

**EVALUACIÓN DE LA ADULTERACIÓN DE LECHE CON LACTOSUERO POR  
LA TÉCNICA ANALÍTICA: ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO CON  
TRANSFORMADA DE FOURIER EN LA REGION MEDIA (FT-MIRS) Y  
CERCANA (FT-NIRS)**

DIEGO FELIPE GÓMEZ LATORRE

FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA  
BOGOTA D.C.  
2019

**EVALUACIÓN DE LA ADULTERACIÓN DE LECHE CON LACTOSUERO POR  
LA TÉCNICA ANALÍTICA: ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO CON  
TRANSFORMADA DE FOURIER EN LA REGION MEDIA (FT-MIRS) Y  
CERCANA (FT-NIRS)**

**DIEGO FELIPE GÓMEZ LATORRE**

Proyecto integral de grado para optar por al título de  
INGENIERO QUIMICO

Director  
Ricardo Vera Bravo  
Químico

FUNDACION UNIVERSIDAD DE AMERICA  
FACULTAD DE INGENIERIAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA QUIMICA  
BOGOTA D.C.  
2019

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

Ing. Elizabeth Torres Gamez

---

David Sotelo Tobon

---

Ing. Jaime Arturo Calvache

Bogotá D.C.: febrero de 2019

## **DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del claustro

**Dr. JAIME POSADA DÍAZ**

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCIA-PEÑA**

Vicerrectora Académica y de Posgrados

**Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS**

Decano General de Facultad de Ingenierías

**Dr. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI**

Director Programa de Ingeniería Química

**Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA G.**

Las Directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente al autor.

*Primeramente, agradezco a Dios por bendecirme con salud y fortalecerme en mente y espíritu; por guiar mi camino y permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida. A mis padres por brindarme su compañía y su apoyo, por guiarme por el camino correcto y educarme en un hogar integro y lleno de amor.*

*Dedico este logro a mi madre por cuyo esfuerzo en el día a día, su dedicación, su amor y confianza incondicional me mantuvieron lleno de fe y seguridad en mí. A mis tías Olga Jeanneth Gómez y Zamira Gómez por ayudarme a renovar mis convicciones, ya que su apoyo y motivación durante el proyecto me permitieron crecer como persona, mantenerme fuerte y culminar este proceso de manera satisfactoria. Y a todos mis familiares y amigos cuya compañía en todo momento fue un sustento emocional.*

*Diego Felipe Gómez Latorre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor del presente proyecto ofrece sus agradecimientos a:

La Ingeniera Elizabeth Torres Gamez, profesora de la Fundación Universidad de América por su constante apoyo, orientación y guía durante el desarrollo del presente proyecto. A la Pontificia Universidad Javeriana por abrirme las puertas y permitirme trabajar en sus instalaciones. Al profesor Ricardo Vera Bravo, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todas las herramientas necesarias para elaborar el proyecto, quien fue un director, un amigo y una guía, por sus comentarios y correcciones siempre adecuados y por sus enseñanzas. Al profesor Alejandro Pérez por el apoyo y consejo que me brindo durante el proceso y a todo el personal de la PUJ, por su disposición a ayudarme y aconsejarme en los momentos de duda.

## CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	21
OBJETIVOS	25
1. GENERALIDADES	26
1.1 LECHE Y LACTOSUERO – COMPOSICION E IMPORTANCIA	26
1.2 LECHE	26
1.2.1 Leche cruda	27
1.2.2 Leche Ultra pasteurizada (UHT)	27
1.2.3 Leche adulterada	27
1.3 CONSTITUYENTES DE LA LECHE	27
1.3.2 Grasa de la leche	28
1.3.3 Proteínas	29
1.4 LACTOSUERO	29
1.4.1 Caseína (CN)	30
1.4.2 Kappa-Caseína ( $\kappa$ -CN)	30
1.4.3 Rennina	30
1.4.4 Glicomacropéptido de caseína (c-GMP)	31
1.5 SONICACION	31
1.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA ( <i>IRS</i> )	32
1.6.1 Tipos de vibraciones moleculares	33
1.6.2 El espectrofotómetro de infrarrojo	34
1.6.3 Interferómetro de Michelson	38
1.6.4 Transformada de Fourier	38
1.6.5 Celdas para IR	39
1.6.4.1 Celda de Seleniuro de Zinc	40
1.6.6 Trayectoria del haz de radiación Infrarroja	41
1.6.7 Muestras líquidas	43
1.6.8 Compensación mediante el haz de referencia	43
1.7 TÉCNICAS EXPERIMENTALES COMUNES EN ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	43
1.7.1 Experimentos en modo de transmisión	43
1.7.2 Experimentos en modo de Reflectancia Difusa (DRIFT)	44
1.7.3 Experimentos en modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR)	45
1.8 ANALISIS CUALITATIVO	46
1.8.1 Frecuencias características de grupo	47
1.9 ANALISIS CUANTITATIVO	47
1.9.1 Relación entre la radiación infrarroja que llega al detector y la concentración de la muestra: la ley de Beer-Lambert	48
1.10 LECHE EN EL INFRARROJO MEDIO Y CERCANO	49
1.10.1 Caracterización del espectro de la leche en la región media	49
1.10.2 Caracterización del espectro de la leche en la región cercana	51

2. IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA	53
2.1 SELECCIÓN DE LA TECNICA ANALITICA	53
2.1.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia ( <i>HPLC</i> )	53
2.1.2 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas ( <i>ELISA</i> )	53
2.1.3 Inmunoensayo <i>Western Blot</i>	54
2.1.4 Electroforesis Capilar	54
2.1.5 Espectroscopia Infrarroja	55
2.2 SELECCION DE CONDICIONES PARA EL ANALISIS	59
2.1.1 Preparación del lactosuero	61
2.1.2 Preparación de muestras enriquecidas con lactosuero	63
2.1.3 Tratamiento de muestras con TCA	65
2.1.4 Equipo de espectroscopia infrarroja IRPrestige-21 de Shimadzu	68
2.1.5 Selección de alícuota depositada en las celdas de análisis	69
2.1.6 Compensación mediante solución referencia ( <i>Background</i> )	69
2.3 FASES DEL ANALISIS DE MUESTRAS	70
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	71
3.2 PREEXPERIMENTACION	71
3.2.1 Fase 1 – Estudio de la respuesta de la técnica a las muestras de leche	71
3.2.2 Fase 2 – Análisis de repetibilidad	78
3.2.2.1 Trazado de línea base y normalizado de los espectros	80
3.2.3 Fase 3 – Comparación de los espectros infrarrojos de muestras adulteradas	86
4. COMPARACION DE TECNICAS: ESPECTROSCOPIA INFRARROJA VS CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA ( <i>HPLC</i> )	103
5. CONCLUSIONES	109
6. RECOMENDACIONES	111
BIBLIOGRAFIA	112
ANEXOS	117

## LISTAS DE CUADROS

	pág.
<b>Cuadro 1.</b> Rol de las fracciones de carbohidratos y la cadena peptídica en varias propiedades biológicas del c-GMP.	31
<b>Cuadro 2.</b> Componentes del equipo FT-IR IRPrestige-21 del laboratorio de macromoléculas de la Pontificia Universidad Javeriana.	37
<b>Cuadro 3.</b> Grupos funcionales característicos del espectro Infrarrojo medio de la leche.	49
<b>Cuadro 4.</b> Grupos funcionales característicos del espectro Infrarrojo cercano de la leche.	51
<b>Cuadro 5.</b> Comparación de técnicas analíticas aplicables para detección de leche adulterada con lactosuero.	55
<b>Cuadro 6.</b> Criterios de evaluación para la selección diferentes técnicas.	58
<b>Cuadro 7.</b> fases establecidas para el desarrollo de la experimentación.	70
<b>Cuadro 8.</b> Pretratamientos aplicados a las muestras para la determinación de repetibilidad.	83

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura química de la lactosa.	28
<b>Figura 2.</b> Espectro Infrarrojo medio (FT-MIRS) de la Lactosa.	28
<b>Figura 3.</b> Micrografías de muestras de leche sometidas a ultrasonido en distintos niveles.	32
<b>Figura 4.</b> Tipos de vibraciones moleculares.	33
<b>Figura 5.</b> Componentes básicos de un espectrofotómetro de infrarrojo.	34
<b>Figura 6.</b> Fuente de luz – Equipo IRPrestige-21.	35
<b>Figura 7.</b> Sistema óptico del equipo IRPrestige-21.	36
<b>Figura 8.</b> Esquema de un interferómetro de Michelson.	38
<b>Figura 9.</b> Interferograma convertido en un espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier.	39
<b>Figura 10.</b> Esquema de celdas IR desmontables para muestras líquidas.	40
<b>Figura 11.</b> Celdas de Seleniuro de Zinc (ZnSe) usadas en el presente proyecto.	41
<b>Figura 12.</b> Divisores de Haz (KBr – izquierda, CaF <sub>2</sub> – derecha) usados en el espectrofotómetro Infrarrojo IRPrestige-21 de la Pontificia Universidad Javeriana.	42
<b>Figura 13.</b> Trayectoria del haz de radiación en un Espectrómetro de Infrarrojo.	42
<b>Figura 14.</b> Configuración para experimentos en modo de transmisión.	44
<b>Figura 15.</b> Configuración para experimentos en modo de reflectancia difusa.	45
<b>Figura 16.</b> Configuración para experimentos en modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR).	46
<b>Figura 17.</b> Tabla de grupos funcionales orgánicos básicos para análisis de espectros Infrarrojos.	47
<b>Figura 18.</b> Disminución de la energía radiante como resultado de la absorción.	48
<b>Figura 19.</b> Espectro Infrarrojo medio de la leche.	50
<b>Figura 20.</b> Espectro Infrarrojo cercano de la leche.	51
<b>Figura 21.</b> Diagrama de la metodología experimental para el presente proyecto.	59
<b>Figura 22.</b> Diagrama de preparación de lactosuero.	62
<b>Figura 23.</b> Diagrama de preparación de muestras enriquecidas con lactosuero.	64
<b>Figura 24.</b> Diagrama del proceso de aplicación de ultrasonido a muestras enriquecidas.	67
<b>Figura 25.</b> Espectrofotómetro infrarrojo SHIMADZU IRPrestige-21 del laboratorio de cromatografía de la Pontificia Universidad Javeriana.	68

<b>Figura 26.</b> Condiciones del equipo IRPrestige-21 para análisis de muestras.	69
<b>Figura 27.</b> Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 de Shimadzu para muestras de leche sin tratamiento (TCA).	72
<b>Figura 28.</b> Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche con tratamiento (TCA).	74
<b>Figura 29.</b> Espectros en el infrarrojo cercano obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche sin tratamiento (TCA).	76
<b>Figura 30.</b> Espectros en el infrarrojo cercano obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche con tratamiento (TCA).	77
<b>Figura 31.</b> Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para selección de alícuota (5, 10 y 15µL de muestra).	79
<b>Figura 32.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para selección de alícuota (5, 10 y 15µL).	81
<b>Figura 33.</b> Comparación de alícuotas depositadas en las celdas de seleniuro de zinc.	82
<b>Figura 34.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para análisis de repetibilidad en leche cruda (sin pretratamiento, calentamiento + agitación y calentamiento + ultrasonido) respectivamente.	85
<b>Figura 35.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) para determinación de adulteración en leche cruda obtenidos por el equipo IRPrestige-21, presentados en el siguiente orden: (0%, 2.5%, 5%, 10%, 12.5%, 15%, 30%).	87
<b>Figura 36.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) del lactosuero.	89
<b>Figura 37.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche cruda adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10% ,5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] obtenidos por el equipo IRPrestige-21.	90
<b>Figura 38.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la lactosa.	91
<b>Figura 39.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la proteína.	92
<b>Figura 40.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Regiones de la grasa.	93
<b>Figura 41.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) para determinación de adulteración en leche comercial B obtenidos por el equipo IRPrestige-21.	94

<b>Figura 42.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] obtenidos por el equipo IRPrestige-21.	96
<b>Figura 43.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la lactosa.	97
<b>Figura 44.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la proteína.	98
<b>Figura 45.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Regiones de la grasa.	98
<b>Figura 46.</b> Comparación de espectros de leche de cruda (0%) tomados en distintos días (a la izquierda cada espectro completo y a la derecha la ampliación de la región de la lactosa)	101
<b>Figura 47.</b> Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche para comparación de técnicas	103
<b>Figura 48.</b> Cromatogramas (HPLC) de las muestras de leche sin adulterar para comparación de técnicas	106
<b>Figura 49.</b> Cromatogramas (HPLC) de las muestras de leche comercial de estado desconocido para comparación de muestras	107

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo A.</b> Ficha técnica del ácido tricloroacético	115
<b>Anexo B.</b> Ficha técnica del etanol	118
<b>Anexo C.</b> Ficha técnica de la acetona	120
<b>Anexo D.</b> Ficha técnica del seleniuro de zinc	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Termino</b>
g	Gramos
µg	Microgramos
L	Litros
µL	Microlitros
s	Segundos
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
MIRS	Medium Infrared Spectroscopy
NIRS	Near Infrared Spectroscopy
(%m/m)	Porcentaje masa – masa
Abs.	Absorbancia
(%T)	Porcentaje de transmitancia
BCAA	Branched Chain Aminoacid
TCA	Trichloroacetic Acid
c-GMP	Glicomacropeptido de Caseina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
°C	Grados Celcius

## GLOSARIO

**ABSORBANCIA:** la absorbancia es la medida de cuanta luz incidente sobre una muestra es absorbida por la misma. Un alto valor de absorbancia indica que la cantidad de luz que atraviesa la muestra es muy baja y, por el contrario, un menor valor de absorbancia indica que la cantidad de luz que atraviesa la muestra es alta.

**ABSORCION FUNDAMENTAL:** se refiere a la transición vibracional desde un estado fundamental, al primer estado excitado, dando lugar a las bandas de mayor intensidad en el espectro.

**ACIDO TRICLOROACETICO (TCA):** el ácido tricloroacético es un ácido orgánico, utilizado comúnmente para precipitar y concentrar las proteínas en una muestra o remover contaminantes, previo a aplicaciones posteriores.

**ADULTERANTE:** sustancia adicionada a un producto con el fin de rendir el mismo u ocultar sus condiciones deterioradas.

**AMINOACIDOS:** son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo. Se agrupan en cadenas lineales para formar proteínas y también se encuentran en los músculos humanos como el segundo mayor componente después del agua.

**AMINOACIDOS DE CADENA RAMIFICADA (BCAA):** los aminoácidos de cadena ramificada sirven como un importante sustrato energético durante el desarrollo de actividades físicas y periodos de estrés, además de como precursor para la síntesis de otros aminoácidos y proteínas.

**BACKGROUND:** también llamado compensación de referencia, es la lectura de una sustancia “blanco” cuyas bandas o picos son indeseados y se pueden eliminar del espectro de la muestra análisis.

**BANDA DE COMBINACION:** las bandas de combinación corresponden al acoplamiento de 2 bandas, para dar lugar a una nueva banda de frecuencia  $v_{comb}$ .

**CALIDAD PROTEICA:** los humanos requieren ciertas cantidades mínimas de aminoácidos esenciales de una fuente biológicamente disponible. La capacidad de una fuente de proteína individual para satisfacer esta necesidad biológica indica la calidad proteica de dicha fuente.

**CAPA DE HIDRATACION:** gracias a la polaridad del agua, esta puede formar interacciones electrostáticas con otras moléculas polares e iones. Cuando hay una gran cantidad de moléculas de agua en relación con las de un soluto, se forma una

capa esférica de moléculas de agua alrededor de dicho soluto lo que permite la distribución uniforme de las partículas de soluto en el agua.

**CASEINA:** es un conjunto de fosfoproteínas presentes en la leche y en derivados de esta como el queso y yogurt. Su abundancia es de aproximadamente el 75% en peso del total de proteínas en la leche.

**COLOIDE:** un coloide es un sistema compuesto por dos fases: una fase líquida o dispersante y otra fase dispersa, por lo general compuesta por partículas sólidas de pequeño tamaño.

**DOMINIO DE LA FRECUENCIA:** un gráfico del dominio de la frecuencia permite observar el comportamiento de los componentes en la señal infrarroja de una muestra analizada de acuerdo a la frecuencia.

**DOMINIO DEL TIEMPO:** un gráfico del dominio del tiempo permite observar los cambios en la potencia radiante obtenidos de una muestra analizada por el equipo infrarrojo en función del tiempo.

**EMULSION:** una emulsión es un sistema compuesto por 2 fluidos inmiscibles mezclados de forma aparentemente homogénea.

**ESPECTRO ELECTROMAGNETICO:** es el rango de frecuencias de la radiación electromagnética con sus longitudes de onda, incluye los rayos gamma, rayos X, radiación ultravioleta, la luz visible, la radiación infrarroja, las microondas y la onda corta de radio.

**ESPECTRO INFRARROJO:** es la representación gráfica de las lecturas de frecuencia o longitud de onda contra la absorbancia o transmitancia presentada por una muestra.

**ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO MEDIO (FT-MIRS):** la espectroscopia del infrarrojo medio trabaja con el rango de frecuencias entre 400 y 4000  $cm^{-1}$ . Esta técnica es una poderosa herramienta para estudiar la composición estructural de muestras orgánicas.

**ESPECTROSCOPIA DEL INFRARROJO PROXIMO/CERCANO (FT-NIRS):** la espectroscopia del infrarrojo cercano trabaja con el rango de frecuencias entre 4000 a 13333  $cm^{-1}$ . Esta técnica permite la detección cuantitativa de especies presentes en una muestra como agua o proteínas.

**ESPECTROSCOPIA INFRARROJA:** es el estudio de la interacción entre la materia y la radiación (absorción y emisión), que se centra en la región infrarroja del espectro electromagnético, la cual se divide en 3 subregiones según la aplicación o técnica

experimental (Lejano infrarrojo, medio infrarrojo y cercano o próximo infrarrojo), en total comprende frecuencias entre 20 a  $13333\text{ cm}^{-1}$ .

**GLICOMACROPEPTIDO DE CASEINA (c-GMP):** es un péptido de naturaleza hidrófila liberado en el lactosuero tras la hidrólisis de la kappa-caseína entre sus aminoácidos 105 y 106. Esta molécula por lo general debe estar ausente en la leche que no ha sido modificada o alterada de forma ilegal, motivo por el cual es usado frecuentemente como indicador de adulteración en leche con lactosuero.

**GLICOSILACION:** la adición de fracciones de carbohidrato a una molécula proteica es conocida como glicosilación de proteínas. Estas adiciones pueden alterar la estabilidad, hidrofiliidad y bioactividad de dicha molécula. Corresponde a una modificación post translacional, durante la cual se generan una serie de reacciones enzimáticas que conducen a la formación de glicoproteínas mediante la unión de monosacáridos a las cadenas aminoacídicas.

**KAPPA-CASEINA:** es una de las cuatro (4) proteínas clasificadas como caseínas. Es una molécula de gran interés para la industria quesera ya que su hidrólisis enzimática genera la coagulación de la leche.

**LACTOSUERO:** es una sustancia líquida de color amarillo verdoso obtenida cuando se remueve el coágulo de la leche luego del proceso de precipitación de la caseína.

**LECHE:** la leche es un enorme sistema fisicoquímico constituido por vitaminas, grasas, sales disueltas, proteínas y un azúcar simple la cual es secretada por animales bovinos para la alimentación de sus crías.

**LECHE CRUDA:** es aquella leche que no ha sido sometida a ningún tipo de procesamiento (Pasteurización, Higienización, adición de conservantes, etc.) posterior a ser extraída del animal productor.

**LECHE UHT:** la leche UHT por sus siglas en inglés (*Ultra High Temperature*) es una leche tratada térmicamente entre aproximadamente  $135$  y  $150^{\circ}\text{C}$  por un muy corto periodo de tiempo (2 a 4 segundos), con el fin de esterilizarla.

**LONGITUD DE ONDA:** es la distancia entre puntos correspondientes de 2 ondas consecutivas.

**MUESTRAS ADULTERADAS:** se refiere a la adición progresiva de lactosuero a muestras de leche con el fin de determinar su adulteración.

**NUMERO DE ONDA:** corresponde al número de ondas observadas por unidad de distancia.

**O-GLICOSILACION:** una O-glicosilación se define como la unión de monosacáridos (N-Acetilgalactosamina, N-Acetilglucosamina, Galactosa, Xilosa, Fucosa, Glucosa o Manosa) al grupo hidroxilo de un aminoácido (por ejemplo: Serina, Tirosina, Treonina, Hidroxilisina e Hidroxiprolina).

**PRECIPITADO:** sustancia sólida, separada de un líquido por diferencias de densidad la cual se deposita en el fondo del recipiente contenedor.

**PARA-KAPPA-CASEINA:** es una de las fracciones generadas luego de la precipitación de la caseína y agrupa las proteínas insolubles de la leche formando un “gel” que repele las proteínas solubles y el agua.

**PROTEINA:** son moléculas orgánicas formadas por la unión de aminoácidos en cadenas lineales. Son esenciales para la vida y cumplen gran variedad de funciones para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos.

**RENNINA:** la rennina o quimosina, comúnmente conocida como cuajo es una enzima proteasa que escinde la kappa-caseína entre sus aminoácidos 105 y 106, generando coagulo de leche y lactosuero.

**RESOLUCION:** define la capacidad del sensor de un equipo para separar y diferenciar los componentes de una muestra en bandas o picos espectrales finos.

**SCAN:** lectura o registro individual de una muestra realizado por el espectrofotómetro de infrarrojo. El número de estos es variable, permitiendo aumentar el número de lecturas que se toma de una misma muestra para aumentar la resolución del espectro obtenido.

**SINAERESIS:** este fenómeno consiste en la expulsión del líquido de un gel. La sinaeresis se da en el proceso de coagulación de la leche cuando el coagulo atrapa las proteínas insolubles y la grasa, pero expulsa o repele la parte líquida (suero) que contiene las proteínas solubles, vitaminas y lactosa.

**SOBRENADANTE:** el sobrenadante corresponde a la fase líquida obtenida de una mezcla luego de ser centrifugada.

**SOBRETONO:** es el nombre dado a las transiciones vibracionales desde el estado fundamental a estados excitados superiores. Si  $\nu$  corresponde a la frecuencia de la absorción fundamental,  $2\nu$ ,  $3\nu$ ... serán las frecuencias de absorción para un sobretono.

**SONICACION:** esta técnica consiste en la aplicación de ondas de ultrasonido a la muestra objetivo con el fin de agitar las partículas de dicha muestra y homogeneizarla.

**TRANSFORMADA DE FOURIER:** los equipos de espectroscopia infrarroja en la actualidad aplican el método matemático de transformada de Fourier, el cual permite transformar las señales en el dominio del tiempo obtenidas por el equipo de espectroscopia a señales en el dominio de la frecuencia, generando resultados de lectura sencilla.

**TRANSMITANCIA:** la razón obtenida al medir la intensidad de un haz de luz que entra en una muestra ( $I_o$ ) y compararla con la intensidad del mismo haz al salir de la muestra ( $I$ ) es llamada transmitancia y es un indicador de la energía que la muestra absorbe o refleja.

## RESUMEN

La adulteración de leche con lactosuero dulce de quesería es una problemática que ha tenido auge en los últimos años. En el proceso de fabricación de queso por acción enzimática, entre un 70 a 80% del total de la leche utilizada se transforma en lactosuero. Este subproducto de carácter levemente ácido alcanza a contener hasta un 50% de los nutrientes originales de la leche (vitaminas, proteínas, grasas, carbohidratos)<sup>1</sup>, sin embargo, en Colombia no es procesado, por lo que su disposición tampoco es regulada, provocando que sea utilizado como un agente para rendir la leche, aprovechando sus similitudes composicionales y la incapacidad de los métodos fisicoquímicos tradicionales para detectarlo, generando lucro de una práctica que la ley colombiana prohíbe.

Una técnica que se ha empezado a explorar en los últimos años y la cual tiene pocos antecedentes en estudios de adulteración de leche adulterada con lactosuero es la Espectroscopia Infrarroja (FT-IR). Colombia no cuenta en la actualidad con una técnica establecida por normatividad con la cual se pueda detectar este tipo de adulteración, por consiguiente, el propósito del presente trabajo es realizar investigaciones con 2 aplicaciones de la Espectroscopia Infrarroja (Infrarrojo Próximo/Cercano – FT-NIR e Infrarrojo Medio – FT-MIR) con el fin de encontrar regiones del espectro que indiquen la presencia de adulteración de forma cualitativa y/o cuantitativa, generando una metodología versátil, que permita un análisis rápido y más económico que otras técnicas enfocadas para este tipo de análisis.

Al finalizar la experimentación no fue posible establecer una curva de calibración con los datos obtenidos para leche sin adulterar y leches adulteradas a distintos niveles, sin embargo si fue posible observar las variaciones generadas por los distintos niveles de lactosuero presentes en las muestras por lo que se concluyó que la técnica de espectroscopia infrarroja tiene la capacidad de determinar las adulteraciones si se calibra adecuadamente, pudiendo constituirse como una técnica de análisis preliminar de muestras, evitando el uso de otras técnicas más robustas y demandantes de tiempo en casos que no sean absolutamente necesarios.

**PALABRAS CLAVE:** Adulteración, Lactosuero dulce de quesería, Espectroscopia Infrarroja (FT-IR), Infrarrojo Próximo/cercano, Infrarrojo Medio.

---

<sup>1</sup> AGENCIA DE NOTICIAS UN. Suero de leche, de contaminante a subproducto nutritivo. (En línea). (may. 2014). [Citado 08 sept De 2018]. Disponible en: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/suero-de-leche-de-contaminante-a-subproducto-nutritivo.html>.

## INTRODUCCION

El suero de leche o lactosuero dulce de quesería es un subproducto de la industria quesera obtenido después de la hidrólisis de la kappa-caseína por acción enzimática, al remover el coágulo de leche que se genera.<sup>2</sup> Esta sustancia de color amarillo verdoso ha pasado de ser tratada como un residuo a ser usada como alimento para cerdos<sup>3</sup> y posteriormente como fuente para la producción de suplementos para deportistas de alto rendimiento y personas de la tercera edad<sup>4,5</sup> (Peptamen – Nestlé,<sup>6</sup> Whey Gold, Whey Protein Ultra, Nitro-Tech, ISOPRO). Este subproducto tienen un alto valor de calidad proteica y contiene una proporción relativamente alta de aminoácidos de cadena ramificada (*Branched-Chain Amino-Acids BCAA*),<sup>7</sup> adicionalmente, las proteínas del suero son usadas en distintos alimentos como yogurt, queso, postres, formulas nutritivas para infantes y bebidas deportivas entre otras, gracias a sus propiedades funcionales como retención de agua/grasa, estabilidad térmica, espumado, espesantes y emulsificantes.<sup>8,9</sup> A pesar de todo lo anterior, la adición de lactosuero líquido a la leche se ha constituido en una práctica muy común para aumentar el volumen total, esto con la intención de obtener un mayor beneficio económico, aprovechando la falta de tecnología apropiada para la detección,<sup>10</sup> además de la dificultad para su debido aprovechamiento, ya que para obtener un kilo de leche en polvo se necesitan 8 litros de leche, sin embargo, para obtener un kilo de suero en polvo (el cual puede ser usado en la producción de galletas, helados, dulces y suplementos alimenticios entre otros) se necesitan aproximadamente 18 litros de lactosuero, generando que la transformación del lactosuero para aprovecharlo en la fabricación de alimentos sea muy poco rentable para el productor, haciendo que este prefiera usarlo para rendir la leche, ya que esta práctica no demanda mayor inversión y si genera un aumento de ingresos.<sup>11</sup> Esto no solo plantea un gran problema social, ético y

---

<sup>2</sup> HUERTAS, R.A. LACTOSUERO: IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS. En: Revista facultad nacional de agronomía – Medellín. Vol. 62., No 1. (2009); p. 4968

<sup>3</sup> O'GRADY, J.F. Whey as Feed for Fattening Pigs: 1. Effects of Limited Whey Feeding. En: Irish Journal of Agricultural Research. Vol. 2. No 2. (Oct. 1963); p. 169.

<sup>4</sup> HA, E., y ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential aminoacids: mechanisms underlying health benefits for active people. En: The journal of nutritional biochemistry. Vol. 14., No 5. (May. 2003); p. 251 – 252.

<sup>5</sup> CRIBB, P.J., y BIENVENUE, A. Las proteínas del suero de leche de los estados unidos y la nutrición en los deportes. (En línea). (2018). [Citado: 30 Sept 2018]. Disponible en: <https://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/525.pdf>

<sup>6</sup> HERNANDEZ-ROJAS, M., y VELEZ-RUIZ, J.F. Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. En: Temas selectos de ingeniería de alimentos. Vol. 8. No 2. (2014); p. 19.

<sup>7</sup> HA, E., y ZEMEL, M.B. Op. Cit., p. 252.

<sup>8</sup> HUERTAS, Op. Cit., p. 4970

<sup>9</sup> FOEGEDING, E.A., y LUCK, P. Whey Protein Products. En: Encyclopedia of dairy sciences. Vol. 3. (2011); p. 874 – 877.

<sup>10</sup> DAS, S., GOSWAMI, B., y BISWAS, K. Milk Adulteration and Detection: A Review. En: Sensor Letters. Vol. 14., No 1. (Ene. 2016); p. 4 - 10.

<sup>11</sup> AGENCIA DE NOTICIAS UN, Op. Cit., p. 2.

económico, sino que también crea riesgos para la salud como enfermedades renales, disminución de la presión sanguínea y problemas cardiacos.<sup>12</sup>

Una preocupación constante de todos los constituyentes de la cadena láctea es la búsqueda de procedimientos y técnicas que aseguren la obtención de productos inocuos y de alta calidad para el consumo humano.<sup>13</sup> Debido a que el lactosuero es una sustancia proveniente de la leche en el proceso de fabricación de queso, tiene características similares, por lo que su adición no afecta de forma adversa la percepción sensorial del producto,<sup>14</sup> además de no ser detectable por las técnicas fisicoquímicas de rutina llevadas a cabo en los laboratorios, pues la variación en proteínas, grasas, agua y sólidos totales entre otras se mantiene entre los rangos permitidos por normatividad.<sup>15,16,17</sup> Por todo lo anterior surge la necesidad de buscar nuevas técnicas que permitan detectar la presencia de lactosuero en muestras de leche de forma confiable, económica y rápida.

Se han reportado distintas técnicas dirigidas a la detección de adulteración de leche con múltiples contaminantes como: agua, urea, melamina, peróxido de hidrogeno y lactosuero.<sup>18</sup> Para este último se encuentran diversas metodologías que permiten su identificación, sin embargo, debido a los equipos que utilizan, el tiempo que requieren para analizar las muestras o sus características analíticas pueden llegar a ser difíciles de aplicar, generar falsos positivos y tener costos de aplicación elevados.<sup>19,20</sup> Entre algunas de estas técnicas se encuentran la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent Assay*), Inmunoensayo *Western Blot* y Electroforesis capilar. Adicionalmente se encuentran algunos reportes que demuestran la capacidad de la técnica de espectroscopia

---

<sup>12</sup> DAS, S., GOSWAMI, Op. Cit., p. 4 -10.

<sup>13</sup> CALDERON, A., GARCIA, F., y MARTINEZ, G. INDICADORES DE CALIDAD DE LECHES CRUDAS EN DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA. En: Revista MVZ Córdoba. Vol. 11., No 1. (2006); p. 726.

<sup>14</sup> NEELIMA., SHARMA R., RAJPUT, Y.S., y MANN, B. Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. En: Dairy science and technology. Vol. 93., No 1. (Ene. 2013); p. 21 – 32.

<sup>15</sup> MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. Decreto 616 de 2006 [Citado 13 Ago 2018], Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/15425e0f-81fb-4111-b215-63e61e9e9130/2006D616.aspx>

<sup>16</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC). Norma técnica colombiana (NTC) 399. Cuarta actualización. Bogotá D.C. (Nov. 2002); p. 3.

<sup>17</sup> MALLQUI, Luis. Métodos para el análisis fisicoquímico de la leche y derivados lácteos. 2da edición. Huancayo, Perú: Editorial Libros y editoriales, (2014); p. 75 – 93.

<sup>18</sup> SANTOS, P.M., PEREIRA-FILHO, E.R., y RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics análisis. En: Food Chemistry. Vol: 138. (May. 2013); p. 20.

<sup>19</sup> BANUPRIYA, P., CHAITANYA, R.S., SUPRIYA, T.V., y VARSHITHA, V. Comparison of different methods used for detection of Urea in milk by quantification of ammonia. En: International Journal of Advanced Research in Electrical, Electronics and Instrumentation Engineering. Vol. 3. No 3. (Mar. 2014); p. 7862

<sup>20</sup> CORBELLINI, C.N. La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. (En línea). [Citado 29 Sept 2018]. Disponible en: <https://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-calidad-de-leche.pdf>

infrarroja para estudiar características estructurales y analizar los grupos funcionales presentes en las muestras, que junto con análisis quimiométrico pueden constituir una herramienta versátil y rápida para el análisis dirigido al control de calidad en la industria láctea.<sup>21</sup>

La Pontificia Universidad Javeriana busca ser pionera en el estudio y desarrollo de metodologías rápidas, económicas y de sencilla aplicación, pero a su vez robustas que permitan la determinación cualitativa y/o cuantitativa de lactosuero como adulterante en la leche y de la mano con la Fundación Universidad de América formar ingenieros íntegros que puedan aplicar los conocimientos teóricos y prácticos adquiridos durante la carrera en el desarrollo de procesos mediante la utilización de equipos y herramientas informáticas, generando un aporte a la sociedad, los productores, entes reguladores y a la industria láctea en general, logrando asegurar la mejor calidad de los productos que llegan al consumidor.

---

<sup>21</sup> POONIA, A., JHA, A., SHARMA, R., SINGH, H.B., KUMAR, A., y SHARMA, N. Detection of adulteration in milk: A review. En: International Journal of Dairy Technology. Vol. 69. (Nov. 2016); p. 2 – 8.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la adulteración de leche con lactosuero por medio de la técnica analítica: Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier en la región del infrarrojo medio (FT-MIRS) y cercano (FT-NIRS).

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Establecer la metodología de las aplicaciones: FT-MIRS y FT-NIRS como una técnica exploratoria para la detección de leche adulterada con lactosuero en el laboratorio de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Determinar los parámetros cualitativos y/o cuantitativos que definan el uso y la funcionalidad de las técnicas a desarrollar para la detección de la adulteración mediante los espectros de leche obtenidos.
- Comparar los resultados obtenidos con las técnicas FT-MIRS y FT-NIRS frente a la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) establecida en la Pontificia Universidad Javeriana.

## 1. GENERALIDADES

Con el objetivo de dar un mayor entendimiento de los procesos de adulteración y análisis de muestras desarrollados, el presente capítulo contextualiza todos los conceptos relativos a las sustancias involucradas en el estudio tales como la leche, el lactosuero, las caseínas y la rennina, así como también la descripción de las técnicas y equipos/herramientas utilizadas.

### 1.1 LECHE Y LACTOSUERO – COMPOSICION E IMPORTANCIA

La leche y el lactosuero son las dos sustancias de interés para el presente estudio, el primero constituye la materia prima que se comercializa y el segundo constituye el adulterante que se está utilizando para modificar la calidad de la leche. La contextualización de los distintos tipos de leche y lactosuero así como las múltiples diferencias composicionales que se pueden presentar por variables como el periodo de lactancia del animal productor, la alimentación, la época del año y el clima para la leche así como el proceso aplicado para la obtención del lactosuero permiten generar un criterio adecuado en la selección de las condiciones y el establecimiento de parámetros para el uso de las técnicas analíticas encaminadas a la detección de adulteración de leche con suero.

### 1.2 LECHE

La leche es un fluido secretado por las hembras de los mamíferos (Bovinos, Bufalinos, Caprinos) con el fin de proporcionar un alto nivel de nutrición en los primeros días de vida de sus crías.<sup>22</sup> Está definida como una enorme matriz o sistema fisicoquímico, con múltiples constituyentes en diferentes estados y fases que coexisten en un delicado equilibrio de fuerzas al borde de la estabilidad. Este hecho ha sido explotado desde hace años con el fin de fabricar productos lácteos mucho antes incluso de conocer y entender el mecanismo científico.<sup>23</sup> En esencia, la leche es una fuente de proteínas, vitaminas, minerales, aminoácidos y lípidos. Las proteínas se encuentran en agregados coloidales, los lípidos se encuentran emulsionados en forma de glóbulos y otros componentes como la lactosa y minerales se encuentran en solución. La cantidad de estos componentes en la leche es dinámica y puede variar por diferentes factores como: la edad del animal productor, la etapa de lactancia, la alimentación y el estado de la ubre.<sup>24</sup>

---

<sup>22</sup> Kelly, A.L. & Larsen, Lotte. Milk biochemistry. Improving the Safety and Quality of Milk. Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition. (2010); p. 3.

<sup>23</sup> Ibid., p. 4.

<sup>24</sup> HAUG, A., HØSTMARK, A.T., y HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition: a review. En: Lipids in Health and Disease. Vol. 6. (Sep. 2007); p. 2.

**1.2.1 Leche cruda.** La leche cruda está definida como el producto de la secreción mamaria normal de animales bufalinos, caprinos y bovinos sanos, obtenida mediante uno o más ordeños higiénicos completos e interrumpidos a la cual no se le ha añadido o sustraído ningún componente y no ha sido sometida a ningún proceso de calentamiento.<sup>25</sup>

**1.2.2 Leche Ultra pasteurizada (UHT).** El procesamiento UHT (*Ultra High Temperature*) corresponde a un proceso de calentamiento de la leche a temperaturas mayores a 130°C (normalmente 140 – 150°C) durante un periodo de pocos segundos (por lo general 2 – 10 segundos) seguido de un envasado aséptico para obtener un producto “comercialmente estéril”.<sup>26</sup> Todos los microorganismos capaces de crecer bajo condiciones normales de almacenamiento son destruidos y bajo dichas condiciones (Alta temperatura y un periodo corto de calentamiento) los cambios físicos, químicos y organolépticos se mantienen al mínimo.<sup>27</sup>

**1.2.3 Leche adulterada.** Una leche se puede considerar adulterada cuando se le han alterado sus condiciones originales, ya sea porque se le han sustraído sus elementos constituyentes y se le han reemplazado o no por otras sustancias, se le han añadido sustancias no permitidas o se le han disimulado/ocultado condiciones deficientes en cuanto a inocuidad y calidad de forma ilegal.<sup>28</sup>

### 1.3 CONSTITUYENTES DE LA LECHE

Tal como se describió en el numeral (1.2) del presente documento, la leche es una enorme matriz con múltiples constituyentes, entre estos se encuentran la lactosa la cual corresponde al glúcido propio de la leche, grasas, proteínas y sales.<sup>29</sup>

**1.3.1 Lactosa.** En términos de concentración, el constituyente dominante es por lo general la lactosa, sin embargo, su presencia varía según la alimentación de la vaca, la etapa de lactancia y del estado de la ubre entre otros. La lactosa es un disacárido que consiste en la unión de galactosa y glucosa por medio de un enlace glicosídico  $\beta$ 1-4,<sup>30</sup> su estructura química se observa en la **figura 1** y el comportamiento del espectro infrarrojo en la región media de la misma se aprecia en la **figura 2**.

---

<sup>25</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC). Norma técnica colombiana (NTC) 399, Op. Cit., p. 3.

<sup>26</sup> MEHTA, R.S. Milk Processed at Ultra-High-Temperatures – A review. En: Journal of Food Protection. Vol. 43. No 3. (Mar 1980); p. 212.

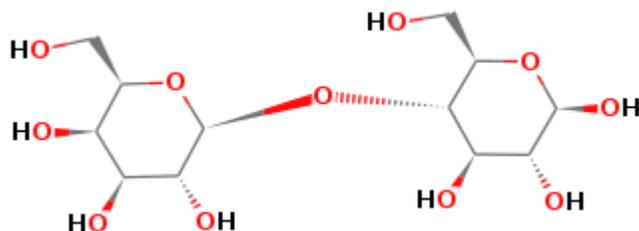
<sup>27</sup> DATTA, N., ELLIOTT, A.J., PERKINS, M.L., y DEETH, H.C. Ultra-High-Temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. En: Australian Journal of Dairy Technology. Vol. 57. No 3. (Oct 2002); p. 211.

<sup>28</sup> MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL. Decreto 616 de 2006, Op.Cit., p. 4.

<sup>29</sup> Kelly, A.L. & Larsen, Lotte. Op. Cit., p. 4.

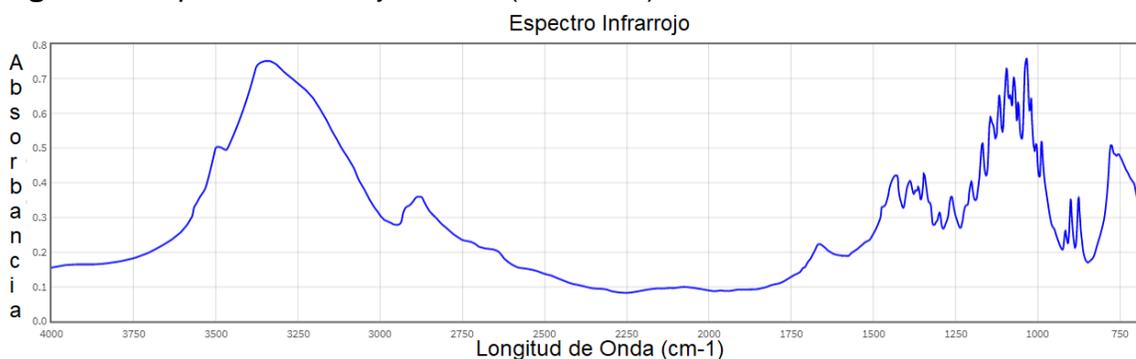
<sup>30</sup> OTTER, D. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition: MILK|Physical and Chemical Properties. Segunda Edición. Editorial: Academic Press, 2003. p. 3961.

**Figura 1.** Estructura química de la lactosa.



**Fuente:** National Institute of Standards and Technology (NIST). Base de Datos de Referencia Estándar del NIST Numero 69. Lactose. U.S. Secretary of commerce. Estados Unidos. Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C63423&Units=SI>.

**Figura 2.** Espectro Infrarrojo medio (FT-MIRS) de la Lactosa.



**Fuente:** National Institute of Standards and Technology (NIST). Base de Datos de Referencia Estándar del NIST Numero 69. Condensed IR lactose spectrum. U.S. Secretary of commerce. Estados Unidos. Disponible en: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C63423&Units=SI>.

**1.3.2 Grasa de la leche.** La segunda sustancia más abundante en la leche es la grasa.<sup>31</sup> Esta se encuentra en forma glóbulos dispersos en emulsión. Las funciones principales de la grasa son como fuente de energía para las crías y como fuente de ácidos grasos (especialmente ácido linoleico) y vitaminas solubles en grasas (A, D, E y K). Los triglicéridos conforman el 98% de la grasa total de la leche y el otro 2% corresponde a diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos, esteroides, fosfolípidos, vitaminas y carotenoides.<sup>32</sup>

<sup>31</sup> Kelly, A.L. & Larsen, Lotte. Op. Cit., p. 5.

<sup>32</sup> OTTER, D. Op. Cit., p. 3958.

**1.3.3 Proteínas.** Las proteínas en la leche bovina componen aproximadamente el 3.5% del contenido total de la leche. Estas tienen la función de brindar a las crías los aminoácidos requeridos para el desarrollo de músculos y otros tejidos. Para cumplir esta labor, las proteínas están diseñadas de modo que forman complejos con una cantidad comparativamente grande de fosfato de calcio ocurriendo en forma de agregados coloidales de gran tamaño llamados micelas de caseína, que coagulan inmediatamente en el estómago de los recién nacidos.<sup>33</sup>

## 1.4 LACTOSUERO

El suero dulce de quesería o lactosuero es una sustancia líquida obtenida del proceso de producción de queso al separar el coágulo de leche, producto de la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína por acción enzimática; contiene más del 50% de los sólidos totales de la leche, incluyendo proteínas, vitaminas, minerales y lactosa.<sup>34</sup> En términos de masa, además de poseer el 50% de los sólidos de la leche, el lactosuero posee el 25% de las proteínas, el 7% de la grasa, el 50% de los minerales y cerca del 95% de la lactosa.<sup>35</sup> Las principales proteínas de suero son  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA) y  $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) con una proporción de 3:1, mientras que las peptonas proteasa, inmunoglobulinas, lactoferrina y la seroalbúmina complementan la composición proteica de este derivado;<sup>36</sup> adicionalmente el lactosuero contiene una fracción hidrófila de la Kappa-caseína llamada Glicomacropéptido la cual constituye entre 20 a 25% de la proteína disuelta en el suero.<sup>37</sup> La composición del lactosuero puede variar en gran medida debido a la tecnología usada para su obtención, el tipo de leche usada y el tipo de queso que se pretenda fabricar.<sup>38</sup> Según esto, se pueden encontrar 2 tipos básicos de lactosuero: 1) Lactosuero dulce, el cual se obtiene cuando la precipitación de caseína se da por acción enzimática y, 2) suero ácido, el cual se obtiene por disminución del pH en la leche.<sup>39</sup>

---

<sup>33</sup> PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. En: Journal of science and technology. Vol. 27. (2005); p. 202.

<sup>34</sup> HERNANDEZ-ROJAS, M., y VELEZ-RUIZ, J.F. Op. Cit., p. 14.

<sup>35</sup> INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Factors affecting the yield of cheese. No 9301 Bruselas. (1991); p. 83.

<sup>36</sup> GRANDA-RESTREPO, D., MEDINA-PINEDA, Y., CULEBRAS-RUBIO, M., y GOMEZ-CLARI, C. Desarrollo y caracterización de una película activa biodegradable con antioxidantes (Alfa-Tocoferol) a partir de las proteínas del lactosuero. En: Revista de la facultad de química farmacéutica – Universidad de Antioquia. Vol. 21. No 1. (2014); p. 12

<sup>37</sup> MOTTA-CORREA, Y., y MOSQUERA, M.W. Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. En: @limentech ciencia y tecnología alimentaria. Vol. 13. No 1. (2015); p. 83.

<sup>38</sup> POVEDA, E. Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. En: Revista Chilena de nutrición. Vol. 40. No 4. (Dic. 2013); p. 398.

<sup>39</sup> Ibid., p. 398.

**1.4.1 Caseína (CN).** Las caseínas son básicamente un grupo de fosfoproteínas que componen entre el 75 al 80% del contenido proteínico total de la leche y se dividen en:  $\alpha_{s1}$ -caseína,  $\alpha_{s2}$ -caseína,  $\beta$ -caseína y  $\kappa$ -caseína, sus principales diferencias residen en sus variantes genéticas, las cantidades variables de residuos fosfoserilo y los diferentes niveles de glicosilación.<sup>40</sup>

**1.4.2 Kappa-Caseína ( $\kappa$ -CN).** La familia  $\kappa$ -CN está compuesta por un componente principal libre de carbohidratos y un mínimo de 6 variantes que representan diversos grados de glicosilación y fosforilación. Esta molécula está compuesta por 169 residuos aminoacídicos y posee un peso molecular de 19.037 u.m.a. El enlace sensible a la hidrólisis con Quimosina (Rennina) ocurre entre los aminoácidos Fenilalanina ( $Phe_{105}$ ) y Metionina ( $Met_{106}$ ). Los productos obtenidos de la hidrólisis corresponden a la Para-Kappa-Caseína (residuos 1-105) y el glicomacropéptido de caseína (residuos 106-169).

**1.4.3 Rennina.** La rennina o quimosina, es una enzima proteasa producida por el cuarto estomago de rumiantes recién nacidos. Esta es secretada en forma de un precursor inactivo: proquimosina, y se activa como quimosina al ser expuesta a un medio ácido. Específicamente escinde el enlace peptídico entre la fenilalanina ( $Phe$ ) 105 y metionina ( $Met$ ) 106 en la cadena de  $\kappa$ -caseína para provocar la coagulación y formación de la para-kappa-caseína (fracción hidrófoba) y el glicomacropéptido de caseína (fracción hidrófila).<sup>41</sup> La presencia de esta enzima en el proceso de fabricación del queso no representa una preocupación para la industria, debido a que la mayor parte de la rennina queda depositada en el lactosuero y durante la cocción del queso se inactiva la enzima que pueda estar presente en este.<sup>42</sup>

---

<sup>40</sup> PHADUNGATH, C. Op. Cit., p. 202.

<sup>41</sup> KUMAR, A., GROVER, S., SHARMA, J., y BATISH, V.K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. En: Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 30. No 4. (2010); p. 243.

<sup>42</sup> HAYES, M.G., OLIVEIRA, J.C., McSWEENEY, P.L., y KELLY, A.L. Thermal inactivation of chymosin during cheese manufacture. En: Journal of Dairy Research. Vol. 69. (2002); p. 269.

**1.4.4 Glicomacropéptido de caseína (c-GMP).** El Glicomacropéptido de caseína (c-GMP) es una fracción heterogénea de péptidos formados por la acción de la quimosina en la  $\kappa$ -caseína. El c-GMP se encuentra en cantidades significativas en el lactosuero dulce producido por hidrólisis enzimática. Se estima que su presencia es de aproximadamente 1.2 a 1.5 g/L constituyendo entre un 15 y 25% de su proteína.<sup>43</sup> La heterogeneidad del c-GMP surge a raíz de las diferencias en las fracciones de carbohidratos y los grupos fosfato unidos a la cadena peptídica.<sup>44</sup> Las glicosilaciones (los carbohidratos unidos a la  $\kappa$ -caseína) se encuentran en las treoninas (*Thr*<sub>131,133,135,142</sub>) y en la serina (*Ser*<sub>141</sub>) a través de enlaces de O-Glicosilación. Cada una de las fracciones de c-GMP con diferentes cadenas de carbohidratos puede ser responsable de diferentes funciones biológicas,<sup>45</sup> algunas de las cuales se explican en el **cuadro 1**.

**Cuadro 1.** Rol de las fracciones de carbohidratos y la cadena peptídica en varias propiedades biológicas del c-GMP.

Propiedad Biológica	Rol de la fracción de carbohidrato	Rol de la cadena peptídica
Inhibición de la toxina de la cólera	✓	
Prevención de infecciones intestinales	✓	
Modulación de la respuesta inmunológica	✓	✓
Inhibición de la hemaglutinación	✓	
Reducción de secreción gástrica		✓
Efecto anticariogénico		✓
Factor Bífido		✓

**Fuente:** NEELIMA, SHARMA, R., RAJPUT, Y.S., y BIMLESH, M. Chemical and functional properties of glycomacropéptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. En: Dairy Science and Technology. Vol. 93. (Ene. 2013); p. 24.

## 1.5 SONICACION

La técnica de sonicación es altamente usada en la industria láctea ya que permite subdividir los glóbulos de grasa y los grumos que se suelen formar cuando la leche no se encuentra en refrigeración y se deja reposar por un periodo de tiempo prolongado.<sup>46</sup> El efecto que genera la aplicación del ultrasonido en la leche con el

<sup>43</sup> EL-SALAM, A., EL-SHIBINY, S., y BUCHHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. En: International Dairy Journal. Vol. 6. (1996); p.327- 328.

<sup>44</sup> Ibid., p. 328-329.

<sup>45</sup> NEELIMA, SHARMA, R., RAJPUT, Y.S., y BIMLESH, M. Op. Cit., p. 21-23.

<sup>46</sup> WU, H., HULBERT, G.H., y MOUNT, J.R. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol. 1. No 3. (Sept. 2000); p. 212.

fin de homogeneizarla se atribuye a la cavitación. Durante el tratamiento se forman burbujas que implosionan dentro del líquido.<sup>47</sup> Este colapso genera ondas de choque que agitan las partículas suspendidas y disminuyen el tamaño de los glóbulos de grasa,<sup>48</sup> este concepto se puede observar más claramente en la **figura 3**, en la cual se presentan micrografías de 3 muestras de leche, las cuales fueron sometidas a homogeneización por ultrasonido durante distintos tiempos y con diferentes potencias, evidenciando que el tratamiento con potencias altas durante periodos cortos logra disminuir en gran medida el tamaño de los glóbulos de grasa.

**Figura 3.** Micrografías de muestras de leche sometidas a ultrasonido en distintos niveles.



Micrografías de muestras de leche: **(a)** sin homogeneización (tamaño promedio de los glóbulos de grasa ~ 4 - 7µm) **(b)** muestra homogeneizada con ultrasonido a 90W por 10 minutos (tamaño promedio de los glóbulos de grasa ~ 2 µm) **(c)** muestra homogeneizada con ultrasonido a 450W por 5 minutos (tamaño promedio de los glóbulos de grasa < 1µm)

**Fuente:** ASHOKKUMAR, M., BHASKARACHARYA, R., KENTISH, S., LEE, J., PALMER, M., y ZISU, B. The ultrasonic processing of dairy products – An overview. En: Dairy of Science and Technology. Vol. 90. (Mar. 2010); p. 152.

## 1.6 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IRS)

La región infrarroja (IR) del espectro electromagnético abarca radiación con valores de frecuencia entre 13333 y 20  $cm^{-1}$ , esta se divide en 3 secciones debido a las características analíticas propias de cada subregión. La primera subregión, llamada infrarroja cercana o próxima constituye el rango de frecuencias entre 4000 a 13333  $cm^{-1}$ , la segunda subregión, llamada infrarroja media está compuesta por frecuencias entre 400 a 4000  $cm^{-1}$  y la tercera subregión conocida como infrarroja lejana compone el rango de frecuencias entre 20 y 400  $cm^{-1}$ .<sup>49</sup> Esta técnica se fundamenta en el hecho de que los enlaces químicos en las moléculas tienen vibraciones que se comportan como un movimiento armónico simple y cuya

<sup>47</sup> ERTUGAY, M.F., SENGÜL, Mustafa, y SENGÜL, Memnune. Effect of Ultrasound Treatment on Milk Honogenisation and Particle Size Distribution of Fat. En: Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. Vol. 28. No 2. (Ene. 2014); p. 305

<sup>48</sup> Ibid., p. 304.

<sup>49</sup> SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Introducción a la espectrometría Infrarroja. Principios de análisis instrumental. Ciudad de México: Cengage Learning, 2008. p. 432 – 433.

frecuencia es una función de la masa de los dos átomos y de la fuerza del enlace.<sup>50</sup> Cuando la frecuencia de vibración de un átomo en la muestra es igual a la frecuencia de la radiación infrarroja dirigida a la molécula, dicha molécula absorbe la radiación y el equipo registrara dicha absorción.<sup>51</sup> Esta técnica está basada en la ley de Beer-Lambert la cual indica que para una muestra líquida homogénea y no dispersante, la concentración de la muestra absorbente es proporcional a la absorbancia de la muestra.<sup>52</sup>

**1.6.1 Tipos de vibraciones moleculares.** Las posiciones relativas de los átomos en una molécula no son fijas, por el contrario, tienden a cambiar constantemente debido a distintas vibraciones. En el caso de una molécula diatómica o triatómica será bastante sencillo definir el número y tipo de vibraciones a las que están sujetos los átomos, sin embargo, en una molécula poliatómica, será difícil, si no imposible, realizar esta determinación, mayormente debido a la gran cantidad de centros de vibración que presentan las moléculas grandes y a la interacción que se puede dar entre estos.<sup>53</sup> Existen 2 tipos básicos de vibración: de tensión y de flexión. En una vibración de tensión ocurre un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, este tipo de vibración se divide en vibración de tensión simétrica y vibración de tensión asimétrica, por otro lado, las vibraciones de flexión consisten en la variación continua en el ángulo entre dos enlaces de un mismo átomo y se subdividen en vibraciones de flexión por tijereteo, balanceo, aleteo y torsión.<sup>54</sup> El comportamiento de cada tipo de vibración y sus divisiones se representa en la **figura 4**.

---

<sup>50</sup> OSBORNE, B.G. Near Infrared Spectroscopy in food analysis. En: Encyclopedia of Analytical Chemistry. (2006); p. 1.

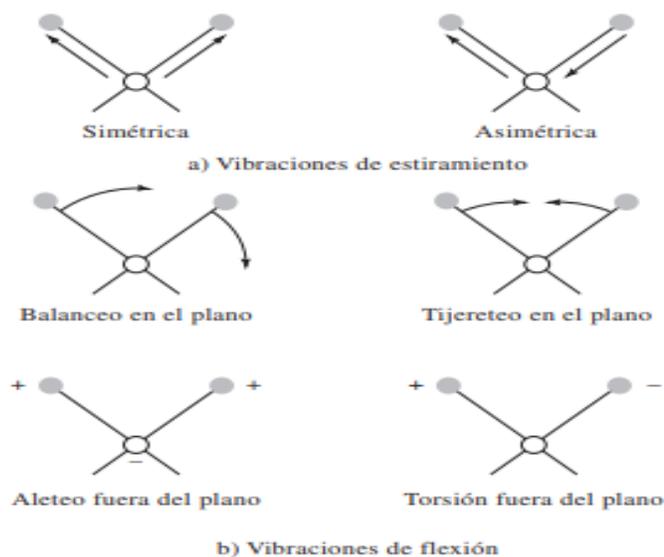
<sup>51</sup> COZZOLINO, D. Advances in food traceability techniques and technologies: Improving food quality throughout the food chain. Rockhampton, Australia: editorial Woodhead Publishing, 2016. p. 120.

<sup>52</sup> Ibid., p. 120.

<sup>53</sup> SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Op. Cit., p. 432 – 433.

<sup>54</sup> Ibid., p. 433.

**Figura 4.**Tipos de vibraciones moleculares.



**Fuente:** SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Introducción a la espectrometría Infrarroja. Principios de análisis instrumental. Ciudad de México: Cengage Learning, 2008. p. 432 – 433.

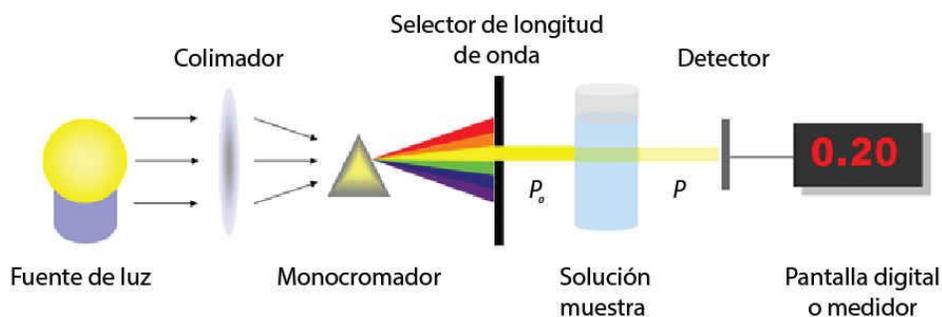
En una molécula que contiene más de dos átomos es posible que se presenten todos los tipos de vibraciones e incluso puede darse un acoplamiento de las vibraciones si estas influyen sobre enlaces con un mismo átomo central. El resultado de este acoplamiento dará lugar a un cambio en las características de la vibración.<sup>55</sup>

**1.6.2 El espectrofotómetro de infrarrojo.** Los espectrofotómetros modernos se caracterizan por poseer tres componentes básicos, los cuales se aprecian en la **figura 5** y corresponden a: la fuente de radiación infrarroja, la cual suministra el haz de radiación que incide sobre la muestra de estudio; un monocromador (el cual se encarga de aislar la energía radiante en sus muchas frecuencias y por medio de una serie de rendijas o aberturas, selecciona la banda estrecha de frecuencias deseadas que incidirá sobre la muestra) o interferómetro; y finalmente el detector el cual recibe el haz de radiación, luego de que este ha interactuado con la muestra y transforma esta banda de frecuencias en una señal eléctrica que será amplificada para ser registrada.<sup>56</sup>

<sup>55</sup> Ibid., p. 433.

<sup>56</sup> CONLEY, R.T. Espectroscopia Infrarroja: El espectrofotómetro de infrarrojo. Boston, massachusetts: Allyn and Bacon Inc, 1972. p. 27.

**Figura 5.** Componentes básicos de un espectrofotómetro de infrarrojo.

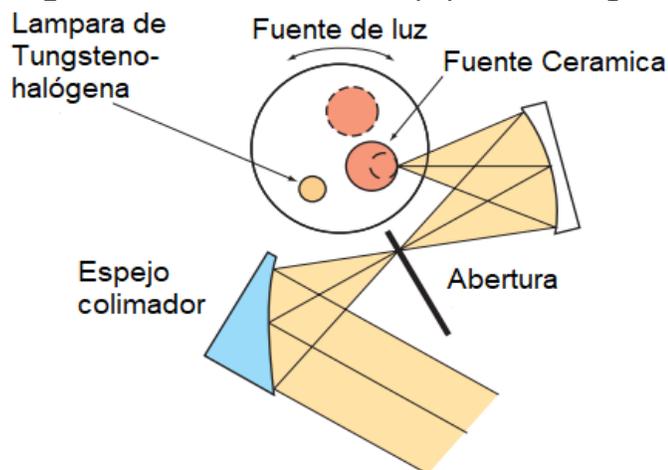


*Adaptado de Heesung Shim*

**Fuente:** FILIP, M.S., MACOCIAN, E.V., TODERAS, A.M., y CARABAN, A. Spectrophotometric Measurements Techniques for Fermentation Process. (En línea). 2012. (Citado: 20 Ago. 2018). Disponible en: <http://imtuoradea.ro/bioethanol/UV.VIS.theory.pdf>

El equipo de espectroscopia infrarroja usado para el desarrollo del presente trabajo es un IRPrestige-21 de Shimadzu el cual cuenta con una fuente de luz cerámica de alta luminiscencia para análisis en el rango medio y una lampara de tungsteno-halógena para mediciones en el rango cercano.<sup>57</sup> La configuración de la fuente de luz en el equipo se presenta en la **figura 6**.

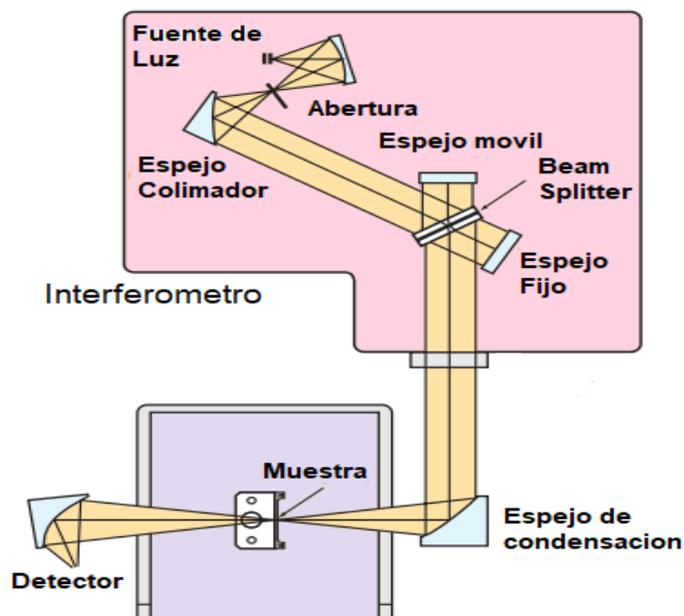
**Figura 6.** Fuente de luz – Equipo IRPrestige-21.



**Fuente:** SHIMADZU. IRPrestige 21 – Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. En línea. (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <http://www.ecopharm.ru/uploads/files/IRPrestige-21.pdf>

<sup>57</sup> SHIMADZU. IRPrestige 21 – Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. (En línea). (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <http://www.ecopharm.ru/uploads/files/IRPrestige-21.pdf>

**Figura 7.** Sistema óptico del equipo IRPrestige-21.



**Fuente:** SHIMADZU. IRPrestige 21 – Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. En línea. (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <http://www.ecopharm.ru/uploads/files/IRPrestige-21.pdf>

El sistema óptico del equipo (ilustrado en la **figura 7**) incluye la fuente de luz, un espejo colimador, un divisor de haz o *Beam Splitter*, el cual es único para el rango de trabajo (ventana de Bromuro de Potasio – KBr para infrarrojo en el rango medio y ventana de Fluoruro de Calcio -  $\text{CaF}_2$  para infrarrojo en el rango cercano)<sup>58</sup>, un espejo fijo, un espejo móvil, un espejo de condensación o convergencia y dos detectores, que, así como los *beam splitters*, son dedicados para cada rango del espectro. Para análisis en el infrarrojo medio el equipo posee un detector DLATGS (*Deuterated Triglycine Sulfate Doped with L-alanine*) y para análisis en el infrarrojo cercano, un detector InGaAs (Indio/Galio/Arsénico).<sup>59</sup> En el **cuadro 2** se lista cada uno de los componentes del equipo y se explica su función específica.

<sup>58</sup> SHIMADZU. IRPrestige 21 – Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. (En línea). (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <http://www.ecopharm.ru/uploads/files/IRPrestige-21.pdf>

<sup>59</sup> SHIMADZU. IRPrestige 21 – Shimadzu Fourier Transform Infrared Spectrophotometer. (En línea). (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <http://www.ecopharm.ru/uploads/files/IRPrestige-21.pdf>

**Cuadro 2.** Componentes del equipo FT-IR IRPrestige-21 del laboratorio de macromoléculas de la Pontificia Universidad Javeriana.

<b>SISTEMA OPTICO</b>	
<b>Componente</b>	<b>Función</b>
Fuente de Iluminación	El instrumento requiere una fuente que emita radiación infrarroja de forma constante y lo suficientemente intensa para ser detectable y que cubra toda la región del espectro deseada. <sup>60</sup>
Espejo Colimador	El espejo colimador recibe el haz de radiación proveniente de la fuente, homogeniza la trayectoria del rayo, lo enfoca y alinea en una dirección diferente, creando un haz paralelo o colimado. <sup>61</sup>
Beam Splitter	El divisor de haz, como su nombre lo indica, divide el haz que incidente en 2 partes que serán reflejadas en el espejo fijo y móvil, regresando al divisor generando un patrón de interferencia que cambia según el desplazamiento del espejo móvil. Este patrón será detectado como variaciones en el nivel de energía infrarroja y finalmente determinará la información espectral. <sup>62</sup>
Espejo Fijo	Este espejo, como su nombre lo dice está fijo por lo que no posee movimiento y trabaja de la mano con el espejo móvil. Cuando el haz de radiación es reflejado por los espejos y regresa al <i>beam splitter</i> , se genera un patrón de interferencia debido a la interacción de ambos haces reflejados. <sup>63</sup>
Espejo Móvil	Este espejo posee movilidad, permitiéndole ajustar su posición para trabajar de la mano con el espejo fijo, ya que, al reflejarse ambos haces de radiación, el patrón de interferencia generado puede ser constructivo si la longitud de onda de ambos es igual o destructivo si son distintas. <sup>64</sup>
Espejo de Condensación	Este espejo está equipado con una función de auto alineación automática que permite obtener siempre la máxima eficiencia para el patrón de interferencia. <sup>65</sup>
Detector	El detector genera una señal como consecuencia de la energía radiante que incide sobre él. Esta señal es transformada en una señal digital que activara el proceso de graficado en el software controlador del equipo. <sup>66</sup>

**Fuente:** Elaboración propia, basado en:<sup>50,51,52,53,54,55,56</sup>

<sup>60</sup> LEYNES, E. INSTRUMENTACION PARA ESPECTROSCOPIA. En línea. (Citado: 26 ago. 2018). Disponible en: [fcq.uach.mx/index.php/docencia/columna-2/material-de-estudio/category/15-analisis-instrumental?download=50:lectura3](http://fcq.uach.mx/index.php/docencia/columna-2/material-de-estudio/category/15-analisis-instrumental?download=50:lectura3)

<sup>61</sup> AZOOPTICS. ¿What is a Collimator?. (En línea). 2013 (Citado: 25 ago. 2018). Disponible en: <https://www.azooptics.com/Article.aspx?ArticleID=541>

<sup>62</sup> HSIEH, H.N. FTIR Instrumentation. (En línea). 2008 (Citado: 26 ago. 2018). Disponible en: <https://studentportalen.uu.se/uusp-filearea-tool/download.action?nodeld=111007&toolAttachmentId=44350>. p.2

<sup>63</sup> Ibid., p. 2.

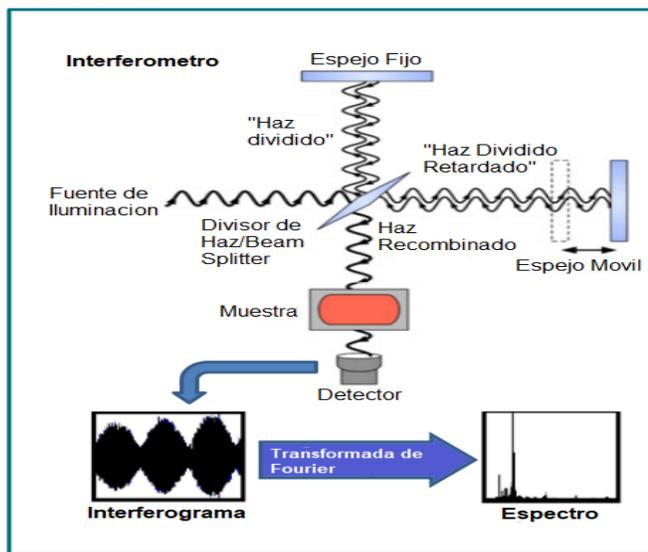
<sup>64</sup> Ibid., p. 2.

<sup>65</sup> SHIMADZU CORPORATION ANALYTICAL AND MEASURING INSTRUMENTS. INSTRUCTION MANUAL USER SYSTEM GUIDE IRPrestige-21 (P/N 206-72010). Shimadzu Fourier transform infrared spectrophotometer. (En línea). (Citado: 26 ago. 2018). Disponible en: <http://www.nanocenter.umd.edu/equipment/nanoopticslab/manuals/optics-03/private/IRPrestige21%20Users%20System%20Guide.pdf>

<sup>66</sup> HSIEH, H.N. Op.Cit., p. 2.

**1.6.3 Interferómetro de Michelson.** Un interferómetro de Michelson está constituido por 2 espejos (móvil y fijo), una fuente de iluminación infrarroja, el *beam splitter* y el espejo colimador. La operación básica del interferómetro consiste en dividir la luz proveniente de una fuente en 2 partes. Cada haz recorre una longitud de trayectoria diferente para después unirse e interferir entre sí,<sup>67</sup> generando un patrón de interferencia o interferograma. **La figura 8** ilustra la configuración básica de un interferómetro de Michelson.

**Figura 8.** Esquema de un interferómetro de Michelson.



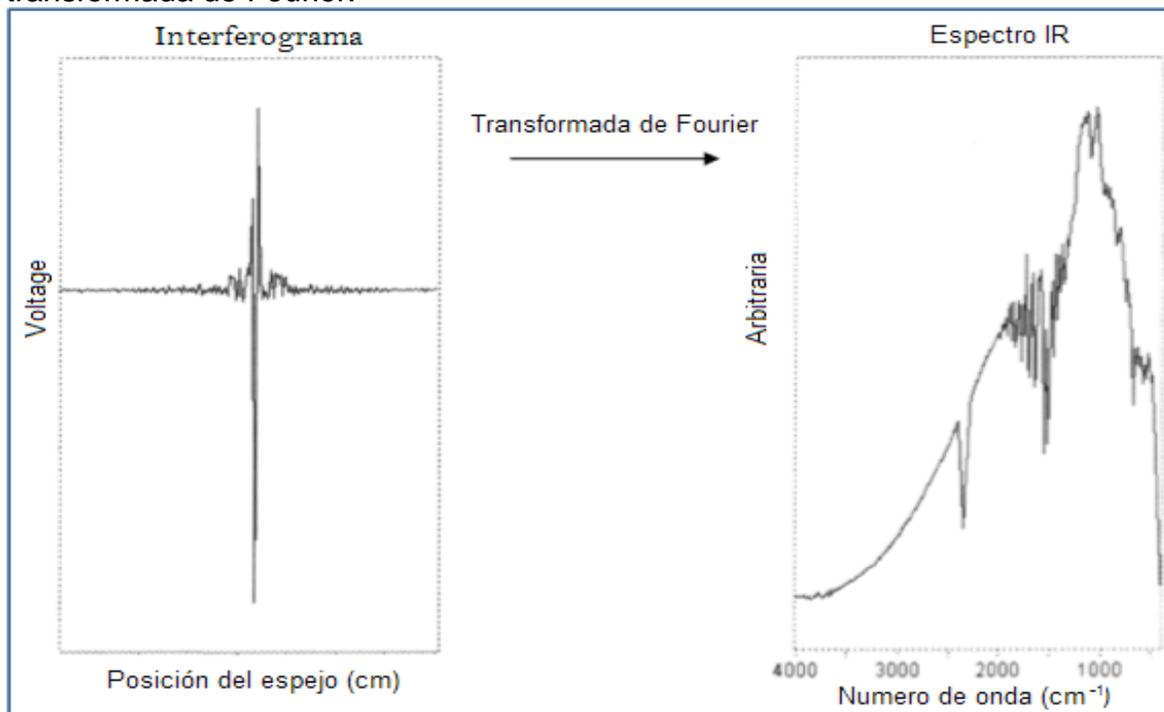
**Fuente:** GENGLER, N. Using (mid-)Infrared spectroscopy methods to measure milk composition, energy balance and beyond in dairy cows. (En línea). 2017. (citado: 13 Oct 2018). Disponible en: <http://sbmaonline.org.br/anais/xii/palestras/2.pdf>

**1.6.4 Transformada de Fourier.** Posteriormente a la obtención del interferograma (el cual representa a las lecturas de la luz de "salida" en función de la posición del espejo móvil) el espectrofotómetro de infrarrojo aplica el método de transformada de Fourier, el cual convierte los datos en bruto obtenidos por el equipo en un espectro fácil de leer.<sup>68</sup> Un ejemplo de un interferograma transformado en un espectro infrarrojo se presenta en la **figura 9**.

<sup>67</sup> PHYSICS IITM. The Michelson Interferometer. (En línea). (Citado: 26 ago. 2018). Disponible en: <http://www.physics.iitm.ac.in/~ph5060/manuals/Michelson.pdf>. p. 1.

<sup>68</sup> MENDEZ, A. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y utilidad en la elucidación de estructuras orgánicas. (En línea). Ene 2018. (citado: 24 Ene 2018). Disponible en:

**Figura 9.** Interferograma convertido en un espectro infrarrojo mediante la transformada de Fourier.



**Fuente:** MENDEZ, A. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) y utilidad en la elucidación de estructuras orgánicas. (En línea). Ene 2018. (citado: 24 Ene 2018). Disponible en: <https://steemit.com/stem-espanol/@anibalmdz/espectroscopia-de-infrarrojo-con-transformada-de-fourier-ftir-y-utilidad-en-la-elucidacion-de-estructuras-organicas>.

**1.6.5 Celdas para IR.** El método de análisis de muestras líquidas por espectroscopia infrarroja involucra depositar la muestra sobre una de las celdas y presionar con la otra para formar una fina película, evitando en el proceso crear burbujas de aire. La película resultante será adecuada para el análisis en el equipo infrarrojo. Luego de realizar la lectura se procede a limpiar las celdas con una solución 3:1 de etanol – acetona. En la actualidad hay una gran variedad de materiales para las celdas, dependiendo del intervalo de transparencia del material, la reactividad con la muestra o el solvente usado.<sup>69</sup> El esquema de celdas para análisis infrarrojo con muestras líquidas se presenta en la **figura 10**.

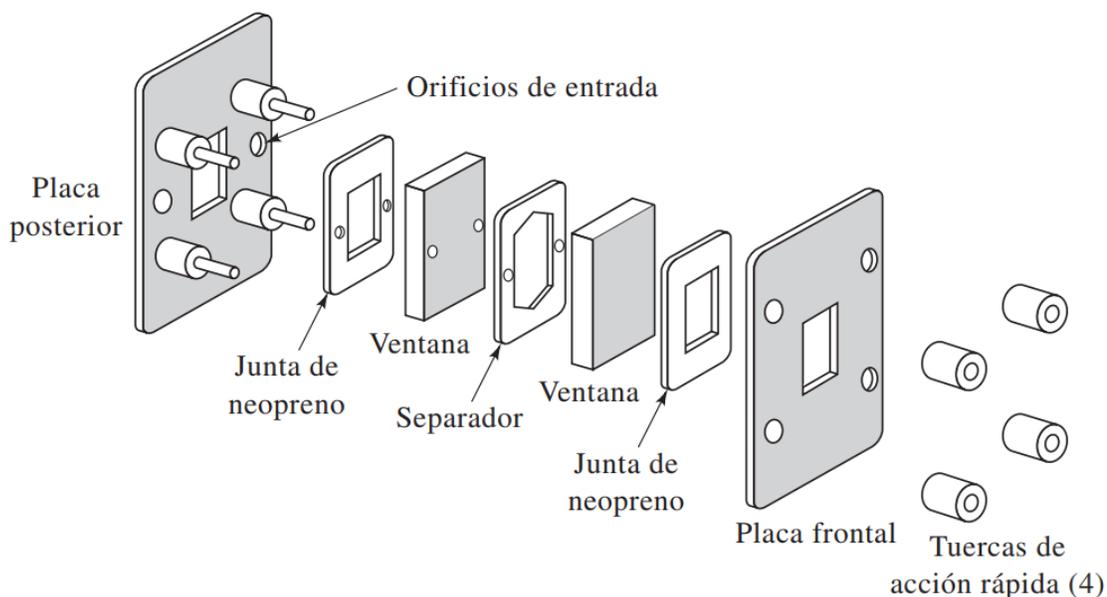
---

<https://steemit.com/stemeespanol/@anibalmdz/espectroscopia-de-infrarrojo-con-transformada-de-fourier-ftir-y-utilidad-en-la-elucidacion-de-estructuras-organicas>.

<sup>69</sup> SHIMADZU CORPORATION ANALYTICAL AND MEASURING INSTRUMENTS. Measurement Methods for Liquid Samples. (En línea). (Citado: 10 sept. 2018). Disponible en: <https://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/talk9/intro.html>

**1.6.4.1 Celda de Seleniuro de Zinc.** Las celdas de seleniuro de zinc son muy utilizadas en espectroscopia infrarroja debido a que no son solubles en agua, tienen una gran resistencia al ataque químico y los solventes orgánicos, ácidos diluidos y bases no la afectan.<sup>70</sup> Además de esto, las pérdidas por reflexión en la región infrarroja son bajas y su rango de trabajo abarca frecuencias desde 15000 – 508  $cm^{-1}$ .<sup>71</sup> Las celdas de Seleniuro de Zinc presentadas en la **figura 11** corresponden a las celdas seleccionadas para el análisis realizado en el presente proyecto.

**Figura 10.** Esquema de celdas IR desmontables para muestras líquidas.



**Fuente:** SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Aplicaciones de la espectrometría Infrarroja. Principios de análisis instrumental. Ciudad de México: Cengage Learning, 2008. p. 457.

<sup>70</sup> BUCK SCIENTIFIC ANALYTICAL INSTRUMENTS. ZnSe (FTIR) Permanent Sealed Liquid Cell. (En línea). (Citado: 10 sept. 2018). Disponible en: <https://buck-scientific-norwalk.myshopify.com/products/znse-ftir-permanent-sealed-liquid-cell>

<sup>71</sup> SPECTRA-TECH. How to select an Infrared Transmission Window. (En línea). (Citado: 10 sept. 2018). Disponible en: [https://kinecat.pl/wp-content/uploads/2012/11/crystal\\_ref.pdf](https://kinecat.pl/wp-content/uploads/2012/11/crystal_ref.pdf)

**Figura 11.** Celdas de Seleniuro de Zinc (ZnSe) usadas en el presente proyecto.



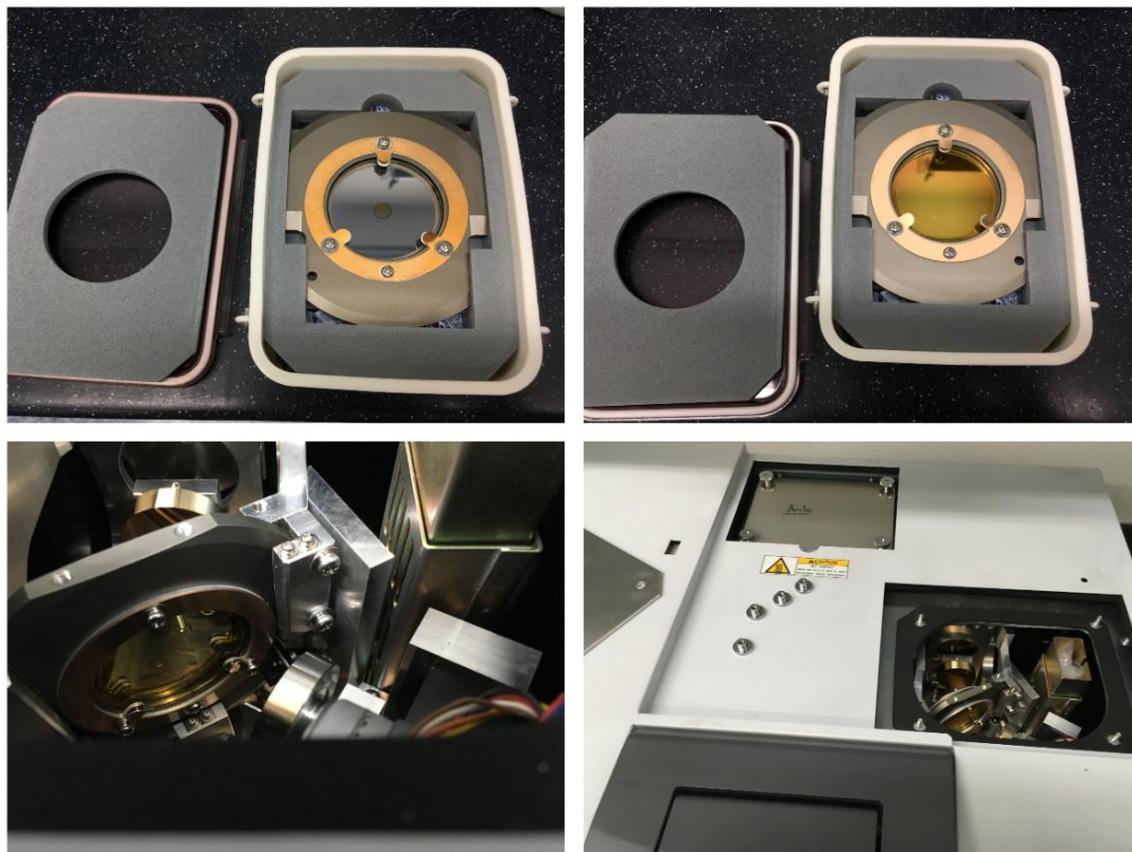
Fuente: Elaboración propia.

**1.6.6 Trayectoria del haz de radiación Infrarroja.** La radiación producida por la fuente infrarroja pasa inicialmente por el divisor de haz o *beam splitter* (ilustrado en la **figura 12**) el cual constituye el corazón del interferómetro.<sup>72</sup> Este refleja la mitad de la luz incidente y transmite la otra mitad. La primera mitad del haz llega al espejo móvil mientras que la segunda mitad llega al espejo fijo, ambos haces son reflejados de vuelta al *beam splitter* donde son nuevamente divididos en una parte que se refleja y una parte que se transmite, en consecuencia, se obtienen 2 haces de salida: uno pasa por la muestra y llega al detector (transductor IR) mientras que el otro regresa a la fuente de radiación (detector de rayo láser).<sup>73</sup> Este proceso se puede observar detalladamente en la **figura 13**.

<sup>72</sup> SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Op.Cit., p. 443.

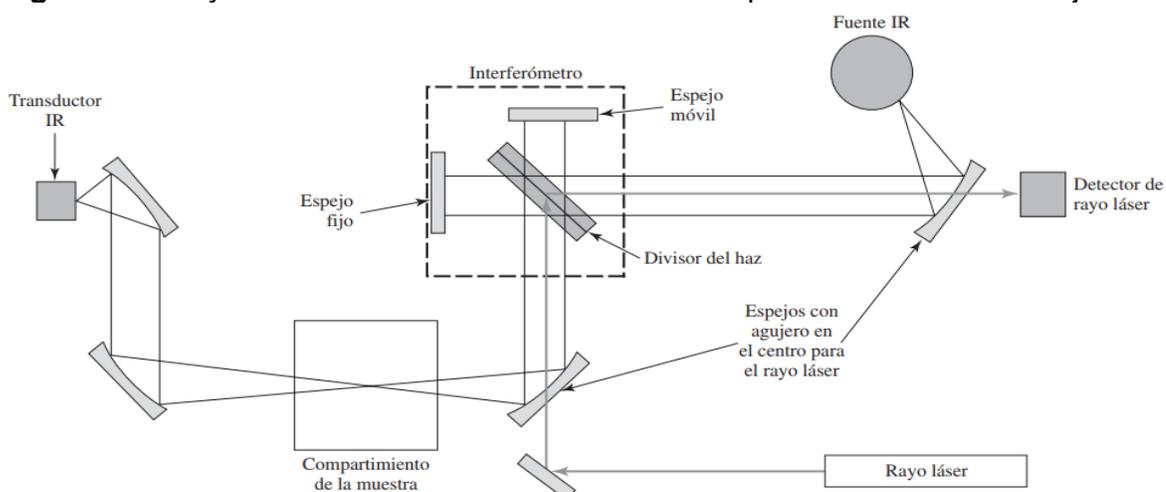
<sup>73</sup> HSIEH, H.N. Op.Cit., p. 2.

**Figura 12.** Divisores de Haz (KBr – izquierda, CaF<sub>2</sub> – derecha) usados en el espectrofotómetro Infrarrojo IRPrestige-21 de la Pontificia Universidad Javeriana.



**Fuente:** Elaboración Propia.

**Figura 13.** Trayectoria del haz de radiación en un Espectrómetro de Infrarrojo.



**Fuente:** SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Introducción a la espectrometría Infrarroja. Principios de análisis instrumental. Ciudad de México: Cengage Learning, 2008. p. 432 – 433.

**1.6.7 Muestras líquidas.** En general, el análisis cualitativo en espectroscopia infrarroja es más común en muestras líquidas puras o soluciones de sólidos. Los líquidos puros son analizados sin disolvente, para evitar la interferencia en la lectura de la muestra análisis y basta con la formación de una película fina formada al depositar un volumen definido de muestra entre las celdas IR con el fin de obtener un espectro que permita identificar la presencia de grupos funcionales.<sup>74</sup>

**1.6.8 Compensación mediante el haz de referencia.** La compensación mediante el haz de referencia o *background* permite eliminar las bandas de absorción atmosférica. Este principio también puede ser aplicado para eliminar las bandas de absorción debidas al solvente usado, al agua u otra sustancia que no sea de interés en la muestra estudio.<sup>75</sup>

## 1.7 TÉCNICAS EXPERIMENTALES COMUNES EN ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Existen diferentes técnicas experimentales para la aplicación de la espectroscopia infrarroja, las cuales se adecuan a las necesidades del investigador. Estas son: **1)** Experimentos en modo de transmisión con discos prensados, **2)** experimentos de reflectancia difusa con muestras en polvo y **3)** estudios de reflectancia total atenuada (ATR) con soluciones acuosas y suspensiones hidratadas.<sup>76</sup>

**1.7.1 Experimentos en modo de transmisión.** El modo de transmisión es el tipo más simple y común de los experimentos de espectroscopia infrarroja. En este, las muestras son disueltas en solventes apropiados o puestas directamente en el porta muestras donde el haz de radiación incidirá sobre las mismas. El detector determina la cantidad de radiación que transmite la muestra. Para obtener solo el espectro de la muestra, se toma previamente el espectro del medio para ser usado como referencia; al analizar la muestra con el medio, el equipo se encarga de relacionar la muestra con la referencia para obtener un espectro limpio.<sup>77</sup> (El equipo IR Prestige-21 de Shimadzu disponible en la Pontificia Universidad Javeriana trabaja con este modo de medición).

La **figura 14** explica el funcionamiento de los experimentos en modo de transmisión; donde  $I_0$  representa la radiación producida por la fuente del equipo antes de

---

<sup>74</sup> CONLEY, R.T. Op. Cit., p. 60

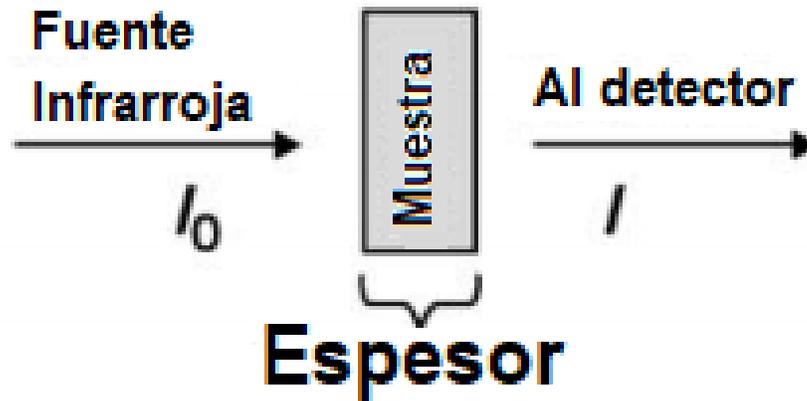
<sup>75</sup> Ibid., p. 65

<sup>76</sup> ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (En línea). 2005. (Citado: 9 Oct. 2018). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125993227500099?via%3Dihub>, p. 82.

<sup>77</sup> Ibid., p. 83.

interactuar con la muestra e  $I$  es la radiación que llega al detector luego de interactuar con la muestra y ser transmitida.

**Figura 14.** Configuración para experimentos en modo de transmisión.

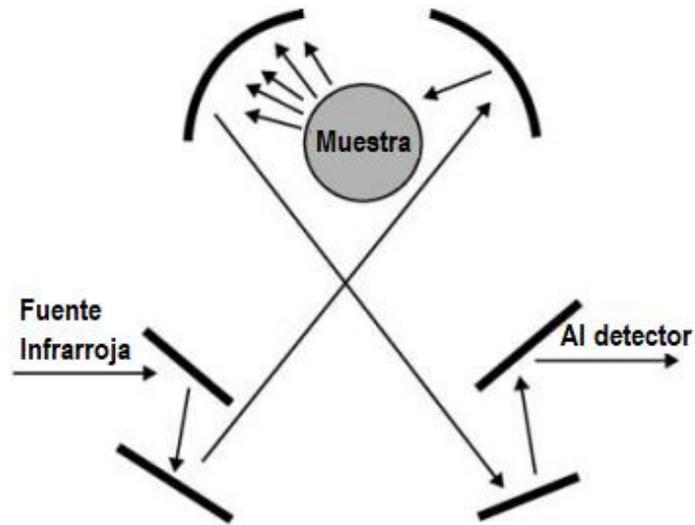


## Modo de Transmisión

**Fuente:** ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (En línea). 2005. (Citado: 9 Oct. 2018). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125993227500099?via%3Dihub>, p. 82.

**1.7.2 Experimentos en modo de Reflectancia Difusa (DRIFT).** El método de reflectancia difusa fue desarrollado con el fin de compensar las falencias del modo de transmisión y extender la espectroscopia infrarroja a diferentes tipos de muestras. Sustancias en forma de polvo o arenilla tienden a dispersar la luz en todas las direcciones de manera difusa. Esta técnica aísla la porción de radiación que es dispersada difusamente de aquella que es transmitida o reflejada especularmente y la usa en la generación de un espectro de reflectancia difusa. La configuración de instrumentos para este tipo de experimento se puede observar en la **figura 15**.

**Figura 15.** Configuración para experimentos en modo de reflectancia difusa.



### Modo DRIFT

**Fuente:** ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (En línea). 2005. (Citado: 9 Oct. 2018). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125993227500099?via%3Dihub>, p. 82.

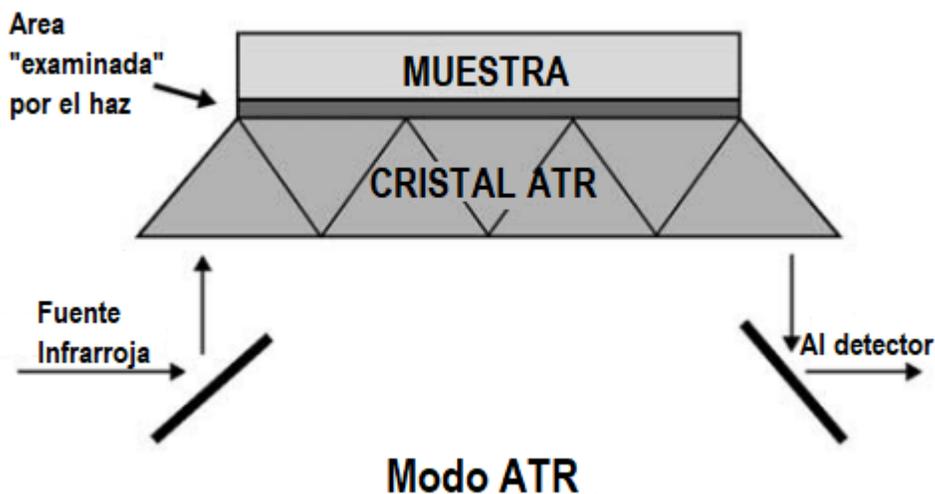
**1.7.3 Experimentos en modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR).** En el método de Reflectancia Total Atenuada (ATR), el haz infrarrojo es dirigido a un cristal ópticamente denso con un índice de refracción alto en un ángulo predeterminado (comúnmente  $45^\circ$ ).<sup>78</sup> Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal, en la muestra que está en contacto íntimo con el mismo. Esta onda evanescente sobresale más allá del cristal y dentro de la muestra apenas unas pocas micras ( $0.5\mu - 5\mu$ ). En las regiones del espectro infrarrojo donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente presentará una alteración o atenuación.<sup>79</sup> La energía atenuada de cada onda evanescente se devuelve al haz infrarrojo, el cual saldrá posteriormente por el extremo opuesto del cristal llegando finalmente al detector del equipo.<sup>80</sup> El procedimiento que sigue el haz generado por el equipo hasta que llega al detector luego de interactuar con la muestra se observa en la **figura 16**.

<sup>78</sup> PERKIN ELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES. FT-IR Spectroscopy Technical Note. Attenuated Total Reflectance (ATR). 2005. p. 2.

<sup>79</sup> Ibid., p. 2.

<sup>80</sup> Ibid., p. 2.

**Figura 16.** Configuración para experimentos en modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR).



**Fuente:** ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (En línea). 2005. (Citado: 9 Oct. 2018). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125993227500099?via%3Dihub>, p. 82.

Para que el análisis por esta técnica sea llevado a cabo satisfactoriamente, se debe cumplir con los siguientes requisitos:

- La muestra debe estar en contacto directo con el cristal ATR, debido a que, dadas sus características, la onda evanescente solo se extiende fuera del cristal entre  $0.5$  y  $5\mu$ .<sup>81</sup>
- El índice de refracción del cristal ATR debe ser significativamente mayor que el de la muestra pues en caso contrario, la reflectancia interna no ocurrirá y la luz en vez de ser reflectada será transmitida.<sup>82</sup>

## 1.8 ANALISIS CUALITATIVO

La espectroscopia infrarroja se ha consolidado como una herramienta de uso cotidiano, la cual permite identificar compuestos orgánicos, determinar la presencia de grupos funcionales y definir la estructura de muestras desconocidas, partiendo de referentes bibliográficos para grupos funcionales, según la frecuencia que ocupan en el espectro.<sup>83</sup>

<sup>81</sup> PERKIN ELMER LIFE AND ANALYTICAL SCIENCES. Op Cit., p. 3.

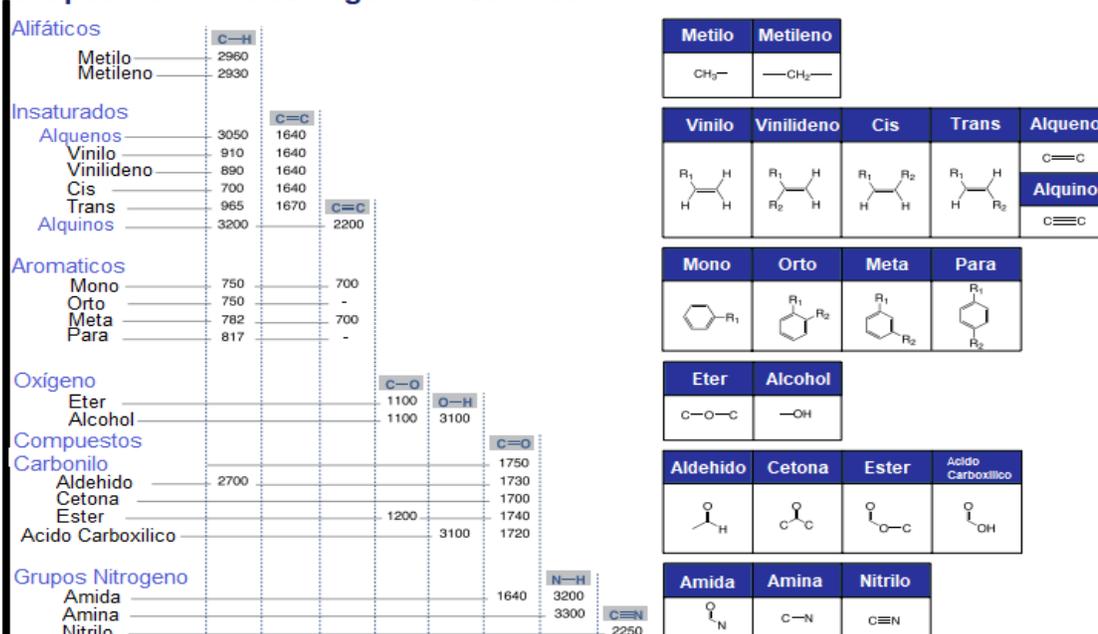
<sup>82</sup> Ibid., p. 3.

<sup>83</sup> SKOOG, A.D., HOLLER, F.J., y CROUCH, S.R. Op Cit., p. 459.

**1.8.1 Frecuencias características de grupo.** Las bandas de absorción asociadas a ciertas unidades estructurales como el  $CH_2$  en un alcano, por ejemplo, tienen vibraciones parecidas a las encontradas en otros alcanos o moléculas orgánicas que también contengan el grupo metileno. Esta repetición en la aparición de bandas, debida a unidades estructurales particulares, ha conducido a la asignación de las llamadas frecuencias características de grupo. Gracias a estas frecuencias se ha podido relacionar ciertas bandas específicas que aparecen de forma regular y específica, con diversas vibraciones de pares de átomos.<sup>84</sup> Un breve ejemplo de las frecuencias de vibración de grupos funcionales dados se da en la **figura 17**.

**Figura 17.** Tabla de grupos funcionales orgánicos básicos para análisis de espectros Infrarrojos.

### Grupos Funcionales Organicos Basicos



**Fuente:** ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. Teachers resource, Introduction to Infrared Spectroscopy (IR). (En línea). 2009. (Citado: 13 Oct 2018). Disponible en: <http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/res00000940/spectroscopy-in-a-suitcase-ir-teacher-resources>.

## 1.9 ANALISIS CUANTITATIVO

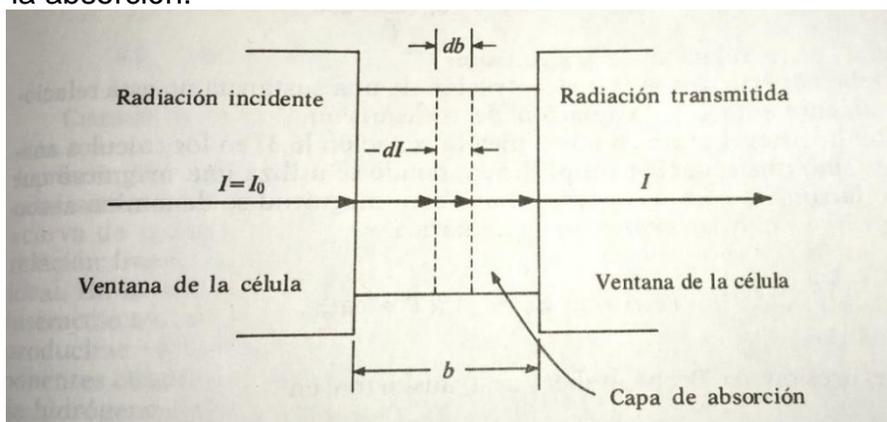
En los últimos años la espectroscopia infrarroja se ha constituido en una técnica confiable y de rutina para el análisis cualitativo de grupos funcionales en muestras variadas. No obstante, no se debe subestimar la utilización de la región infrarroja para mediciones de carácter cuantitativo. La determinación cuantitativa de un

<sup>84</sup> CONLEY, R.T. Op. Cit., p. 90.

componente específico en una mezcla se realiza por comparación de la intensidad de la banda de absorción propia de dicho componente en la mezcla con la misma banda del componente puro en disoluciones de concentración conocida.<sup>85</sup>

**1.9.1 Relación entre la radiación infrarroja que llega al detector y la concentración de la muestra: la ley de Beer-Lambert.** Debido a que todos los métodos espectrofotométricos registran la intensidad relativa de luz que llega al detector o el porcentaje de transmisión de la radiación incidente al pasar por la muestra, es necesario conocer la relación entre la radiación que llega al detector y la concentración del componente en solución antes de realizar un análisis cuantitativo.<sup>86</sup>

**Figura 18.** Disminución de la energía radiante como resultado de la absorción.



**Fuente:** CONLEY, R.T. Espectroscopia Infrarroja: Análisis Cuantitativo. Boston, massachusetts: Allyn and Bacon Inc, 1972. p. 219.

Si se considera el paso de un haz de radiación por una célula como se observa en la **Figura 18**, ( $I_0$ ) representa la cantidad de radiación inicial que pasa a través de  $1 \text{ cm}^2$  de la superficie de la célula por segundo. Considerando un segmento diferencial de la célula ( $db$ ), La disminución de la cantidad de radiación por segundo  $-dI$  en el segmento ( $db$ ) corresponderá a la cantidad de radiación por segundo y por centímetro cuadrado disponible para la absorción, y al número de moléculas capaces de absorber la radiación en dicho segmento, siendo este último dato proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes  $c$ .<sup>87</sup> Esto significa que la espectroscopia infrarroja FTIR calibrada correctamente, puede ser usada como técnica cuantitativa, siguiendo la siguiente relación:  $A = \epsilon bC$ , donde  $A$  es la absorbancia,  $\epsilon$  corresponde al coeficiente de absortividad molar,  $b$  es el espesor de

<sup>85</sup> Ibid., p. 218.

<sup>86</sup> Ibid., p. 219.

<sup>87</sup> Ibid., p. 219- 220

la película formada por la muestra y C es la concentración de la molécula en la muestra.<sup>88</sup>

## 1.10 LECHE EN EL INFRARROJO MEDIO Y CERCANO

A fin de tener una referencia bibliográfica que permita conocer el comportamiento de los espectros infrarrojos de la leche en la región media y cercana, así como establecer la relación entre las especies propias de la leche y cada banda presente en los espectros, se seleccionaron 2 antecedentes en los cuales se documenta una caracterización completa para los espectros en cada región:

**1.10.1 Caracterización del espectro de la leche en la región media.** C. Grelet et al.<sup>89</sup> Llevaron a cabo un estudio de estandarización del espectro infrarrojo medio de la leche a partir de una red de industrias lecheras europea. Este estudio presenta las características más destacables del espectro de la leche, la discriminación individual de los picos o bandas infrarrojas y su relación con las especies propias de la leche. La **figura 19** presenta el espectro estandarizado obtenido; cada banda presente en este espectro se explica detenidamente mediante el **cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Grupos funcionales característicos del espectro Infrarrojo medio de la leche.

Especie	Grupo Funcional		Numero de onda ( $cm^{-1}$ )	Observaciones
Lactosa	Alcoholes primarios	C - O	1045	Vibración de estiramiento del C - O (ancha y fuerte).
	Alcoholes Secundarios	C - O	1076	Vibración de estiramiento del C - O (ancha y fuerte).
		C - H		N/A
		C - C		N/A
	Éteres	C - O - C	1157	Vibración de estiramiento asimétrica del C - O - C, intensa.
1250				

<sup>88</sup> ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Op Cit., p. 82.

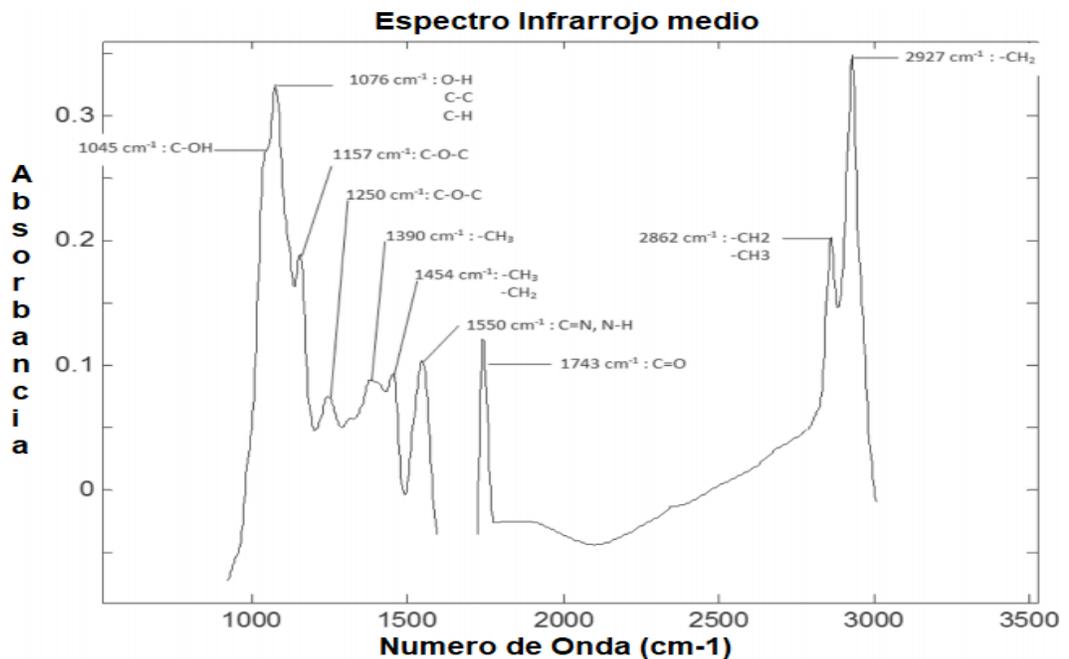
<sup>89</sup> GRELET, C., PIERNA, J.A., DARDENNE, P., BAETEN, B., DEHARENG, F. Op. Cit., p. 3 – 5.

**Cuadro 3.** (Continuación).

Especie	Grupo Funcional		Numero de Onda	Observaciones
Proteína	Amidas	C - N	1690 - 1650	A la vibración de estiramiento de carbonilo se la conoce como banda de amida I. La deformación N - H se conoce como vibración de amida II.
		N - H	1600 - 1550	
Grasa	Alcanos	CH <sub>2</sub>	1390 - 1454	Flexión del C - H; aguda.
		CH <sub>3</sub>		Deformación simétrica del C - H.
		CH <sub>2</sub>	2862 - 2927	Vibración simétrica del átomo de H; independiente del tamaño de la molécula.
		CH <sub>3</sub>		vibraciones de estiramiento asimétrica y simétrica del C - H.
	Esteres	C = O	1745 - 1725	Vibración de estiramiento del C = O

**Fuente:** CONLEY, R.T. Espectroscopia Infrarroja: Análisis Cualitativo. Boston, massachusetts: Allyn and Bacon Inc, 1972. p. 90 – 178.

**Figura 19.** Espectro Infrarrojo medio de la leche.



**Fuente:** GRELET, C., PIERNA, J.A., DARDENNE, P., BAETEN, B., DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. En: Journal of Dairy Science. Vol. 98. No 4. (Abr 2015); p. 5.

**1.10.2 Caracterización del espectro de la leche en la región cercana.** De igual manera, S. Kasemsumran et al.<sup>90</sup> Llevaron a cabo un estudio en el cual se buscaba determinar la adulteración de leche cruda con agua y lactosuero. Este estudio presenta, entre otros, el comportamiento del espectro infrarrojo cercano para la leche (**figura 20**), así como los grupos funcionales y/o especies a las que pertenecen las bandas obtenidas, datos que se representan en el **cuadro 4**.

**Cuadro 4.** Grupos funcionales característicos del espectro Infrarrojo cercano de la leche.

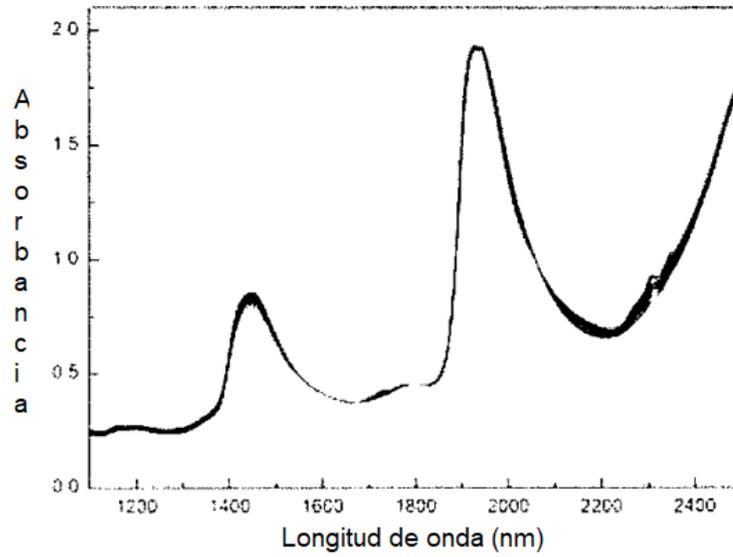
Especie	Grupo Funcional		Longitud de onda (nm)	Observaciones
Agua	Hidroxilo	O - H	1450	Vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas del agua.
Agua	Hidroxilo	O - H	1900	Combinación de vibraciones de estiramiento y flexión del agua.
Proteína y lactosa	-	-	2300 - 2400	sobretonos y bandas de combinación de proteínas y lactosa – esta banda crece en intensidad por la presencia de lactosuero.

**Fuente:** KASEMSUMRAN, S., THANAPASE, W., y KIATSOONTHON, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. En: Analytical sciences: the international journal of japan society for analytical chemistry. Vol. 23. No 7. (Jul 2007); p. 908.

---

<sup>90</sup> KASEMSUMRAN, S., THANAPASE, W., y KIATSOONTHON, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. En: Analytical sciences: the international journal of japan society for analytical chemistry. Vol. 23. No 7. (Jul 2007); p. 908.

**Figura 20.** Espectro Infrarrojo cercano de la leche.



**Fuente:** KASEMSUMRAN, S., THANAPASE, W., y KIATSOONTHON, A. Feasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. En: Analytical sciences: the international journal of japan society for analytical chemistry. Vol. 23. No 7. (Jul 2007); p. 908.

## 2. IMPLEMENTACION DE LA METODOLOGIA

Con el propósito de lograr la detección de leche adulterada con lactosuero por medio de una metodología que sea rápida, versátil y potencialmente más económica que otras técnicas dedicadas para este tipo de análisis, el presente capítulo contiene la revisión de dichas técnicas generando una comparación entre sus principales ventajas y desventajas orientadas a las necesidades/requisitos de la metodología que se desea desarrollar. Igualmente se establecen las condiciones para preparación y análisis de muestras.

### 2.1 SELECCIÓN DE LA TECNICA ANALITICA

En la actualidad existen gran variedad de métodos aplicados a la detección de leche adulterada con suero dulce de quesería, entre los cuales se encuentran la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (*HPLC*), el ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*ELISA*), el Inmunoensayo *Western Blot*, la Electroforesis Capilar y la Espectroscopia Infrarroja. Técnicas que han sido reportadas por varios autores a nivel internacional, demostrando la capacidad analítica de detectar esta práctica fraudulenta.

**2.1.1 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (*HPLC*).** Esta técnica emplea diversas formas de separación como intercambio iónico, permeación de gel, interacción hidrofóbica y fase reversa (*RP*), las cuales han cobrado importancia en la separación y cuantificación de proteínas lácteas, gracias a su versatilidad.<sup>91</sup> Para la detección de leche adulterada con lactosuero, esta técnica se enfoca en la estimación de glicomacropéptido de caseína el cual es aislado mediante el tratamiento de las muestras con ácido tricloroacético (TCA) y detectado a 210 nm.<sup>92</sup>

**2.1.2 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*ELISA*).** El test de *ELISA* es una técnica usada para detectar y cuantificar sustancias como: péptidos, proteínas, hormonas y anticuerpos. Basa su funcionamiento en la unión de un antígeno con un anticuerpo acoplado a una enzima. Este conjunto se incuba con un sustrato y se evalúa la actividad de la enzima.<sup>93</sup>

Con el fin de detectar el GMP, el cual corresponde al marcador de la adulteración de leche con lactosuero, se usa un anticuerpo de conejo anti-GMP y se construyen

---

<sup>91</sup> NEELIMA, SHARMA, R., RAJPUT, Y.S., y MANN, B. Op. Cit., p. 35.

<sup>92</sup> OLIEMAN, C., y VAN RIEL, J.A.M. Detection of rennet whey solids in skim milk powder and buttermilk powder with reversed-phase HPLC. En: Netherlands milk and dairy journal. Vol. 37 (1983); p. 172 – 173.

<sup>93</sup> THERMOFISHER SCIENTIFIC. ¿What is ELISA (Enzyme Linked Immunosolvent Assay)? (En línea). (Citado: 23. Sept. 2018). Disponible en: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

curvas de calibración con los datos obtenidos para las leches adulteradas a distintas concentraciones.<sup>94</sup>

**2.1.3 Inmunoensayo *Western Blot*.** El *Western Blot (WB)* es una técnica inmunológica usada ampliamente para la detección de proteínas específicas. Las proteínas nativas en una muestra se separan por medio de electroforesis con gel y luego son transferidas a una membrana, donde las proteínas de interés son detectadas por anticuerpos específicos.<sup>95</sup> Su aplicación en la detección de leche adulterada con lactosuero se da mediante la separación por electroforesis de las proteínas en la muestra (la cual ha sido tratada previamente con TCA con el fin de precipitar la  $\kappa$ -caseína) para luego realizar una electro-transferencia de las proteínas separadas a una membrana que se incubaba en una solución de *western blot* la cual contiene el anticuerpo anti-GMP. Al final de este proceso se realiza el revelado del *blot*.<sup>96</sup>

**2.1.4 Electroforesis Capilar.** La separación de las proteínas de la leche mediante electroforesis capilar es una de las técnicas más ampliamente aplicadas en la autenticación de productos lácteos. Tanto los patrones de la caseína como los de las proteínas del suero en la electroforesis capilar pueden ser usados para confirmar la autenticidad del producto. La detección de lactosuero en leche se puede llevar a cabo mediante la utilización de un buffer citrato de sodio con un límite de detección de sólidos de suero del 0.4% y la detección se dará a una longitud de onda aproximada de 214nm.<sup>97</sup>

---

<sup>94</sup> BREMER, M., KEMMERS-VONCKEN, A., BOERS, E., FRANKHUIZEN, R., y HAASNOOT, W. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of bovine rennet whey power in milk powder and buttermilk powder. En: *International Dairy Journal*. Vol. 18. No. 3. (Mar. 2008); p. 295-296.

<sup>95</sup> GWOZDZ, T., y DOREY, K. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Chapter 6: *Western Blot*. Manchester, U.K. Academic Press, 2016.

<sup>96</sup> CHAVEZ, N.A., SALINAS, E., JAUREGUI, J., PALOMARES, L.A., y MACIAS, K. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. En: *Food and Agricultural Immunology*. Vol. 19. No 4. (Dic. 2008); p. 266-267.

<sup>97</sup> KVASNICKA, F. Capillary electrophoresis in food authenticity. En: *Journal of separation science*. Vol. 28. (Mar. 2005); p. 821.

**2.1.5 Espectroscopia Infrarroja.** Como se estableció en el numeral (1.6) del presente documento, esta técnica aprovecha que los enlaces químicos en las moléculas tienen vibraciones que se comportan como un movimiento armónico simple,<sup>98</sup> por lo cual, al dirigir radiación infrarroja a una muestra de estudio, está la absorbe si se cumple que la frecuencia de vibración de uno de sus enlaces sea igual a la frecuencia de la radiación infrarroja incidente. Esta absorción es detectada, registrada y discriminada.<sup>99</sup>

A fin de dar mayor claridad, el **cuadro 5** contiene información acerca de las condiciones de análisis, el analito indicativo y las ventajas y desventajas de cada técnica, permitiendo realizar una comparación entre ellas.

**Cuadro 5.** Comparación de técnicas analíticas aplicables para detección de leche adulterada con lactosuero.

Método	Condiciones de análisis	Analito Indicativo	Ventajas	Desventajas
(HPLC)	<b>Detector de luz UV de longitud de onda variable:</b> Configurado a 210nm. <b>Columna:</b> Fase reversa a base de sílice (Diámetro interno: 7,5 x 0.46 cm). <b>Horno de columna:</b> Configurado a temperatura de 35°C. <sup>100</sup>	c-GMP	Versatilidad para el análisis de múltiples muestras (Posibilidad de automatización). <sup>101</sup>  Método altamente sensitivo y preciso. <sup>102</sup>	Transformación de la muestra (Tratamiento con TCA). <sup>103</sup>  Tiempo de análisis prolongado. <sup>104,105</sup>  Elevados costos. <sup>106</sup>

<sup>98</sup> OSBORNE, B.G. Op. Cit., p. 1

<sup>99</sup> COZZOLINO, D. Op. Cit., p. 120.

<sup>100</sup> OLIEMAN, C., y VAN RIEL, J.A.M. Op. Cit., p. 173.

<sup>101</sup> POONIA, A., JHA, A., SHARMA, R., SINGH, H.B., KUMAR, A., y SHARMA, N. Op. Cit., p. 6.

<sup>102</sup> FERREIRA, I., CAÇOTE, H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. En: Journal of Chromatography A. Vol. 1015. No 2. (10 Oct 2003); p. 117.

<sup>103</sup> REGLAMENTO (CE) N° 213/2001. Anexo XVIII – Investigación del suero de leche en polvo en la leche desnatada en polvo destinada al almacenamiento público mediante determinación de los glicomacropéptidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (CLHP). Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 2001.

<sup>104</sup> MÜNSTEDT, T., RADEMACHER, E., y PETZ, M. HPLC, CHARM II and ELISA: Advantages and Disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey. En: Apimondia Journal. Vol. 40. (2005); p. 8.

<sup>105</sup> HERNANDEZ, A.V., y PEÑA, C.S. Propuesta para el control de la adulteración en leche cruda con la adición de lactosuero por medio de una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en Alquería. Bogotá D.C. (2016). Trabajo de grado. Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías.

<sup>106</sup> MÜNSTEDT, T., RADEMACHER, E., y PETZ, M. Op. Cit., p. 8.

**Cuadro 5.** (Continuación).

Método	Condiciones de análisis	Analito Indicativo	Ventajas	Desventajas
ELISA	<p><b>Procesado de muestras:</b> tratamiento con ácido tricloroacético (TCA).</p> <p><b>Desarrollo de sándwich ELISA:</b> Recubrimiento de microplatos con 50µL de buffer carbonato conteniendo 1 mg/L de anticuerpo purificado anti-GMP. Adición de 50µL de muestra y posterior agitación. <b>Detección de GMP:</b> Adición de anticuerpo anti-GMP biotinilado. Adición de 50 µL de buffer citrato.</p> <p><b>Detención de desarrollo de color:</b> Adición de 50 µL de 2 mol/L de <math>H_2SO_4</math>. Lectura de Absorbancia en un lector de platos ELISA a 490 nm.<sup>107</sup></p>	c-GMP	<p>alta sensibilidad y especificidad, Método Rápido y fácilmente automatizado, Procesamiento de un gran número de muestras y medición de muestras “ciegas” en un mismo microplato.<sup>108</sup></p>	<p>Obtención de falsos positivos debidos a la incapacidad del ELISA para distinguir entre sustancias/ alimentos estrechamente relacionados.<sup>109</sup></p> <p>La selección y/o obtención de anticuerpos adecuados representa el problema principal de la técnica.<sup>110</sup></p> <p>Transformación de la muestra (Tratamiento con TCA).<sup>111</sup></p>

<sup>107</sup> CHAVEZ, N.A., JAUREGUI, J., PALOMARES, L.A., MACIAS, K.E., JIMENEZ, M., y SALINAS, E. A highly sensitive sandwich ELISA for the determination of glycomacropeptide to detect liquid whey in raw milk. En: Dairy science and technology. Vol. 92. (2012); p. 125.

<sup>108</sup> ZACHAR, P., SOLTÉS, M., KASARDA, R., NOVOTNY, J., NOVIKMEKOVÁ, M., y MARCINCAKOVÁ, D. Analytical methods for the species identification of milk and milk products. En: Mjlekarstvo / Dairy. Vol. 61. No 3. (Jul 2011); p. 201 – 204.

<sup>109</sup> TAYLOR, S.L., NORDLEE, J.A., NIEMANN, L.M., y LAMBRECHT, D.M. Allergen Immunoassays – Considerations for use of naturally incurred standards. En: Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 395. (Sept 2009); p. 85 – 86.

<sup>110</sup> POONIA, A., JHA, A., SHARMA, R., SINGH, H.B., KUMAR, A., y SHARMA, N. Op. Cit., p. 4.

<sup>111</sup> CHAVEZ, N.A., JAUREGUI, J., PALOMARES, L.A., MACIAS, K.E., JIMENEZ, M., y SALINAS, E. Op. Cit., p. 124

**Cuadro 5.** (Continuación).

Método	Condiciones de análisis	Analito Indicativo	Ventajas	Desventajas
<i>Western Blot</i>	<p><b>Separación electroforética SDS-PAGE:</b> 1.5h a 80V, buffer de corrida.</p> <p><b>Trasferencia:</b> 2h a 100 mAmp., buffer de transferencia</p> <p><b>Incubación en solución <i>Western Blot</i>:</b> solución contenedora del anticuerpo anti-GMP - dilución (1:1000), 40 min., agitación continua.</p> <p><b>Revelado:</b> adición de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbecidina (TMB).<sup>112</sup></p>	c-GMP	Reportes de sensibilidad mucho mayor a otras técnicas usadas para la detección de adulteración con lactosuero. <sup>113</sup>	<p>Transformación de la muestra (Tratamiento con TCA).<sup>114</sup></p> <p>La presencia de k-CN incluso a nivel de traza puede generar falsos positivos.<sup>115</sup></p> <p>Procedimiento que exige periodos de tiempo prolongados y personal experimentado.<sup>116</sup></p>
Electroforesis Capilar	Capilar de sílice fundida sin recubrimiento (570x0.05mm de diámetro interno), 40°C, + 30kV, citrato de sodio 20mM, pH 3.5, detección a 214nm. <sup>117</sup>	c-GMP	Alta eficiencia y resolución, bajo consumo de solventes y corto tiempo de análisis. <sup>118</sup>	Interferencia debida a la proteólisis que se genera en la leche almacenada. (Falso positivo). <sup>119</sup>

<sup>112</sup> CHAVEZ, N.A., SALINAS, E., JAUREGUI, J., PALOMARES, L.A., y MACIAS, K.E. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by *Western blot* immunoassay. En: Food and Agricultural Immunology. Vol. 19. No 4. (2008); p. 267.

<sup>113</sup> Ibid., p. 271.

<sup>114</sup> Ibid., p. 267.

<sup>115</sup> NEELIMA, SHARMA, R., RAJPUT, Y.S., y BIMLESH, M. Op. Cit., p. 33.

<sup>116</sup> Ibid., p. 33.

<sup>117</sup> KVASNIČKA, F. Capillary Electrophoresis in Food Authenticity. En: Journal of Separation Science. Vol. 28. No. 10. (Jun 2005); p. 821.

<sup>118</sup> NEELIMA., SHARMA R., RAJPUT, Y.S., y MANN, B. Op. Cit., p. 33.

<sup>119</sup> Ibid., p. 33.

**Cuadro 5.** (Continuación).

Método	Condiciones de análisis	Analito Indicativo	Ventajas	Desventajas
(FT-IRS)	<p><b>Establecimiento de condiciones de lectura:</b> Lectura de espectros en el rango de 400 a 5000 <math>cm^{-1}</math>.</p> <p><b>Compensación mediante el haz de referencia:</b> Eliminación de las bandas del agua.</p> <p><b>Lectura.</b> A una resolución de 8 <math>cm^{-1}</math>.<sup>120</sup></p>	(Grasa, Proteína y Caseína). <sup>121</sup> Lactosa. <sup>122</sup>	Metodología Sencilla, no destructiva y requiere tiempos cortos para el análisis. <sup>123</sup>	<p>No constituye una técnica cuantitativa si no ha sido debidamente calibrada y/o se utilizan equipos especiales.<sup>124</sup></p> <p>Uso de software para desarrollo de análisis multivariado si se desea cuantificar (SIMCA, PCA, PLSR).<sup>125</sup></p>

**Fuente:** Elaboración propia, basado en:<sup>98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125</sup>

**Cuadro 6.** Criterios de evaluación para la selección diferentes técnicas.

Método	¿tiempo de análisis corto?	Económico	Pre-tratamiento de muestras	¿Presenta Interferencia?	uso de solventes
HPLC			✓		✓
ELISA			✓	✓	
Western Blot			✓	✓	
Electroforesis Capilar	✓		✓	✓	✓
Espectroscopia Infrarroja	✓	✓			

**Fuente:** Elaboración Propia.

Luego de una revisión bibliográfica de las posibles técnicas aplicables a la detección de adulteración de leche con lactosuero, se seleccionó la Espectroscopia Infrarroja

<sup>120</sup> GRELET, C., PIERNA, J.A., DARDENNE, P., BAETEN, B., DEHARENG, F. Standardization of milk mid-infrared spectra from a European dairy network. En: Journal of Dairy Science. Vol. 98. No 4. (Abr 2015); p. 3 – 5.

<sup>121</sup> CASSOLI, L.D., SARTORI, B., y MACHADO, P.F. The use of the Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Determine Adulterants in Raw Milk. En: Revista Brasileira de Zootecnia. Vol. 40. No 11. (2011); p. 2592 – 2594.

<sup>122</sup> RAMIREZ, A.O., RAMIREZ, M.P., MACUIL, R., y LOPEZ, M. Análisis de Leche Adulterada con Suero en Polvo y Líquido por Espectroscopia de Infrarrojo. (En línea). (Citado: 14 Oct 2018). Disponible en: [http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos\\_anexo/20080679\\_6033.pdf](http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20080679_6033.pdf)

<sup>123</sup> SANTOS, P.M., PEREIRA-FILHO, E.R., y RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Op. Cit., p. 24.

<sup>124</sup> ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Op. Cit., p. 82.

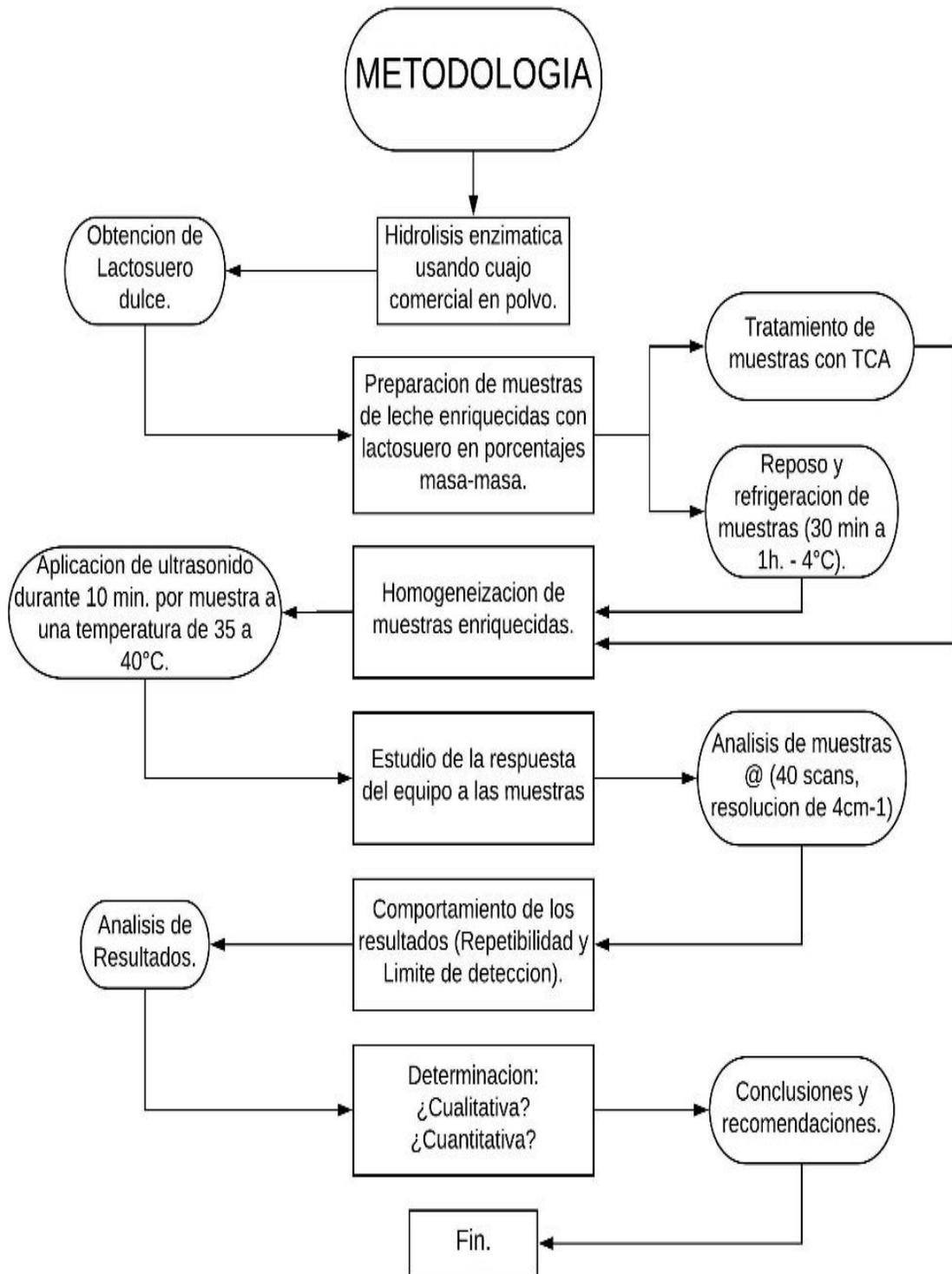
<sup>125</sup> SANTOS, P.M., PEREIRA-FILHO, E.R., y RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Op. Cit., p. 22 – 24.

(FT-IR) en modo de TRANSMISION ya que, según se puede observar en el **cuadro 6**, es una técnica versátil y práctica, permitiendo realizar lecturas con gran rapidez sin necesidad de realizar un tratamiento previo de las muestras y constituyéndola en una técnica no-destructiva. Estas cualidades (Practicidad, tiempos de análisis cortos y economía) engloban el enfoque de la metodología que se busca desarrollar y solo se encuentran juntas en la Espectroscopia Infrarroja. Esta técnica también ofrece otras ventajas como ser la única que no requiere tratamiento de muestras o el uso de solventes. Todo lo nombrado anteriormente, así como el hecho de que a día de hoy no haya muchos antecedentes publicados acerca de la aplicación de esta técnica en la detección de adulteración de leche con lactosuero, representa la oportunidad de aportar desarrollo a los avances existentes y llegar a obtener una metodología que logre determinaciones de carácter cualitativo y/o cuantitativo.

## **2.2 SELECCION DE CONDICIONES PARA EL ANALISIS**

A fin de clarificar el proceso general de obtención de muestras adulteradas y su análisis, la **figura 21** resume el paso a paso de la metodología llevada a cabo en el presente proyecto.

Figura 21. Diagrama de la metodología experimental para el presente proyecto.



Fuente: Elaboración propia.

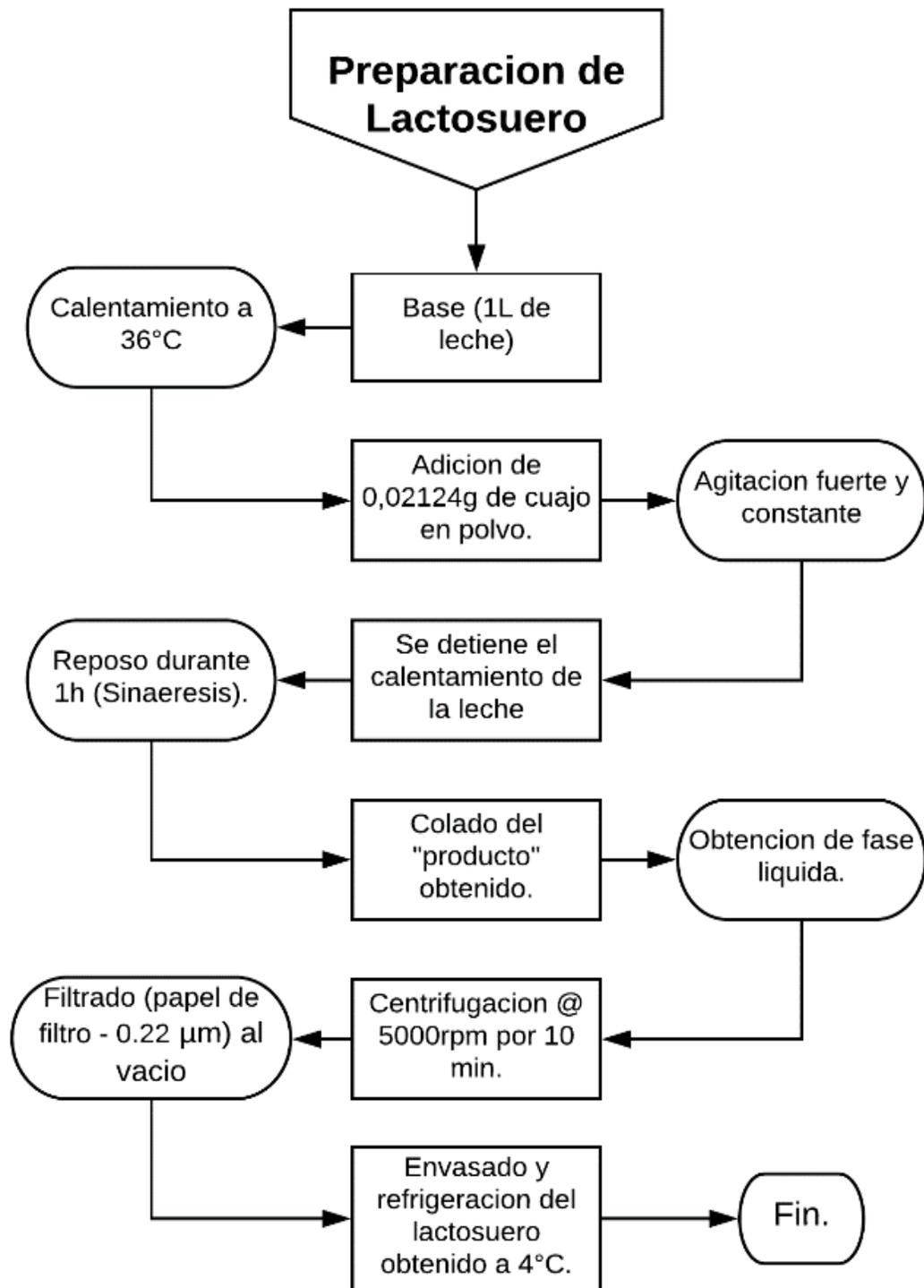
**2.1.1 Preparación del lactosuero.** La leche cruda fresca utilizada tanto para la preparación del lactosuero como para la preparación de las muestras a analizar fue provista por el laboratorio de Macromoléculas de la Pontificia Universidad Javeriana. Con el fin de generar la coagulación de la leche se usó cuajo comercial en polvo, cuyo contenido de 1,597g por sobre permite cuajar 75L de leche. Para la preparación se usó una base de 1L, la cual debe calentarse a una temperatura aproximada de 36°C previo a la adición del cuajo ya que por debajo de 20°C la actividad enzimática es muy leve y por encima de 65°C es totalmente inactiva.<sup>126</sup> Posterior al calentamiento se añaden 0,02124g (cantidad que corresponde al volumen de leche que se quiere cuajar) y se agita fuertemente durante la adición, hecho esto, se retira la leche del calentamiento y se deja descansar alrededor de una hora para que la sinéresis<sup>127</sup> se lleve a cabo. Pasado este tiempo se separa el precipitado del sobrenadante con un colador. El lactosuero obtenido debe ser centrifugado a 5000 rpm por 10 min. para remover el cuajo que no haya sido removido en el primer proceso de separación y filtrado nuevamente usando papel de filtro con tamaño de poro de 0.22µm y al vacío. El lactosuero resultante se almacena en recipientes de vidrio y se mantiene en refrigeración (4°C). Este proceso se ilustra mediante el diagrama presentado en la **figura 22**.

---

<sup>126</sup> TROCH, T., LEFÉBURE, E., BAETEN, V., COLINET, F., GENGLER, N., y SINDIC, M. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. En: *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. Vol. 21. No 4. (2017); p. 278.

<sup>127</sup> *Ibid.*, p. 278.

Figura 22. Diagrama de preparación de lactosuero.



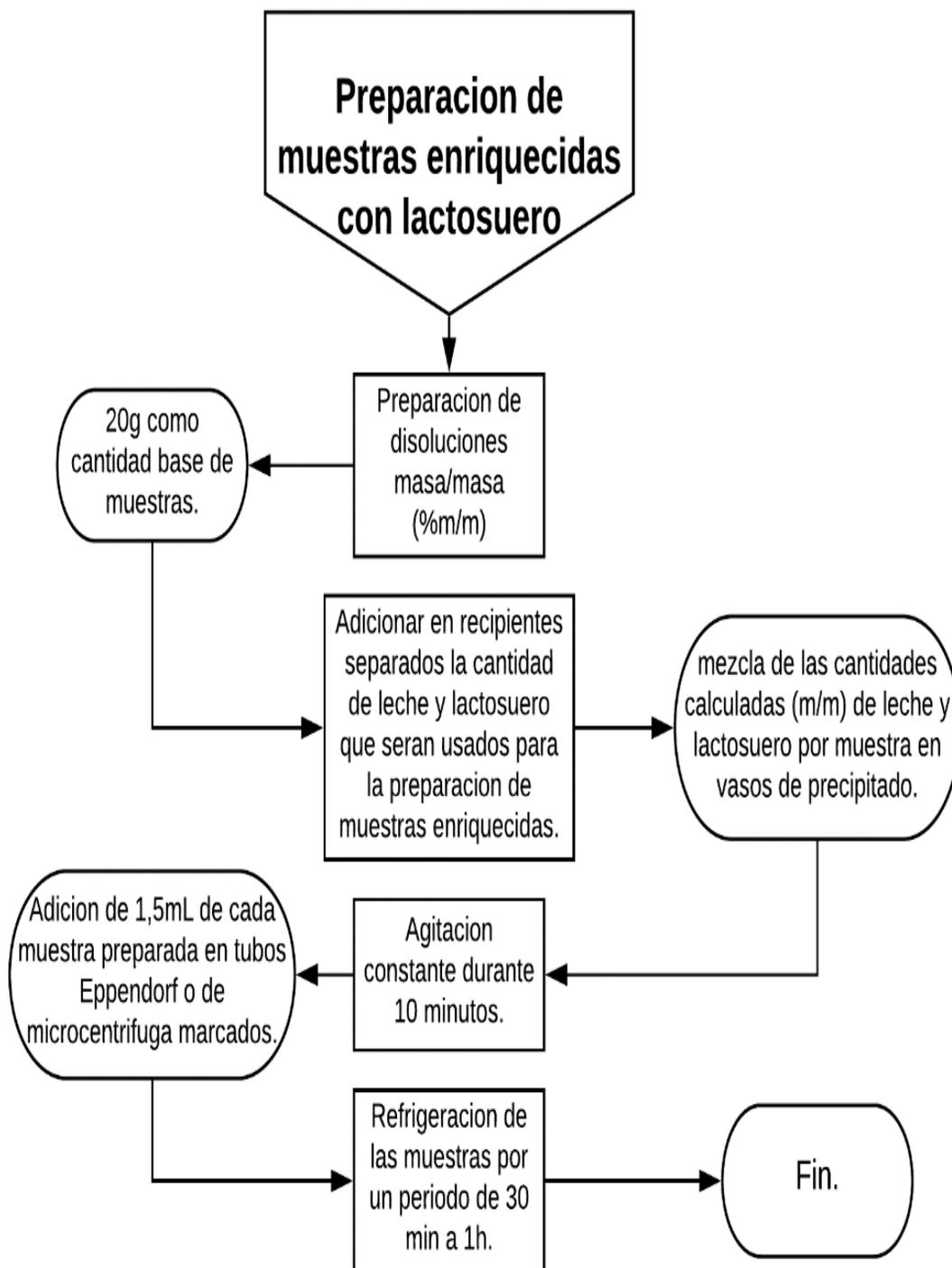
Fuente: Elaboración propia.

**2.1.2 Preparación de muestras enriquecidas con lactosuero.** Las muestras adulteradas se dividen en 2 grupos dependiendo de la leche usada. Estos grupos corresponderán a Leche cruda A y Leche Comercial B. El enriquecimiento de las muestras con Lactosuero se llevó a cabo en porcentajes masa/masa (%m/m), esto siguiendo las recomendaciones establecidas en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas – Reglamento (CE) N° 213/2001, el cual en su anexo XVIII establece una metodología para la detección de leche adulterada con lactosuero por medio de una Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).<sup>128</sup> El proceso de adición de lactosuero a la leche se realizó tomando como base 20g de muestra, preparando las disoluciones con los distintos niveles de adulteración en periodos de máximo 30 minutos por ensayo (entendiendo por ensayo el grupo individual de muestras adulteradas a analizar). Previo análisis las muestras adulteradas se mantuvieron en reposo y refrigeración a 4°C por un periodo de 30 minutos a 1 hora. El paso a paso de este procedimiento se ilustra en el diagrama presentado en la **figura 23**.

---

<sup>128</sup> REGLAMENTO (CE) N° 213/2001. Anexo XVIII. Op. Cit.

**Figura 23.** Diagrama de preparación de muestras enriquecidas con lactosuero.



**Fuente:** Elaboración propia.

**2.1.3 Tratamiento de muestras con TCA.** Para muestras biológicas que contienen bajas concentraciones de proteína, el enriquecimiento de estas es un paso crítico con el fin de obtener cantidades suficientes según la necesidad del estudio a realizar. Existen gran variedad de métodos para el enriquecimiento y purificación de proteínas (Preparación de Muestras con Ayuda de Filtro para Proteómica – FASP<sup>129</sup> y Ensayos de Precipitación de Proteínas mediado por Aptámeros<sup>130</sup>), no obstante, cada método tiene sus propias restricciones. Durante la preparación de muestras, se ha convertido en una práctica común el uso de reactivos orgánicos con el fin de precipitar las proteínas, lo que permite remover elementos que generen interferencia tales como polisacáridos, taninos y alcaloides entre otros. Entre estos reactivos orgánicos, el Acido Tricloroacético es de los más utilizados para precipitación de proteínas, ya que la precipitación mediada por este reactivo, es independiente de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas.<sup>131</sup> El modo de acción del TCA consiste en la eliminación de la capa de hidratación que rodea las proteínas y la reemplaza por el radical fuertemente no polar ( $Cl_3C - C$ ) Eliminando su solubilidad en agua.

El tratamiento de muestras con este reactivo consiste en generar una solución 2:1 leche – TCA (24%) y dejar en reposo por aproximadamente una hora, pasado este tiempo se centrifuga el producto obtenido a 3000 rpm por 10 minutos y se usan filtros con tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m para obtener las muestras que serán analizadas. Para el tratamiento de las muestras llevado a cabo en el presente estudio se tomó como base un volumen de 20 mL de leche, al cual le corresponde un volumen de 10 mL de TCA.

**2.1.3 Baño de ultrasonido.** Pasado el periodo de reposo, se depositan 1.5 mL de cada muestra adulterada en tubos de microcentrífuga o Eppendorf marcados para aplicar ultrasonido. El equipo se inicia antes de ingresar las muestras con el fin de alcanzar una temperatura promedio entre 35 y 40°C, posteriormente se ajusta para aplicar ultrasonido por periodos de 10 minutos por muestra. Este pretratamiento se aplica con el fin de disminuir el tamaño promedio de los glóbulos de grasa en la leche y generar una mayor homogeneidad de la muestra<sup>132</sup> eliminando factores que

---

<sup>129</sup> ERDE, J., OGORZALEK, R.R., y LOO, J.A. Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample recovery for Quantitative Proteomic Experiments. En: Journal of Proteome Research. Vol.13. No 4. (Abr 2014); p. A.

<sup>130</sup> KIM, K., LEE, S., RYU, S., y HAN, D. Efficient Isolation and Elution of Cellular Proteins using Aptamer-mediated Protein Precipitation Assay. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 448. (2014); p. 114.

<sup>131</sup> NGO, A.N., EZOULIN, M., YOUM, I., y YOUAN, B. Optimal Concentration of 2,2,2-Trichloroacetic Acid for Protein Precipitation Based on Response Surface Methodology. En: Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques. Vol. 5. No 4. (2014); p. 1.

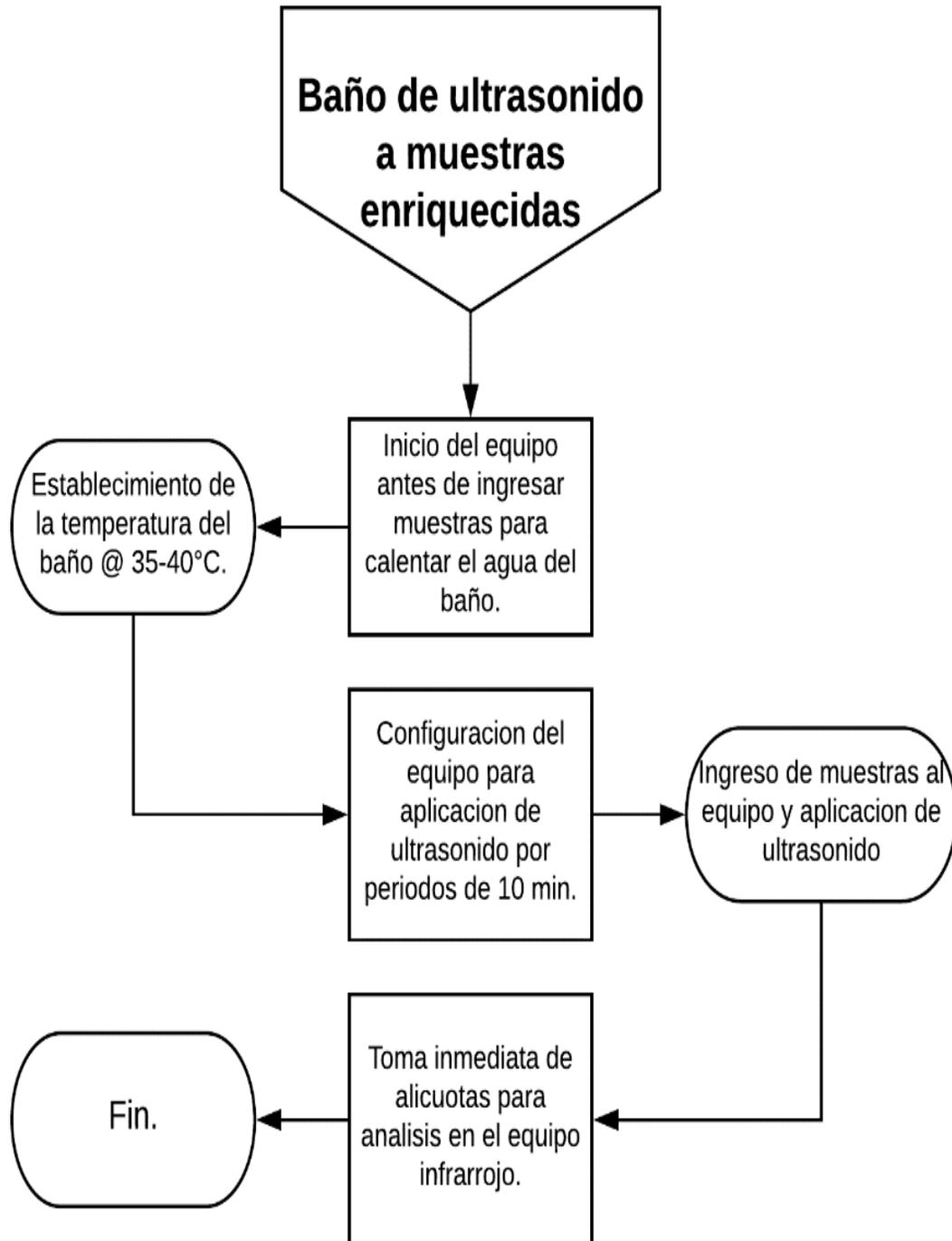
<sup>132</sup> ERTUGAY, M.F., SENGÜL, Mustafa, y SENGÜL, Memnune. Op. Cit., 305 – 306.

puedan generar aleatoriedad en el análisis. (este procedimiento se explica de forma precisa mediante el diagrama de la **figura 24**), pues según lo establecido en el **numeral (1.2)** del presente documento la leche no es una solución totalmente homogénea y mantenerla fuera de refrigeración por periodos prolongados de tiempo genera que la grasa se separe y forme glóbulos visibles en la superficie, los cuales, aun con su tamaño promedio normal ( $\sim 4 - 7\mu\text{m}$ )<sup>133</sup> pueden intervenir con las lecturas realizadas en el equipo de infrarrojo.

---

<sup>133</sup> ASHOKKUMAR, M., BHASKARACHARYA, R., KENTISH, S., LEE, J., PALMER, M., y ZISU, B. The ultrasonic processing of dairy products – An overview. En: Dairy of Science and Technology. Vol. 90. (Mar. 2010); p. 152.

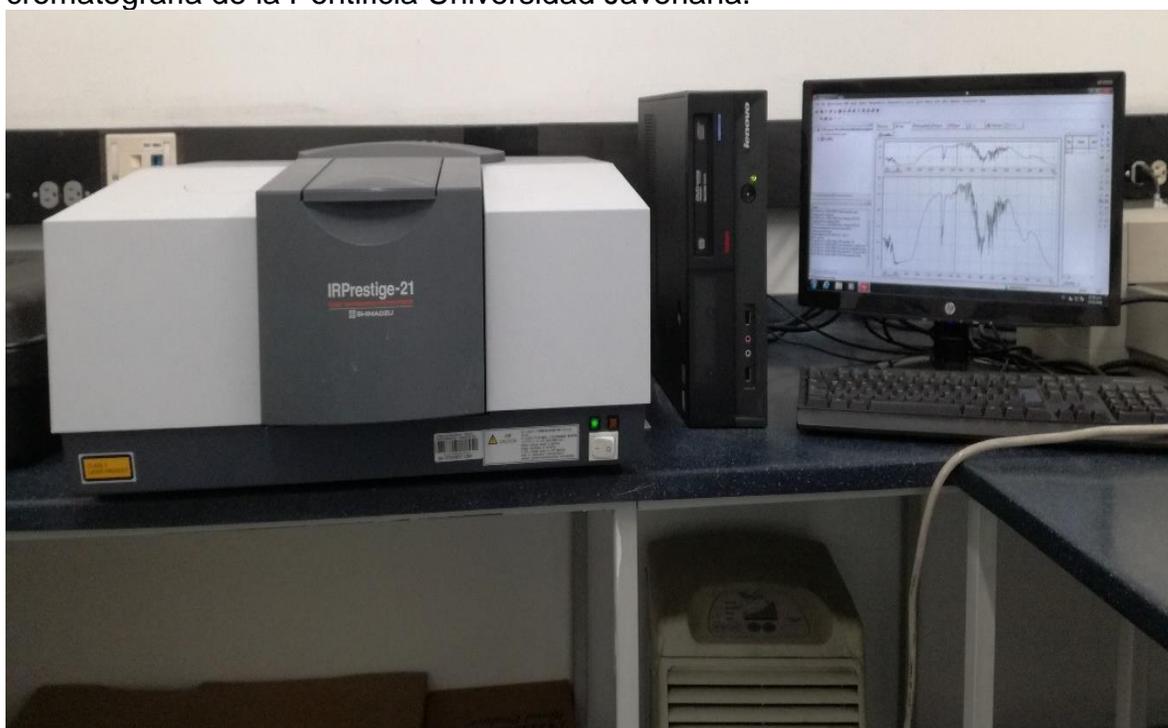
**Figura 24.** Diagrama del proceso de aplicación de ultrasonido a muestras enriquecidas.



**Fuente:** Elaboración propia.

**2.1.4 Equipo de espectroscopia infrarroja IRPrestige-21 de Shimadzu.** El equipo de Infrarrojo utilizado para el estudio se ilustra en la **figura 25**. Se encontraron reportes dirigidos al estudio de adulteración de leche por medio de espectroscopia infrarroja en los que se establecen condiciones variadas para la lectura de las muestras: B.M.A. de Carvalho et al.<sup>134</sup> Proponen una combinación de 16 *scans* por muestra y una resolución espectral de  $16\text{cm}^{-1}$ , por otra parte, P.M. Santos et al.<sup>135</sup> Proponen una combinación de 128 *scans* por muestra y una resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ . Teniendo esto en cuenta y considerando las condiciones de medición por defecto del equipo IR-Prestige-21 (20 *scans* por muestra y resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ ) se optó por duplicar la cantidad de *scans* que tiene configurado el equipo por defecto y mantener la resolución, con lo cual, todos los espectros presentados en el presente estudio fueron obtenidos con 40 *scans* por muestra y resolución de  $4\text{cm}^{-1}$ . Todas las condiciones de medición establecidas para la lectura de las muestras se observan de forma organizada mediante el diagrama presentado en la **figura 26**.

**Figura 25.** Espectrofotómetro infrarrojo SHIMADZU IRPrestige-21 del laboratorio de cromatografía de la Pontificia Universidad Javeriana.



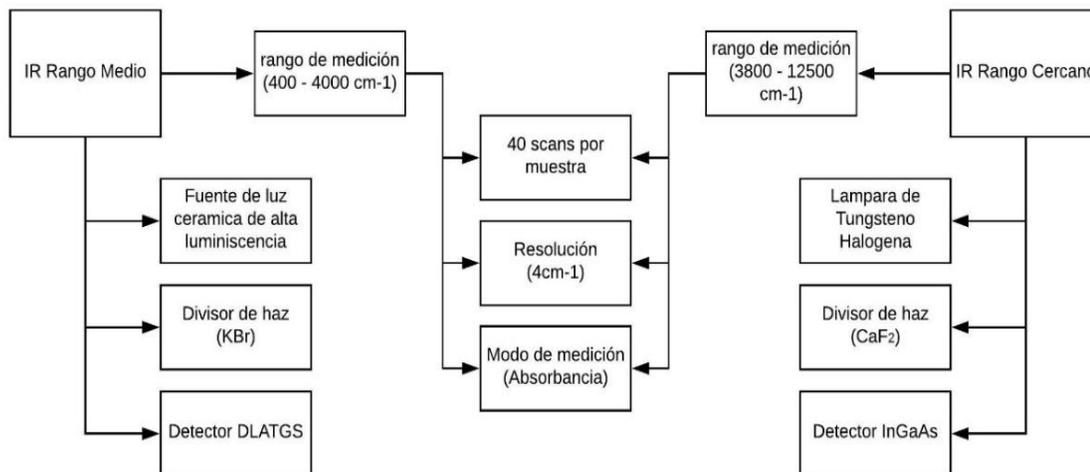
**Fuente:** Elaboración propia.

---

<sup>134</sup>

<sup>135</sup> SANTOS, P.M., PEREIRA-FILHO, E.R., y RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Op. Cit., p. 20.

**Figura 26.** Condiciones del equipo IRPrestige-21 para análisis de muestras.



**Fuente:** Elaboración propia.

**2.1.5 Selección de alícuota depositada en las celdas de análisis.** El análisis de muestras líquidas en espectroscopia infrarroja requiere que el espesor de la película de muestra sea constante con el fin de controlar la aleatoriedad en los resultados y poder realizar un análisis cuantitativo.<sup>136</sup> De acuerdo a esto se estableció un valor de volumen constante para la alícuota depositada en la celda. Se probaron alícuotas de leche en un rango desde 5µL hasta 15µL y se estableció un volumen fijo de 10µL para los análisis llevados a cabo en el presente proyecto, esto debido a que alícuotas con menor volumen no llegaban a crear una película de muestra completa y uniforme a lo largo de toda la celda y alícuotas con mayor volumen generaban un desbordamiento, generando una pérdida de la muestra con lo que el volumen analizado se convertía en un valor incierto.

**2.1.6 Compensación mediante solución referencia (*Background*).** Para el estudio de la matriz láctea se escogió agua como solución de fondo o background, debido a que la leche está compuesta en su mayoría por agua (87% aproximadamente),<sup>137</sup> por lo cual la remoción de las bandas de esta, genera espectros más nítidos, permitiendo observar las demás especies en el espectro de la leche con mayor claridad.

<sup>136</sup> SHIMADZU CORPORATION ANALYTICAL AND MEASURING INSTRUMENTS. Measurement Methods for Liquid Samples. (En línea). (Citado: 11 sept. 2018). Disponible en: <https://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/talk9/intro.html>

<sup>137</sup> LU, M., y WANG, N.S. Spoilage of milk and dairy products. En: The microbiological quality of food. (Nov. 2016); p. 151.

## 2.3 FASES DEL ANALISIS DE MUESTRAS

Con base en la información brindada en los capítulos 1 (Generalidades) y 2 (Implementación de la metodología) se decidió dividir el análisis en 3 fases, las dos primeras constituyen la pre-experimentación, durante las cuales se busca estandarizar la metodología, eliminando cualquier factor que pueda generar aleatoriedad en los resultados y la tercera fase corresponde a la experimentación llevada a cabo con la metodología establecida por medio de las 2 fases anteriores. El **cuadro 7** describe cada fase a desarrollar.

- La primera fase consiste en la determinación de la respuesta de la técnica frente a las muestras de leche tratadas y sin tratar con TCA, esto permitirá observar si el comportamiento de los espectros obtenidos corresponde a los espectros presentes en bibliografía.
- La segunda fase corresponde al análisis de la repetibilidad en los resultados obtenidos. Esta fase permitirá determinar si la metodología es reproducible, según se mantengan las condiciones técnicas (preparación de muestras y equipos utilizados) y prácticas (forma de analizar las muestras líquidas y manipulación por parte del investigador) establecidas en el presente estudio.
- La tercera fase analizará el comportamiento de los espectros obtenidos para los distintos niveles de adulteración en búsqueda de picos/bandas que demuestren un comportamiento sistemático, el cual pueda relacionarse con las diferentes cantidades de lactosuero presentes en las muestras.

**Cuadro 7.** fases establecidas para el desarrollo de la experimentación.

<b>Fases</b>	<b>Análisis realizado</b>	<b>descripción</b>
<b>Fase 1</b>	Estudio de respuesta de la técnica a las muestras.	Comparación de los resultados obtenidos por el equipo IRPrestige-21 de Shimadzu con el espectro de la leche reportado en bibliografía.
<b>Fase 2</b>	Análisis de repetibilidad y límite de detección.	Comparación de espectros repetidos de una misma muestra con el fin de observar la repetibilidad obtenida por el equipo IRPrestige -21 de Shimadzu.
<b>Fase 3</b>	Determinación de la adulteración.	Comparación de los espectros de muestras enriquecidas a distintos niveles para determinar parámetros de carácter cualitativo y/o cuantitativo que permitan observar la adulteración.

**Fuente:** Elaboración propia.

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

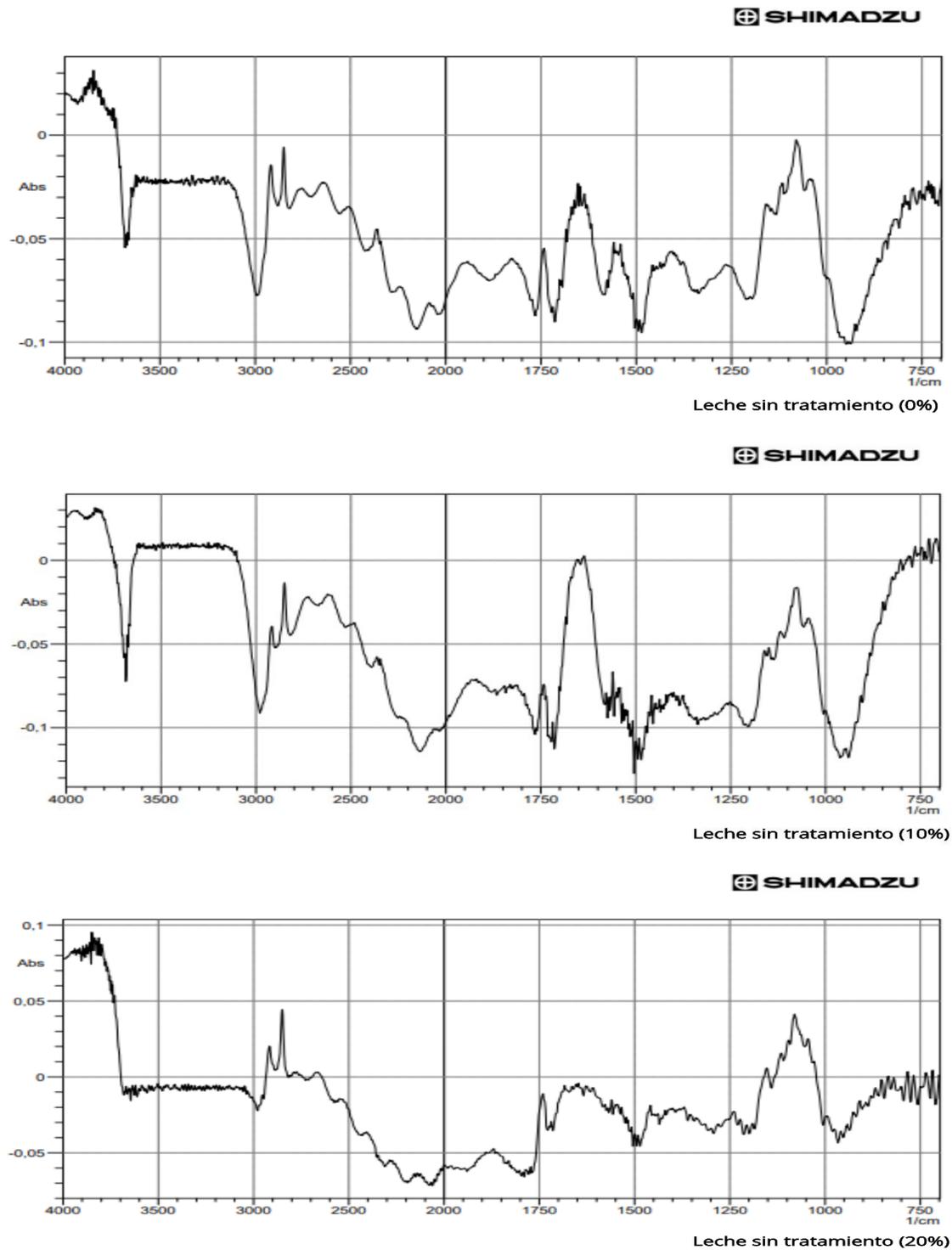
En este capítulo se detalla todo el desarrollo experimental llevado a cabo, con el objeto de determinar los parámetros de carácter cualitativo y/o cuantitativo que definan la funcionalidad de las aplicaciones de la espectroscopia infrarroja trabajadas, encaminadas a la discriminación de presencia de adulteración de leche con lactosuero dulce de quesería.

#### 3.2 PREEXPERIMENTACION

A fin de conocer el comportamiento del equipo IRPrestige-21 de Shimadzu y determinar la respuesta de la técnica, se llevaron a cabo lecturas de muestras de leche cruda fresca, así como leche cruda tratada con TCA para observar los espectros obtenidos, compararlos con la información presente en la bibliografía, estudiar la repetibilidad obtenida y establecer una metodología propia.

**3.2.1 Fase 1 – Estudio de la respuesta de la técnica a las muestras de leche.** El primer análisis realizado durante esta fase correspondió a la lectura en el equipo IRPrestige-21 de 2 grupos de muestras en la región media y cercana, conformados por muestras enriquecidas al 0%, 10% y 20% con lactosuero, siendo el primer grupo leche sin tratamiento y el segundo leche tratada con TCA. Las muestras preparadas fueron llevadas al laboratorio y se mantuvieron a temperatura ambiente. El análisis de cada muestra se llevó a cabo mediante la adición de una gota en las celdas de seleniuro de zinc, teniendo precaución de que la película formada por la gota fuera uniforme y abarcara el tamaño total de la celda. El análisis de todas las muestras (tratadas y sin tratar con TCA) tomo alrededor de 8 horas y los resultados obtenidos se presentan mediante la **figura 27**.

**Figura 27.** Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 de Shimadzu para muestras de leche sin tratamiento (TCA).

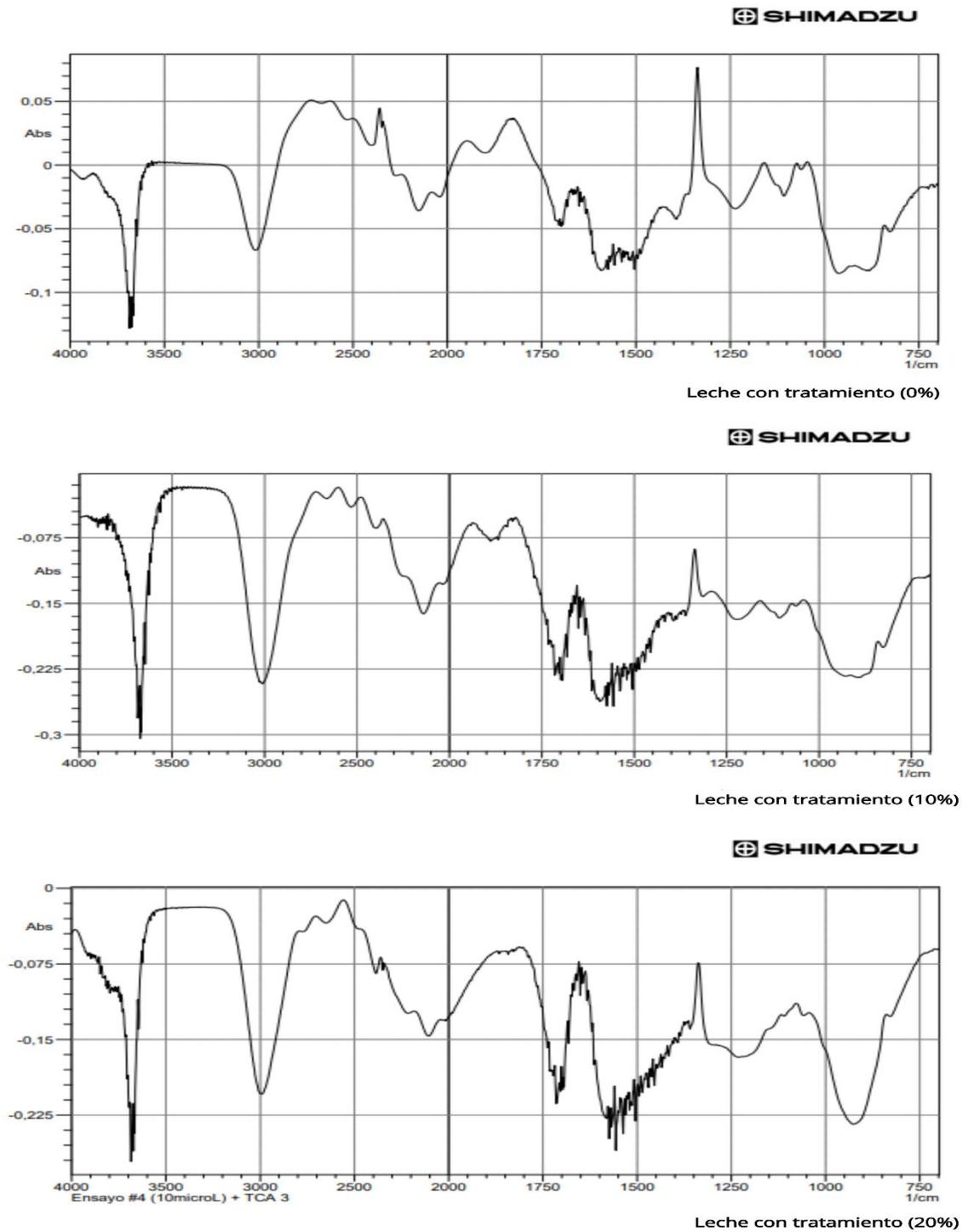


**Fuente:** Elaboración propia.

Los resultados obtenidos por el equipo de espectroscopia infrarroja IRPrestige-21 en la región media evidencian la presencia de bandas similares a las que se presentan en el espectro de leche reportado en la bibliografía. Luego de realizar la compensación de referencia con agua, los espectros muestran las bandas características entre 1000 a 1200  $cm^{-1}$  pertenecientes a la lactosa, así mismo se pueden observar las bandas de proteína entre 1500 a 1700  $cm^{-1}$  y las de grasa entre 1740 a 1745  $cm^{-1}$  y 2840 a 2930  $cm^{-1}$ . Un aspecto notable en los espectros presentados es el hecho de que la mayoría de bandas presentan absorbancias menores a 0 lo cual podría explicarse como un error; sin embargo, teniendo en cuenta que se usa agua (la cual es altamente absorbente en la región del infrarrojo) como solución blanco y que el espectrofotómetro trabaja de forma “aditiva” restando las señales de la solución blanco al espectro de la muestra de leche, dicho comportamiento “anormal” se atribuye a la solución utilizada como blanco analítico. Esta interferencia, sin embargo, no impide la obtención de espectros de gran similitud al referente bibliográfico, los cuales pueden ser corregidos mediante la aplicación de una línea base, obteniendo únicamente absorbancias positivas.

El análisis de las muestras se realizó de igual forma tanto para muestras sin tratamiento y tratadas, los resultados de las muestras tratadas con TCA se presentan mediante la **figura 28**:

**Figura 28.** Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche con tratamiento (TCA).



**Fuente:** Elaboración propia.

De igual manera, los espectros obtenidos para las muestras de leche tratadas con TCA exhiben un comportamiento similar a la referencia bibliográfica, sin embargo, también se encuentran diferencias notables como la desaparición de las bandas de grasa y una pérdida de resolución en la banda perteneciente a la lactosa. Esto se debe a que el tratamiento con TCA permite precipitar proteínas y otros componentes presentes en la leche. Las muestras tratadas con TCA generalmente son analizadas por medio de técnicas de separación que detectan la presencia del glicomacropeptido de caseína y en ocasiones, permiten su cuantificación, como es el caso de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) y la Electroforesis Capilar entre otras. No obstante, ya que la espectroscopia infrarroja no corresponde a una técnica de separación sino a una que permite aprovechar la interacción radiación-materia, inicialmente no puede constituirse por sí sola como una técnica que permita la detección de componentes traza específicos en una muestra; pese a esto, si permite elucidar características estructurales, la presencia de grupos funcionales en una muestra de análisis “pura”, y por consiguiente, determinar como un agente externo puede afectar dicha estructura.

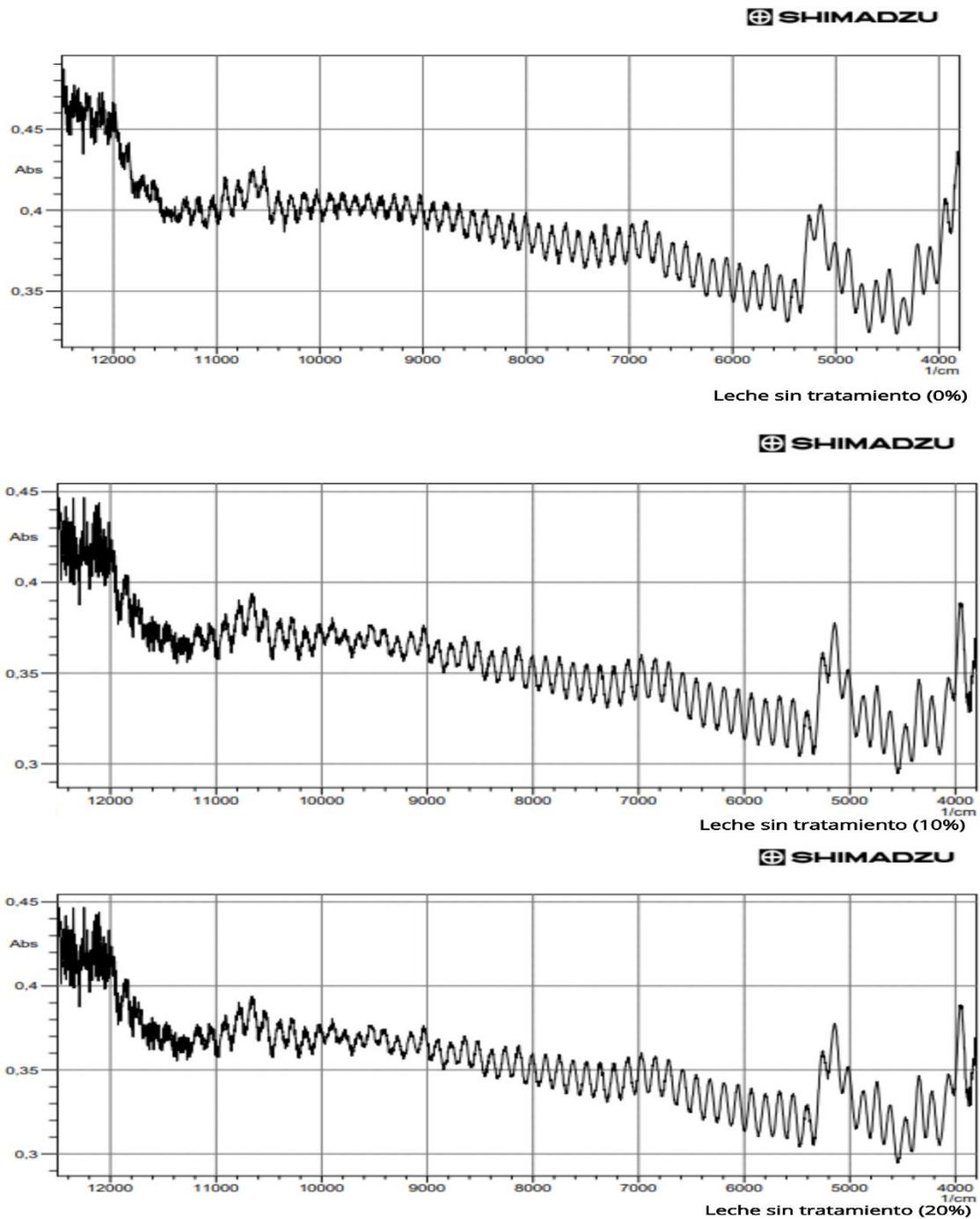
El hecho de que los espectros obtenidos para leche tratada con TCA se asemejen a los espectros tomados de las muestras sin tratamiento y, en general, al referente bibliográfico indica que, si bien, en menor proporción, las muestras tratadas con TCA siguen conteniendo lactosa y otras proteínas/péptidos distintos al glicomacropeptido de caseína (como es el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina)<sup>138</sup>, por lo cual, enfocar la metodología hacia la detección específica de glicomacropeptido de caseína pierde validez, haciendo que el análisis de muestras tratadas con TCA no sea relevante.

Terminadas las mediciones en el rango medio se configuró el equipo para lecturas en el rango cercano cambiando el divisor de haz de bromuro de potasio KBr al de fluoruro de calcio  $CaF_2$ , cambiando la fuente de luz cerámica a la lámpara de tungsteno-halógena y el rango de medición de  $(400 - 4000\text{cm}^{-1})$  a  $(3800 - 12800\text{cm}^{-1})$ . Las muestras analizadas en el rango cercano fueron preparadas de la misma forma que aquellas analizadas en el rango medio y el proceso de medición se llevó a cabo de la misma manera, la **figura 29** presenta los resultados obtenidos para las muestras en el rango del infrarrojo cercano:

---

<sup>138</sup> FOX, K.K., HOLSINGER, V.H., POSATI, L.P., y PALLANSCH, M.J. Separation of  $\beta$ -lactoglobulin from other milk serum proteins by trichloroacetic acid. En: Journal of Dairy Science. Vol. 50. No 9. (Sept 1967); p. 1363.

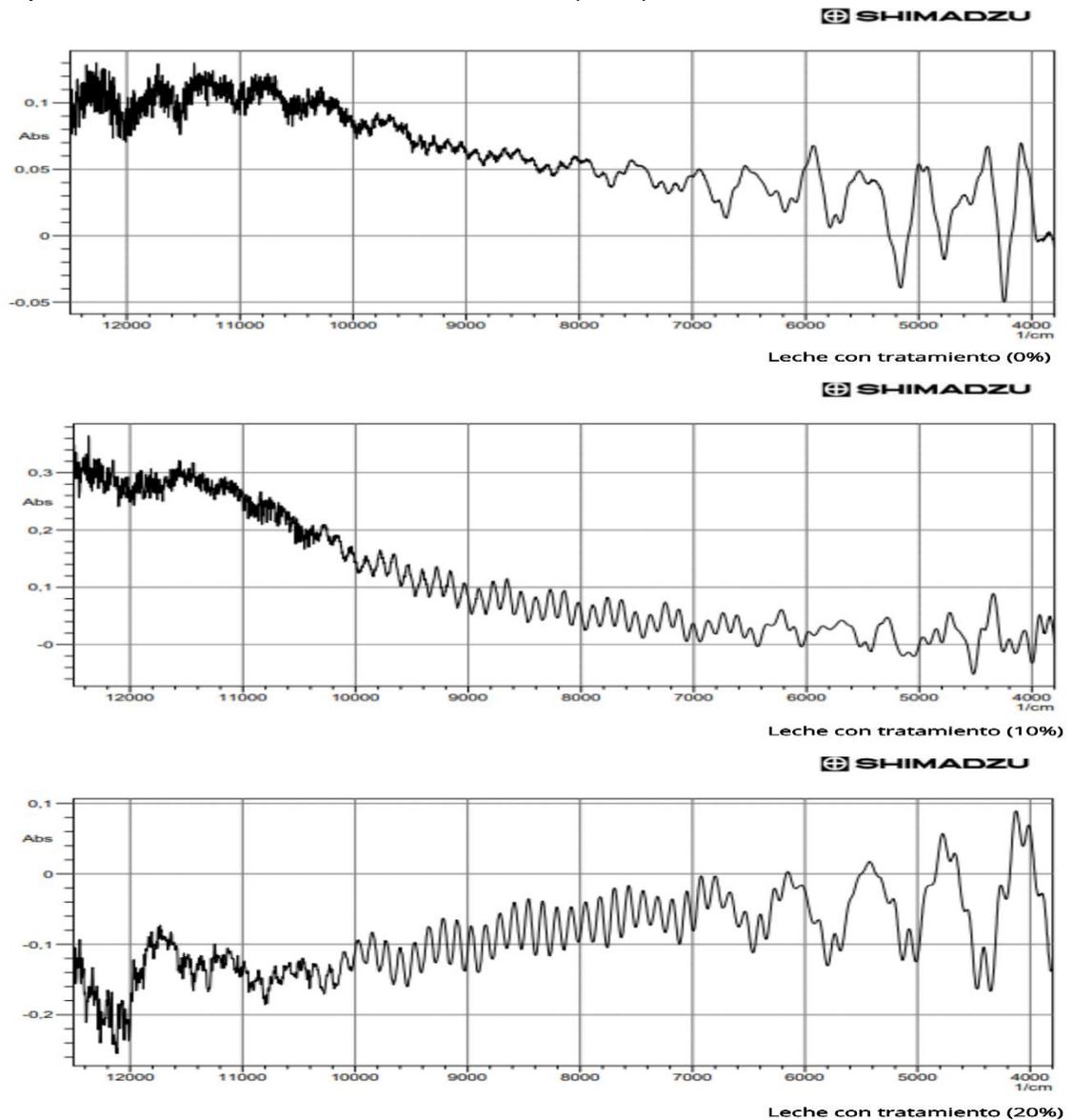
**Figura 29.** Espectros en el infrarrojo cercano obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche sin tratamiento (TCA).



Fuente: Elaboración propia.

Los espectros obtenidos para las muestras de leche en el rango cercano (sin tratamiento con TCA) exhiben un comportamiento diferente al referente bibliográfico. El rango de longitudes de onda mostrado en bibliografía se encuentra entre 1000 a 2500nm y corresponde a un rango de números de onda entre 10000 a 4000  $cm^{-1}$ , sin embargo, no se observa correspondencia.

**Figura 30.** Espectros en el infrarrojo cercano obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para muestras de leche con tratamiento (TCA).



Fuente: Elaboración propia.

Las muestras tratadas con TCA (cuyos espectros se presentan en la **figura 30**) demuestran un cambio del comportamiento general del espectro en el rango de

7000 a 4000  $cm^{-1}$ , sin embargo, esta información puede considerarse como ruido espectral y dista de tener similitudes con el referente bibliográfico inicial. Dos posibles razones por las cuales se presenta gran diferencia entre el espectro referente establecido por S. Kasemsumran et al.<sup>139</sup> Y los espectros obtenidos en el presente proyecto pueden radicar en el detector utilizado; ya que el que fue usado para obtener el espectro de referencia fue un detector de sulfuro de plomo (PbS) y el detector utilizado en el presente proyecto es un detector Indio-Galio-Arsenico (InGaAs), por otra parte puede radicar en la presencia de agua en la muestra, debido a que la leche es una solución acuosa y la espectroscopia de infrarrojo en la región cercana detecta sobretonos y bandas de combinación por lo que la presencia de agua la cual es altamente absorbente de radiación infrarroja pudo generar que todo el espectro se comportara como ruido.

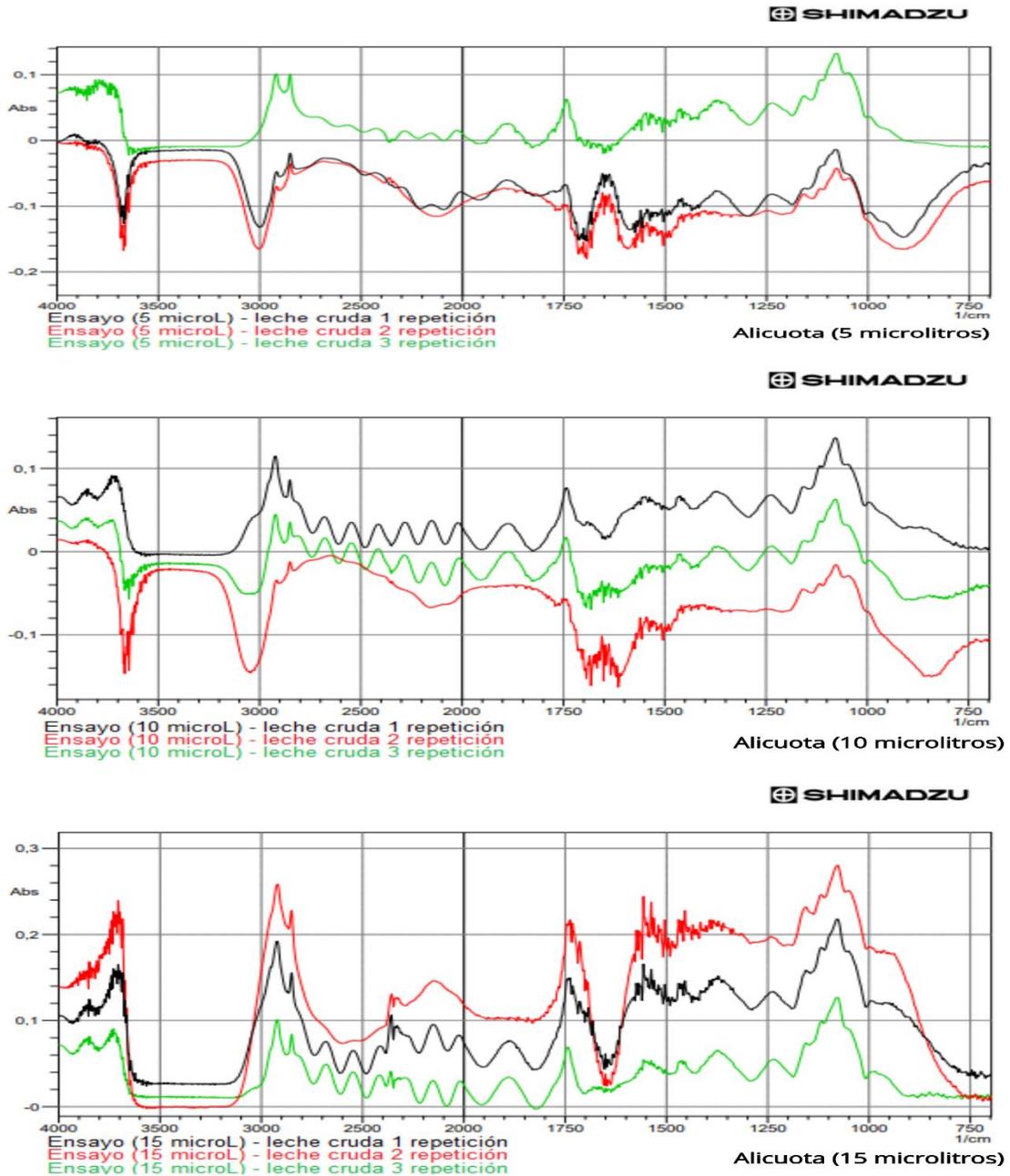
**3.2.2 Fase 2 – Análisis de repetibilidad.** Durante esta fase se realizaron múltiples ensayos encaminados a analizar la capacidad del equipo IRPrestige-21 de arrojar datos repetibles de una única muestra en varias lecturas realizadas un mismo día, así como en ensayos realizados en días distintos. Para este fin se analizó el comportamiento de los espectros sin tratar las muestras, al aplicar calentamiento y agitación mecánica, así como al aplicar ultrasonido y calentamiento, realizando 3 lecturas por muestra. La preparación de las adulteraciones para el análisis se llevó a cabo **según el numeral (2.1.1 y 2.1.2)**. Adicionalmente se realizó un estudio de proporción de alícuota depositada en las celdas por medio del análisis de muestras, depositando (5, 10 y 15 $\mu$ L), puesto que la literatura indica que el espesor de la película formada por la muestra debe ser una variable controlada.<sup>140</sup> Los resultados obtenidos son presentados a continuación:

---

<sup>139</sup> KASEMSUMRAN, S., THANAPASE, W., y KIATSOONTHON, A. Op Cit., p. 908.

<sup>140</sup> ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Op. Cit., p. 82.

**Figura 31.** Espectros en el infrarrojo medio obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para selección de alícuota (5, 10 y 15  $\mu$ L de muestra).



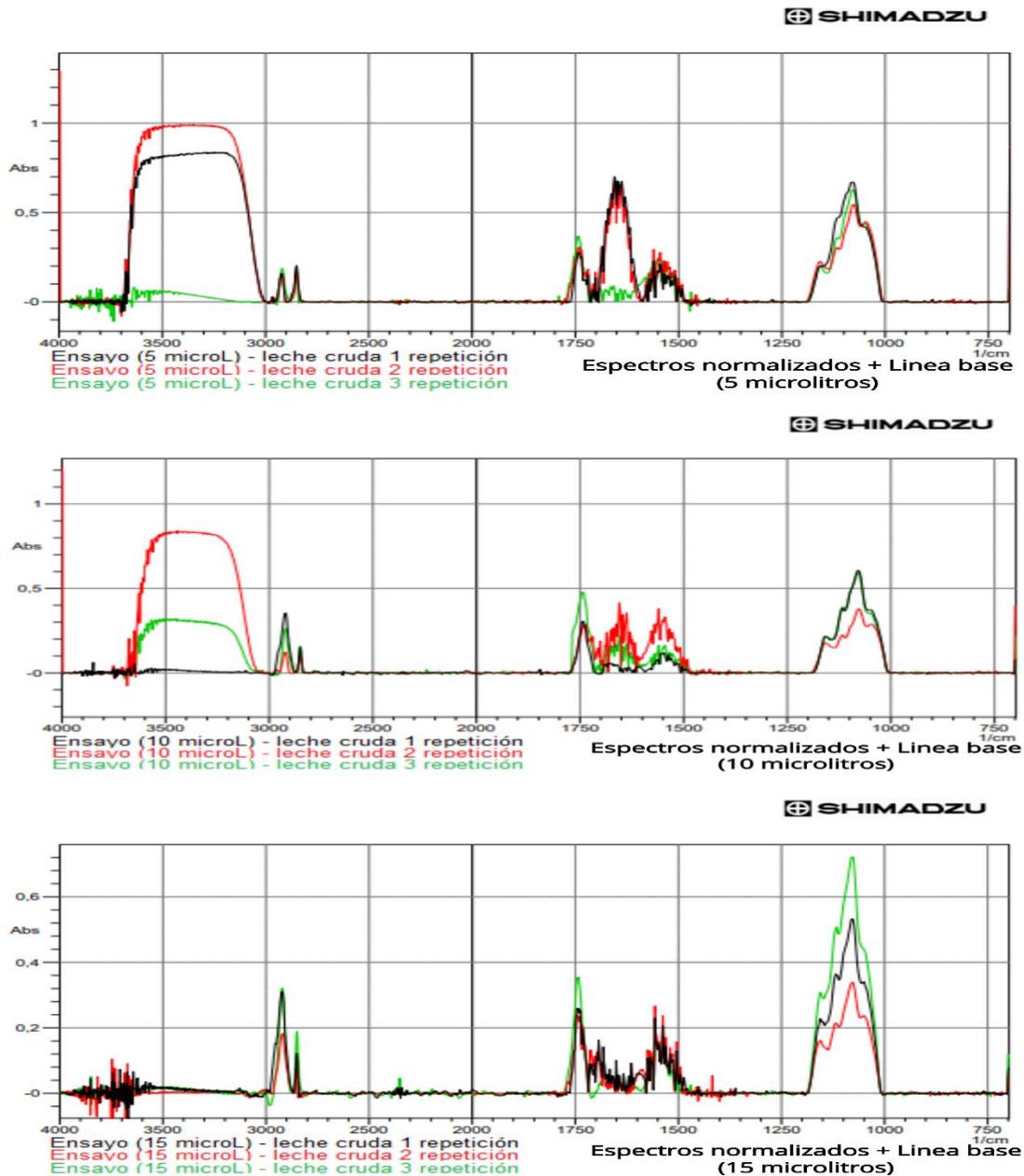
Fuente: Elaboración propia.

El análisis comparativo de diferentes espectros obtenidos para una misma muestra (presentados mediante la **figura 31**) resulta una labor ardua si no se realiza un tratamiento de resultados que permita comparar cada espectro en una misma escala. El software perteneciente al equipo IRPrestige-21 de Shimadzu ofrece las herramientas “normalizar” y “trazado de línea base” las cuales permiten trabajar los

espectros individualmente de modo que se puedan llevar las bandas a una misma escala y eliminar o suavizar regiones que puedan presentar ruido espectral o bandas irrelevantes para el análisis.

**3.2.2.1 Trazado de línea base y normalizado de los espectros.** Este procedimiento se lleva a cabo con el fin de poder analizar el comportamiento de un espectro individual cuando se desea comparar con otros espectros similares. El normalizado del espectro consiste en seleccionar una banda conocida cuyo comportamiento no tienda a desaparecer y “escalar” el resto del espectro con base en este pico, por otra parte, la línea base consiste en aplicar puntos, creando una línea que, en un plano cartesiano corresponderá al valor de  $Y=0$ . Al aplicar estos dos tratamientos a los datos, es posible obtener espectros en los cuales se pueden discriminar las alturas de las bandas, así como eliminar señales de ruido innecesarias. Los espectros presentados en la **figura 32** corresponden a los ensayos de selección de alícuota a los cuales se les ha trazado la línea base y han sido normalizados:

**Figura 32.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para selección de alícuota (5, 10 y 15 $\mu$ L).

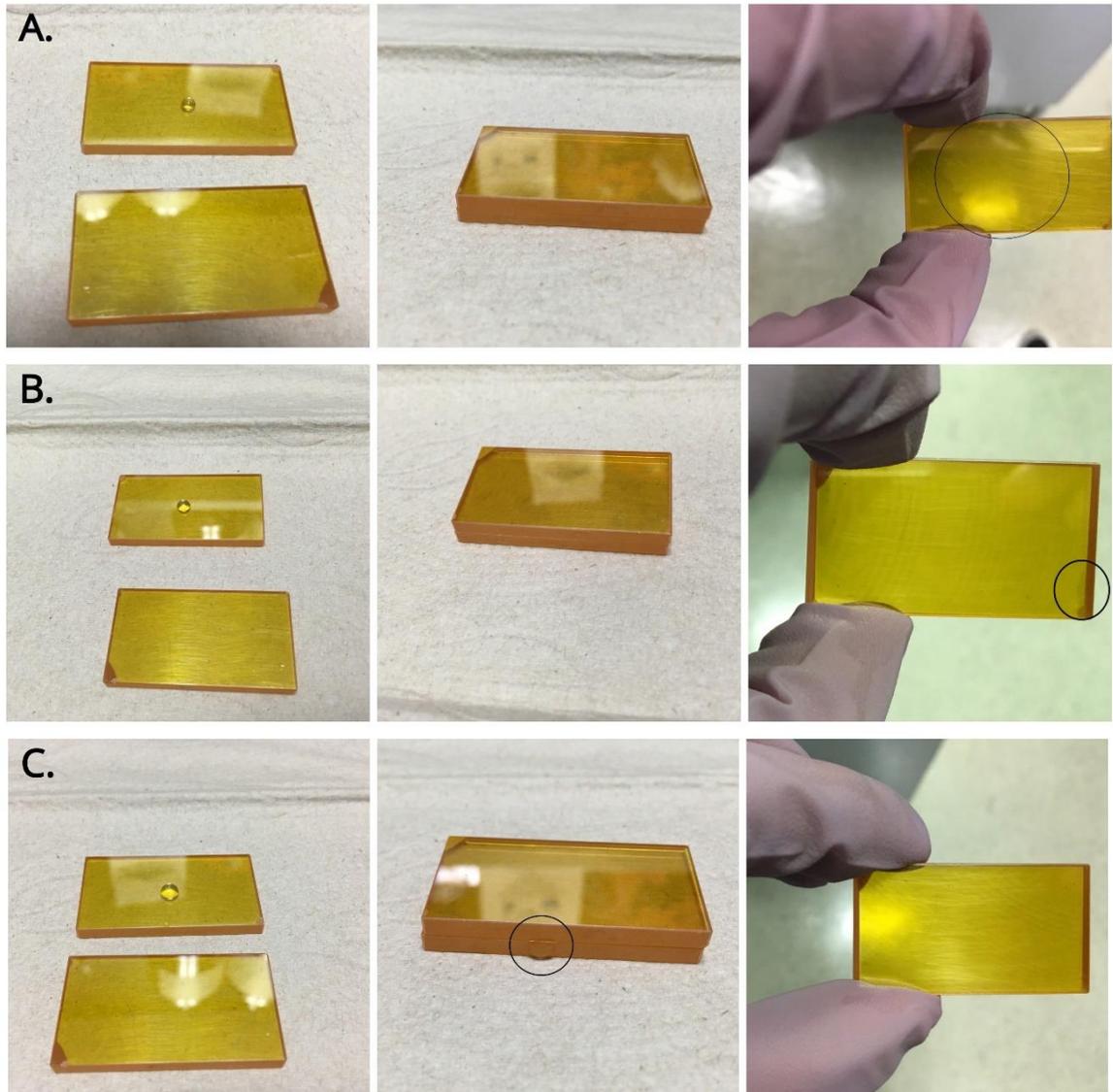


Fuente: Elaboración propia.

Esta presentación permite comparar individualmente un espectro de otros y facilita la lectura para el analista. El análisis de los espectros por triplicado obtenidos para cada alícuota (5, 10 y 15 $\mu$ L) arrojó que la alícuota que demuestra mejor comportamiento, fue la de 10 microlitros debido a que los espectros obtenidos para este volumen presentan menor variación entre mediciones consecutivas,

observándose que la 1° y 3° repetición se comporta aproximadamente igual en la región de la lactosa.

**Figura 33.** Comparación de alícuotas depositadas en las celdas de seleniuro de zinc.



**Fuente:** Elaboración propia.

La selección de la alícuota no se redujo únicamente al análisis del comportamiento de los espectros obtenidos para las 3 alícuotas establecidas; también se analizó la expansión de las alícuotas en la celda (formación de la película) adicionando agua como solución de estudio (análisis presentado mediante la **figura 33**). Se observa que dicha figura está dividida en 3 grupos: figura 32A, 32B y 32C. Estos 3 grupos corresponden a la alícuota depositada en las celdas para el análisis de la película

formada; siendo 32A un volumen de 5 $\mu$ L, 32B un volumen de 10 $\mu$ L y 32C un volumen de 15 $\mu$ L. Teniendo en cuenta lo anterior, al observar el comportamiento para un volumen de 5 $\mu$ L (32A), es notable la formación de una película incompleta que solo cubre una pequeña parte del área total de las celdas. El comportamiento para un volumen de 10 $\mu$ L (32B), demuestra la formación de una película que cubre toda la celda, observándose una pequeña región en el borde que no está cubierta por la muestra, no obstante, esta región no presenta implicaciones al momento de realizar las lecturas, puesto que el porta-muestras del equipo IRPrestige-21 está dispuesto de tal modo, que el haz de radiación generado incide en el centro de la celda. Finalmente, el comportamiento para un volumen de 15 $\mu$ L (32C) demuestra la formación de una película completa que cubre la totalidad del área de las celdas, sin embargo, se advierte que al juntar las celdas se pierde una cantidad de muestra por desbordamiento de la misma.

Con el propósito de realizar los análisis posteriores con una alícuota que genere una película uniforme, se seleccionó un volumen de 10  $\mu$ L de muestra, puesto que presentó los mejores resultados teniendo en cuenta la formación homogénea de la película y la reproducibilidad de los espectros obtenidos para este volumen, evitando también la generación de burbujas y la pérdida de muestra por desbordamiento.

Con el volumen de alícuota establecido, se procedió a evaluar la variable homogeneidad, sometiendo las muestras de leche a dos tratamientos distintos: ultrasonido y agitación magnética mientras se mantiene un calentamiento constante en un rango de temperaturas entre 35 y 40°C, lo cual permite asegurar que las mediciones se lleven a cabo a las mismas condiciones. El rango de temperatura se seleccionó según lo expresado en la NTC 399<sup>141</sup> la cual establece que la temperatura de la leche cruda inmediatamente después de ser extraída de la ubre es de aproximadamente 40°C. la comparación de los espectros obtenidos para las muestras sin pretratamiento, con agitación magnética y con ultrasonido, permitió observar la repetibilidad obtenida según el pretratamiento utilizado. Cada pretratamiento aplicado se explica en el **cuadro 8**.

---

<sup>141</sup> INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION (ICONTEC). Norma técnica colombiana (NTC) 399. Cuarta actualización. Bogotá D.C. (Nov. 2002); p. 3.

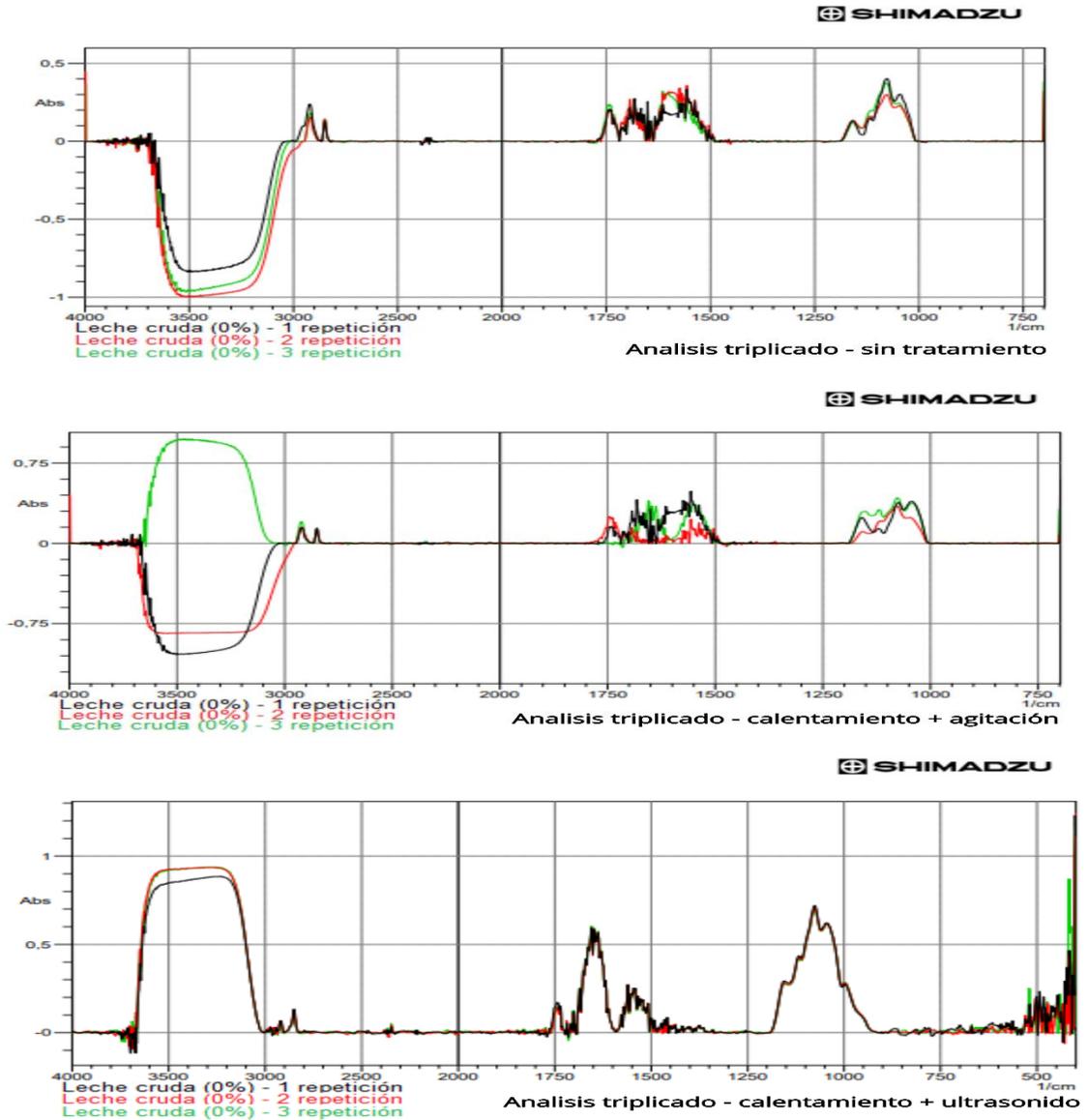
**Cuadro 8.** Pretratamientos aplicados a las muestras para la determinación de repetibilidad.

<b>Alícuota fija: 10<math>\mu</math>L</b>	
<b>Pretratamientos aplicados a muestras para análisis</b>	<b>Descripción</b>
Sin pretratamiento	Análisis directo de las muestras controlando la temperatura en un rango entre 35 – 40°C.
Agitación	Uso de agitador magnético con plancha de calentamiento durante 10 minutos controlando la temperatura en un rango entre 35 - 40°C.
Ultrasonido	Uso de Sonicador con sistema de calentamiento durante 10 minutos controlando la temperatura en un rango entre 35 - 40°C.

**Fuente:** Elaboración propia.

Los resultados para cada pretratamiento se obtuvieron depositando siempre un volumen de muestra fijo en las celdas de 10 $\mu$ L luego de ser sometidas al correspondiente pretratamiento; los espectros obtenidos se muestran a continuación:

**Figura 34.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) obtenidos por el equipo IRPrestige-21 para análisis de repetibilidad en leche cruda (sin pretratamiento, calentamiento + agitación y calentamiento + ultrasonido) respectivamente.



Fuente: Elaboración propia.

En la **figura 34** se observa el comportamiento de las muestras sometidas a distintos pretratamientos (sin pretratamiento, agitación magnética y ultrasonido), los espectros de aquellas tratadas mediante ultrasonido exhiben la mayor repetibilidad de entre los otros dos, motivo por el cual se estableció el uso de este para todos los análisis posteriores. Con esta etapa concluye la fase de pre-experimentación, la cual permitió establecer las mejores condiciones para el análisis de las muestras,

asegurando una buena reproducibilidad de los datos mediante la asignación de una alícuota de análisis fija (10 $\mu$ L) y un pretratamiento de muestras (calentamiento + ultrasonido) con el fin de controlar posibles variables que puedan alterar los resultados obtenidos.

**3.2.3 Fase 3 – Comparación de los espectros infrarrojos de muestras adulteradas.** Establecidas todas las condiciones técnicas y procedimentales bajo las cuales el equipo permite obtener mejores resultados, se inicia el análisis de distintas muestras de leche adulteradas, el cual incluye 2 tipos distintos de leche; leche cruda y leche comercial UHT la cual será denominada como leche comercial B. Los niveles de adulteración trabajados en esta fase se incrementaron, siendo estos: 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15, 30% (%m/m), debido a que se busca determinar si el aumento en los niveles de adulteración de las muestras tiene una relación directa con cambios progresivos en los espectros obtenidos, así mismo se incrementaron el número de tomas de espectro a 4 realizadas a cada muestra, con el fin observar la tendencia de los resultados en caso de que se presenten variación entre estos y descartar que factores externos afecten la lectura del equipo. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 35**:

**Figura 35.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) para determinación de adulteración en leche cruda obtenidos por el equipo IRPrestige-21, presentados en el siguiente orden: (0%, 2.5%, 5%, 10%, 12.5%, 15%, 30%).

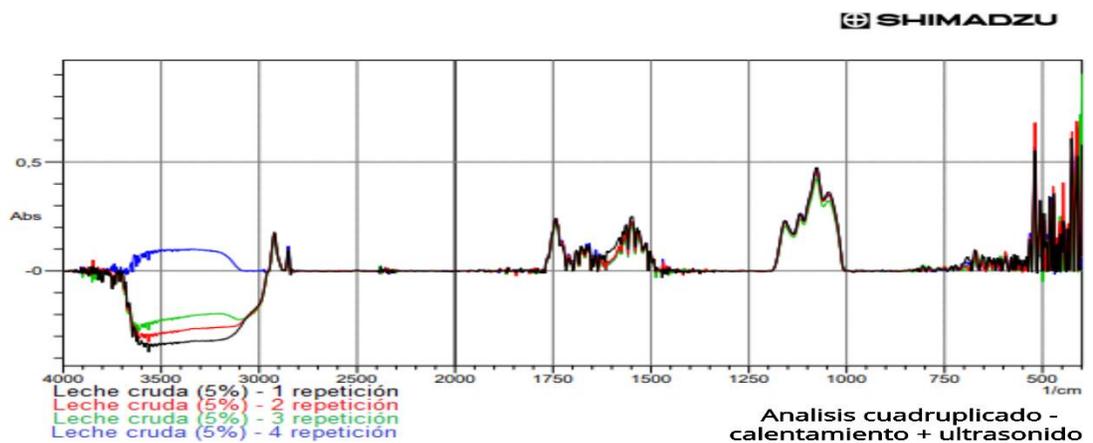
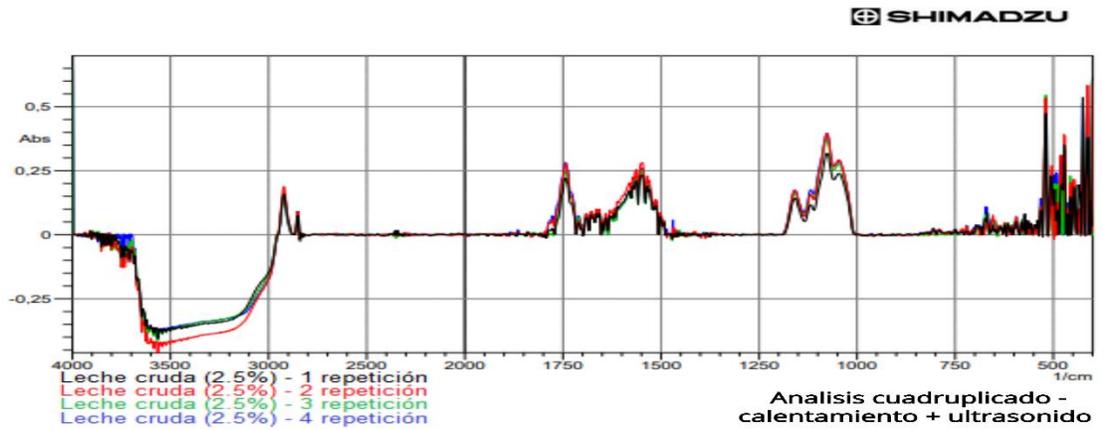
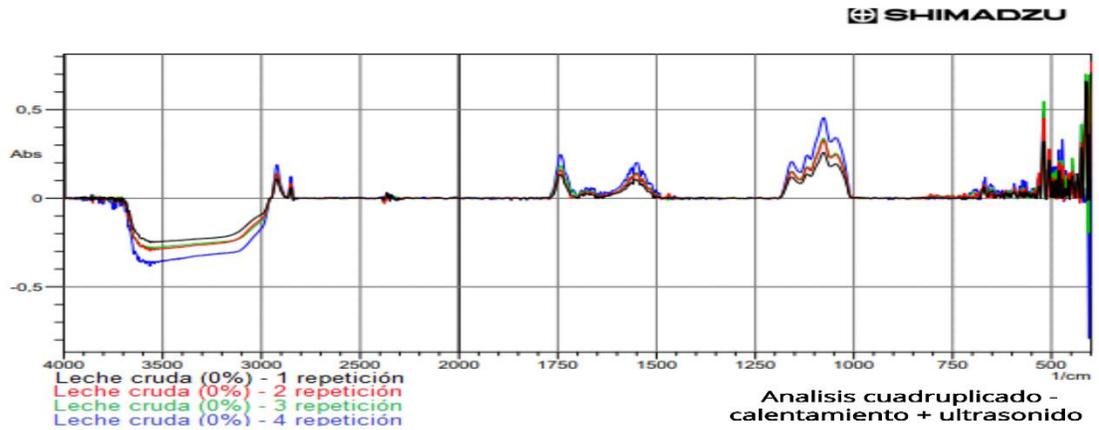
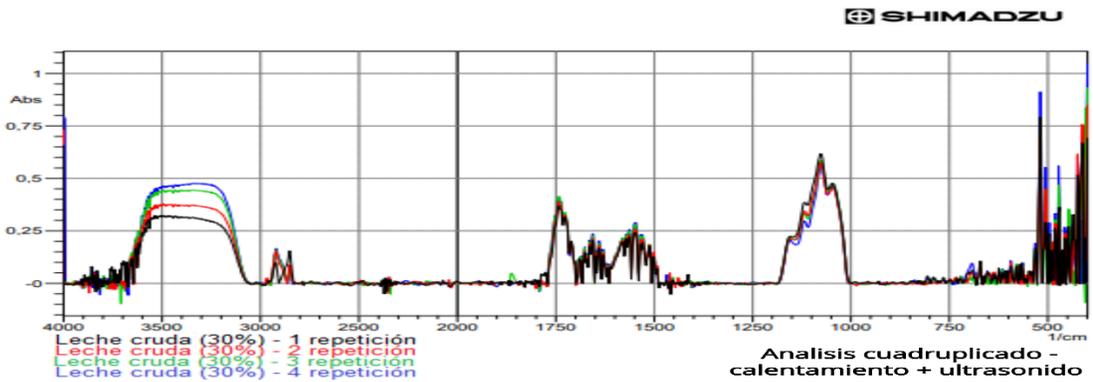
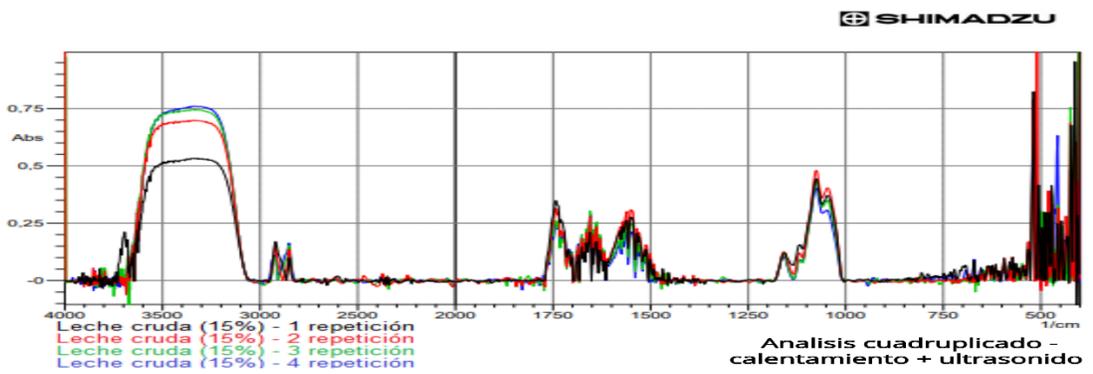
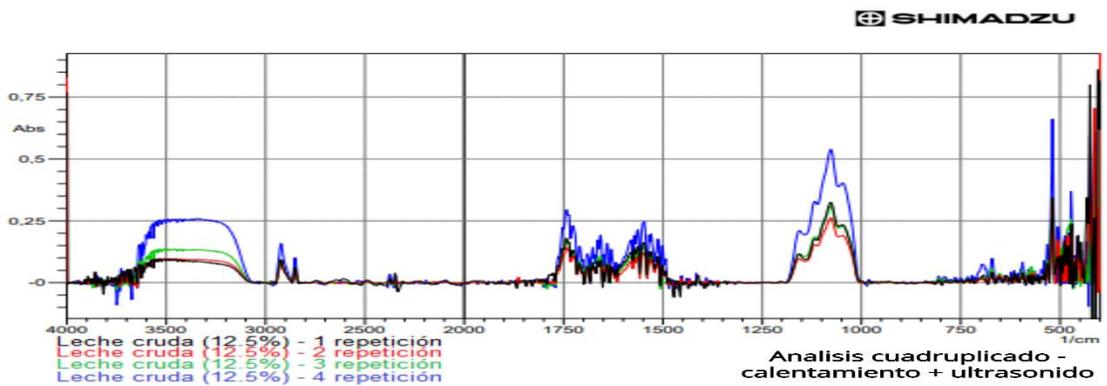
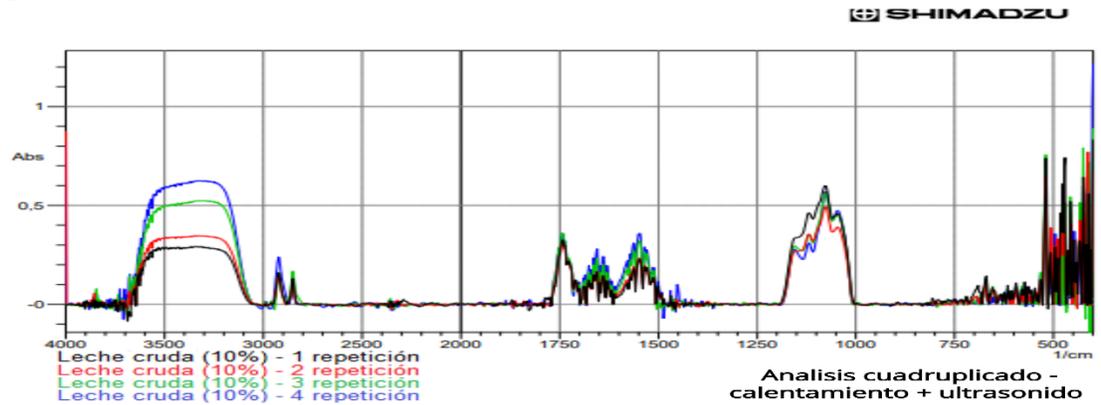


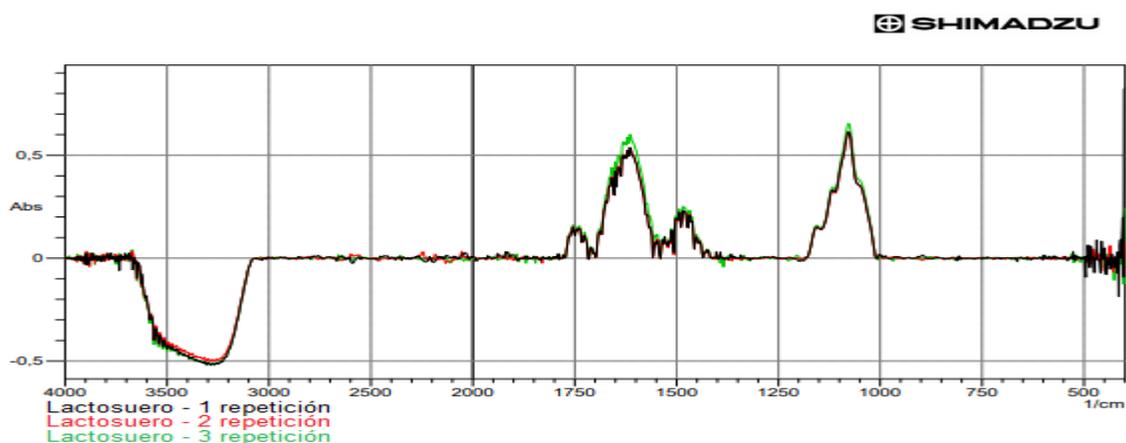
Figura 36. (Continuación).



Fuente: Elaboración propia.

Los espectros obtenidos para muestras adulteradas a diferentes niveles mantienen la repetibilidad, por lo cual se puede descartar que la adición de lactosuero altere las lecturas realizadas por el equipo. Del mismo modo, se observa que la adición de lactosuero no genera cambios en el espectro como aparición o pérdida de señales ya establecidas. Esto se debe a que el lactosuero es un subproducto del proceso de fabricación de queso y es de esperarse que el espectro de este en estado puro se asemeje al espectro de la leche, tal como se observa en la **figura 36**.

**Figura 37.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) del lactosuero.



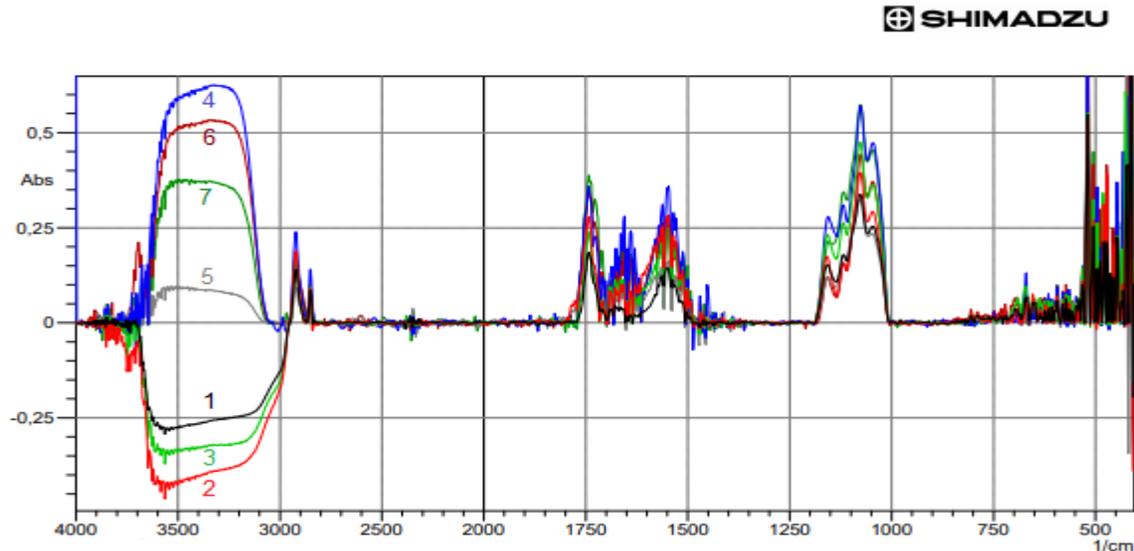
**Fuente:** Elaboración propia.

Si bien, el espectro obtenido tras analizar el lactosuero puro se comporta de forma idéntica a los espectros obtenidos para la leche, también se observa que las bandas de los grupos funcionales pertenecientes a grasa presentes entre  $2840$  a  $2930\text{ cm}^{-1}$  desaparecen por completo, siendo esta la única diferencia apreciable. A partir de la comparación de los espectros de leche cruda con los espectros obtenidos para lactosuero, se puede inferir que los posibles cambios en los espectros, debidos a los niveles crecientes de adulteración en las muestras, estarán relacionados con un cambio en la intensidad de una o varias de las bandas espectrales de las especies presentes en la leche (proteína, lactosa o grasa). Esto sucede, gracias a la característica analítica de la espectroscopia infrarroja por la cual la técnica detecta especies absorbentes en un volumen definido de muestra, dando lugar a una relación directa entre la concentración de una especie y la intensidad de la banda relacionada con dicha especie.

A fin de comparar los espectros de muestras de leche adulteradas con lactosuero, se seleccionó un espectro de cada nivel. Debido a que el software del equipo no tiene una función para promediar todas las repeticiones obtenidas de una sola muestra, los espectros seleccionados fueron aquellos que presentaran la mayor

intensidad. La **figura 37**, muestra los espectros para las muestras adulteradas al 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15 y 30%:

**Figura 38.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche cruda adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] obtenidos por el equipo IRPrestige-21.



**Fuente:** Elaboración propia.

Es destacable el comportamiento observado en la región característica del agua entre  $3000$  y  $3600\text{ cm}^{-1}$ , puesto que se obtienen tanto absorbancias positivas como negativas. Este efecto puede estar relacionado con la falta de control en el espesor de las películas de muestra y solución de referencia (Background) formadas por las celdas de seleniuro de zinc previo al análisis, puesto que el haz de referencia funciona como un método para sustraer las bandas de sustancias que no sean de interés para el analista en una muestra generando un espectro más “limpio” de la misma, la lectura de diferentes cantidades de muestra y solución de referencia en cada ensayo genera que la absorción descrita para el agua en las muestras sea totalmente aleatoria. Adicionalmente, esta región no es de interés para los análisis, según lo expresado por C. Grelet et al.,<sup>142</sup> y P.M. Santos et al.,<sup>143</sup> quienes propusieron metodologías para la determinación de adulteración de leche con lactosuero mediante espectroscopia infrarroja en la región media y cuyos análisis se realizan en la región entre  $400$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$ , descartando la región perteneciente al agua.

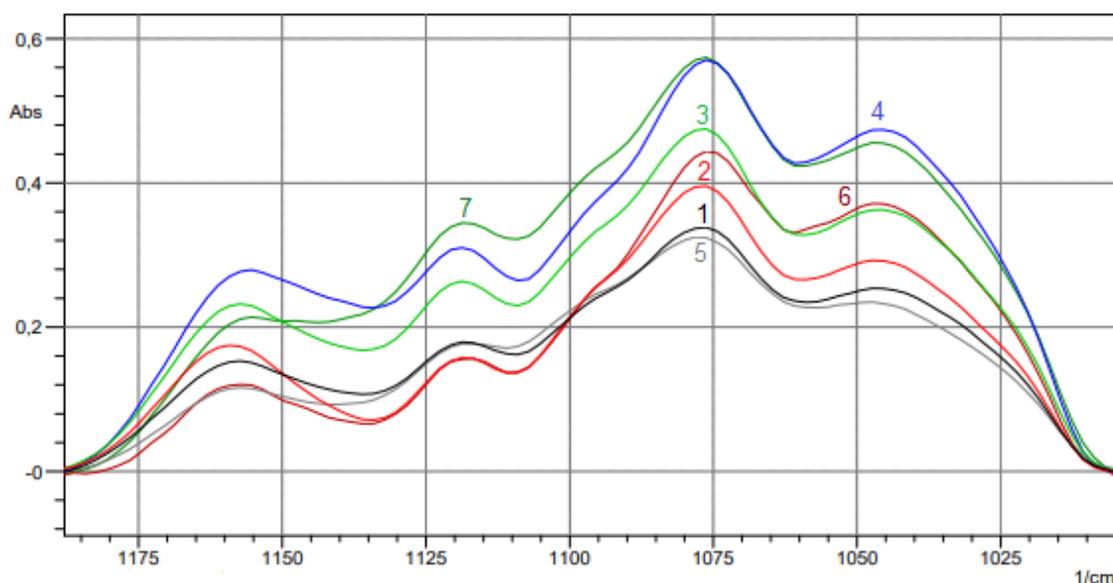
<sup>142</sup> GRELET, C., PIERNA, J.A., DARDENNE, P., BAETEN, B., DEHARENG, F. Op. Cit., p. 3 – 5.

<sup>143</sup> SANTOS, P.M., PEREIRA-FILHO, E.R., y RODRIGUEZ-SAONA, L.E. Op. Cit., p. 20 – 21.

La comparación del comportamiento de cada zona de interés se dificulta, si se analiza el total de la región espectral media, motivo por el cual, se realizan ampliaciones de las regiones pertenecientes a la lactosa ( $1045$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$ ), proteínas ( $1550$  a  $1690\text{ cm}^{-1}$ ) y grasa ( $1725$  a  $1745$  y  $2862$  a  $2927\text{ cm}^{-1}$ ). Dichas ampliaciones para cada región se pueden apreciar en las **figuras 38, 39 y 40** respectivamente.

**Figura 39.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la lactosa.

SHIMADZU



**Fuente:** Elaboración propia.

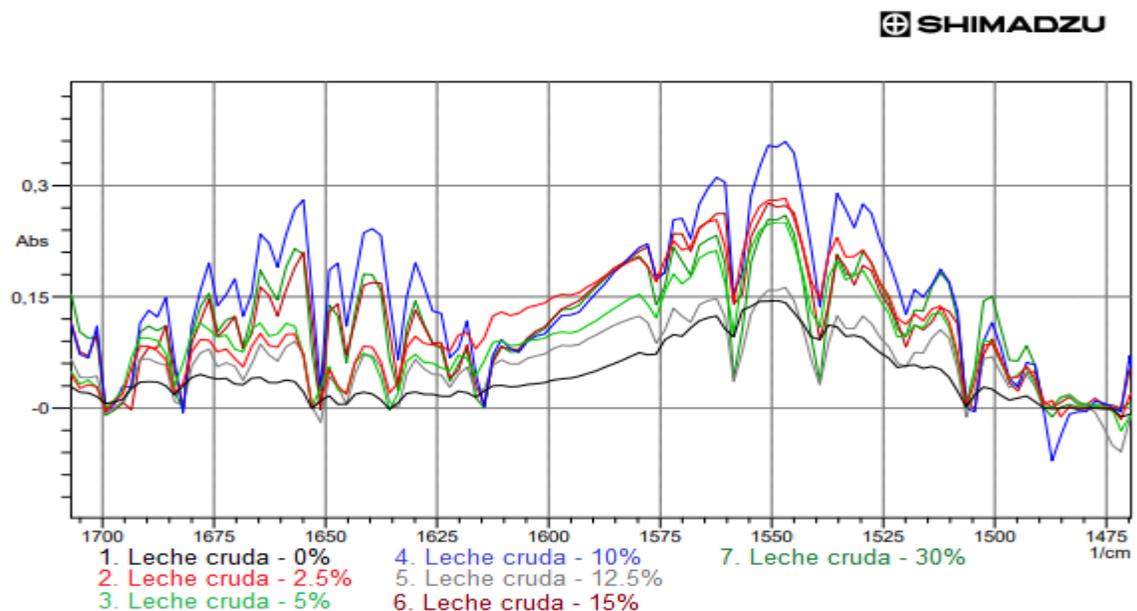
La comparación de los espectros para leche cruda adulterada a diferentes niveles en la región perteneciente a la lactosa, demuestra un comportamiento que indica un aumento progresivo en la intensidad general del grupo de bandas relacionadas con este glúcido, dicho incremento solo se observa entre los niveles: 0%, 2.5%, 5% y 10%, debido a que, niveles de adulteración superiores al 10% presentan un comportamiento aleatorio. El hecho de que exista variabilidad en las intensidades de muestras adulteradas a distintos niveles puede ser un indicador cualitativo del cambio composicional que está generando el lactosuero en las muestras.

Una justificación preliminar al comportamiento de los espectros pertenecientes a los primeros cuatro niveles de adulteración (0%, 2.5%, 5% y 10%) radica en las características del lactosuero, puesto que, como se estableció en el numeral 1.4 del presente documento, esta sustancia contiene el 95% de la lactosa presente en la

leche, por lo que, adulterar leche con lactosuero no solo añade glicomacropeptido de caseína, el cual es un péptido que no debería estar presente en la leche fresca, sino que aumenta considerablemente la concentración de lactosa total en la leche, lo que se traduce en un incremento en la intensidad de las bandas del espectro infrarrojo para la lactosa.

El lactosuero obtenido para la adulteración de muestras no es sometido a ningún tratamiento con el fin de detener la actividad enzimática (desactivación) relativa a la rennina utilizada para cuajar la leche, esto puede generar que las muestras de leche adulterada a niveles mayores al 10% se vean afectadas por los remanentes de la enzima que se encuentra en el lactosuero, produciendo cambios en los resultados obtenidos por el equipo de espectroscopia infrarroja.

**Figura 40.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la proteína.

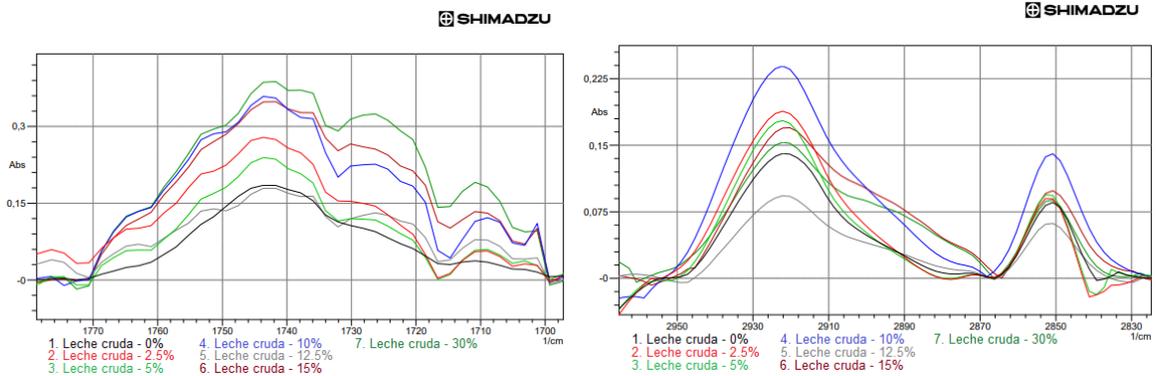


**Fuente:** Elaboración propia.

El análisis de la región de proteína presenta un comportamiento mas aleatorio que el observado en la región de lactosa. El orden de los niveles de adulteración no coincide entre las bandas de amida I (1700 – 1615  $cm^{-1}$ ) y amida II (1500 – 1600 $cm^{-1}$ ), puesto que para la amida I el orden de los niveles crecientes corresponde a (0%, 12.5%, 2.5%, 5%, 15%, 30%, 10%) y para la amida II corresponde a (0%, 12.5%, 5%, 30%, 15%, 2.5%, 10%). Esta región en general no conserva el comportamiento de crecimiento lineal observado en la región de la lactosa. Se descarta que el calentamiento de las muestras o la aplicación de

ultrasonido puedan generar desnaturalización de las proteínas, sin embargo, como se comentó anteriormente, la presencia de remanentes de rennina puede afectar la composición proteica en las muestras. Por este motivo, se excluye la utilización de esta región para el análisis de las adulteraciones.

**Figura 41.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Regiones de la grasa.



**Fuente:** Elaboración propia.

Las regiones pertenecientes a los grupos funcionales característicos de la grasa tampoco presentan un comportamiento lineal que se pueda relacionar con los niveles crecientes de adulteración, adicionalmente no pueden considerarse como regiones analíticas confiables en general, debido a que la grasa en la leche es uno de los componentes que más varía por la región geográfica en la que es obtenida, la alimentación de la vaca y el clima entre otros.

Culminado el análisis de muestras de leche cruda adulterada, se procedió a iniciar los análisis en muestras de leche comercial B adulteradas, con el fin de determinar si existen diferencias entre el espectro de la leche cruda y el espectro para una leche UHT de consumo masivo. Todo el proceso de adulteración y pretratamiento de muestras se llevó del mismo modo que para la leche cruda, según la metodología procedimental establecida en el **numeral 2.1**.

Se analizaron muestras de leche comercial UHT, la cual para fines de este estudio se denominó leche comercial B. El análisis se realizó de igual forma que el realizado para las muestras de leche cruda; se prepararon muestras adulteradas al 0, 2.5, 5, 10, 12.5, 15 y 30% (%m/m), los espectros fueron obtenidos con la configuración para el espectrofotómetro de infrarrojo establecida en el numeral 2.1.4, aplicando ultrasonido a cada muestra por 10 minutos antes de ser analizadas y depositando 10µL como alícuota de análisis en las celdas. Los resultados obtenidos se muestran mediante la **figura 41** y **42**:

**Figura 42.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) para determinación de adulteración en leche comercial B obtenidos por el equipo IRPrestige-21.

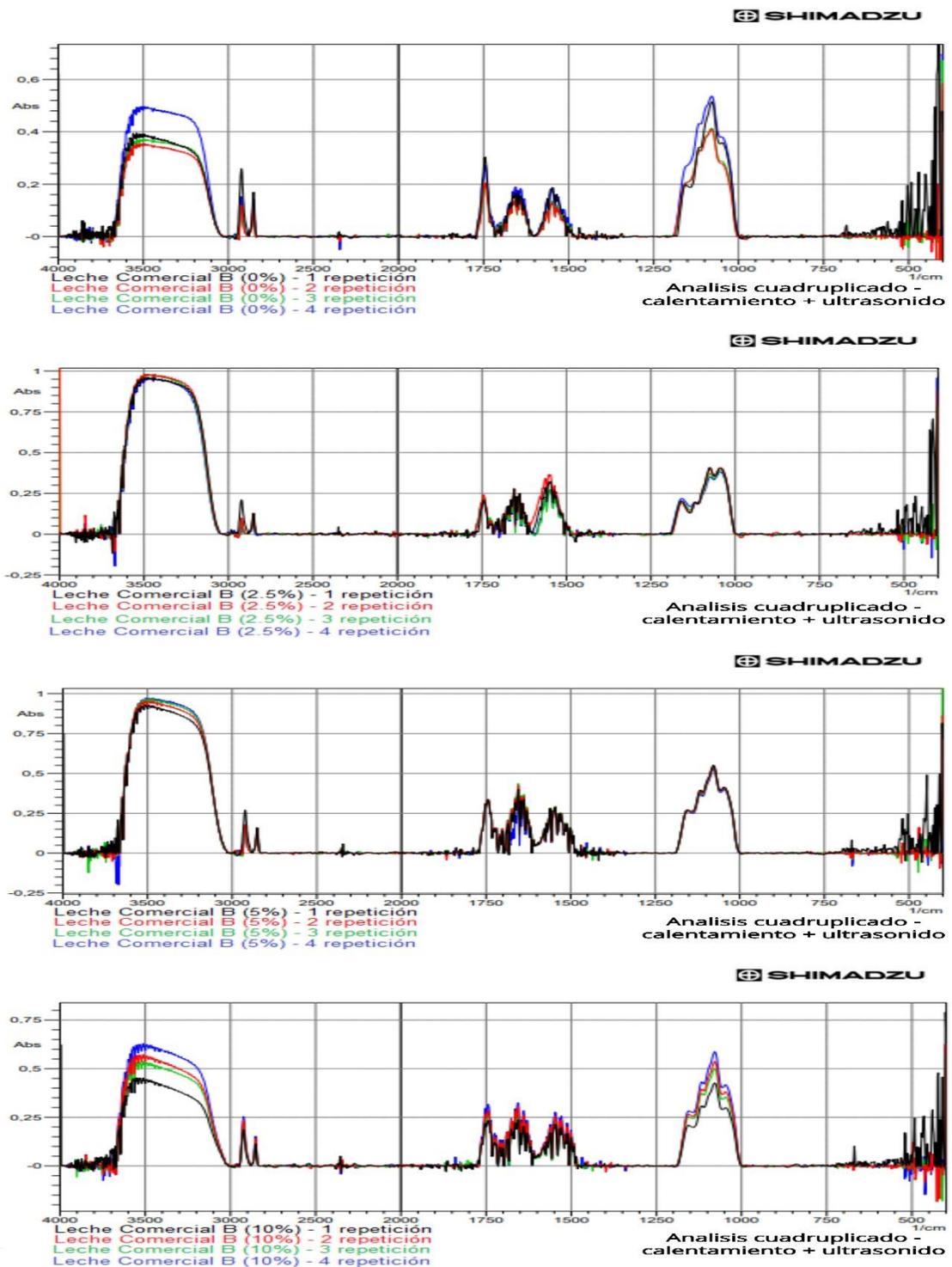
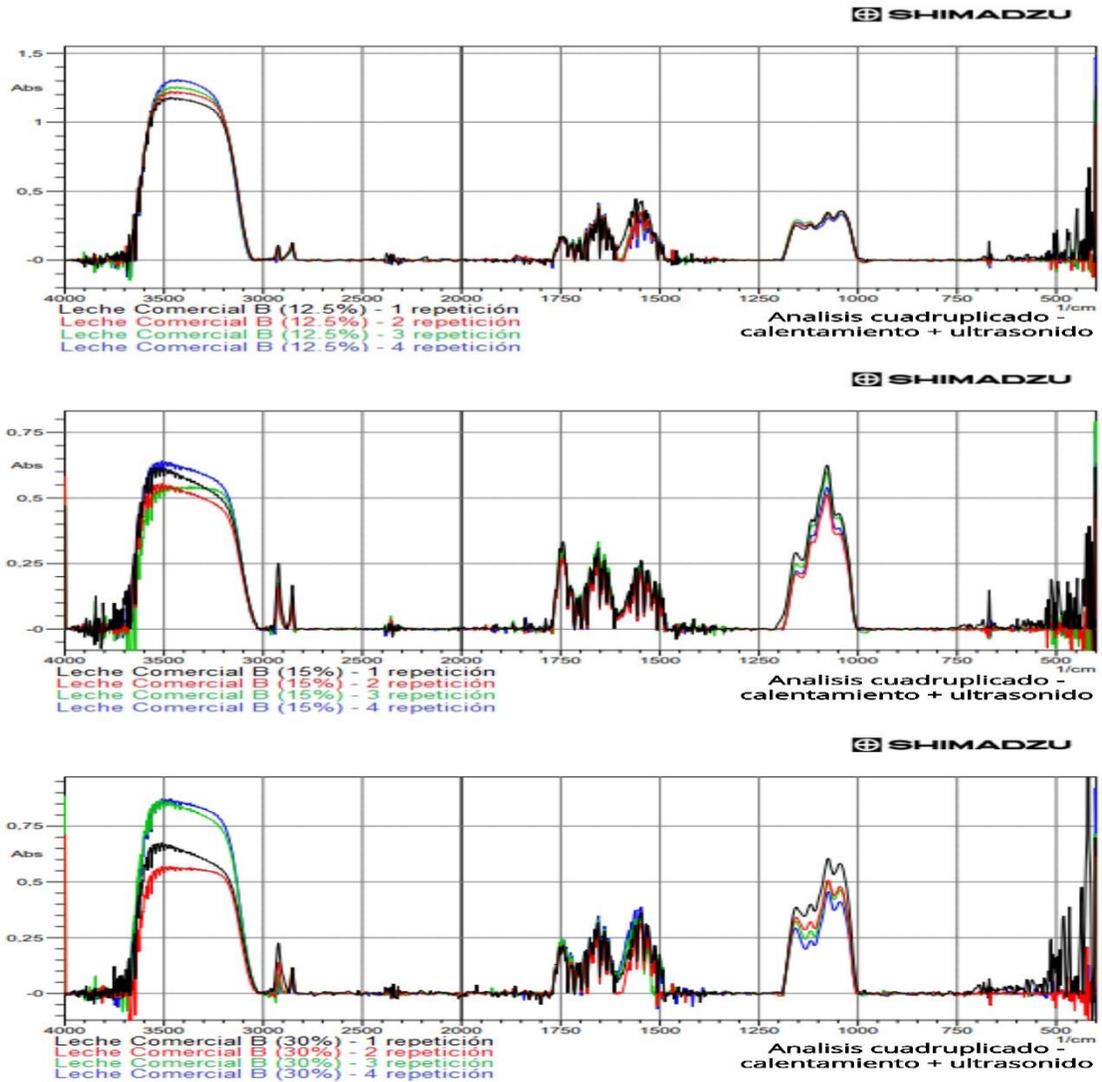


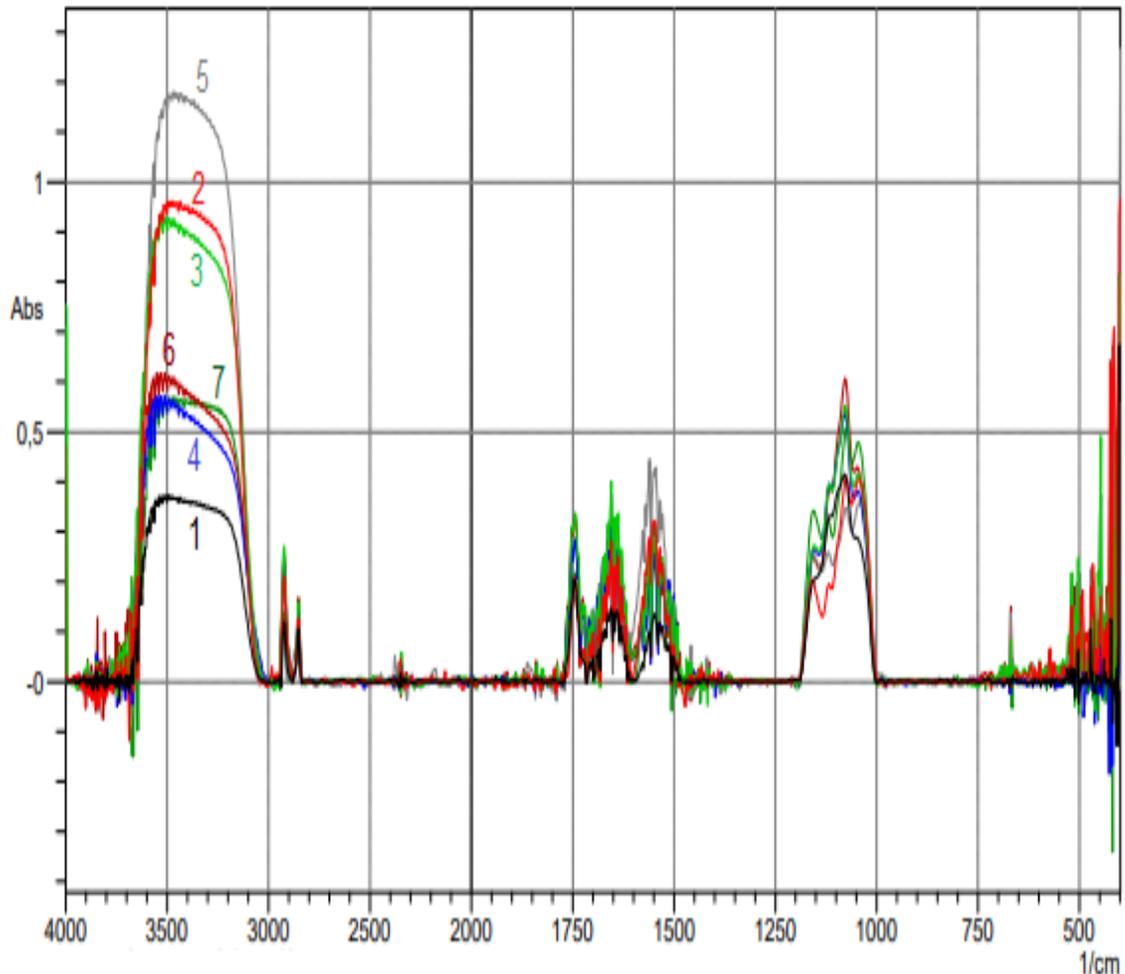
Figura 43. (Continuación).



Fuente: Elaboración propia.

De los resultados obtenidos para las muestras de leche comercial B adulterada se observan dos características a destacar: la primera consiste en la similitud presentada entre el referente bibliográfico para un espectro de leche y los espectros obtenidos para leche comercial (UHT), permitiendo descartar la presencia de bandas diferentes o la deformación de las presentadas por bibliografía por motivo del tratamiento UHT para hacer de la leche cruda, un producto consumible. La segunda radica en la disminución de la repetibilidad obtenida, comparada con la exhibida en las muestras de leche cruda, puesto que, las muestras de leche comercial B presentan una disminución de intensidad en la banda de la lactosa entre repeticiones de una misma muestra.

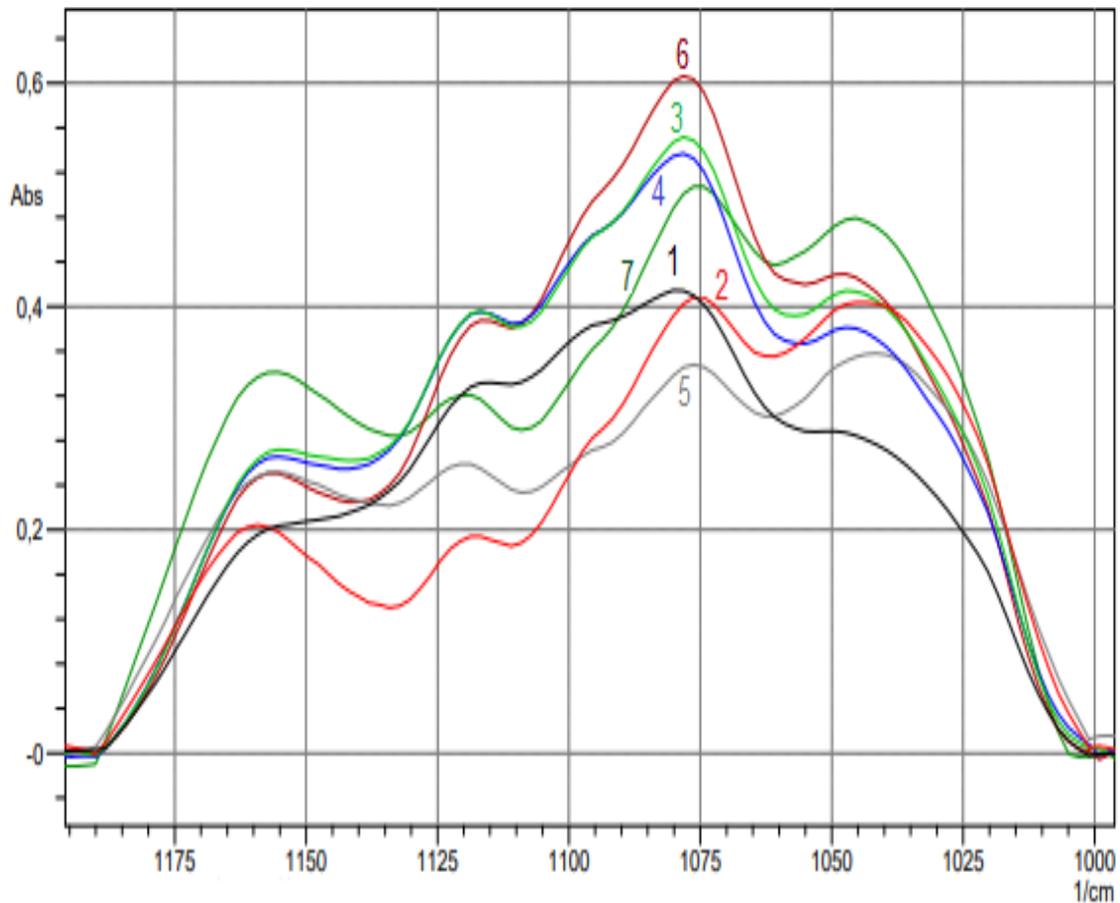
**Figura 44.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] obtenidos por el equipo IRPrestige-21.



**Fuente:** Elaboración propia.

Al momento de analizar cada región específica en busca de patrones en la intensidad de las bandas, se hace evidente la necesidad de ampliar cada región o grupo de bandas con el fin de observar con mayor claridad los resultados obtenidos y generar conclusiones de los mismos. Las regiones espectrales presentadas a continuación corresponden a Lactosa (**figura 43**), Proteína (**figura 44**) y Grasa (**figura 45**):

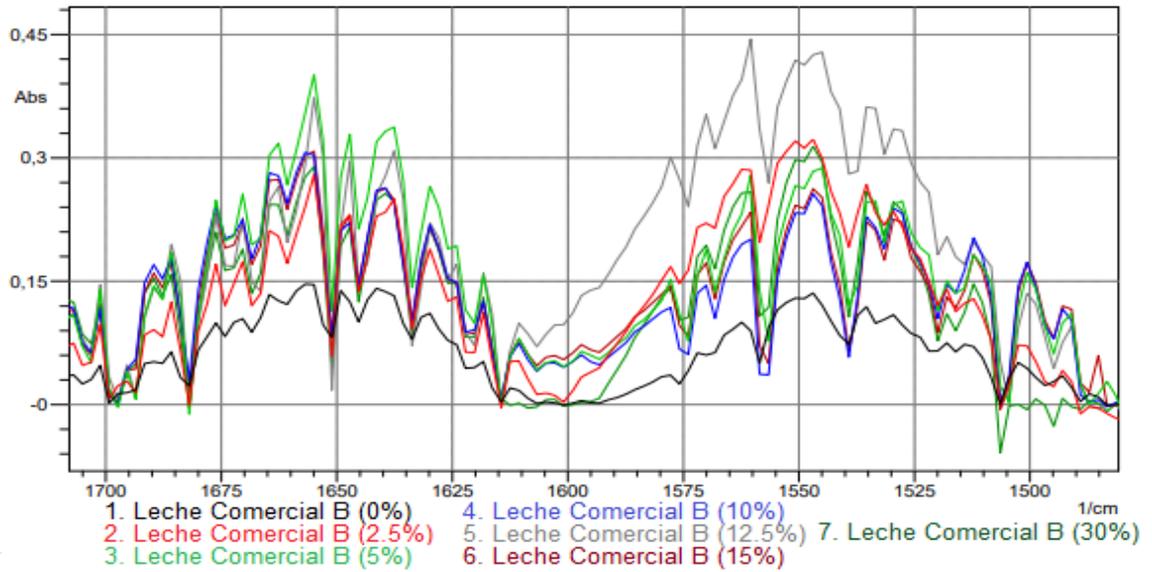
**Figura 45.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la lactosa.



**Fuente:** Elaboración propia.

Los resultados obtenidos de las muestras de leche comercial UHT adulterada a diferentes niveles, muestran un comportamiento totalmente aleatorio, siendo su orden de incremento en intensidades de menor a mayor: (12.5, 2.5, 0, 30, 10, 5 y 15%), por lo que no es posible atribuir un comportamiento lineal de incremento o disminución de intensidades en la región de la lactosa que este directamente relacionado con la adición progresiva de lactosuero, sin embargo la variación en las intensidades pueden estar fuertemente relacionadas con la “alteración” composicional que genera el lactosuero en la leche.

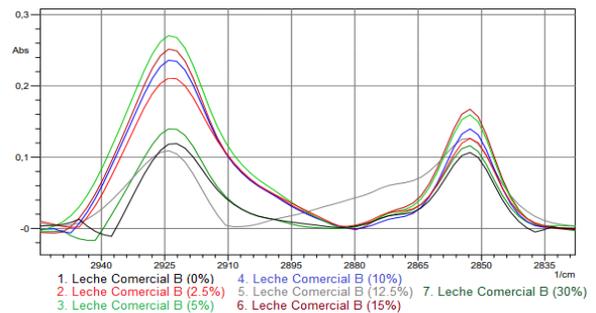
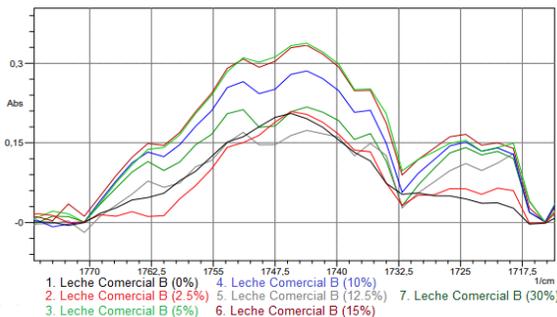
**Figura 46.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Región de la proteína.



Fuente: Elaboración propia.

Las bandas de amida I y amida II obtenidas para las muestras de leche comercial (UHT) también exhiben un comportamiento aleatorio, pues no se encuentra una progresión de incremento o disminución lineal en la intensidad de los picos que se relacione con los niveles de adulteración. Adicionalmente se encuentra que cada banda tiene su propio comportamiento y no uno único para ambas bandas.

**Figura 47.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche comercial B adulteradas [1) 0%, 2) 2.5%, 3) 5%, 4) 10%, 5) 12.5%, 6) 15% y 7) 30%] – Regiones de la grasa.



Fuente: Elaboración propia.

Tal como se estableció para la región de la grasa en las muestras de leche cruda, esta región puede no ser la más confiable para el análisis que se desea llevar a cabo, puesto que el tamaño de los glóbulos de grasa cambia rápidamente con el tiempo si no se refrigeran y/o agitan las muestras. Como es de esperarse teniendo en cuenta el comportamiento que han tenido las regiones de lactosa y proteína de la leche comercial UHT, la región de grasa tampoco presenta un comportamiento ascendente o descendente lineal en cuanto a intensidad de las bandas, en relación con los niveles de adulteración.

A lo largo del desarrollo experimental se pudo observar el comportamiento de los espectros de muestras de leche cruda y leche comercial UHT, el cual es idéntico en ambos tipos de leche al referente bibliográfico presentado; a partir de esto se analizó el espectro del lactosuero para observar su comportamiento y poder determinar si la adición de lactosuero podría generar la aparición de nuevas bandas en el espectro base de las muestras de leche, lo cual se descartó debido a que el espectro del lactosuero es idéntico al de la leche en cuanto a las bandas presentes. Esto permitió determinar que, si la técnica se basa en la detección de especies absorbentes presentes en una muestra de análisis y las discrimina como bandas en el espectro obtenido según la frecuencia de vibración característica de los enlaces, el aumento o disminución de la intensidad en una banda obtenida estará directamente relacionado con la concentración de la especie que está relacionada con dicha banda y en consecuencia, se hace posible la detección y cuantificación de las adulteraciones si se observan cambios progresivos en el espectro base de la leche debidos a la presencia de una especie cuya concentración sea importante en el lactosuero. Se seleccionó la lactosa debido a que, durante el proceso de preparación de lactosuero, un 95% de la lactosa en la leche queda depositada en el lactosuero, convirtiéndola en una especie rica en el lactosuero la cual es fácilmente detectable en el espectro infrarrojo de la leche.

A partir de lo establecido anteriormente se propusieron 2 hipótesis:

1. Debido a que se está incrementando la concentración total de lactosa en las muestras adulteradas, la intensidad de las bandas que responden a grupos funcionales de la lactosa, deben incrementar en proporción a la cantidad de lactosuero adicionado.
2. En base al trabajo realizado por A. Ortiz Ramírez et al.<sup>144</sup> En el cual se establece que, en una comparativa, el espectro infrarrojo de la leche tiene la banda de lactosa más intensa, el espectro del lactosuero tiene la banda de lactosa menos

---

<sup>144</sup> RAMIREZ, A., LOPEZ, M.P., DELGADO, R., y ROJAS, M. Análisis de leche adulterada con suero en polvo y líquido por espectroscopia de infrarrojo. (En línea). (Citado: 4 nov 2018). Disponible en: [http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos\\_anexo/20080679\\_6033.pdf](http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20080679_6033.pdf)

intensa y los espectros de leche adulterada con lactosuero dulce de quesería (líquido) tendrán bandas de lactosa con intensidad decreciente a mayor nivel de adulteración. Este comportamiento es argumentado basándose en el hecho de que la leche al convertirse en lactosuero pierde grasa y sólidos, con lo cual, de manera resumida se convierte en una solución compuesta mayoritariamente por agua, haciendo que la adulteración de leche con lactosuero se comporte como una “disolución con agua” disminuyendo los sólidos totales de las muestras.

Al finalizar la experimentación tanto para leche cruda como para la leche comercial B no se logró comprobar ninguna de las 2 hipótesis puesto que no se observó ninguno de los 2 comportamientos predichos. La obtención de espectros cuyo comportamiento en la banda de la lactosa es aleatoria se puede explicar basándose en la ley de Beer-Lambert la cual establece la relación para la absorbancia como sigue<sup>145</sup>:

$$A = \epsilon bC$$

Donde:

- A = Absorbancia.
- $\epsilon$  = Coeficiente de absorción molar.
- b = longitud del haz en el medio absorbente.
- C = Concentración de la molécula en la muestra.

Según esto, la concentración de una especie en una muestra, en el caso específico de un experimento de espectroscopia infrarroja, depende del espesor de la película líquida de muestra formada, con lo cual, dejar esta variable sin controlar puede generar que, a pesar de que el equipo de infrarrojo genere resultados comparables a los obtenidos por bibliografía, se pierda la capacidad de la técnica para cuantificar.

Las celdas de seleniuro de zinc utilizadas en el desarrollo del presente proyecto consistían en 2 ventanas de 41x23x3mm (alto, ancho, espesor) las cuales no tenían ningún soporte, cavidad o método para asegurar el espesor de las películas de muestra líquida formadas, en contraste con otras celdas disponibles en el mercado las cuales permiten analizar muestras formando películas de muestra con espesores determinados, lo que da lugar a la posibilidad de realizar análisis cuantitativo. Las ventanas utilizadas en el presente proyecto son presumiblemente destinadas al análisis cualitativo con el fin de determinar características químicas de muestras. La metodología aplicada para analizar la muestra consistió en depositar la alícuota de 10 $\mu$ L de muestra sobre una de las celdas para posteriormente juntarla con la segunda celda, finalmente se aplicó fuerza manual para homogeneizar la alícuota y formar una película de un espesor “fijo”, sin

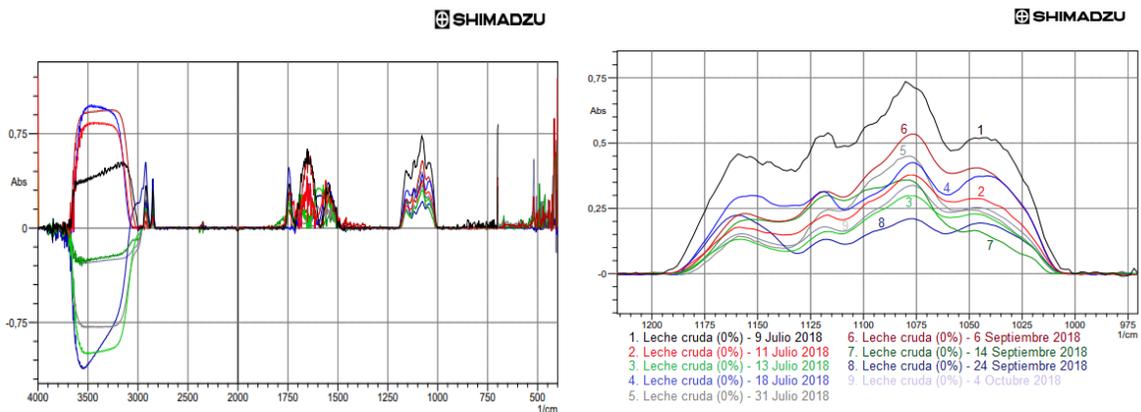
---

<sup>145</sup> ALBEN, J., y FIAMINGO, F. Op Cit., p. 82.

embargo, esta metodología no asegura que el espesor de la película formada entre una y otra medición sea el mismo.

Esta proposición se puede respaldar si se observan los resultados de muestras de leche cruda sin adulterar, tomadas en distintos días:

**Figura 48.** Comparación de espectros de leche de cruda (0%) tomados en distintos días (a la izquierda cada espectro completo y a la derecha la ampliación de la región de la lactosa).



**Fuente:** Elaboración propia.

Al observar la **figura 46**, se vuelve apreciable la gran variación para espectros de muestras de leche cruda sin adulterar, los cuales “deberían ser iguales” puesto que se trata de un mismo analito, sin embargo, es de esperarse que el comportamiento de todos los espectros no sea totalmente repetible, esto es debido al comportamiento variable de la leche, puesto que, como se estableció con anterioridad, aun viniendo de una misma vaca, la región en la que se encuentre el animal, su alimentación, y edad además del clima de la región son algunos de los factores que pueden afectar la composición de la leche que producirá, por lo que es inevitable obtener pequeñas variaciones entre espectros. Sin embargo, las variaciones que se observan en los espectros para muestras analizadas en distintas fechas tienen un rango muy amplio de absorbancias registradas: entre 0.30 a 0.45, siendo esta región donde se presenta la mayor tendencia por lo que no se tienen en cuenta las muestras 1, 6 y 8 las cuales podrían asumirse como errores de lectura.

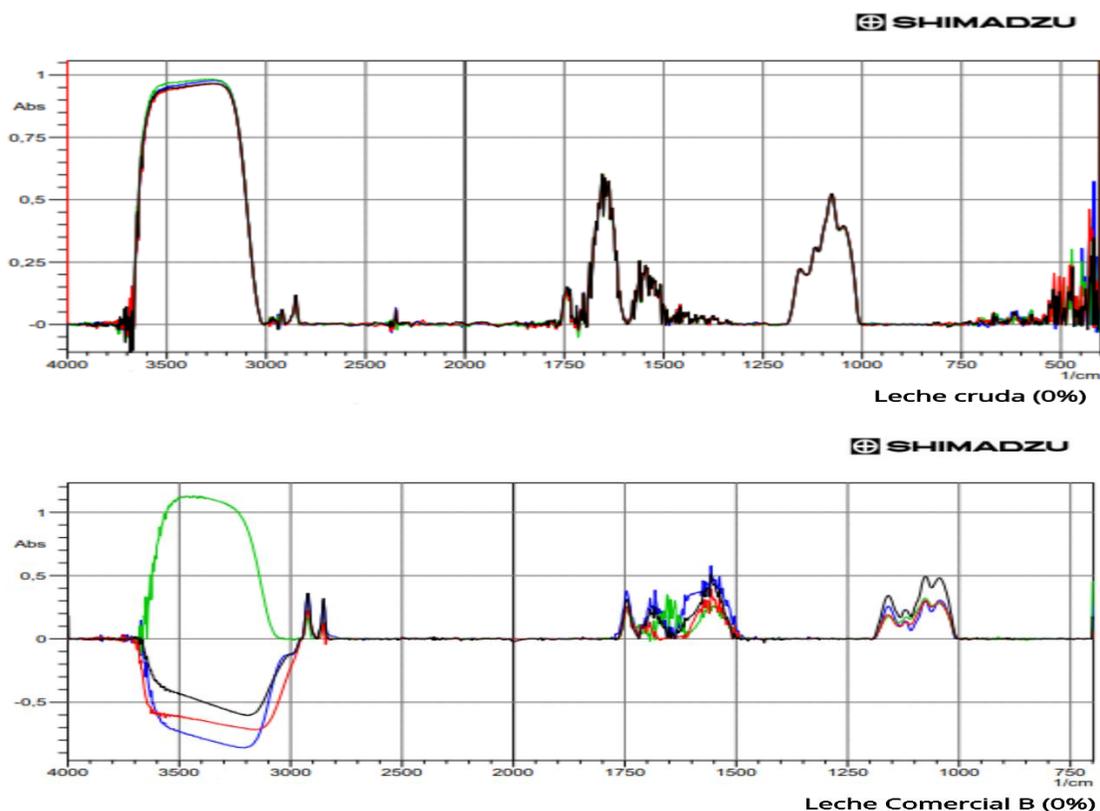
Se podría pensar que este rango de absorbancias es pequeño y por ende representa las variaciones composicionales propias de la leche, sin embargo, el hecho de que se encuentren espectros de muestras de leche adulterada que presentan absorbancias en este mismo rango y sumando el hecho de que el equipo muestre un comportamiento repetible para una misma muestra analizada durante un único ensayo, descarta la posibilidad de que las variaciones se deban al equipo

o a la naturaleza variable de la leche, lo que refuerza la teoría de que los análisis realizados no se comportan de una forma lineal en relación con los niveles de adulteración debido a que la cantidad de muestra analizada (espesor de la película formada) podía variar entre mediciones de un mismo ensayo y entre ensayos realizados en distintos días.

#### 4. COMPARACION DE TECNICAS: ESPECTROSCOPIA INFRARROJA VS CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)

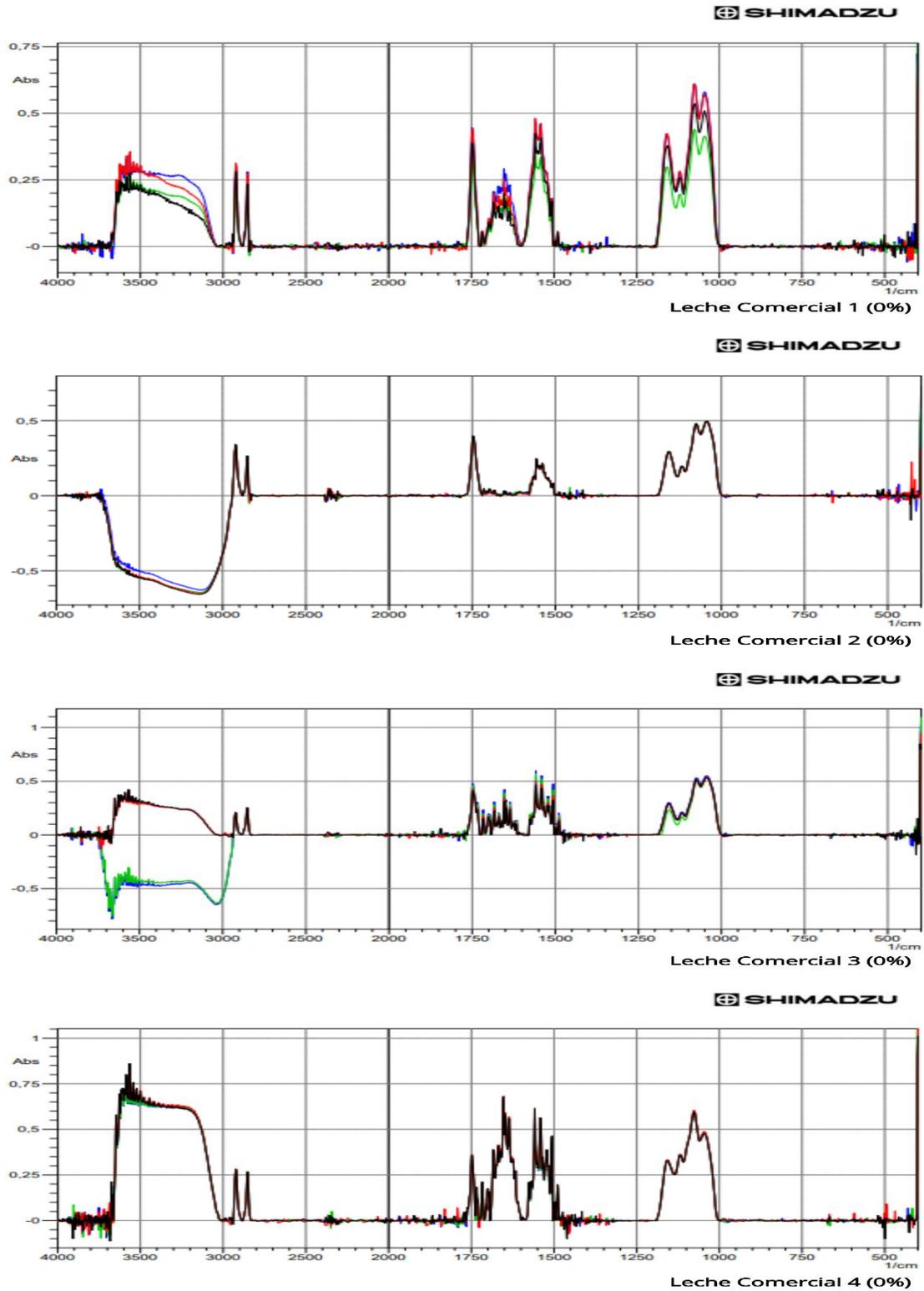
Con el propósito de observar las capacidades analíticas de la metodología establecida para la espectroscopia infrarroja en el rango medio y cercano comparada con la metodología para la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) establecida en la Pontificia Universidad Javeriana, por los Ingenieros Angela Viviana Hernández y Cesar Steven Peña,<sup>146</sup> y determinar si la espectroscopia infrarroja se puede consolidar como una técnica para la determinación de leche adulterada con lactosuero de mayor simplicidad y rapidez, se estableció un nuevo grupo compuesto por muestras de: leche cruda, leche comercial B y otras cuatro leches de carácter comercial (UHT) nombradas “leche comercial” 1, 2, 3 y 4. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **figura 47**:

**Figura 49.** Espectros en el infrarrojo medio (normalizados) de las muestras de leche para comparación de técnicas.



<sup>146</sup> HERNANDEZ, A.V., y PEÑA, C.S. Op Cit.

Figura 50. (Continuación).



Fuente: Elaboración propia.

Se observa claramente que la repetibilidad se mantiene para cada marca diferente de leche, no se evidencia la aparición de bandas diferentes a aquellas propias de la leche establecidas por bibliografía, sin embargo, si es notable una variación en las bandas de proteína entre diferentes marcas de leche; esto puede ser debido al tratamiento y esterilización que cada productor aplica a la leche antes de comercializarla, o al tiempo de maduración que ha tenido cada leche antes de ser comprada y utilizada en el análisis.

Como se estableció a lo largo del capítulo 3; observar un comportamiento lineal en los espectros, relacionado con los niveles crecientes de adulteración, permitiría desarrollar una curva de calibración con la cual establecer los rango de absorbancia entre los que la técnica detecta cada nivel y generar un modelo de predicción de adulteración, pudiendo así comparar la metodología de cuantificación de la técnica HPLC establecida en la Pontificia Universidad Javeriana la cual es altamente selectiva y precisa con la metodología de predicción desarrollada en el presente proyecto.

A pesar de tratarse de 2 técnicas cuyo procedimiento y resultados no pueden compararse inicialmente, si se puede comparar la capacidad de cada una para “predecir” el nivel de adulteración en una muestra desconocida, permitiendo establecer si la espectroscopia infrarroja puede ser utilizada como una técnica previa, de análisis mucho más rápido que la cromatografía líquida de alta eficacia, que permita agilizar el proceso de analizar y genere una disminución en los gastos por análisis.

Los resultados obtenidos para el grupo de muestras analizadas por medio de la cromatografía líquida de alta eficacia se presentan en la **figura 48 y 49**:

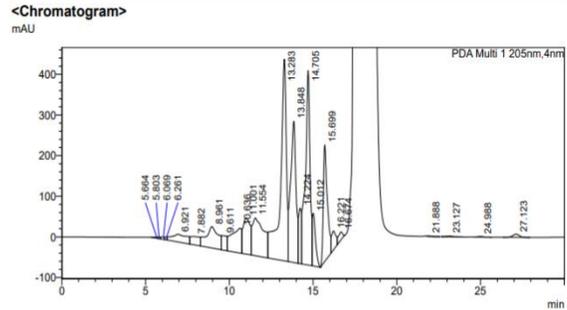
**Figura 51.** Cromatogramas (HPLC) de las muestras de leche sin adulterar para comparación de técnicas.

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

**Leche Cruda**

<Sample Information>  
 Sample Name : B. 0%  
 Sample ID : B. 0%  
 Data Filename : B. 0%.lcd  
 Method Filename : Metodo Leche.lcm  
 Batch Filename : Competencia Septiembre.lcb  
 Vial # : 1-2  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/11/2018 4:55:52 PM  
 Date Processed : 10/11/2018 5:25:55 PM

Sample Type : Standard  
 Level : 1  
 Acquired by : Angela Viviana Hernandez Co  
 Processed by : Angela Viviana Hernandez Co



<Peak Table>  
PDA Ch1 205nm

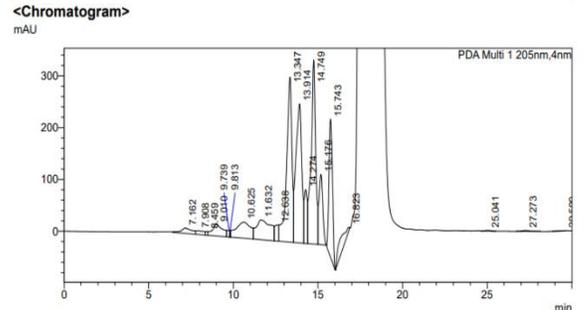
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	5.664	41881	2837	0.000			
2	5.803	33112	3961	0.000		V	
3	6.069	81727	6154	0.000		V	
4	6.261	69271	7672	0.000		V	
5	6.921	1229146	19008	0.000		V	
6	7.882	785219	20505	0.000		V	
7	8.961	2630966	52608	0.000		V	
8	9.611	746537	35145	0.000		V	
9	10.636	2549829	60893	0.000	%	V	c-GMP
10	11.001	2585699	88033	0.000		V	
11	11.554	4498169	92932	0.000		V	
12	13.283	12250017	495983	0.000		V	
13	13.848	7753744	34728	0.000		V	
14	14.224	1641700	136569	0.000		V	
15	14.705	9359783	478601	0.000		V	
16	15.012	1692505	129434	0.000		V	
17	15.699	4756085	286499	0.000		V	
18	16.221	826375	46065	0.000		V	
19	16.674	366072	18842	0.000		V	
20	21.888	23661	1474	0.000		V	
21	23.127	51130	1962	0.000		V	
22	24.988	42176	1669	0.000		V	

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

**Leche Comercial B**

<Sample Information>  
 Sample Name : M. Diego 5  
 Sample ID : M. Diego 5  
 Data Filename : M. Diego 5.lcd  
 Method Filename : Metodo Leche.lcm  
 Batch Filename : Competencia Septiembre.lcb  
 Vial # : 1-54  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/13/2018 8:02:45 AM  
 Date Processed : 10/13/2018 8:32:47 AM

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : Angela Viviana Hernandez Co  
 Processed by : Angela Viviana Hernandez Co



<Peak Table>  
A Ch1 205nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	7.162	479168	10280	0.000		V	
2	7.908	236359	7153	0.000		V	
3	8.459	64885	7372	0.000		V	
4	9.010	965058	22211	0.000		V	
5	9.739	139941	13048	0.000		V	
6	9.813	42458	13302	0.000		V	
7	10.625	1851710	31332	-1.990	%	V	c-GMP
8	11.632	2282927	38290	0.000		V	
9	12.638	482763	31200	0.000		V	
10	13.347	6988066	318435	0.000		V	
11	13.914	6509309	268580	0.000		V	
12	14.274	1254226	104033	0.000		V	
13	14.749	6539362	355334	0.000		V	
14	15.176	2133366	135917	0.000		V	
15	15.743	3805267	266812	0.000		V	
16	16.823	1044041	6615	0.000		V	
17	25.041	37888	1514	0.000		V	
18	27.273	53507	1736	0.000		V	
19	29.599	20820	676	0.000		V	
total		34931123	1633840				

**Fuente:** Elaboración propia.

Las muestras tanto de leche cruda como de leche comercial B componen el blanco analítico ya que se conoce la calidad de estas en términos de adulteración. Los resultados obtenidos por la cromatografía líquida de alta eficacia corroboran la calidad de las leches y permiten establecer una base confiable a partir de la cual se pueden realizar las posteriores adulteraciones. El hecho de que la leche comercial B tenga un porcentaje de c-GMP (El cual es el marcador indicativo de adulteración para esta técnica) menor a 0% indica que la muestra posee una cantidad de c-GMP menor al valor configurado para la técnica analítica. Estos datos permitirían establecer el nivel de absorbancia adecuado para las muestras de leche sin adulterar (0%) en la espectroscopia infrarroja.

**Figura 52.** Cromatogramas (HPLC) de las muestras de leche comercial de estado desconocido para comparación de muestras.

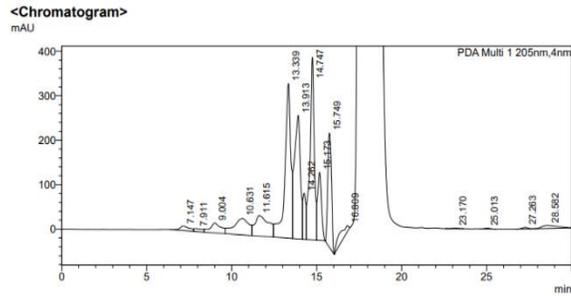
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

### Leche Comercial 1

<Sample Information>

Sample Name : M. Diego 1  
 Sample ID : M. Diego 1  
 Data Filename : M. Diego 1.lcd  
 Method Filename : Metodo Leche.lcm  
 Batch Filename : Competencia Septiembre.lcb  
 Vial # : 1-50  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/13/2018 6:00:53 AM  
 Date Processed : 10/13/2018 6:30:55 AM

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : Angela Viviana Hernandez Co  
 Processed by : Angela Viviana Hernandez Co



<Peak Table>

PDA Ch1 205nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	7.147	434416	10556	0.000		V	
2	7.911	234453	6530	0.000		V	
3	9.004	993679	22226	0.000		V	
4	10.631	2284484	36957	-0.618	%	V	c-GMP
5	11.615	2635555	46413	0.000		V	
6	13.339	8358253	348032	0.000		V	
7	13.913	6785760	278038	0.000		V	
8	14.262	1244826	103737	0.000		V	
9	14.747	7187899	410936	0.000		V	
10	15.173	2481186	152979	0.000		V	
11	15.749	3915217	256563	0.000			
12	16.809	936238	13546	0.000			
13	23.170	28286	1068	0.000			
14	25.013	46494	1766	0.000		V	
15	27.263	77172	3098	0.000			
16	28.582	449933	6904	0.000			
Total		38093849	1699349				

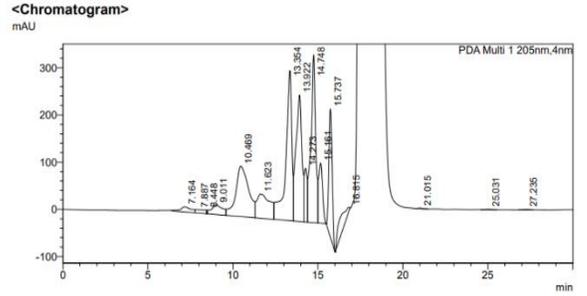
SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

### Leche Comercial 2

<Sample Information>

Sample Name : M. Diego 2  
 Sample ID : M. Diego 2  
 Data Filename : M. Diego 2.lcd  
 Method Filename : Metodo Leche.lcm  
 Batch Filename : Competencia Septiembre.lcb  
 Vial # : 1-51  
 Injection Volume : 20 uL  
 Date Acquired : 10/13/2018 6:31:20 AM  
 Date Processed : 10/13/2018 7:01:22 AM

Sample Type : Unknown  
 Acquired by : Angela Viviana Hernandez Co  
 Processed by : Angela Viviana Hernandez Co

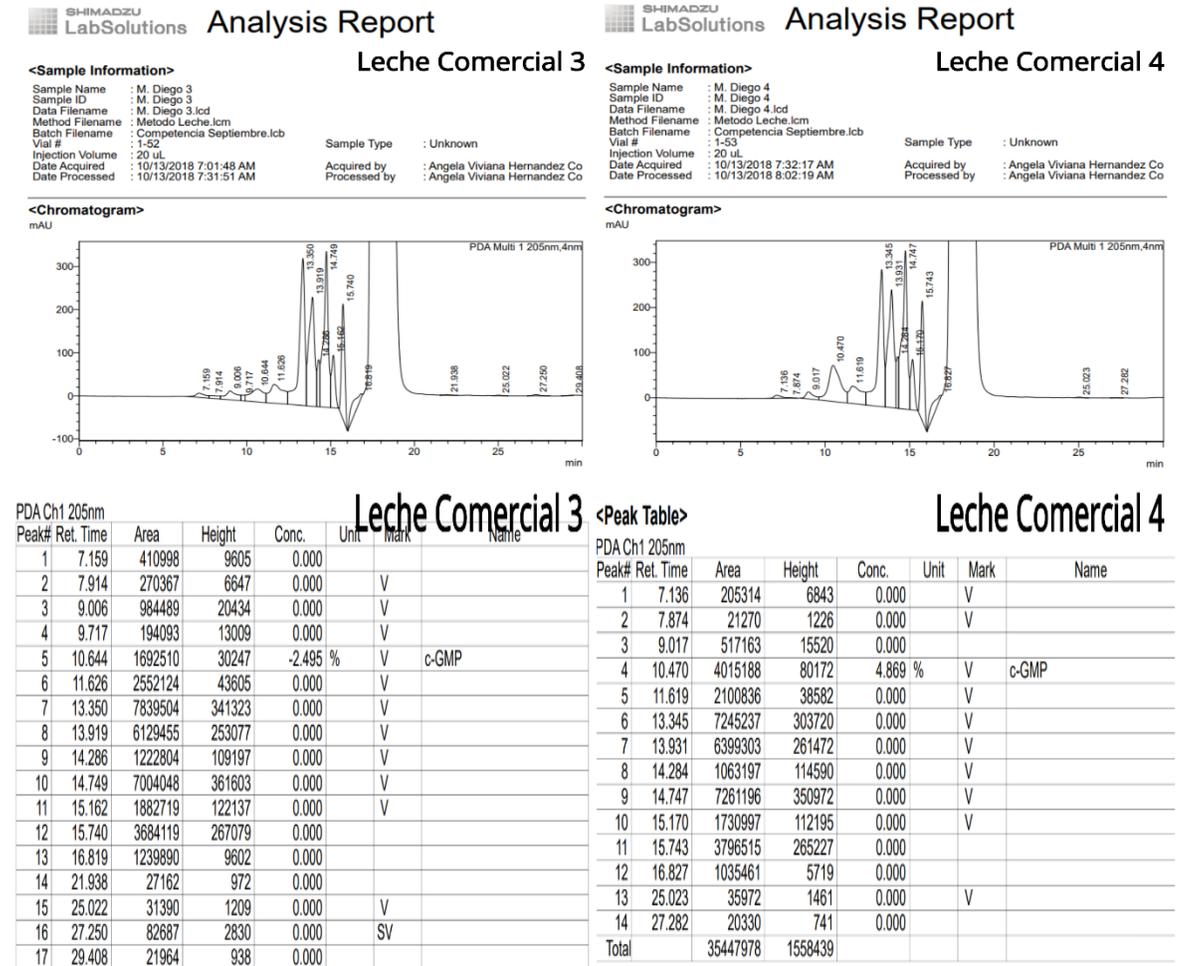


<Peak Table>

PDA Ch1 205nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	Name
1	7.164	486795	10600	0.000		V	
2	7.887	282166	7096	0.000		V	
3	8.448	29398	7616	0.000		V	
4	9.011	939033	20863	0.000		V	
5	10.469	5640918	107016	10.023	%	V	c-GMP
6	11.623	2766754	51182	0.000		V	
7	13.354	7818898	318099	0.000		V	
8	13.922	6506988	267907	0.000		V	
9	14.273	1335314	114017	0.000		V	
10	14.748	6813367	355248	0.000		V	
11	15.161	2078774	127548	0.000		V	
12	15.737	3628825	272226	0.000			
13	16.815	1371052	9966	0.000			
14	21.015	21128	1283	0.000			
15	25.031	36110	1426	0.000		V	
16	27.235	30755	1135	0.000			
Total		39786277	1673230				

Figura 53. (Continuación).



Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos para las cuatro leches comerciales UHT indican que dos de estas están adulteradas a diferentes niveles (10% y 5%) y las otras dos son de "buena calidad". La obtención de estos resultados y la curva de calibración con los datos de la espectroscopia infrarroja, habría permitido contrastar los valores conocidos de adulteración determinados por la cromatografía y la predicción del nivel de adulteración generado a partir de la comparación de la intensidad de las bandas de las leches "de estado desconocido" con los espectros control para cada nivel. Finalmente, una aproximación de los niveles predichos por la metodología de espectroscopia infrarroja a los valores detectados por la cromatografía líquida de alta eficacia habría permitido establecer a la espectroscopia infrarroja como una metodología de detección de adulteración aproximada, de mayor rapidez y economía.

## 5. CONCLUSIONES

- Se estandarizaron las condiciones para llevar a cabo el análisis de muestras de leche adulteradas con lactosuero las cuales se establecieron de la siguiente manera: Volumen de muestra depositada en las celdas de seleniuro de zinc (10  $\mu\text{L}$ ), calentamiento de muestras previo al análisis (35 – 40°C) y aplicación de ultrasonido para homogeneización, esto permitió obtener condiciones óptimas para la obtención de resultados en relación con la repetibilidad de los espectros.
- Se descarta que la aleatoriedad de las intensidades presentadas en las bandas de los espectros para distintos niveles de adulteración sea debida al equipo o a la manipulación y tratamiento de las muestras llevadas a cabo por el investigador, esto debido a que se comprobó que el equipo permite obtener espectros con la resolución adecuada, los cuales se comportan de forma similar a los espectros reportados por bibliografía. También se logró comprobar que el equipo presenta una buena repetibilidad, permitiendo obtener comportamientos idénticos para repetidas mediciones de una misma muestra. Todo lo anterior permitió establecer que la falta de homogeneidad en el espesor de la película de muestra formada para el análisis (de acuerdo con la ley de Beer-Lambert) genera una gran variación en los resultados. De acuerdo al procedimiento de análisis para la espectroscopia infrarroja en modo de transmisión, la lectura de películas de muestra con diferentes espesores generara resultados, en términos de especies absorbentes muy variables, independiente del nivel de adulteración, impidiendo la cuantificación.
- En general, la metodología establecida para la detección de leche adulterada con lactosuero por medio de espectroscopia infrarroja en modo de transmisión muestra la capacidad de detectar la adulteración y convertirse en una herramienta de análisis preliminar. Las regiones sugeridas para realizar dicho análisis se encuentran entre 1000 a 1250  $\text{cm}^{-1}$  (región perteneciente a grupos funcionales característicos de la lactosa) y 1550 a 1690  $\text{cm}^{-1}$  (región perteneciente a grupos funcionales característicos de la proteína) dado que esta última también representa validez científica (gracias al incremento de c-GMP debido a la abundancia de esta especie en el lactosuero) para el análisis si se logra estandarizar el espesor de las películas de muestra analizadas.
- Se descarto la aplicación de la espectroscopia infrarroja en el rango cercano (FT-NIRS) debido a que los espectros obtenidos no presentaron similitudes con el referente bibliográfico y tampoco permitieron obtener información de la muestra. La explicación para la disposición de los resultados se puede atribuir al detector utilizado el cual puede ser un motivo técnico relacionado o a la presencia de

agua en la muestra, ya que esta es una sustancia altamente absorbente de radiación infrarroja, y debido a la naturaleza de la región cercana, la cual exhibe bandas de combinación y sobretonos puede ser susceptible a variaciones fuertes o distorsión del espectro.

- Se elimino el pretratamiento de las muestras con TCA. (contemplado inicialmente debido a su uso en técnicas de separación como la electroforesis capilar y HPLC), no obstante, ya que la espectroscopia infrarroja no es una técnica de separación y tampoco tiene la misma especificidad de las técnicas nombradas anteriormente, no es adecuada para determinar las adulteraciones con una molécula específica (c-GMP) como indicador de adulteración.

## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el análisis de adulteración de leche con lactosuero, utilizando la metodología establecida, mediante celdas de seleniuro de zinc que permitan el control de la película o alícuota que es atravesada por el haz de radiación. Esto permitirá descartar que la incapacidad de obtener una relación lineal entre las intensidades de banda y los niveles de adulteración está ligada al espesor variable de la película de muestra analizada.
- Se recomienda aplicar la metodología establecida en el presente proyecto para el análisis de muestras adulteradas por medio de espectroscopia infrarroja con Reflectancia Total Atenuada (ATR) con el fin de eliminar las desventajas de la espectroscopia infrarroja en modo de transmisión como lo son el control de la alícuota (espesor de la muestra a analizar) y las variaciones debidas a la presencia de agua en la muestra.
- Se recomienda aplicar la metodología establecida en el presente proyecto para el análisis de muestras adulteradas por medio de la espectroscopia infrarroja en la región cercana, en un equipo dedicado para esta región, ya que el equipo IRPrestige-21 de Shimadzu permite realizar análisis en ambas regiones, sin embargo, no es un equipo dedicado para la espectroscopia en la región cercana.
- En caso de continuar con la metodología aquí presentada, se recomienda comparar los resultados obtenidos por la espectroscopia infrarroja con una técnica de separación distinta a la cromatografía líquida de alta eficacia (por ejemplo: Electroforesis Capilar).

## BIBLIOGRAFIA

- ALBEN, James y FIAMINGO, Frank. 1984. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy." *Optical Techniques in Biological Research* 133–79.
- ASHOKKUMAR, MUTHUPANDIAN et al. 2010. "The Ultrasonic Processing of Dairy Products – An Overview." *Dairy Science & Technology* 90(2–3):147–68.
- BAMIEDAKIS. NIKOLAOS. HUTTER, Tanya. PENTY, Richard. WHITE, Ian y ELLIOTT, Stephen. 2013. "PCB-Integrated Optical Waveguide Sensors: An Ammonia Gas Sensor." *Journal of Lightwave Technology* 31(10):1628–35.
- BREMER, Maria et al. 2008. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Bovine Rennet Whey Powder in Milk Powder and Buttermilk Powder." *International Dairy Journal* 18(3):294–302.
- CASSOLI. DAGHER, L. SARTORI, Beatriz y MACHADO, Fernando. 2011. "The Use of the Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Determine Adulterants in Raw Milk." *Revista Brasileira de Zootecnia* 40(11):2591–96.
- CHÁVEZ, Norma. et al. 2012. "A Highly Sensitive Sandwich ELISA for the Determination of Glycomacropeptide to Detect Liquid Whey in Raw Milk." *Dairy Science and Technology* 92(2):121–32.
- CRIBB, Paul. 2011. "Las Proteínas Del Suero de Leche de Los Estados Unidos y La Nutrición En Los Deportes." *Research Scientist, BioDeakin, Deakin University* 2(Wpc 80):1–12.
- DAS. SIULI. GOSWAMI, Bhaswati. y BISWAS, Karabi. 2016. "Milk Adulteration and Detection: A Review." *Sensor Letters* 14(1):4–18.
- EL-SALAM. ABD, M.H. y BUCHHEIMH, W. 1996. "Review Article Characteristics and Potential Uses of the Casein Macropeptide." *International Dairy Journal* 6(327):327–41.
- ERDE, Jonathan. OGORZALE, Rachel y LOO, Joseph. 2014. "Enhanced FASP (EFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments." *Journal of Proteome Research* 13(4):1885–95.

- ERTUGAY, M. FATIH. ŞENGÜL, Mustafa y ŞENGÜL, Memnune. 2004. "Effect of Ultrasound Treatment on Milk Homogenisation and Particle Size Distribution of Fat." *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 28(2):303–8.
- FERREIRA, Isabel y CAÇOTE, Helena. 2003. "Detection and Quantification of Bovine, Ovine and Caprine Milk Percentages in Protected Denomination of Origin Cheeses by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Beta-Lactoglobulins." *Journal of Chromatography A* 1015(1–2):111–18.
- FOEGEDING, E. A. y LUCK, P. J. 2002. "Whey Protein Products." *Milk Proteins* 1957–60.
- FOX, K. K. HOLSINGER, V. H. POSATI, L. P. y PALLANSCH, M. J. 1967. "Separation of  $\beta$ -Lactoglobulin from Other Milk Serum Proteins by Trichloroacetic Acid." *Journal of Dairy Science* 50(9):1363–67.
- GRANDA-RESTREPO, Diana. MEDINA-PINEDA, Yaqueline. CULEBRAS-RUBIO, Mario y GÓMEZ-CLARI, Clara. 2014. "Desarrollo y Caracterización de Una Película Activa Biodegradable Con Antioxidantes (Alfa-Tocoferol) a Partir de Las Proteínas Del Lactosuero." *Vitae* 21(1):11–19.
- GRELET, C. FERNÁNDEZ PIERNA, J. A. DARDENNE, P. BAETEN, V. y DEHARENG, F. 2015. "Standardization of Milk Mid-Infrared Spectra from a European Dairy Network." *Journal of Dairy Science* 98(4):2150–60.
- HA, Ewan y ZEMEL, Michael. 2003. "Functional Properties of Whey, Whey Components, and Essential Amino Acids: Mechanisms Underlying Health Benefits for Active People (Review)." *Journal of Nutritional Biochemistry* 14(5):251–58.
- HAUG, Anna. HØSTMARK, Arne y HARSTAD, Odd. 2007. "Bovine Milk in Human Nutrition - A Review." *Lipids in Health and Disease* 6:1–16.
- HAYES, Maurice G. OLIVEIRA, Jorge. MCSWEENEY, Paul y KELLY, Alan. 2002. "Thermal Inactivation of Chymosin during Cheese Manufacture." *Journal of Dairy Research* 69(2):269–79.
- HERNÁNDEZ-ROJAS, F y VÉLEZ-RUIZ, J. F. 2014. "Suero de Leche y Su Aplicación En La Elaboración de Alimentos Funcionales." *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 8(2):13–22.

HONGYU, Wu. HULBERT, Greg y MOUNT, John. 2000. "Effects of Ultrasound on Milk Homogenization and Fermentation with Yogurt Starter." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1(3):211–18.

HUERTAS, Ricardo. 2008. "LACTOSUERO: IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS." *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 62(1):4967–82.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERTIFICACION. Compendio de normas para trabajos escritos. NTC-1486-6166. Bogotá D.C.: El instituto, 2018. ISBN 9789588585673 153 p.

ISIDRA, R. GARCÍA-RISCO, Mónica. LÓPEZ-FANDIÑO, Rosina. OLANO, Agustín y RAMOS, Mercedes. 2000. "Detection of Rennet Whey Solids in UHT Milk by Capillary Electrophoresis." *International Dairy Journal* 10(5–6):333–38.

KASEMSUMRAN, Sumaporn. THANAPASE Warunee y KIATSOONTHON, Artaya. 2007. "Feasibility of Near-Infrared Spectroscopy to Detect and to Quantify Adulterants in Cow Milk." *Analytical Sciences* 23(7):907–10.

KELLY, A. L. y LARSEN, L. 2010. *Milk Biochemistry*. Vol. 1. Woodhead Publishing Limited.

KIM, Kiseok. LEE, Seungjin. RYU, Sungho y HAN, Dongil. 2014. "Efficient Isolation and Elution of Cellular Proteins Using Aptamer-Mediated Protein Precipitation Assay." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 448(1):114–19.

KUMAR, A. GROVER, S. SHARMA, J. y BATISH, V. K. 2010. "Chymosin and Other Milk Coagulants: Sources and Biotechnological Interventions." *Critical Reviews in Biotechnology* 30(4):243–58.

LU, Michael y SUN WANG, Nam. 2016. *Spoilage of Milk and Dairy Products*. Elsevier Ltd.

MALLQUI, Luis Artica. 2014. "Métodos Para El Análisis Fisicoquímico de La Leche y Derivados Lácteos Métodos Para El Análisis Fisicoquímico de La Leche y Derivados Lácteos." *Teia* 2:173.

MEHTA, R. S. 1980. "Milk Processed at Ultra-High-Temperatures -A Review." *Journal of Food Protection* 43(3):212–25.

MELINDA, L. y HILTON, C. 2002. "Ultra-High-Temperature (UHT) Treatment of Milk: Comparison of Direct and Indirect Modes of Heating." *Australian Journal of Dairy Technology* 57(3):211–27.

MOSQUERA, Welner. 2015. "Aprovechamiento Del Lactosuero y Sus Componentes Como Materia Prima En La Industria de Alimentos Use of Whey and Its Components as Raw Material in the Food Industry." *@Limentech* 13(1):81–91.

MUNSTEDT, T. RADEMACHER, E. y PETZ, M. 2005. "HPLC, CHARM II, and ELISA: Advantages and Disadvantages for the Analysis of Tetracyclines in Honey." *Apiacta* 40:5–9.

NEELIMA, Rajan Sharma. YUDHISHTHIR, Singh Rajput y MANN, Bimlesh. 2013. "Chemical and Functional Properties of Glycomacropeptide (GMP) and Its Role in the Detection of Cheese Whey Adulteration in Milk: A Review." *Dairy Science and Technology* 93(1):21–43.

NGO, Albert N. 2014. "Optimal Concentration of 2,2,2-Trichloroacetic Acid for Protein Precipitation Based on Response Surface Methodology." *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* 5(4).

Oficial, Diario, Comunidades Europeas, Comunidad Europea, Aoac International, and Los Reglamentos. 2001. "7.2.2001 ES Diario Oficial de Las Comunidades Europeas I (Actos Cuya Publicación Es Una Condición Para Su Aplicabilidad) L 37/1 REGLAMENTO (CE) No 213/2001 DE LA COMISIÓN de 9 de Enero de 2001 Por." (4):63–68.

OLIEMAN, C. y VAN RIEL, J. 1989. "Detection of Rennet Whey Solids in Skim Milk Powder and Buttermilk Powder with Reversed-Phase HPLC." *Neth. Milk Dairy J* 43(January 1989):171–84.

OSBORNE, Brian G. 2000. "Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis." *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1–14.

PERKINELMER. 2005. "FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR)." *PerkinElmer Life and Analytical Sciences* 1–5.

PHADUNGATH, Chanokphat. 2005. "Casein Micelle Structure: A Concise Review." *Journal of Science and Technology* 27(May 2004):201–12.

POONIA, Amrita et al. 2017. "Detection of Adulteration in Milk: A Review." *International Journal of Dairy Technology* 70(1):23–42.

POVEDA, Elpidia. 2013. "Suero Lácteo, Generalidades y Potencial Uso Como Fuente de Calcio de Alta Biodisponibilidad." *Revista Chilena de Nutrición* 40(4):397–403.

SANTOS, P. M. PEREIRA-FILHO, E. R. y RODRIGUEZ-SAONA, L. E. 2013. "Rapid Detection and Quantification of Milk Adulteration Using Infrared Microspectroscopy and Chemometrics Analysis." *Food Chemistry* 138(1):19–24.

TAYLOR, Steve. NORDLEE, Julie. NIEMANN, Lynn y LAMBRECHT, Debra. 2009. "Allergen Immunoassays-Considerations for Use of Naturally Incurred Standards." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395(1):83–92.

TROCH, Thibault et al. 2017. "Cow Milk Coagulation: Process Description, Variation Factors and Evaluation Methodologies. A Review." *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* 21(4):276–87.

ZACHAR, P. ŠOLTÉS, M. KASARDA, R. NOVOTNÝ, J. y MARCINČÁKOVÁ, Novikmecová. 2011. "Analytical Methods for the Species Identification of Milk and Milk Products." *Mljekarstvo* 61(3):199–207.

# **ANEXOS**

## ANEXO A

### FICHA TÉCNICA DEL ACIDO TRICLOROACETICO Fichas Internacionales de Seguridad Química

ÁCIDO TRICLOROACÉTICO			ICSC: 0586 Noviembre 1998
CAS:	76-03-9	Ácido tricloroetanoico	
RTECS:	AJ7875000	TCA	
NU:	1839	$C_2HCl_3O_2 / CCl_3COOH$	
CE Índice Anexo I:	607-004-00-7	Masa molecular: 163.4	
CE / EINECS:	200-927-2		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: están permitidos todos los agentes extintores.
EXPLOSIÓN			
EXPOSICIÓN		¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MEDICO EN TODOS LOS CASOS!
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Sensación de quemazón. Dolor de cabeza. Náuseas. Vómitos. Jadeo. Dificultad respiratoria. Síntomas no inmediatos (véanse Notas).	Ventilación (no si es polvo), extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición de semiincorporado. Respiración artificial si estuviera indicada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Dolor. Enrojecimiento. Ampollas. Quemaduras cutáneas.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Dolor. Enrojecimiento. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Sensación de quemazón. Dolor abdominal. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Dar a beber agua abundante. Reposo. Proporcionar asistencia médica. Véanse Notas.

<b>DERRAMES Y FUGAS</b>	<b>ENVASADO Y ETIQUETADO</b>
<p>Barrer la sustancia derramada e introducirla en un recipiente llenos de agua; si fuera necesario, humedecer el polvo para evitar su dispersión. Neutralizar cuidadosamente el residuo con bases como bicarbonato de sodio y hidróxido de sodio. Eliminarlo a continuación con agua abundante. Protección personal: traje de protección completa incluyendo equipo autónomo de respiración.</p>	<p>Envase irrompible; colocar el envase frágil dentro de un recipiente irrompible cerrado.  Clasificación UE  Símbolo: C, N  R: 35-50/53  S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61  Clasificación NU  Clasificación de Peligros NU: 8  Grupo de Envasado NU: II</p>
<b>RESPUESTA DE EMERGENCIA</b>	<b>ALMACENAMIENTO</b>
<p>Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-80GC4-II+III</p>	<p>Separado de alimentos y piensos. Véanse Peligros Químicos. Mantener en lugar fresco. Mantener en lugar seco. Bien cerrado. Mantener en lugar bien ventilado.</p>
<p style="text-align: center;">Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2005</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: left;"> <p><b>IPCS</b> International Programme on Chemical Safety</p> </div> <div style="text-align: center;">  <b>WHO</b> </div> <div style="text-align: center;">  <b>ILO</b> </div> <div style="text-align: center;">  <b>UNEP</b> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;">  MINISTERIO DE TRABAJO E INMIGRACION </div> <div style="text-align: center;">  INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO </div> </div>	

## Fichas Internacionales de Seguridad Química

<b>ÁCIDO TRICLOROACÉTICO</b>		<b>ICSC: 0586</b>
<b>DATOS IMPORTANTES</b>		
<p><b>ESTADO FÍSICO; ASPECTO</b> Cristales incoloros e higroscópicos, de olor acre.</p> <p><b>PELIGROS QUÍMICOS</b> La sustancia se descompone al calentarla intensamente, produciendo humos tóxicos y corrosivos, incluyendo cloruro de hidrógeno y cloroformo. La disolución en agua es un ácido fuerte, reacciona violentamente con bases y es corrosiva para muchos metales.</p> <p><b>LÍMITES DE EXPOSICIÓN</b> TLV: 1 ppm (como TWA), A3 (ACGIH 2005). MAK: 1lb (no establecido pero hay datos disponibles) (DFG 2005).</p>	<p><b>VÍAS DE EXPOSICIÓN</b> La sustancia se puede absorber por inhalación del vapor y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACIÓN</b> Por evaporación de esta sustancia a 20°C se puede alcanzar bastante lentamente una concentración nociva en el aire.</p> <p><b>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN</b> La sustancia es corrosiva para los ojos, la piel y el tracto respiratorio. Corrosivo por ingestión. La inhalación del vapor puede originar edema pulmonar (véanse Notas). Los efectos pueden aparecer de forma no inmediata. Se recomienda vigilancia médica.</p>	
<b>PROPIEDADES FÍSICAS</b>		
<p>Punto de ebullición: 198°C Punto de fusión: 58°C Densidad: 1.6 g/cm<sup>3</sup></p> <p>Solubilidad en agua: muy elevada Presión de vapor, Pa a 51°C: 133 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 5.6</p>	<p>Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 1.7</p>	
<b>DATOS AMBIENTALES</b>		
<b>NOTAS</b>		
<p>Los síntomas del edema pulmonar no se ponen de manifiesto, a menudo, hasta pasadas algunas horas y se agravan por el esfuerzo físico. Reposo y vigilancia médica son, por ello, imprescindibles. Debe considerarse la inmediata administración de un aerosol adecuado por un médico o persona por él autorizada. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en octubre de 2005: ver Límites de exposición, Clasificación UE, Respuesta de Emergencia</p>		

## ANEXO B

### FICHA TÉCNICA DEL ETANOL

#### Fichas Internacionales de Seguridad Química

<b>ETANOL (ANHIDRO)</b>		<b>ICSC: 0044</b>
<b>Octubre 2000</b>		
Alcohol etílico		
CAS:	64-17-5	<chem>CH3CH2OH</chem> / <chem>C2H6O</chem>
RTECS:	KQ6300000	Masa molecular: 46.1
NU:	1170	
CE Índice Anexo I:	603-002-00-5	
CE / EINECS:	200-578-6	

TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
<b>INCENDIO</b>	Altamente inflamable.	Evitar las llamas, NO producir chispas y NO fumar. NO poner en contacto con oxidantes fuertes.	Polvo, espuma resistente al alcohol, agua en grandes cantidades, dióxido de carbono,
<b>EXPLOSIÓN</b>	Las mezclas vapor/aire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosión. NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.

EXPOSICIÓN			
<b>Inhalación</b>	Tos. Dolor de cabeza. Fatiga. Somnolencia.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
<b>Piel</b>	Piel seca.	Guantes de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar con agua y jabón.
<b>Ojos</b>	Enrojecimiento. Dolor. Quemazón.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
<b>Ingestión</b>	Sensación de quemazón. Dolor de cabeza. Confusión. Vértigo. Pérdida del conocimiento.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica.

<b>DERRAMES Y FUGAS</b>	<b>ENVASADO Y ETIQUETADO</b>
Ventilar. Eliminar toda fuente de ignición. Recoger, en la medida de lo posible, el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos. Eliminar el residuo con agua abundante.	<b>Clasificación UE</b> Símbolo: F R: 11 S: (2-)7-16 <b>Clasificación NU</b> Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II
<b>RESPUESTA DE EMERGENCIA</b>	<b>ALMACENAMIENTO</b>
Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-30S1170. Código NFPA: H 0; F 3; R 0;	A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes.
 <p>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © IPCS, CE 2005</p>	

## Fichas Internacionales de Seguridad Química

<b>ETANOL (ANHIDRO)</b>	<b>ICSC: 0044</b>
-------------------------	-------------------

DATOS IMPORTANTES	
<p><b>ESTADO FÍSICO; ASPECTO:</b> Líquido incoloro, de olor característico.</p> <p><b>PELIGROS FÍSICOS:</b> El vapor se mezcla bien con el aire, formándose fácilmente mezclas explosivas.</p> <p><b>PELIGROS QUÍMICOS:</b> Reacciona lentamente con hipoclorito cálcico, óxido de plata y amoníaco originando peligro de incendio y explosión. Reacciona violentamente con oxidantes fuertes tales como ácido nítrico, nitrato de plata, nitrato de mercurio o perclorato magnésico, originando peligro de incendio y explosión.</p> <p><b>LÍMITES DE EXPOSICIÓN:</b> TLV: 1000 ppm (como TWA), A4 (no clasificable como cancerígeno humano) (ACGIH 2004). MAK: 500 ppm; 960 mg/m<sup>3</sup>; Categoría de limitación de pico: II(2), Cancerígeno: categoría 5, Mutágeno: categoría 5, Riesgo para el embarazo: grupo C (DFG 2004).</p>	<p><b>VÍAS DE EXPOSICIÓN:</b> La sustancia se puede absorber por inhalación del vapor y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACIÓN:</b> Por evaporación de esta sustancia a 20 °C se puede alcanzar bastante lentamente una concentración nociva en el aire.</p> <p><b>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN:</b> La sustancia irrita los ojos. La inhalación de altas concentraciones del vapor puede originar irritación de los ojos y del tracto respiratorio. La sustancia puede afectar al sistema nervioso central.</p> <p><b>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA:</b> El líquido desengrasa la piel. La sustancia puede afectar al tracto respiratorio superior y al sistema nervioso central, dando lugar a irritación, dolor de cabeza, fatiga y falta de concentración. Ver Notas.</p>

<b>PROPIEDADES FÍSICAS</b>	
Punto de ebullición: 79 °C Punto de fusión: -117 °C Densidad relativa (agua = 1): 0,8 Solubilidad en agua: miscible Presión de vapor, kPa a 20 °C: 5,8 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 1,6	Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20 °C (aire = 1): 1,03 Punto de inflamación: 13 °C c.c. Temperatura de autoignición: 363 °C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 3.3-19 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: -0.32
<b>DATOS AMBIENTALES</b>	
<b>NOTAS</b>	
El consumo de etanol durante el embarazo puede afectar al feto. La ingesta crónica de etanol puede causar cirrosis hepática. El punto de inflamación de la disolución acuosa al 50% es 24 °C. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en abril de 2005: ver Límites de exposición.	
<b>INFORMACIÓN ADICIONAL</b>	
Límites de exposición profesional (INSHT 2013):  VLA-EC: 1000 ppm; 1910 mg/m <sup>3</sup>  Notas: Esta sustancia tiene prohibida total o parcialmente su comercialización y uso como fitosanitario y/o biocida.	
<b>Nota legal</b>	Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.
© IPCS, CE 2005	

## ANEXO C

### FICHA TECNICA DE LA ACETONA Fichas Internacionales de Seguridad Química

ACETONA		ICSC: 0087 Abril 2009	
CAS:	67-64-1	2-Propanona	
RTECS:	AL3150000	Dimetil cetona	
NU:	1090	Metil cetona	
CE Índice Anexo I:	606-001-00-8	$C_3H_6O / CH_3-CO-CH_3$	
CE / EINECS:	200-662-2	Masa molecular: 58.1	
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Altamente inflamable.	Evitar las llamas, NO producir chispas y NO fumar.	Polvo, espuma resistente al alcohol, agua en grandes cantidades o dióxido de carbono.
EXPLOSIÓN	Las mezclas vapor/aire son explosivas. El calentamiento intenso puede producir aumento de la presión con riesgo de estallido.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosión. NO utilizar aire comprimido para llenar, vaciar o manipular. Utilícense herramientas manuales no generadoras de chispas.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICIÓN			
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Confusión mental. Dolor de cabeza. Vértigo. Somnolencia. Pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio y reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Piel seca.	Guantes de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor. Visión borrosa.	Gafas de protección de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad). Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Náuseas. Vómitos. (Ver Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica.

<b>EXPOSICIÓN</b>			
Inhalación	Dolor de garganta. Tos. Confusión mental. Dolor de cabeza. Vértigo. Somnolencia. Pérdida del conocimiento.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio y reposo. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Piel seca.	Guantes de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor. Visión borrosa.	Gafas de protección de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad). Proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Náuseas. Vómitos. (Ver Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Proporcionar asistencia médica.
<b>DERRAMES Y FUGAS</b>		<b>ENVASADO Y ETIQUETADO</b>	
Eliminar toda fuente de ignición. Ventilar. Protección personal: filtro para gases y vapores orgánicos de bajo punto de ebullición adaptado a la concentración de la sustancia en el aire. NO verterlo en el alcantarillado. Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes precintables. Absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. Eliminarlo a continuación con agua abundante.		Clasificación UE Símbolo: F, Xi R: 11-36-66-67 S: (2)-9-16-26 Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II Clasificación GHS Peligro Líquido y vapores muy inflamables. Provoca irritación ocular.	
<b>RESPUESTA DE EMERGENCIA</b>		<b>ALMACENAMIENTO</b>	
Código NFPA: H1; F3; R0		A prueba de incendio. Separado de: Ver Peligros Químicos. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas.	
Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2009 			

<b>DATOS AMBIENTALES</b>	
<b>NOTAS</b>	
El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el efecto nocivo.	
<b>INFORMACIÓN ADICIONAL</b>	
Límites de Exposición Profesional (INSHT 2011): VLA-ED: 500 ppm; 1210 mg/m <sup>3</sup> VLB: 50 mg/l en orina. Nota I.	
<b>NOTA LEGAL</b>	Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.
© IPCS, CE 2009	

## ANEXO D

### FICHA TECNICA DEL SELENIURO DE ZINC

#### SECCIÓN 1: Identificación de la sustancia o la mezcla y de la sociedad o la empresa

- **1.1 Identificador del producto**
  - **Nombre comercial:** *ZNSE COATED 45 TROUGH TOP-PLATE*
  - **Número del artículo:** *L1200324*
- **1.2 Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados**
  - *No existen más datos relevantes disponibles.*
  - **Utilización del producto / de la elaboración:** *Sustancias químicas de laboratorio*
- **1.3 Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad**
  - **Fabricante/distribuidor:**

*PerkinElmer, Inc.  
710 Bridgeport Avenue  
Shelton, Connecticut 06484 USA  
CustomerCareUS@perkinelmer.com  
203-925-4600*

*PerkinElmer, Inc.  
Ronda de Poniente 19 28760 Tres Cantos  
Madrid  
Spain*

*atencionalcliente@perkinelmer.com*

*P: 800 099 164 (gratuito)*

*P: 34 918 061 200 (general)*

*F: 800 099 165 (gratuito)*

- **1.4 Teléfono de emergencia:**
  - CHEMTREC (within US) 800-424-9300*
  - CHEMTREC (from outside US) +1 703-527-3887 (call collect)*
  - CHEMTREC (within AU) +(61)-290372994*

#### SECCIÓN 2: Identificación de los peligros

- **2.1 Clasificación de la sustancia o de la mezcla**
  - **Clasificación con arreglo al Reglamento (CE) n° 1272/2008**



*GHS08 peligro para la salud*

*STOT RE 2      H373 Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.*



*GHS09 medio ambiente*

*Aquatic Chronic 2 H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.*



*GHS07*

*Acute Tox. 4      H302 Nocivo en caso de ingestión.*

*Acute Tox. 4      H332 Nocivo en caso de inhalación.*

*( se continua en página 2 )*

ES

Nombre comercial: ZNSE COATED 45 TROUGH TOP-PLATE

( se continua en página 1 )

- **2.2 Elementos de la etiqueta**
- **Etiquetado con arreglo al Reglamento (CE) n° 1272/2008**  
El producto se ha clasificado y etiquetado de conformidad con el reglamento CLP.
- **Pictogramas de peligro GHS07, GHS08, GHS09**
- **Palabra de advertencia Atención**
  
- **Componentes peligrosos a indicar en el etiquetaje:**  
seleniuro de cinc
- **Indicaciones de peligro**  
H302+H332 Nocivo en caso de ingestión o inhalación.  
H373 Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas.  
H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
- **Consejos de prudencia**  
P260 No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.  
P273 Evitar su liberación al medio ambiente.  
P301+P312 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico si la persona se encuentra mal.  
P330 Enjuagarse la boca.  
P304+P340 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración.  
P501 Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.
- **2.3 Otros peligros**  
El producto no contiene compuestos halogenados ligados orgánicamente (AOX), nitratos, combinaciones de metales pesados o formaldehído en cantidades mensurables.
- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
- **PBT:** No aplicable.
- **mPmB:** No aplicable.

### SECCIÓN 3: Composición/información sobre los componentes

- **3.2 Caracterización química: Mezclas**
- **Descripción:** Mezcla formada por las sustancias especificadas a continuación con adiciones no peligrosas.

· **Componentes peligrosos:**

CAS: 60676-86-0 EINECS: 262-373-8	silice, vítrea sustancia a la que se aplica un límite comunitario de exposición en el lugar de trabajo	90,0%
CAS: 1315-09-9 EINECS: 215-259-7	seleniuro de cinc ⚠ Acute Tox. 3, H301; Acute Tox. 3, H331 ⚠ STOT RE 2, H373 ⚠ Aquatic Acute 1, H400; Aquatic Chronic 1, H410	10,0%

- **Indicaciones adicionales:** El texto de los posibles riesgos aquí indicados se puede consultar en el capítulo 16.

ES

**Nombre comercial: ZNSE COATED 45 TROUGH TOP-PLATE**

( se continua en página 2 )

#### **SECCIÓN 4: Primeros auxilios**

· **4.1 Descripción de los primeros auxilios**

· **Instrucciones generales:**

*Los síntomas de intoxicación pueden presentarse después de muchas horas, por lo que se requiere una supervisión médica durante un mínimo de 48 horas después del accidente.*

· **En caso de inhalación del producto:**

*Suministrar aire fresco; eventualmente hacer respiración artificial, calor. Si los trastornos persisten, consultar al médico.*

*Las personas desmayadas deben tenderse y transportarse de lado con la suficiente estabilidad.*

· **En caso de contacto con la piel:** *Por regla general, el producto no irrita la piel.*

· **En caso de con los ojos:** *Limpiar los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente.*

· **En caso de ingestión:** *Consultar inmediatamente un médico.*

· **4.2 Principales síntomas y efectos, agudos y retardados** *No existen más datos relevantes disponibles.*

· **4.3 Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente** *No existen más datos relevantes disponibles.*

#### **SECCIÓN 5: Medidas de lucha contra incendios**

· **5.1 Medios de extinción**

· **Sustancias extintoras apropiadas:** *Combatir los incendios con medidas adaptados al ambiente circundante.*

· **5.2 Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla** *No existen más datos relevantes disponibles.*

· **5.3 Recomendaciones para el personal de lucha contra incendios**

· **Equipo especial de protección:** *Colocarse la protección respiratoria.*

#### **SECCIÓN 6: Medidas en caso de vertido accidental**

· **6.1 Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia** *No es necesario.*

· **6.2 Precauciones relativas al medio ambiente:**

*Al penetrar en las aguas o en el alcantarillado, avisar a las autoridades pertinentes.*

· **6.3 Métodos y material de contención y de limpieza:**

*Desechar el material contaminado como vertido según ítem 13.*

*Asegurar suficiente ventilación.*

· **6.4 Referencia a otras secciones**

*Ver capítulo 7 para mayor información sobre una manipulación segura.*

*Ver capítulo 8 para mayor información sobre el equipo personal de protección.*

*Para mayor información sobre cómo desechar el producto, ver capítulo 13.*