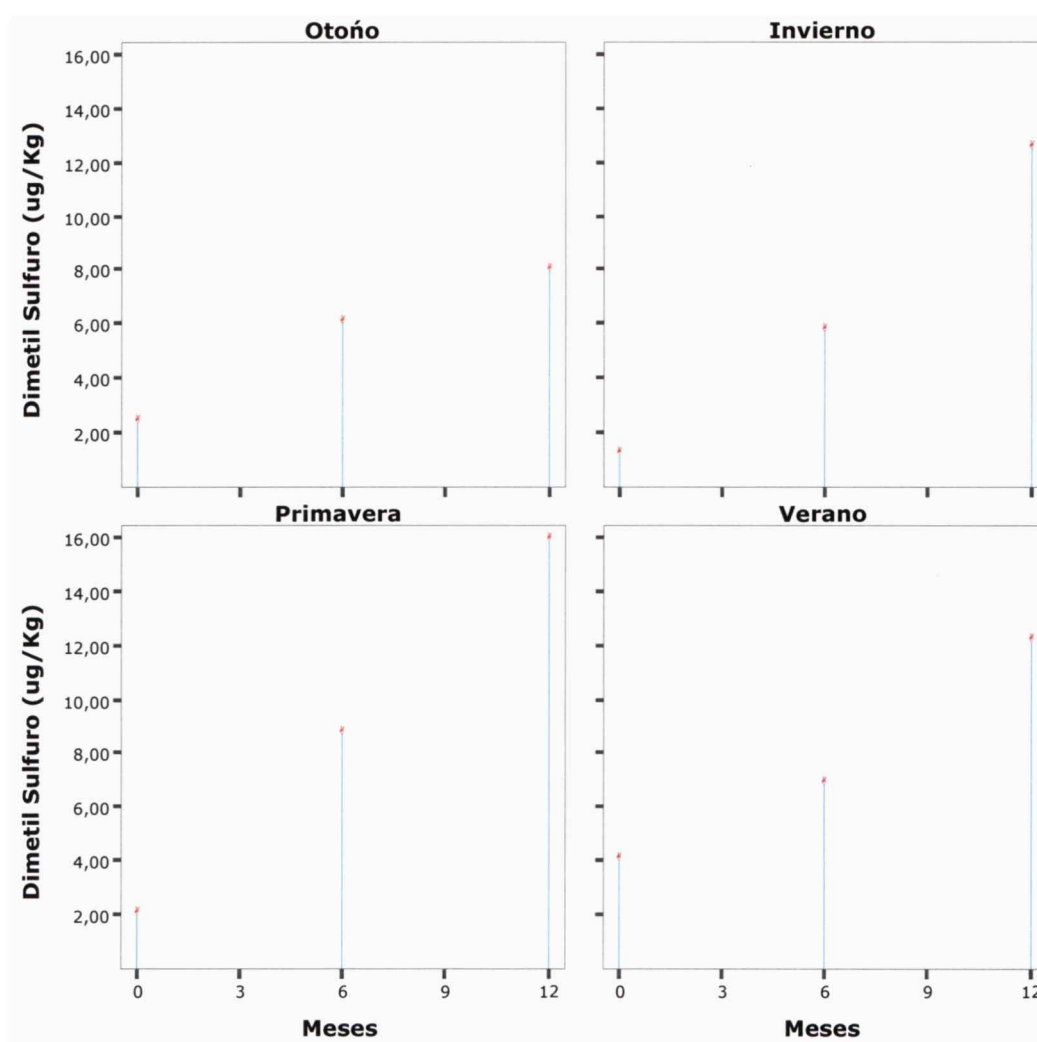


Figura 39. Contenido de dimetil sulfuro (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.

De forma similar a lo observado para las LEP provenientes del TTI, las LEP del TTD envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a 20°C durante 12 meses (**Figura 39**) evidenciaron cambios incrementales en el contenido de dimetil sulfuro durante el almacenamiento en todas las estaciones,

siendo el nivel hacia el final del almacenamiento significativamente más alto ($P < 0,05$) que el inicial. Estos resultados coincidieron con los incrementos del componente bajo estudio hallados por Hall y col. (1985) en leche entera en polvo almacenada bajo N_2 a la oscuridad a 25°C durante 84 semanas.

Los niveles hallados de dimetil sulfuro hacia el final del almacenamiento en las distintas estaciones, en general, no superaron el nivel de $14 \mu\text{gkg}^{-1}$ asociado con la aparición de *off-flavor* (Badings, 1991). Además, es de destacar que el panel de jueces entrenados no percibió el descriptor forraje en dichas muestras.

III.2.2.2.2. 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses

En la **Figura 40** se muestra el nivel de 3-CH₃ butanal durante el tiempo de almacenamiento. Se puede observar que al inicio del almacenamiento solamente las LEP de verano mostraron un nivel de 3-CH₃ butanal determinado. A los 6 meses de almacenamiento fue posible detectar el citado compuesto en las LEP de primavera y verano. Hacia el final del almacenamiento (12 meses) se observó un determinado nivel de 3-CH₃ butanal en las LEP provenientes de todas las estaciones.

Siguiendo el razonamiento del apartado **III.2.1.2.** el contenido de 3-CH₃ butanal en estas LEP podría explicarse a través del contenido de HMF libre. En la **Tabla 16** (sección **III.1.1.**) se mostró el contenido de HMF libre de las LEP del TTD en las distintas estaciones, observándose que las LEP de primavera y verano presentaban contenidos de HMF libre significativamente más altos que las LEP de otoño e invierno. Este resultado podría ser indicativo de un mayor grado de Maillard de las LEP de primavera y verano, explicando así los niveles de 3-CH₃ butanal detectados durante el almacenamiento de las citadas LEP.

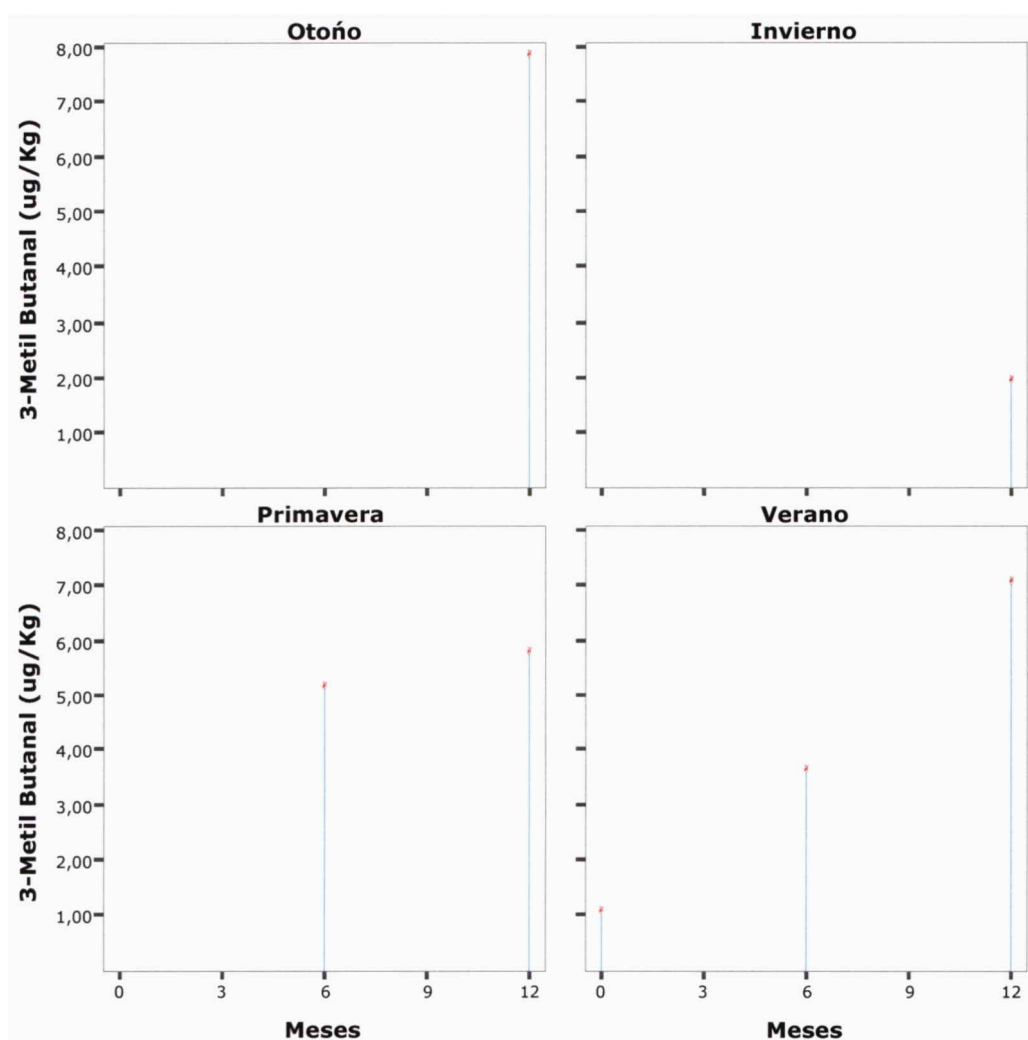


Figura 40. Contenido de 3-CH₃ butanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.

Los resultados presentados por Hall y col. (1985), muestran un incremento de 3-CH₃ butanal en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 84 semanas a 25°C en la oscuridad. Además, los autores observaron que la velocidad de incremento del citado componente era menor en las muestras almacenadas en atmósfera de N₂ que en las muestras almacenadas en aire.

III.2.2.2.3. Pentanal y hexanal en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses

En las **Figuras 41** y **42** se muestra el contenido de pentanal y hexanal, respectivamente. Es posible observar que tanto el pentanal como hexanal, en general, mostraron un incremento a través del período de almacenamiento en las LEP de todas las estaciones, siendo las diferencias entre los contenidos del inicio y final del almacenamiento estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Las LEP de verano mostraron los mayores valores de los citados componentes.

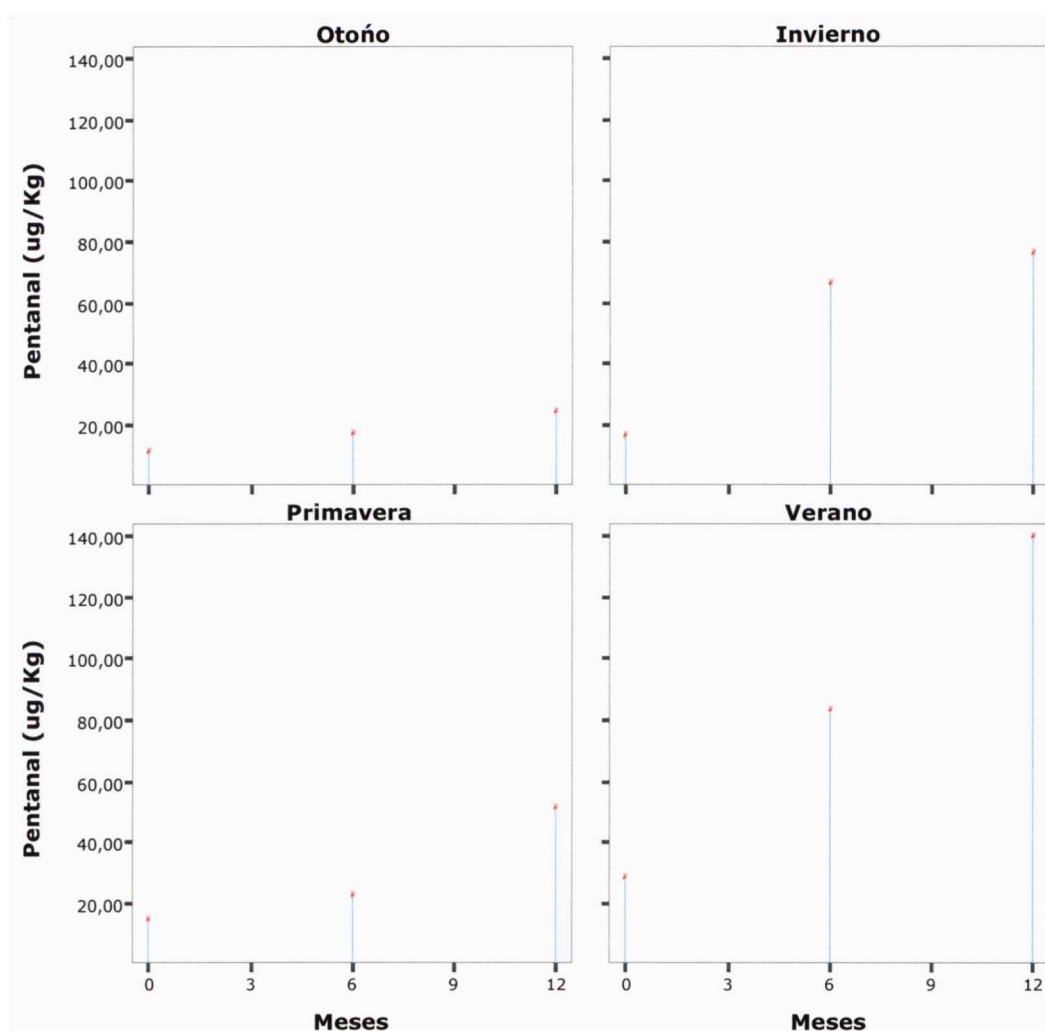


Figura 41. Contenido de pentanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas a $20^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 meses.

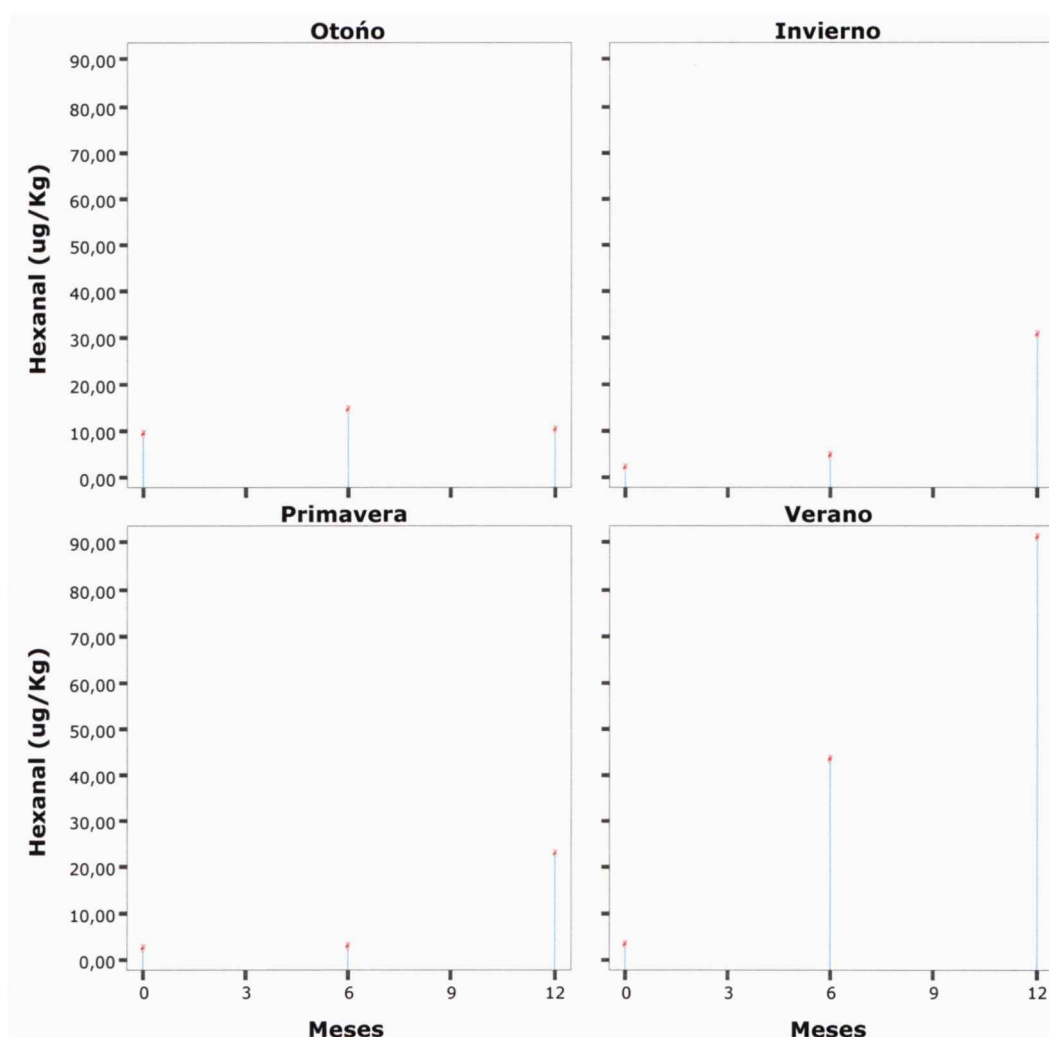


Figura 42. Contenido de hexanal (μgKg^{-1}) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses.

La concentración de oxígeno en el producto, factor determinante en la oxidación lipídica, es dependiente de la presión parcial de oxígeno en el espacio de cabeza del producto. Dependiendo de esta presión estarán disueltas diferentes cantidades de oxígeno en el espacio de cabeza del producto. Sin embargo, la cantidad de oxígeno disuelto también depende de la composición del producto. El oxígeno disponible para la oxidación en un producto envasado tiene diversos orígenes. Puede estar disuelto en el producto, estar en el espacio de cabeza del envase, ó llegar al producto por difusión a través del material de empaque (Páez, 2002). Páez (2002) señaló que cuando la concentración de oxígeno residual excede el 2% se eleva el

riesgo de oxidación lipídica. En el presente trabajo la concentración residual de oxígeno detectada en el espacio de cabeza de las LEP fue superior al 2%, observándose en general un incremento a través del tiempo. Cabe resaltar que los valores de oxígeno en el espacio de cabeza de las LEP de verano fueron de: 4,03%; 5,88% y 6,20% para 0, 6 y 12 meses, respectivamente. Este resultado podría explicar en parte los valores de pentanal y hexanal obtenidos en la citada estación.

La grasa libre evidenció el valor más alto en la estación verano (**Tabla 31**), pudiendo ser en parte responsable de los mayores niveles de pentanal y hexanal alcanzados en dicha estación. Sin embargo, es importante recordar que estos compuestos son componentes volátiles resultantes de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Descalzo y col., 2005) y que una dieta basada en pastura conduce a valores incrementados de estos ácidos grasos, volviendo a la leche más vulnerable a la oxidación (Melton y col., 1982; Larick y Turner, 1989; García y col., 1999; Yang y col., 2002).

Al igual que en las muestras almacenadas en aire, para las muestras aquí presentadas se determinó el valor de SRATB a 532nm y 450nm y el VP durante el almacenamiento de las mismas.

En las **Figuras 43** y **44** se puede observar que, en general, tanto la medida de SRATB a 532 nm como 450 nm mostraron un comportamiento no definido. Sin embargo, cabe resaltar que el rango de absorbancia a 532 nm de 0,031-0,040 señalado por King (1962) a partir del cual se comienza a detectar el *flavor* oxidado, en general, no se alcanzó durante el período de almacenamiento. Páez (2002), informó que el valor de SRATB a 532 nm de leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ no superó el rango asociado al *flavor* oxidado (King, 1962) durante 15 meses de almacenamiento a 21°C.

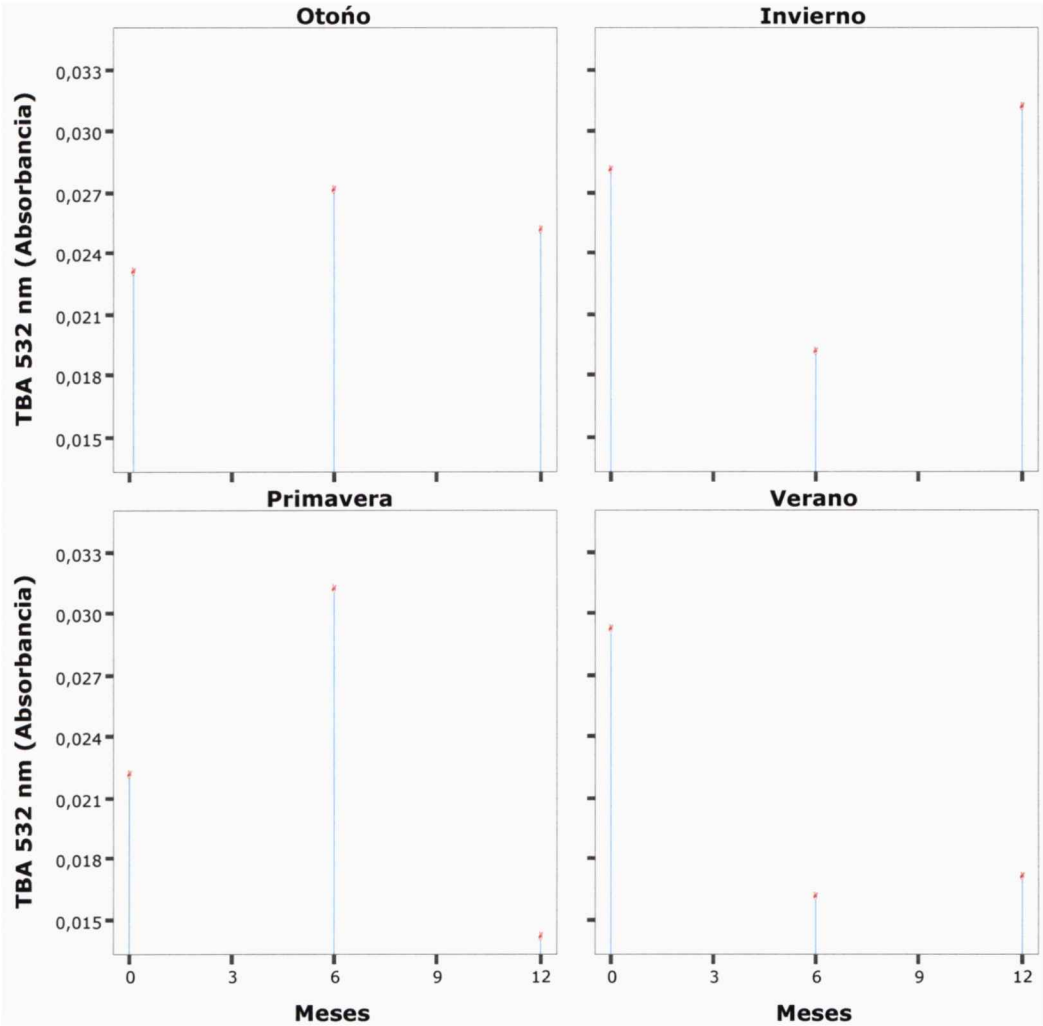


Figura 43: Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 532 nm de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenada a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

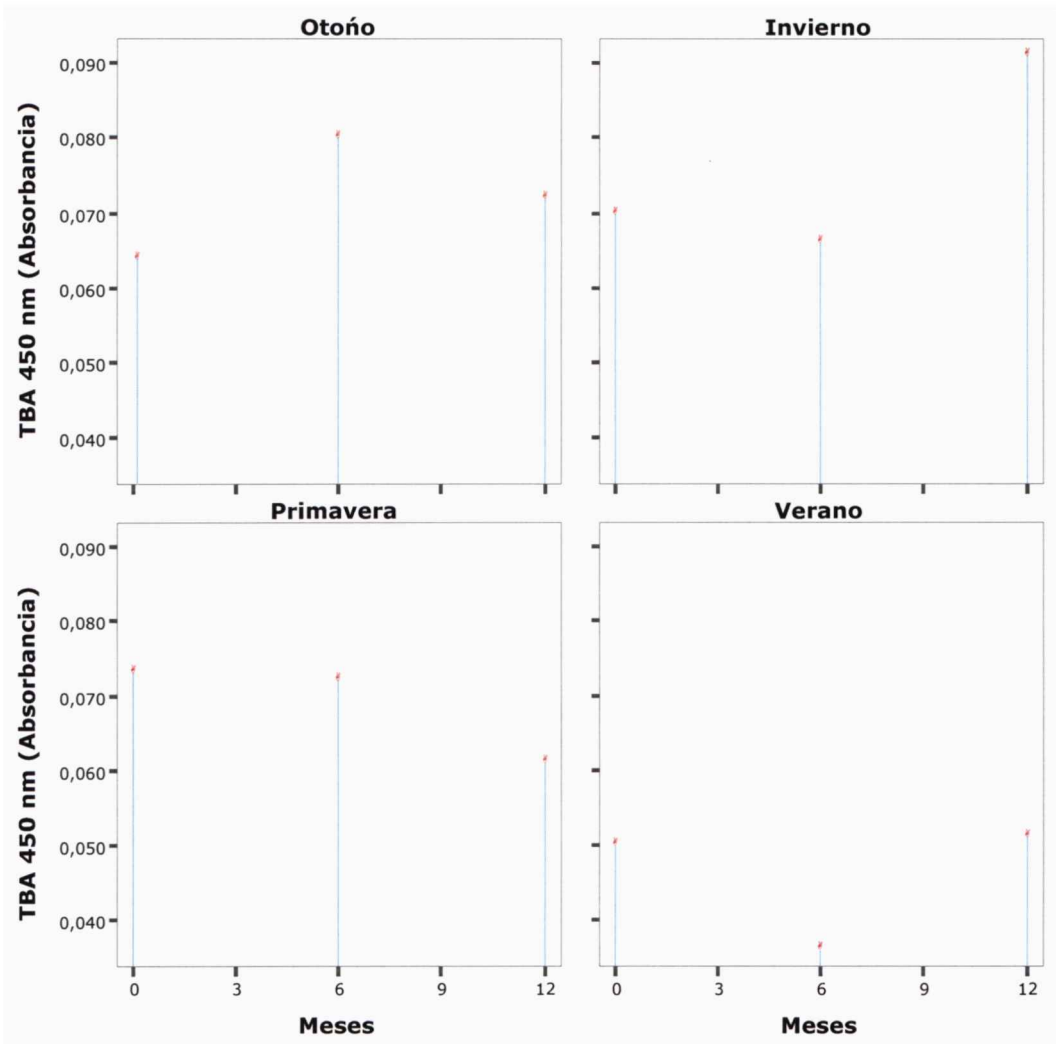


Figura 44: Valores de SRATB (unidades de absorbancia) a 450 nm de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenada a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

En relación al VP, en la **Figura 45** se observa que nunca se superó el nivel de 2 meqO₂/Kg grasa indicado por Sidwell y col. (1955) y Van Mils y col. (1991) como umbral de aparición de defectos oxidativos. Por otro lado, de acuerdo a los resultados de VP informados por Páez (2002) (sección **III.2.2.1.3.**) las muestras de leche en polvo citadas no deberían presentar cambios importantes desde el punto de vista sensorial.

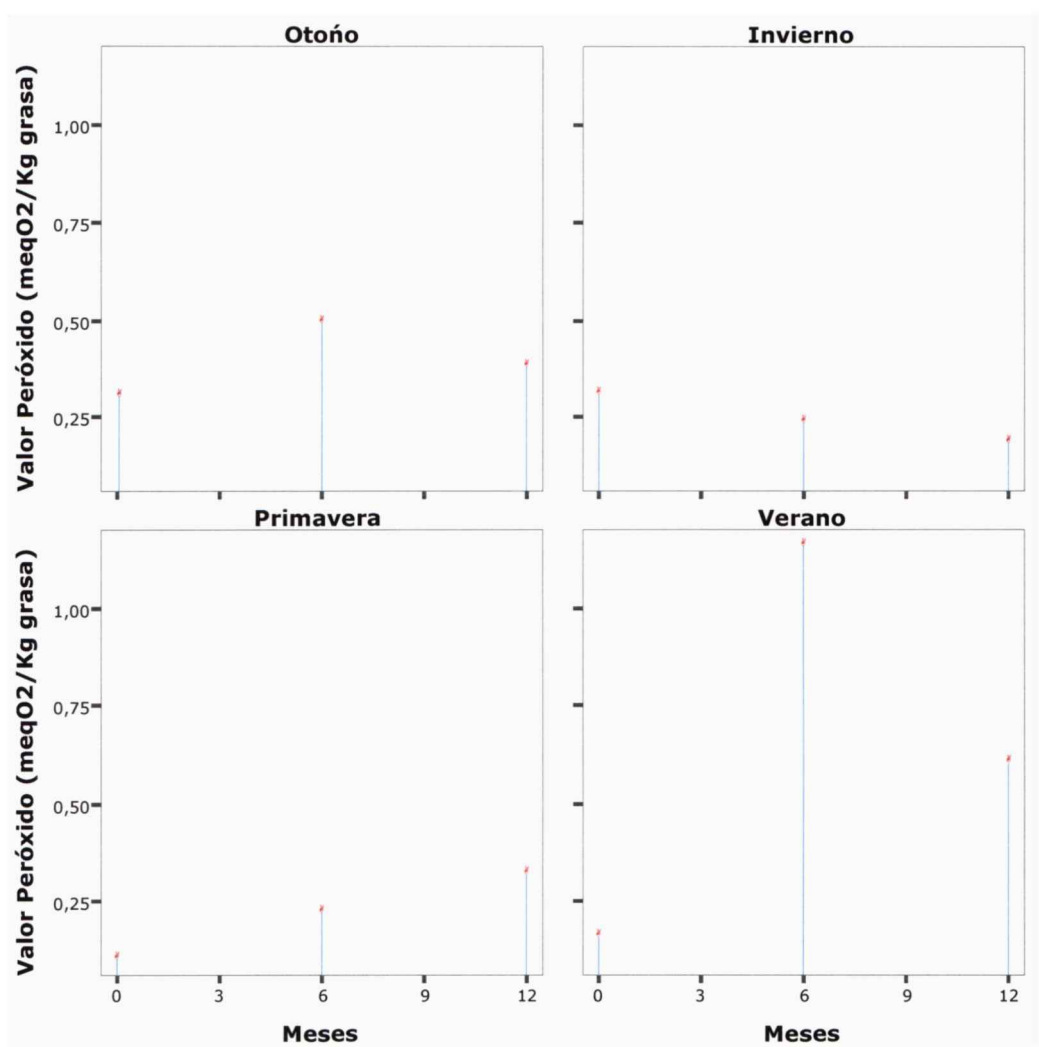


Figura 45: Valor peróxido (meqO₂/Kg grasa) de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenada a 20°C±0,5°C durante 12 meses.

Los resultados del panel de jueces entrenados mostraron la aparición del *flavor* oxidado hacia los 6 y 12 meses de almacenamiento para las muestras de LEP de otoño y verano.

En el caso de las muestras de verano los niveles de pentanal y hexanal (**Figuras 41 y 42**) a los 12 meses de almacenamiento superaron el nivel umbral de olor en leche informado por Day y col. (1963). Sin embargo, de acuerdo al umbral de 30 µgKg⁻¹ de hexanal informado por (Páez, 2002), las LEP de verano deberían haber presentado *flavor* oxidado ya a los 6 meses de almacenamiento. La diferencia en los umbrales dados por los diferentes autores puede ser el resultado de las distintas

preferencias que las personas de distintas partes de mundo tienen sobre un dado producto.

Por otro lado, la percepción del *flavor* oxidado de las muestras de otoño no tiene relación alguna a los umbrales de percepción de hexanal dados en bibliografía (Day y col., 1963) o aquel determinado por Páez (2002). Este resultado, podría explicarse teniendo en cuenta que estas LEP podrían tener otros compuestos producto de la oxidación lipídica no caracterizados en el presente que hayan provocado la detección del *flavor* oxidado en las muestras de otoño.

Al igual que para las LEP almacenadas en aire, grupos -SH reactivos (Celestino y col., 1997b; Singh y Newstead, 1998), como así también los productos de la reacción de Maillard (Singh y Newstead, 1998; Páez, 2002), formados durante la elaboración de la LEP y posterior almacenamiento podrían ser responsables de su estabilidad oxidativa.

Finalmente, un punto a destacar es que el contenido de cobre, importante pro-oxidante (Marsili, 2000), no fue detectado en ninguna de las LEP evaluadas.

III.2.2.2.4. Ácido butírico en leche entera en polvo envasada en atmósfera de N₂ y almacenada 12 meses

En la **Figura 46** se observa el nivel del ácido butírico para las LEP de las distintas estaciones. En la estación de otoño se observó un decrecimiento durante el período de almacenamiento, siendo estadísticamente significativa ($P < 0,05$). Por su parte, las estaciones de invierno, primavera y verano evidenciaron el mayor nivel de ácido butírico hacia el final del almacenamiento, el cual resultó estadísticamente diferente del nivel hallado al comienzo.

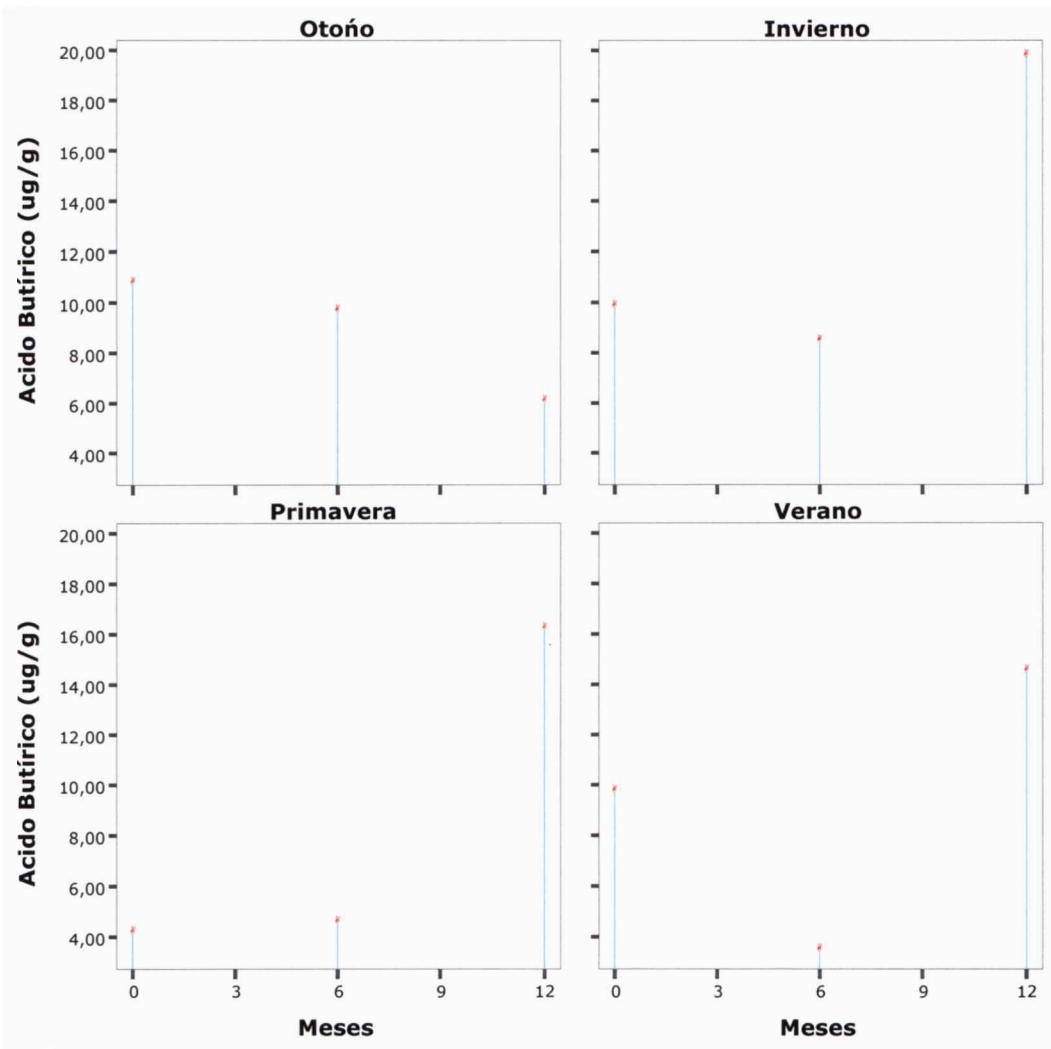


Figura 46. Contenido de ácido butírico ($\mu\text{g g}^{-1}$) en LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^\circ\text{C}\pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 12 meses.

Hay que destacar que los niveles obtenidos del citado compuesto, en todos los tiempos y para todas las estaciones, se encontraron por debajo del umbral de *flavor* del ácido butírico en leche de 25 mgKg^{-1} ó de $46,1 \text{ mgKg}^{-1}$ (Norma FIL-IDF N°265, 1991) y de $24,6 \text{ mgkg}^{-1}$ (Chen y col., 2003). Nuevamente, es importante recalcar que si el objetivo es conocer la aparición de defectos organolépticos en la leche, es necesario realizar una determinación precisa de los ácidos grasos libres, y en particular los de cadena corta (Norma FIL-IDF N°265, 1991). Por su parte, como ya fue señalado el recuento de bacterias psicrotóficas en la materia prima destinada a la elaboración de la LEP del TTD no superó el recuento de $2 \times 10^6 \text{ UFCml}^{-1}$

(Muir y col., 1978), asociado con la aparición de defectos en el *flavor*. Además, el contenido de humedad durante el almacenamiento de las LEP se halló por debajo del 3%, por lo que de acuerdo a Renner (1988) no deberíamos tener actividad enzimática. Sin embargo, el panel jueces entrenados percibió el *flavor* rancio hacia el final del almacenamiento de las LEP de la estación de otoño y de verano. Estos resultados podrían deberse a que algún otro ácido graso libre distinto a ácido butírico podría encontrarse en una concentración mayor a su nivel umbral de percepción y así otorgar el *flavor* rancio a las citadas LEP.

Finalmente, se presenta en la **Figura 47** un ACP de los componentes volátiles. Como se puede observar se obtuvo una sola componente que explico el 69,2% de la variabilidad total. Esta componente tiene una alta correlación positiva con el dimetil sulfuro ($r=0,850$), pentanal ($r=0,907$) y hexanal ($r=0,892$) y con el ácido butírico ($r= 0,653$). En dicha figura se observa que las LEP de verano son las que tienen mayor cantidad de todos los volátiles estudiados hacia el final del almacenamiento, seguido de las LEP de primavera e invierno.

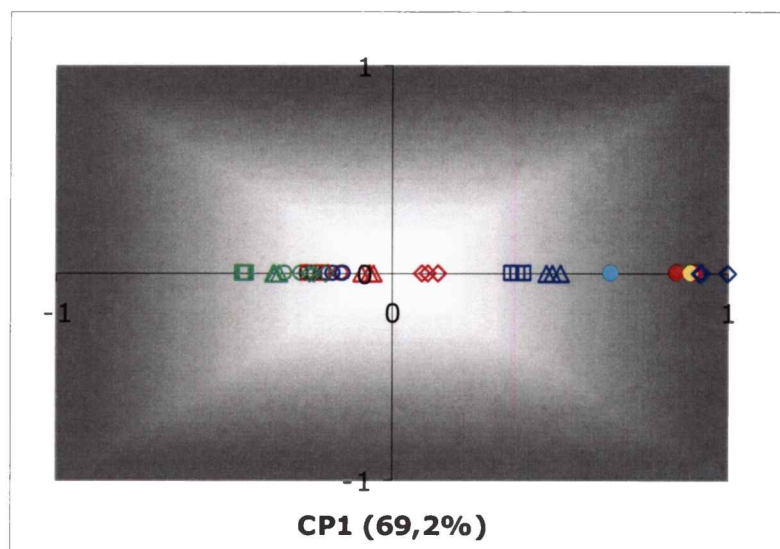


Figura 47. Análisis de componente principales, considerando el contenido de componentes volátiles, de LEP elaboradas aplicando el TTD, envasadas en atmósfera de N_2 y almacenadas a $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ durante 12 meses.

● Dimetil sulfuro ● Ácido Butírico ● Pentanal ● Hexanal ● Otoño-0 ● Otoño-6 ● Otoño-12
 ▲ Invierno-0 ▲ Invierno-6 ▲ Invierno-12 ■ Primavera-0 ■ Primavera-6 ■ Primavera-12 ◆
 Verano-0 ◆ Verano-6 ◆ Verano-12

La posibilidad de concretar un sueño
es lo que hace la vida interesante.

Paulo Coelho

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

IV.1. CONCLUSIONES PARTICULARES

Los resultados obtenidos permiten arribar a las siguientes conclusiones:

IV.1.1. COLOR EN LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA

- ✓ Se observó que el tipo de tratamiento térmico empleado durante la elaboración de la leche entera en polvo es determinante de los cambios de color ocurridos en las mismas como consecuencia del desarrollo de la reacción de Maillard, siendo el tratamiento térmico de menor temperatura-mayor tiempo (indirecto), el que produjo cambios más pronunciados en el color.
- ✓ Se detectó un efecto estacional sobre el color de la leche entera en polvo el cual podría deberse a las diferencias en la composición de la materia prima dadas por las diferencias fisiológicas y nutricionales de las vacas lecheras durante las distintas estaciones del año.
- ✓ Se obtuvieron funciones, que incluyeron variables fisicoquímicas sencillas de determinar a escala industrial, que permitieron clasificar la leche en polvo según su procedencia en relación al tratamiento térmico aplicado y en función de la estación de elaboración. Tales funciones incluyeron algunos parámetros de color y químicos sencillos de determinar a escala industrial.
- ✓ Se obtuvieron valores de ΔE^2 , que al comparar con valores de ΔE^2 umbrales citados en la bibliografía, mostraron que no es posible percibir visualmente los cambios de color ocurridos en las LEP del presente estudio.

IV.1.2. EVOLUCIÓN DEL COLOR EN LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

- ✓ Se evidenciaron cambios en los parámetros de color durante el almacenamiento de leche entera en polvo envasada en aire y atmósfera de N₂. Estos fueron más notables en determinadas estaciones del año como primavera y verano.
- ✓ Las LEP provenientes del TTD, envasadas en atmósfera de N₂ y almacenadas durante 12 meses parecieran no haber sufrido cambios sustanciales en el color, indicando que la combinación de un tratamiento térmico menos intenso y la atmósfera de N₂ habría contribuido a preservar las características del color de las LEP.
- ✓ Se obtuvieron valores de ΔE^2 , que de acuerdo a los valores umbrales citados en la bibliografía, no permitirían percibir visualmente los cambios de color ocurridos en las LEP del presente estudio durante el almacenamiento, a excepción de las LEP del TTD de verano.

IV.1.3. FLAVOR EN LECHE ENTERA EN POLVO RECIÉN ELABORADA

- ✓ Se observó un efecto significativo del tipo de tratamiento térmico empleado sobre el *flavor* de la LEP recién elaborada, afectando el nivel de componentes volátiles asociados a procesos de degradación de aminoácidos, degradación oxidativa y a la reacción de Maillard.
- ✓ Se evidenció un efecto estacional significativo sobre el *flavor* de la LEP recién elaborada. Dicho efecto se asoció a los diferentes programas de alimentación utilizados a lo largo del año en la cuenca lechera santafesina.
- ✓ Los niveles hallados de los distintos componentes estudiados si bien estuvieron afectados por el tipo de tratamiento térmico y por la estación de elaboración de la LEP, no superaron los niveles umbrales de percepción asociados a defectos en el *flavor*.
- ✓ Se observó que la nariz electrónica se puede emplear como una herramienta para registrar los cambios estacionales en el perfil de olor

en leche entera en polvo. La poca preparación de muestra que implica el análisis mediante NE, la facilidad de su manejo y su rapidez en la generación e interpretación de datos hacen de la NE una herramienta de potencial aplicación para el control de calidad en la industria alimentaria.

IV.1.4. EVOLUCIÓN DEL FLAVOR EN LECHE ENTERA EN POLVO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

- ✓ Se observaron variaciones de los componentes volátiles durante el almacenamiento de las LEP tanto en aquellas envasadas en aire como en atmósfera de N₂, especialmente en las estaciones de primavera y verano para algunos de los componentes estudiados.
- ✓ Los cambios observados en los niveles de los componentes estudiados, no resultaron en el desarrollo de *off-flavors* asociados a procesos de oxidación lipídica, lipólisis y reacción de Maillard.

IV.2. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados logrados en el presente trabajo muestran diferencias en la calidad organoléptica de la leche entera en polvo, producida en la cuenca lechera santafesina, medida en cambios del color y compuestos volátiles relevantes del *flavor* y perfil de olor mediante nariz electrónica. Tales diferencias responden a variaciones composicionales de la materia prima provocadas por los diferentes programas de alimentación empleados en las diferentes estaciones del año y a las condiciones comerciales de procesamiento y almacenamiento normalmente empleadas en la industria láctea Argentina. No obstante de las diferencias observadas en los parámetros de color y el perfil de olor, la calidad organoléptica no resultó afectada negativamente bajo las condiciones evaluadas.

Con relación al empleo de herramientas objetivas, rápidas, confiables y precisas para la medición del olor de productos alimenticios, la NE mostró ser una herramienta útil con potencial aplicación en la industria láctea para

el monitoreo en línea de productos lácteos. Sin embargo, es de destacar que para propósitos de investigación se consideró apropiado el uso complementario del método secuencial mediante análisis por CG-SPME y el método global directo mediante NE para monitorear los cambios estacionales en las características del olor en leche entera en polvo y así poder establecer las causas de tales cambios.

Sólo si alcanzas el límite, el límite retrocede ante ti.

Si no lo haces, si confinás tus esfuerzos,
la frontera se achicará para acomodarse a ellos.

Expandirás tus posibilidades si te extiendes
hasta el límite.

Hugh Nibley

PERSPECTIVAS EN EL MERCADO LÁCTEO

PERSPECTIVAS EN EL ÁREA DE LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS PARA EL SIGLO XXI

por Creamer y col., 2002

Mirando hacia atrás, los últimos 50 años de la ciencia y la tecnología de los productos lácteos fue una interesante experiencia ya que mucho de la ciencia y la tecnología básica que soportan las prácticas actuales se conocieron y se usaron al comienzo de aquella época.

En las diferentes áreas de productos lácteos, una gran parte del trabajo continuará en un esfuerzo por desarrollar productos con funcionalidad predecible e invariante, ej.: *flavor* y textura bajo condiciones particulares.

En relación al campo, hay algunos temas claves que dirigirán los cambios en la lechería en los próximos años, entre los que se mencionan:

- ✓ Manejo de la cría de ganado a través de la biotecnología.
- ✓ Mejoramiento continuo de la eficiencia en la producción para aumentar el valor de la leche.
- ✓ Evaluación de los costos potenciales de los gases emanados desde el tambo.
- ✓ Evaluación de los costos potenciales de los programas de control de erradicación de enfermedades del ganado.
- ✓ **Desarrollo de leches "funcionales".**

Desarrollo de leches "funcionales"

En la sociedad moderna el consumidor tiene el poder de conducir cambios.

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación generaron una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los *alimentos funcionales*.

Actualmente existen muchos *alimentos funcionales* en el mundo. Varias compañías multinacionales han lanzado al mercado diferentes tipos de *alimentos funcionales* tales como cereales para desayuno, margarinas, yogures y leches fermentadas, quesos, huevos, jugos de frutas, aguas fortificadas entre otros productos.

Las *Leches funcionales* disponibles hoy en el mercado incluyen leches específicas de cria, tales como el nicho de productos lácteos de Jersey y Guernsey, "Gold Top" y "Fountains Gold", vendidos en Gran Bretaña; leches hiperinmunes tales como "Stoillat" vendida por la producción lechera de Nueva Zelanda (siglas en inglés: NZMP), las cuales confieren una inmunidad pasiva contra las infecciones de intestino, leche con alto contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) para quesos tales como los vendidos en el norte de los Estados Unidos, llamada "leche A₂", la cual se sostiene que tiene efectos benéficos en relación a la diabetes y las enfermedades coronarias (Hill y Boland, 2001).

Hay un interés creciente en el uso de *probióticos* y *prebióticos* en leche y productos lácteos. Los *probióticos* son organismo vivos que, luego de su ingestión en suficiente cantidad, ejercen efectos benéficos para la salud más allá de los nutricionales básicos. Entre los beneficios, comprobados por la investigación, hacia la salud se encuentran:

- ✓ Mejoramiento de la capacidad inmunológica.
- ✓ Disminución de la diarrea.
- ✓ Mejoramiento de la utilización de la lactosa.

Los *prebióticos* son ingredientes alimentarios no digeribles que incluyen a los oligosacáridos y a la fibra dietaria, los cuales pueden modificar la flora intestinal a favor de la salud promoviendo el crecimiento de bacterias saludables para el organismo (Boland y col., 2001).

Por algún tiempo se contempló el uso de la genética para la producción de leches con determinadas características funcionales. Sin embargo, es poco probable que en un futuro predecible tenga lugar la modificación transgénica de la leche con propósitos funcionales y nutricionales. Hay varias razones que explican este hecho:

- ✓ La leche es un producto animal y fuertemente orientado a la salud de bebés y adolescentes. En una investigación de mercado esto se identificó como un área sensible comparada con la aceptabilidad de los alimentos genéticamente modificados (GM) del área de frutas y vegetales. La leche será probablemente uno de los últimos alimentos en el cual se acepte la modificación genética.
- ✓ El costo de producción en la obtención de ganado de vacas GM sería muy alto y el progreso muy lento a menos que se utilicen los métodos de clonación y transferencia de embriones.
- ✓ Un cambio en la modificación genética limitará severamente la ganancia genética, ya que el "pool" genético estará restringido a las genéticas de los animales que donan para los padres originales GM. Esta segregación del "pool" genético bovino global limitará severamente la participación en el mejoramiento genético de las especies, el cual corrientemente es de aproximadamente un 2% por año.
- ✓ La modificación para obtener leche más adecuada para un producto específico es poco probable que sea benéfico para todos los otros productos lácteos.

HACIA DONDE SE DIRIGE EL MERCADO LÁCTEO ARGENTINO EN RELACIÓN AL DESARROLLO DE LECHES FUNCIONALES

En Argentina, las compañías del rubro lácteo están retomando el ritmo de lanzamientos que tenían antes de la devaluación y uno de los mayores campos de batalla es el negocio de las llamadas *leches funcionales*, es decir, productos que fueron concebidos para cumplir con una función específica desde un punto de vista de la salud. El mercado de las *leches funcionales* en la Argentina se calcula en 30 millones de litros anuales, lo que representa cerca de \$ 50 millones. Las distintas líneas de productos incluyen leches fortificadas y recientemente una nueva línea de leche con alto contenido de CLA. Sin embargo, en Argentina, las *leches*

funcionales están lejos de convertirse en un producto masivo. Debido a que su precio promedio es muy superior al de las líneas más básicas, se concentra en la franja norte de la Capital Federal y el Gran Buenos Aires más de la mitad de las ventas. A nivel local, el producto con mayor aceptación es la leche fortificada con hierro, que representa dos tercios de las ventas de la categoría. A pesar de ello, existe en la población la preocupación por la salud y el bienestar, así como por el consumo de alimentos más nutritivos y benéficos. De esta manera, el mercado de los *alimentos funcionales* en general y *leches funcionales* en particular se encuentra en expansión y existen múltiples posibilidades para el desarrollo de diferentes productos dirigidos a todos los sectores de consumidores.

Recientemente una red de centros de investigación del país conformados por diferentes unidades del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), la Facultad de Ingeniería Química perteneciente a la Universidad Nacional del Litoral y el Centro de Investigación Y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata, presentaron, ante la Secretaria de Ciencia y Tecnología (SECYT), en el marco de la convocatoria PAV-INTA 2004 un proyecto orientado al desarrollo de un producto lácteo probiótico. La propuesta involucra la obtención de leche enriquecida naturalmente en vitaminas antioxidantes y ácidos grasos omega-3 y CLA a través de la alimentación de vacas lecheras con pastura de alfalfa de alta calidad para la elaboración de un alimento funcional lácteo, consistente en leche en polvo con el agregado de bacterias probióticas microencapsuladas, que resulte resistente y sensorialmente estable a las condiciones de almacenamiento no refrigerado. Esta última característica, elemento diferenciador de otros alimentos lácteos probióticos presentes en el mercado, facilitará su distribución y comercialización.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,
la electricidad y la energía atómica:

LA VOLUNTAD

Albert Einstein

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adda, J. Flavour in dairy products. In *Development in Food Flavour*; Birch, G.G., Lindley, M.G., Eds.; Elsevier Applied Science: London, **1986**; pp 151-172.
- ADMI. Bulletin 916 Standards for grades of dry milk including methods of analysis. American Dry Milk Institute, Chicago, Illinois, **1971**.
- Alimentos de Santa Fe (Cadenas Agroalimentarias), Lácteos, **2005**. Ministerio de la Producción, Secretaria de Agricultura, Ganadería y Recursos Naturales, Subsecretaria de Producción Agroalimentaria, Alimentación. <http://www.santafe.gov.ar>
- Allen, J. C. y Hamilton, R. J. "Rancidity in dairy Products" In *Rancidity in Foods*; Allen, J. C. y Hamilton, R. J., Eds.; Chapman & Hall, **1994**; pp 179-190.
- Ames, J. M. Control of the Maillard reaction in food systems. *Trends in Food Science and Technology* **1990**, 1, 150-154.
- Ames, J. M.; Apriyantono, A.; Arnoldi, A. Low molecular weight coloured compounds formed in xylose-lysine model systems. *Food Chemistry* **1993**, 46, 121-127.
- Ampuero, S.; Bosset, J. O. The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B* **2003**, 94, 1-12.
- Andersson, K. "Influence of reduced oxygen concentrations on lipid oxidation in food during storage" SIK Report **1998**. Nº 636.
- Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **1990**, 62, 2145-2148.
- Ashoor, S. H.; Zent, J. B. The Maillard browning of common amino acids and sugars. *Journal of Food Science* **1984**, 49, 1206-1207.
- Badings, H. T. Milk. In *Volatile Compounds in Food and Beverages*; Maarse, H., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1991**; pp 91-106.
- Baltes, W.; Kurnet-Kirchoff, J.; Reese, G. Model reactions on generation of thermal aroma compounds. In *Thermal generation of aromas*; Parlamient T. H., McGorin, R. J., Ho, C. T., Eds.; **1989**; pp 143-155.

- Barrefors, P.; Granelli, K.; Appelqvist, L. A.; Bjoerck, L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavor. *Journal of Dairy Science* **1995**, *78*, 2691-2699.
- Bedinghaus, A. J.; Ockerman, H. W. Antioxidative Maillard reaction products from reducing sugars and free amino acids in cooked ground pork patties. *Journal of Food Science* **1995**, *60*, 992-995.
- Bemelmans, J. M. H. Review of isolation and concentration techniques. In *Progress in Flavour Research*; Land, D. G., Nursten, H. E., Eds.; Applied Science Publications: London, **1979**; pp 79-98.
- BeMiller, J. N.; Whistler, R. L. Carbohydrates. In *Food Chemistry*; Fennema, R.O., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1996**; pp 157-223.
- Benkler, K. F.; Reineccius, G. A. Flavor isolation from fatty foods via solvent extraction and membrane dialysis. *Journal of Food Science* **1980**, *45*, 1084-1085.
- Berset, C.; Cuvellier, M. E. Methodes d'évaluation du degre d'oxydation des lipids et de mesure du pouvoir antioxydant. *Sciences des Aliments* **1996**, *16*, 219-245.
- Beutling, D. Biogene amine in der ERNÄHRUNG. *Archiv Lebensmittel Hygiene*, **1996**, *47*, 81-104.
- Billmeyer, F. W.; Saltzman, M. Principles of color technology. John Wiley & Sons: New York, **1981**.
- Boland, M.; MacGibbon, A.; Hill, J. P. Designer milks for the new millennium. *Livestock Production Science* **2001**, *72*, 99-109.
- Boon, P. M.; Keen, A. R.; Walker, N. J. Off-flavour in stored whole milk powder. II. Separation and identification of individual monocarbonyl components. *N.Z. Journal of Dairy Science Technology* **1976**, *11*, 189-195.
- Börjesson, T.; Eklöv, T.; Johnsson, A.; Sundgren, E.; Schnürer, J. Electronic nose for odour classification of grains. *Cereal Chemistry* **1996**, *73*, 457-461.

- Bosset, J. O.; Lavanchy, P. Flavour research by the Swiss Federal Dairy Research Institute (FAM): retrospective, trends, and future prospects. *Lebensmittel-Technologie* **1991**, 24, 190-202.
- Bosset, J. O.; Bühler-Moor, U.; Eberhard, P.; Gauch, R.; Lavanchy, P.; Sieber, S. Dimethylsulfid-und Dimethyldisulfidgehalt sowie Aroma als Indikatoren für die thermische Behandlung von Milch. *Schweizerische Milchwirtschaft Forschung* **1994**, 23, 67-71.
- Braggins, T. J.; Frost, D. A. The effect of extended chilled storage in CO₂ atmosphere on the odour and flavour of sheepmeat as assessed by sensory panel and an electronic nose. In *Proceedings of 43th international congress of meat science and technology*, Auckland, New Zealand, **1997**, pp 198-199.
- Brudzewski, K.; Osowsky, S.; Markiewicz, T. Classification of milk by means of an electronic nose and SVM neural network. *Sensors and Actuators B* **2004**, 98, 291-298.
- Buera, M. P.; Chirife, J.; Resnik, S. L.; Wetzler, G. Nonenzymic browning in liquid model systems of high water activity: kinetics of colour changes due to Maillard reaction between different single sugars. *Journal of Food Science* **1987**, 52, 1063-1067.
- Bugaud, C.; Buchin, S.; Coulon, J. B.; Hauwuy, A.; Dupont, D. Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid, and volatile compound composition of milk. *Le Lait* **2001**, 81, 401-414.
- Burton, H. Reviews of the progress of dairy science. The bacteriological, chemical, biochemical, and physical changes that can occur in milk at temperatures of 100-150°C. *Journal of Dairy Research* **1984**, 51, 341-363.
- Buttery, B. G.; Siefert, B. M.; Guadagni, D. C.; Ling, L. C. Characterization of additional volatile components of tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1971**, 19, 524-529.
- Buttery, B. G.; Turnbaugh, J. G.; Ling, L. C. Contribution of volatile to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1988**, 36, 1006-1009.

- Calvo, M. M.; de la Hoz, L. Flavour of heated milks: a review. *International Dairy Journal* **1992**, 2, 69-81.
- Careri, M.; Manini, P.; Spagnoli, S.; Barbieri, G.; Bolzoni, L. Simultaneous distillation-extraction and dynamic headspace methods in the gas chromatographic analysis of Parmesan cheese volatiles. *Chromatographia* **1994**, 38, 386-394.
- Carpenter, K. J.; Booth, V. H. Damage to lysine in food processing: its measurement and its significance. *Nutrition Abstracts Review* **1973**, 43, 423-451.
- Castillo, A. La calidad composicional. Sincronización, balance y diagnóstico de dietas en vacas lecheras. En *Manual de referencia para el logro de leche de calidad*; Taverna, M. A.; Calvino, L.; Páez, R.; Chávez, M.; Charlón, V.; Vanzini, V.; Abdala, A.; Castillo, A.; Cuatrín, A., Gallardo, M., Editado por EEA INTA Rafaela, **2002**; pp 117-123.
- Celestino, E. L.; Iyer, M.; Roginski, H. The effects of refrigerated storage of raw milk on the quality of whole milk powder stored for different periods. *International Dairy Journal* **1997a**, 7, 119-127.
- Celestino, E. L.; Iyer, M.; Roginski, H. Reconstituted UHT-treated milk: effects of raw milk, powder quality and storage conditions of UHT milk on its physico-chemical attributes and flavor. *International Dairy Journal* **1997b**, 7, 129-140.
- Chen, L.; Daniel, R. M.; Coolbear, T. Detection and impact of proteasa and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* **2003**, 13, 255-275.
- Chialva, F.; Gabri, G.; Liddle, P. A. P.; Ulian, F. Quality evaluation of odourtic herbs by direct headspace GC analysis. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1982**, 5, 182-185.
- Chilliard, Y.; Bauchart, D.; Cartier, P.; Chazal, M. P. Etalonnage, compararison et automatisaion de differentes methods de dosage des acides gras libres du lait de vache. Doc No 84031-INRA THEIX, **1983**.

- Christian, M. P.; Grainger, C.; Sutherland, B. J.; Mayes, J. J.; Hannah, M. C.; Kefford, B. Managing diet quality for Cheddar cheese manufacturing milk. Part 1. The influence of protein and energy supplements. *Journal of Dairy Research* **1999**, 66, 341-355.
- Claassen, M.; Lawless, H. T. Comparison of descriptive terminology systems for sensory evaluation of fluid milk. *Journal of Food Science* **1992**, 57, 596-600, 621.
- Código Alimentario Argentino, Capítulo VIII, Alimentos Lácteos, RES GMC N° 082/93, Julio 2002, <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>
- Cogan, T. M. Heat resistant lipases and proteinases and the quality of dairy products. *M. F. Bulletin Doc.* **1980**, 118, 26-32
- Collomb, M.; Spahni, M. Revue des methods de dosage des acides gras libres dans le lait et les produits laitiers. *Lebensm. Wiss u technologie* **1995**, 28, 355-379.
- Coulon, J. B.; Priolo, A. Influence of forage feeding on the composition and organoleptic properties of meat and dairy products: bases for a "terroir" effect. In *Proceeding of the XIX European Grassland Federation*, La Rochelle, France, **2002**; pp 513-524.
- Creamer, L. K.; Pearce, L. E.; Hill, J. P.; Boland, M. J. Milk and dairy products in the 21st century. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 7187-7193.
- Cronin, D. A. Techniques of analysis of flavours. In *Food Flavours. Part A. Introduction*; Morton, I. D.; MacLeod, A. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1982**; pp 15-48.
- Darby, M. R.; Karni, E. Free competition and the optimal amount of fraud. *Journal of Law and Economics* **1973**, 16, 67-88.
- Davies, C. G. A.; Wedzicha, B. L. Kinetics of the inhibition of ascorbic acid browning by sulphite. *Food Additives and Contaminants* **1992**, 9, 471-477.
- Davies, C. G. A.; Labuza, T. P. The Maillard reaction application to confectionary products. Department of Food Science and Nutrition, University of

Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108, **2005**.
http://faculty.che.umn.edu/fscn/Ted_Labuza/cv/tplcv.htm

Day, E. A.; Lillard, D. A.; Montgomery, M. W. Autoxidation of milk lipids. III. Effect on flavor of the additive interactions of carbonyl compounds at subthreshold concentrations. *Journal of Dairy Science* **1963**, 46, 191-194.

De Block, J.; Merchiers, M.; Van Renterghem, R. Capillary electrophoresis of the whey protein fraction of milk powders. A possible method for monitoring storage conditions. *International Dairy Journal* **1998**, 8, 787-792.

Deeth, H. C.; Fitz Gerald, C. H. A convenient method for determining the extent of lipolysis in milk. *Australian Journal of Dairy Technology* **1975**, 30, 109-111.

Deeth, H. C.; Fitz Gerald, C. H.; Snow, J. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* **1983**, 18, 13-20.

Deeth, H. C.; Gerald, C. H. Lipolytic Enzymes and hidrolytic rancidity in milk and milk products. In *Advanced Dairy Chemistry Vol II*; Fox, P. F., Ed.; **1994**; pp 247 – 308.

De Roos, K. B. How lipids influence food flavor. *Food Technology* **1997**, 51, 60-62.

Descalzo, A. M.; Insani, E. M.; Biolatto, A.; Sancho, A. M.; García, P. T.; Pensel, N. A.; Josifovich, J. A. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science* **2005**, 70, 35-44.

Dumont, J. P.; Adda, J. Flavour formation in dairy products. In *Progress in flavour research*; Land, D. G.; Nursten, H. E., Eds.; Applied Science: London, **1979**; pp 245-262.

Eichner, K.; Karel, M. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1972**, 20, 218-223.

Eichner, K.; Wolf, W. Maillard reaction products as indicator compounds for optimizing drying and storage conditions. In *The Maillard reaction in Foods*

and Nutrition, Waller, G. R., Feather, M. S., Eds.; ACS Symposium Series 215; American Chemical Society: Washintong, DC, **1983**; pp 317-333.

Eisert, R.; Levsen, K. Solid - phase microextraction coupled to gas chromatography A new method for the analysis of organics in water. *Journal of Chromatography A* **1996**, 733, 143-157.

Evans, E. W. Instrumental and analytical assessment of flavour. *Journal of the Society of Dairy Technology* **1972**, 25, 125-135.

Federación Internacional de Lechería —FIL—, 1996, Leche en Polvo, <http://www.laserenisima.com.ar>

Fenaille, F.; Visani, P.; Fumeaux, R.; Milo, C.; Guy, P. A. Comparison of mass spectrometry-based electronic nose and solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry technique to assess infant formula oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 2790-2796.

Ferraro, D. G. Nivel de ácidos grasos libres en leche no elaborada. Lipólisis y calidad de leche. Programa de Promoción de Calidad de Leche. P.P.C.L. La Serenísima, Mastellone Hnos. S.A. (2004). <http://www.laserenisima.com.ar>

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, F. Revisión: Indicadores del deterioro de la calidad proteica y valor nutritivo de la leche. *Food Science and Technology International* **1999**, 5, 447-461.

Finot, P. A., Deutsch, R., Bujard, E. The extent of the Maillard reaction during the processing of milk. *Progress in Food and Nutrition Science* **1981**, 5, 345-355.

Fisher, N.; Widder, S. How protein influence food flavor. *Food Technology* **1997**, 51, 68-70.

Focant, M.; Mignolet, E.; Marique, M.; Clabots, F.; Breyne, T.; Dalemans, D.; Larondelle, Y. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapessed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science* **1998**, 81, 1095-1101.

- Fox, M.; Loncin, M.; Weiss, M. Investigations into the influence of water activity, pH and heat treatment on the velocity of the Maillard reaction in foods. *Journal of Food Quality* **1983**, 6, 103-118.
- Francis, F. J. Quality as influenced by color. *Food Quality and Preference* **1995**, 6, 149-155.
- Franzen, K.; Singh, R. K.; Okos, M. R. Kinetics of nonenzymic browning in dried skim milk. *Journal of Food Engineering* **1990**, 11, 225-239.
- Gallardo, A. La calidad composicional. Pautas de manejo de vacas lecheras en pastoreo. En *Manual de referencia para el logro de leche de calidad*; Taverna, M. A.; Calvinho, L.; Páez, R.; Chávez, M.; Charlón, V.; Vanzini, V.; Abdala, A.; Castillo, A.; Cuatrín, A., Gallardo, M., Editado por EEA INTA Rafaela, **2002**; pp 125-133.
- García, P. T.; Pensel, N. A.; Margaría, C. A.; Olga Rosso, C. M.; Machado, C. Intramuscular fat, cholesterol, and 18:2 *n*-6/18:3 *n*-3 ratio in total lipids in two frame steers under different dietary regimen. In *Proceeding of the 45th international congress of meat science and technology*; Yokohama, Japan, **1999**; pp 76-77.
- Gatellier, P.; Mercier, Y.; Renerre, M. Effect of diet finishing mode (pasture or mixed diet) on antioxidative status of Charolais bovine meat. *Meat Science* **2004**, 67, 385-394.
- Giese, J. Measuring physical proprieties of food. *Food Technology* **1995**, 49, 54-63.
- Gilabert, E. J. Medida del color. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia. Servicio de Publicaciones, SPUPV-92684, **1992**.
- Godshall, M. A. How carbohydrates influence food flavor. *Food Technology* **1997**, 51, 63-67.
- Granelli, K.; Barrefors, P.; Bjoerck, L.; Appelqvist, L. A. Futher studies on lipid composition of bovine milk in relation to spontaneous oxidized flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 77, 161-171.

- Gregory III, J. F. Vitamins. In *Food Chemistry*; Fennema, R. O., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1996**; pp 531-616.
- Grigioni, G.; Margaría, C.; Pensel, N. A.; Sánchez, G.; Vaudagna, S. Warmed-over flavour analysis in low temperature-long time processed meat by an "electronic nose". *Meat Science* **2000**, *56*, 221-228.
- Grigioni, G.; Carduza, F.; Irurueta, M.; Pensel, N. Flavour characteristics of Ilex paraguariensis infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2004**, *84*, 427-432.
- Grimm, C. C.; Lloyds, S. W.; Miller, J. A.; Spanier A. M. The analysis of food volatiles using direct thermal desorption. In *Techniques for Analyzing Food Aroma*; Marsili, R. Ed.; Marcel Dekker: New York, **1997**; pp 59-79.
- Grummer, R. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* **1991**, *74*, 3244-3257.
- Grunert, K.G. Current issues in the understanding of the consumer choice. Trends in *Food Science & Technology* **2002**, *13*, 275-285.
- Grunert, K. G.; Bredahl, L.; Brunsø, K. Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector-a review. *Meat Science* **2004**, *66*, 259-272.
- Guadagni, G.; Buttery, R. G.; Okano, S. Odour thresholds of the some organic compounds associated with food flavors. *Journal of de Science Agricultural and Food Chemistry* **1963**, *14*, 761-765.
- Guirao, M. El sistema visual. En *Los sentidos. Bases de la percepción*; Guirao, M., Ed.; Alambra Universidad, **1980**; pp 235-280.
- Hall, G.; Andersson J. Flavor changes in whole milk powder during storage. III Relationships between flavor properties and volatile compounds. *Journal of Food Quality* **1985**, *7*, 237-253.
- Hall, G.; Andersson J.; Lignert, H.; Olofsson, B. Flavor changes in whole milk powder during storage. II The kinetics of the formation of volatile fat

oxidation products and other volatile compounds. *Journal of Food Quality* **1985**, 7, 153-190.

Hansen, A. P.; Hemphill, P. L. Utilization of heat to increase shelf life of blended acid whey and buttermilk powder for frozen desserts. *Journal of Dairy Science* **1984**, 67, 54-56.

Hammond, E. G. The flavors of dairy products. In *Flavor Chemistry of Lipid Food*; Min, D. B., Smouse, T. H., Eds.; Champaign IL: American Oil Chemists' Society, **1989**; pp 222-236.

Harmon, A. D. Solid - phase microextraction for the analysis of flavors. *Food Science Technology* **1997**, 79, 81-112.

Harper, W. J.; Hall, C. W. Organoleptic properties of dairy products. In *Dairy Technology and Engineering*; Harper, W. J., Hall, C. W., Eds.; AVI Pub, Westport, CN, **1976**; pp 75-140.

Hawthorne, S. B.; Miller, D. J. Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused silica fibers. *Journal of Chromatography A* **1992**, 603, 185-191.

Heredia, F. J.; Cameán, A. M.; Guzmán, M. Utilidad de los parámetros cromáticos en la evaluación de la calidad de vinos tintos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **1986**, 26, 477-481.

Hermosin, I.; Ledl, F.; Gomez-Sanchez A. Influence of oxidized lipids on the nonenzymic browning reaction: interaction between linolenic acid and an Amadori compound. *Chemical Physics of Lipids* **1992**, 63, 265-270.

Hill, J. P.; Boland, M. J. Milk protein variants-relationship with health and disease. *Australian Journal of Dairy Technology* **2001**, 56, 117-122.

Hodge, J. E. Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1953**, 1, 927-943.

Hough, G.; Martínez, E.; Barbieri, T. Sensory thresholds of flavor defects in reconstituted whole milk powders. *Journal of Dairy Science* **1992**, 75, 2370-2374

- Hoyland, D.; Taylor, A. J. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chemistry* **1991**, 40, 271-291.
- Hudon G.; Guy C.; Hermia J. Measurement of odor intensity by an electronic nose. *Journal of the Air & Waste Management Association* **2000**, 50, 1750-1758.
- Hutchings, J. B. Chemistry of food colour. In *Food colour and appearance*; Hutchings, J. B, ed.; Aspen publication: Maryland, **1999**; pp 368-469.
- <http://www.leffingwell.com/odorback.htm>, Odor Detection Thresholds 2005.
- Imhof, R.; Bosset, J. O. Relationship between microorganisms and formation of aroma compounds in fermented dairy products (review). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* **1994**, 198, 267-276.
- Jacobson, M. Physical and chemical test of food quality. In *Food Theory and Applications*; Paul, P.C.; Palmer, H.H., Eds.; Jhon Wiley & Sons: New York, **1972**.
- Jennings, W. G.; Filsoof, M.; Comparison of sample preparation techniques for gas chromatographic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1977**, 25, 440-445.
- Jennings, W. G.; Rapp, A. Sample preparation for gas chromatographic analysis; Bersch W.; Jennings, W. G., Kaiser, R.E., Eds.; A Hutig Verlag, Heidelberg, **1983**; 1-104.
- Jensen, C.; Lauridsen, C.; Bertelsen, G. Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science and Technology* **1998**, 9, 62-72.
- Jung, S.; Ghoul, M.; de Lamballerie-Anton, M. Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **2003**, 36, 625-631.
- Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn J. Applications of Solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* **2000**, 880, 35-62.

- Keeney, M.; Bassette, R. Detection of intermediate compounds in the early stage of browning reaction in the Whole milk products. *Journal of Dairy Science* **1959**, *42*, 945-961.
- Kessler y Fink. Changes in heated and storage milk with an interpretation by reaction kinetics. *Journal of Food Science* **1986**, *51*, 1105-1155.
- Kim, H.; Hardy, J.; Novak, G.; Ramet, J. P.; Weber, F. Off-tastes in raw and reconstituted milk. *FAO Animal Production and Health*, **2004**; paper 35, <http://www.fao.org>
- King, R. L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I. Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. *Journal of Dairy Science* **1962**, *45*, 1165-1171.
- King, B. M.; Duineveld, C. A. A. Factors affecting the perception of naturalness and flavor strength in citrus drinks. In *Olfaction and Taste XII*; Murphy, C., Ed.; New York Academy of Sciences: New York, **1997**; pp 847-853.
- Kirton, A. H.; Crane, B.; Paterson, D. J.; Clare, N. T. Yellow fat in lambs caused by carotenoids pigmentation. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **1975**, *18*, 267-272.
- Klein, B.; Gauch, R.; Bosset, J. O. Comparison of four extraction, concentration and injection techniques for volatile compounds analysis by GC-MS: an application to the study of the volatile flavour of Swiss Emmentaler cheese. In *Flavour Science and Technology*; Bessiere, Y., Thomas, A. F., Eds.; John Wiley and Sons: Chichester, **1990**; 205-208.
- Kneifel, W.; Ulberth, F.; Schaffer, E. Tristimulus colour reflectance measurement of milk and dairy products. *Lait* **1992**, *72*, 383-391.
- Knight, T. W.; Death, A. F. Effect of oral and injected vitamin A (retinal) supplements on liver vitamin A and plasma carotenoids and cholesterol concentrations in cattle. *Animal Science* **1999**, *69*, 607-612.
- Kristensen, D.; Hansen, E.; Arndal, A.; Trinderup, R. A.; Skibsted, L. H. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *International Dairy Journal* **2001**, *11*, 837-843.

- Kruggel, W. G.; Field, R. A.; Miller, G. J.; Horton, K. M.; Busboom, J. R. Influence of sex and diet on lutein in lamb fat. *Journal of Animal Science* **1982**, *54*, 970-975.
- Kubleka, P.; Munk, F. Ein Beitrag zur optic der farbanstriche. z. tech. *Physica* **1931**, *12*, 593-601.
- Kudo, N.; Hols, G.; van Mil, P. J. J. M. The insolubility index of moist skim milk powder: Influence of the temperature of the secondary drying air. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **1990**, *44*, 89-98.
- Kwok, K. C.; MacDougall, D. B.; Niranjan, K. Reaction kinetics of heat-induced colour in soymilk. *Journal of Food Engineering* **1999**, *40*, 15-20.
- Labuza, T. P. Kinectics of lipid oxidation in foods. Critical Review. *Journal of Food Science* **1971**, *2*, 355-404.
- Labuza, T. P. A theorical comparison of loss in food under fluctuating temperature sequences. *Journal of Food Science* **1979**, *44*, 1162-1168.
- Lacrampe, J. L.; Dherbomez, M.; Weber, F. Problèmes d'extraction et d'analyse de certains composes aromatiques des produits laitiers. I. Techniques de concentration et d'extraction. *Lait* **1975**, *55*, 517-529.
- Lane, G. A.; Frase, K.; Kolver, E. S.; Rowan, D. D.; Allen, J. M.; Mills, O. E.; Abraham, A. S.; Olney, S. D. Effect of a total mixed ration diet on the concentration of amino acid-derived volatiles in milk. In *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* **2002**, *62*, pp 242-245.
- Larick, D. K.; Turner, B. E. Influence of finishing diet on the phospholipid composition and fatty acid profile of individual phospholipids in lean muscle of beef cattle. *Journal of Animal Science* **1989**, *67*, 2282-2293.
- Lee, M. S.; Nagy, S. Quality Changes and Nonenzymic Browning Intermediates in Grapafuit Juice During Storage. *Journal of Food Science* **1983**, *53*, 168-176.
- Lingnert, H. Antioxidative Maillard reaction products – III. Applications in cookies. *Journal of Food Processing and Preservation* **1980**, *4*, 219-233.

- Louter, A. J. H.; Vreuls, J. J.; Brinkman, U. A. Th. On-line combination of aqueous-sample preparation and capillary gas chromatography. Review Article. *Journal of Chromatography A* **1999**, 842, 391-426.
- Lorraine, H. H. Detectors and data handling. In *Modern practice of gas chromatography*; Grob, R. L., Ed.; John Wiley & Sons: New York, **1995**; pp 265-321.
- Lozano, R. D. El color y su medición. En *La medición psicofísica del color*; Américalee S.R.L., Ed.; **1978**; pp 187-204.
- Maarse, H.; Belz, R. Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research. In *Handbuch der Aromaforschung* Rothe, M., Ed.; Akademie Verlag, Berlin, **1981**; 1-290.
- Mabon, J. T. Color measurements of food. *Cereal Foods World* **1993**, 38, 21-25.
- Majors, R. E. An overview of sample preparation. "In Sample preparation Perspective". *Liquid Chromatography-Gas Chromatography* **1991**, 9, 16-18, 20.
- Majors, R. E. Trends in sample preparation. "In Sample preparation Perspective". *Liquid Chromatography-Gas Chromatography* **1992**, 10, 912-914, 916, 918.
- Manning, D. J.; Price, J.C. Instrumental methods in determining flavour. *Journal of the Society of Dairy Technology* **1983**, 36, 33-35.
- Mariaca, R.; Bosset, J. O. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait* **1997**, 77, 13-40.
- Marsili, R. T.; Miller, N.; Kilmer, G. J.; Simmons, R. E. Identification and quantification of the primary chemicals responsible for the characteristic malodour of beet sugar by purge and trap GC-MS-OD techniques. *Journal of Chromatographic Science* **1994**, 32, 165-171.
- Marsili, R. Techniques for analyzing food aroma. In *Food Sci. Technol Ser/79*; Marsili, R., Ed.; Marcel Dekker: New York and Basel, **1996**; pp 1-400.

- Marsili, R. T. Comparison of solid-phase microextraction and dynamic headspace methods for the GC-MS analysis of light-induced lipid oxidation products in milk. *Journal of Chromatographic Science* **1999a**, 37, 17-23.
- Marsili R.T. SPME-MS-MVA as an Electronic Nose for the study of off-flavour in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999b**, 47, 648-654.
- Marsili, R. T. Shelf-life prediction of processed milk by solid-phase microextraction, mass espectrometry, and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 3470-3475.
- Martín Hernández, M. C. Proteasas y lipasas de la leche. Enzimas termorresistentes de bacterias psicrotrofas y su efecto en leche y productos lácteos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **1991**, 31, 1-18.
- Måsson, H. L.; Fondén, R.; Petterson H. E. Composition of Sweddish dairy milk. *International Dairy Journal* **2003**, 13, 409-425.
- Mauron, J. The maillard reaction in food: a critical review from the nutritional standpoint. *Progress in Food and Nutrition Science* **1981**, 5, 5-35.
- McSweeney, P. L. H.; Nursten H. E.; Urbach, G. Flavours and off-flavours in milk and dairy products; In *Advanced Dairy Chemistry, Lactose, Water, Salts and Vitamins*; Fox, P.F., Ed.; Chapman and Hall: London, United Kingdom, **1997**; pp 403-468.
- Melton, S. L.; Black, J. M.; Davis, G. W.; Backus, W. R. Flavour and selected chemical characteristics of ground beef from steers background on pasture and fed corn up to 140 days. *Journal of Food Science* **1982**, 47, 699-704.
- Morales, F. J.; van Boekel, M. A. J. S. A study on advanced maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *International Dairy Journal* **1998**, 8, 907-915.
- Morales, M. S.; Palmquist, D. L.; Weiss, W. P. Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soy beans or tallow. *Journal of Dairy Science* **2000**, 83, 2112-2119.

- Muir, D. D.; Kelly, M. E.; Phillips, J. D. The effect of storage temperature on bacterial growth and lipolysis in raw milk. *Journal of the Society of Dairy Technology* **1978**, 31, 203-208.
- Muir, D. D. The shelf life of dairy products: 4. Intermediate and long life dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology* **1996**, 49, 119-124.
- Nawar, W. W. Lipids. In *Food Chemistry*; Fennema, R. O., Ed.; Marcel Dekker: New York, **1996**; pp 225-319.
- Nickerson, G. B.; Likens, S. T. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *Journal of Chromatography* **1996**, 21, 1-3.
- Nielsen, B. R.; Stapelfeldt, H.; Skibsted, L. H. Early prediction of the shelf life of medium-heat whole milk powders using stepwise multiple regression and principal component analysis. *International Dairy Journal* **1997a**, 7, 341-348.
- Nielsen, B. R.; Stapelfeldt, H.; Skibsted, L. H. Differentiation between 15 whole milk powders in relation to oxidative stability during accelerated storage: analysis of variance and canonical variable analysis. *International Dairy Journal* **1997b**, 7, 589-599.
- Norma Argentina IRAM ISO 9000: **2000**. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y Vocabularios.
- Norma Argentina IRAM 14067-3: **1993**. Análisis Sensorial. Productos Lácteos. Leche en Polvo. Ensayo de categorización por puntuación.
- Norma FIL-IDF N° 265-1991 A practical guide to the control of lipolysis in the manufacture of dairy products. International Standard FIL-IDF 265:**1991**, International Dairy Federation, Brussels.
- Norma FIL-IDF N° 74 A-1991 Anhydrous milkfat. Determination of peroxide value. International Standard FIL-IDF 74 A:**1991**, International Dairy Federation, Brussels.
- Norma FIL-IDF N° 26 A-1993. Determination of the water content of dried milk. International Standard FIL-IDF 26 A:**1993**, International Dairy Federation, Brussels.

- Nursten, H. E. The flavour of milk and dairy products: I. Milk of different kinds, milk powder, butter and cream. *International Journal of Dairy Technology* **1997**, *50*, 48-56.
- O'Brien, B.; Mhara, R.; Connolly, J. F.; Harrington, D. Seasonal variation in the composition of Irish manufacturing and retails milks. Part 4. Mineral and trace elements. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **1999**, *38*, 87-99.
- O'Beirne, D. Effects of pH on non-enzymic browning during storage in apple juice concentrate prepared from Bramley's seedling apples. *Journal of Food Science* **1986**, *52*, 1073-1074.
- Olivecrona, J. In *Flavour impairment of milk and products due to lipolysis*. Bulletin of IDF No. 118/1980, **1980**, 19-25.
- Oliver, R. L. A cognitive model of the antecedents and consequences of satisfaction decisions. *Journal of Marketing Research* **1980**, *17*, 460-469.
- Oliver, R. L. Cognitive, affective, and attributes bases of the satisfaction responses. *Journal of the Consumer Research* **1993**, *20*, 418-431.
- Ordóñez, J. A.; Cambero Leónidez-Fernández, M. I.; García, M. L.; García de Fernando, G.; de la Hoz, L.; Selgas, M. D. Leche de consumo. En *Tecnología de Alimentos. Vol II: Alimentos de Origen Animal*; Ordóñez, J. A., Ed.; **1998**, pp 64-87.
- Páez, R.; Chávez, M.; Gaggiotti, M.; Charlón, V.; Taverna, M.; Cuatrín, A.; Negri, L. Estudio comparativo de dos técnicas de dosaje de ácidos grasos libres en leche cruda y leche en polvo. Libro de resúmenes del VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, **1999**, pp 135.
- Páez, R. Efecto de condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad oxidativa de leche entera en polvo. *Trabajo de Tesis*, EEA-Rafaela, **2002**.
- Páez, R. B.; García, P.; Comerón, E. A.; Romero, L. A.; Ahorna, M. S.; Taverna, M. A. Perfil de ácidos grasos de leche de vacas Holando y Jersey en

condiciones similares de oferta alimenticia. Libro de resúmenes del Congreso Argentino de Producción Animal AAPA, Buenos Aires, Argentina, **2002a**, vol. 22, suplemento 1, pp 43.

Páez, R.; Taverna, M.; Chavéz, M.; Cuatrín, A.; Neder, V. Efecto del tipo de proceso de elaboración de leche en polvo sobre los ácidos grasos libres, INTA EEA Rafaela, **2002b**, <http://rafaela.inta.gov.ar/publicaciones>

Pagliarini, E.; Vernile, M.; Peri, C. Kinetic study on colour changes in milk due to heat. *Journal of Food Science* **1990**, 55, 1766-1767.

Pearce, T.; Gardner J. Predicting organoleptic scores of sub-ppm flavour notes. Part 1. Theoretical and experimental details. Part 2. Computational analysis and results. *Analyst* **1998**, 123, 2047-2066.

Pellegrino, L.; Resmini, P.; Luf, W. Assessment (indices) of heat treatment of milk. In *Heat-induced changes in milk*; Fox, P. F., Ed.; International Dairy Federation, Brussels, **1995**; pp. 409-453.

Pérez-Alvarez, J. A.; Fernández-López, J.; Rosmini, M. R.; Sayas, M. E. Bases para la medición de color en los alimentos. *Techno Food* **1999**, 9, 18-23.

Persaud, K. C.; Khaffaf, S. M.; Hobbs, P. J.; Sneath, R. W. Assessment of conducting polymer odour sensors for agricultural malodour measurements. *Chemical Senses* **1996**, 21, 495-505.

Petriella, C.; Resnik, S. L.; Lozano, R. D.; Chirife, J. Kinetics of deteriorative reaction in model systems of high water activity: colour changes due to non-enzymatic browning. *Journal of Food Science* **1985**, 50, 622-626.

Piggot J. R. Understanding flavour quality: Difficult or imposible? *Food Quality and Preference* **1994**, 5, 167-171.

Priolo, A.; Lanza, M.; Barbagallo, D.; Finocchiaro, L.; Biondi, L. Can the reflectance spectrum be used to trace grass feeding in ewe milk?. *Small Ruminant Research* **2003**, 48, 103-107.

Ramaswamy, R.; Baer, R. J.; Schingoethe, D. J.; Hippen, A. R.; Kasperson, K. M.; Whitlock, L. A. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish

oil, extruded soybeans, or their combination. *Journal of Dairy Science* **2001**, 84, 2144-2151.

Rampilli, M.; Andreini, R. Evaluation of colour components in sterilized milk. *Italian Journal of Food Science* **1992**, 4, 285-291.

Renner, E. Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high ambient temperatures. *Journal of Dairy Research* **1988**, 55, 125-142.

Rhim, J. W.; Jones, V. A.; Swartzel, K. R. Kinetics studies in the colour changes of skim milk. *Lebensmittelwissenschaft und-Technologie* **1988**, 21, 334-338.

Rizzi, G. P. Chemical Structure of coloured Maillard reaction products. *Food Reviews International* **1997**, 13, 1-28.

Roberts, D. D.; Pollien, P.; Milo, C. Solid-Phase Microextraction Method Development for Headspace Analysis of Volatile Flavor Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, 48, 2430-2437.

Rouseff, R. L.; Fisher, J. F.; Nagy, S. HPLC separation and comparison of the browning pigments formed in grapefruits juice stored in glass and cans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, 37, 765-769.

SAGPyA, 2005. Cadenas Alimentarias. Lácteos. Productos Lácteos. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

SAGPyA, 2005. Cadenas Alimentarias. Lácteos. Leche en Polvo Entera. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

SAGPyA, 2005. Cadenas Alimentarias. Lácteos. Informe sector lácteos. Análisis de coyuntura, N° 26, Julio 2004. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar>

Saito, Z. Particle structure in spray-dried whole milk and in instant skimmed milk powder as related to lactose crystallization. *Food Microstructure* **1985**, 4, 333-340.

Sanchez Moreno, C.; Larrauri J. Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. *Food Science and Technology International* **1998**, 4, 391-399.

- Schebor, C.; Buera, M. P. Karel, M.; Chirife, J. Color formation due to non-enzymatic browning in amorphous, glassy, anhydrous, model systems. *Food Chemistry* **1999**, 65, 427-432.
- Schreurs, N. M.; Marotti, D.M.; Tavendale, M.H.; Lane, G.A.; Barry, T.N.; McNabb, W.C. Skatole and indole formation in comparison to rumen ammonia and volatile acids in sheep fed fresh forages. *Animal Production in Australia* **2004**, 25, 160-163.
- Shamsuzzaman, K. Survival of lipase during manufacture of nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science* **1987**, 70, 746-751.
- Shipstead, H.; Tarassuk N. P. Chemical changes in dehydrated milk during storage. *Dehydrated foods* **1953**, 9, 613-616.
- Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Imayoshi, K.; Noda, K.; Osajima, Y. Volatile flavor compounds in spray-dried milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994a**, 42, 984-988.
- Shiratsuchi, H.; Shimoda, M.; Imayoshi, K.; Noda, K.; Osajima, Y. Off-flavor compounds in spray-dried milk powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994b**, 42, 1323-1327.
- Sidwell, C.; Salwin, H.; Mitchell Jr. J. Measurement of oxidation in dried milk products with thiobarbituric acid. *Journal of the American Oil Chemist's Society* **1955**, 32, 13-16.
- Singh, H.; Newstead, F. Aspects of proteins in milk powder manufacture. In *Advanced Dairy Chemistry, Aspects of proteins in milk powder manufacture*; Fox, P. F., Ed.; **1998**; Vol 1, pp 735-765.
- Smit, L.; Schönfeldt, H.; deBeer, W.; Smith, M. The effect of locality and season on the composition of South African whole milk. *Journal of Food Composition and Analysis* **2000**, 13, 345-367.
- Sorensen, I.; Krag, J.; Pisecky, J.; Westergaard, V. Métodos de análisis para productos lácteos en polvo. A/S NIRO 4ª Ed. Copenhagen. Denmark; **1978**.

- Spanier, A. M.; Braggins, T. J. Electronic nose: what are they and what are their potential uses in meat science? *Reciprocal meat conference, American Meat Science Association*, 52, Oklahoma, United States, **1999**.
- Stapelfeldt, H.; Nielsen B. R.; Skibsted, L. H. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. *International Dairy Journal* **1997**, 7, 331-339.
- Stead D. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* **1986**, 53, 481-505.
- Steenkamp, J. E. M. B. Conceptual model of the quality perception process. *Journal of Business Research* **1990**, 21, 309-333.
- Stephan, A.; Bücking, M.; Steinhart, H. Novel analytical tools for food flavours. *Food Research International* **2000**, 33, 199-209.
- Stevenson, R. J.; Chen, X. D.; Mills, O. E. Modern analyses and binding studies of flavour volatiles with particular references to dairy protein products. *Food Research International* **1996**, 29, 265-290.
- Strocka, D.; Brockes, A. Comparison of CIE (1931) 2° and the CIE (1964) 10° colorimeter standard observers with individual observers in the assessment of metameric matches. In Color 69. Manfred, R., ed.; Göttingen, Musterschmidt, **1970**.
- Swaigood, H. E. Características de los fluidos nutritivos de origen animal: leche. In *Química de los alimentos*; Fennema, O. R., Ed.; Marcel Dekker; New York, **1996**, pp 532-590.
- Swatland, H. J. Optical prediction of water holding capacity. In *Proceeding of 47th Annual Reciprocal Meat Conference*. Philadelphia (Pennsylvania), American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board, **1994**.
- Swatland, H. J. Reversible pH effect on pork paleness in a model system. *Journal Food Science* **1995**, 60, 988-991.
- Szczesniak, A. S. Physical properties of food: What they are and their relation to other food properties. In *Physical properties of Food*; Peleg, M., Bagley, E. B., Eds.; Westport (Connecticut), AVI Publishing Co., **1983**.

- Taverna, M. A. La calida como estrategia. Por qué y para qué?. En *Manual de referencia para el logro de leche de calidad*; Taverna, M. A.; Calvinho, L.; Páez, R.; Chávez, M.; Charlón. V.; Vanzini, V.; Abdala, A.; Castillo, A.; Cuatrín, A., Gallardo, M., Editado por EEA INTA Rafaela, **2002**; pp 7-13.
- Taverna, M. A.; Páez, R. Las alteraciones. La lipólisis en la leche: tipos, causas y formas de prevención. En *Manual de referencia para el logro de leche de calidad*; Taverna, M. A.; Calvinho, L.; Páez, R.; Chávez, M.; Charlón. V.; Vanzini, V.; Abdala, A.; Castillo, A.; Cuatrín, A., Gallardo, M., Editado por EEA INTA Rafaela, **2002**; pp 109-113.
- Tomlinson, A. J.; Mlotkiewicz, J. A.; Lewis, I. A. S. Application of capillary electrophoresis to the separation of coloured products of Maillard reactions. *Food Chemistry* **1994**, 49, 219-223.
- Ulberth, F.; Roubicek, D. Monitoring of oxidative deterioration of milk powder by headspace gas chromatography. *International Dairy Journal* **1995**, 5, 523-531.
- UNE. Norma Española 72-012: Observador fotométrico UNE 1 (para visión fotópica). Madrid, IRANOR, **1982**.
- UNE. Norma Española 72-032: Especificación numérica del color sicofísico de estímulos luminosos. Madrid, IRANOR, **1984**.
- Urbach, G.; Stark, W. Effect of diet on the γ - and δ -lactone and methyl ketone potential of bovine butterfat. *Journal of Dairy Research* **1978**, 45, 223-229.
- Urbach, G. Effect of feed on flavor in dairy foods. *Journal of Dairy Science* **1990**, 73, 3639-3650.
- Valero, E.; Villamiel, M.; Miralles, B.; Sanz, J.; Martínez-Castro, I. Changes in flavour and volatile components during storage of whole and skimmed UHT milk. *Food Chemistry* **2001**, 72, 51-58.
- Vallejo-Cordoba, B.; Nakai, S. Using a simultaneous factor optimization approach for the detection of volatiles in milk by dynamic headspace gas chromatographic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, 2378-2384.

- Van Boekel, M. A. . S. Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* **1998**, 62, 403-414.
- Van Mils, P.; Jans, A. Storage stability of whole milk powder: effects of process and storage conditions on product properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **1991**, 45, 145-167.
- Visser, F. R.; Taylor, A. Improved performance on the AromaScan A32S electronic nose and its potential for detecting aroma differences in dairy products. *Journal of Sensory Studies* **1998**, 13, 95-120.
- Weber, D. C.; Skillings, J. H. A first Course in the Design of the Experiments: A Linear Models Approach. **2000**. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Werkhoff P.; Bretschneider W. Dynamic headspace gas chromatography: concentration of volatile components after thermal desorption by intermediate cryofocusing in a cold trap. *Journal of Chromatography* **1987**, 483, 43-49.
- Weurman C. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1969**, 17, 370-376.
- Whitfield, F. B. Microbiology of food taints. *International Journal of Food Science and Technology* **1998**, 33, 31-51.
- Wilkes, J. G.; Conte, E. D.; Yongkyoung, K.; Holcomb, M.; Sutherland, J. B.; Miller, D. W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A* **2000**, 880, 3-33.
- Xanthopoulos, V.; Picque, D.; Bassit, N.; Boquien, C. Y.; Corrieu, G., Methods for the determination of aroma compounds in dairy products: a comparative study. *Journal of Dairy Research* **1994**, 61, 289-297.
- Yang, X.; Peppard T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1994**, 42, 1925-1930.
- Yang, A.; Lanari, M. C.; Brewster, M. J.; Tume, R. K. Lipid stability and meat colour of beef from pasture-and grain-fed cattle with or without vitamin E supplementation. *Meat Science* **2002b**, 60, 41-50.

- Yeo, H.; Shibamoto, T. Effects of moisture content on the Maillard browning model system upon microwave irradiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1991**, 39, 1860-1862.
- Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid phase microextraction. *Analytical Chemistry* **1993**, 65, 1843-1852.
- Zhang, Z.; Yang, M.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction, a solvent-free alternative for sample preparation. *Analytical Chemistry* **1994**, 66, 844-853.