

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

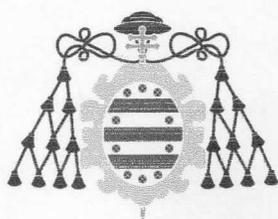
Departamento de Química Física y Analítica.

**Programa de Doctorado con Mención de Calidad: Análisis Químico,
Bioquímico y Estructural Avanzados**

***“Desarrollo y evaluación de herramientas
analíticas para el control de calidad de la
producción láctea”***

TESIS DOCTORAL - OCTUBRE 2015

M. Amelia González Arrojo



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

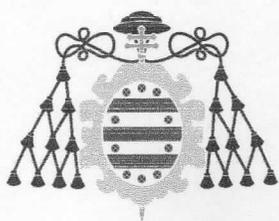
1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA PRODUCCIÓN LÁCTEA	Inglés: DEVELOPMENT AND ASSESMENT OF ANALYTICAL TOOLS FOR MILK PRODUCTION QUALITY CONTROL
2.- Autor	
Nombre: MARÍA AMELIA GONZÁLEZ ARROJO	
Programa de Doctorado: ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL AVANZADO.	
Órgano responsable: FACULTAD DE QUÍMICA	

RESUMEN (en español)

Las conexiones entre alimento, salud animal, nutrición animal y productos animales saludables para consumo humano, como la leche, implican una investigación multidisciplinar. En este sentido, la presencia de ciertos AG de la leche ha adquirido enorme interés dados sus efectos positivos en la salud humana. En el apartado Experimental 1 de la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado la implementación de una metodología para la cuantificación de AG de interés en leche. Se ha estudiado la obtención de la fracción lipídica mediante una centrifugación y ultracentrifugación. Posteriormente se ha optimizado y evaluado el proceso de transmetilación/extracción mediante catálisis básica a diferentes temperaturas. Dichos procesos se han validado por comparación de los resultados con el método de referencia, que incluye una extracción de la fracción lipídica mediante disolventes orgánicos. El método de análisis mediante GC-MS empleado para la cuantificación de los ésteres metílicos de AG así obtenidos, se optimizó para adecuarlo a los AG de interés. Los resultados obtenidos indican que la temperatura no afecta al número de AG identificados, aunque sí a la reproducibilidad del método, y que el desarrollo de una metodología alternativa a temperatura ambiente, cumple los criterios de precisión y exactitud establecidos por la Norma ISO15885/IDF184.

En el estudio Experimental 2, se desarrolló un procedimiento de extracción/metilación de AG en leche en un solo paso, mediante el empleo del MW como alternativa al método convencional. Se probaron digestiones en medio ácido (AD) para leche y fracción lipídica y en medio básico (BD) en muestras de fracción lipídica. El primer fue la optimización secuencial de las condiciones experimentales, tanto instrumentales (T y t), como químicas (ratio muestra/disolvente). Se analizaron estadísticamente los resultados y se establecieron las condiciones más favorables para AD y BD. Se evaluó la exactitud y la precisión del método mediante un material de referencia (grasa de mantequilla). En base a los resultados obtenidos, la metodología BD se considera la seleccionada, estudiando como punto final su reproducibilidad como método de análisis, resultando ser satisfactoria al cumplir los criterios de evaluación de resultados de la Norma ISO15885/IDF184.

Siguiendo en la línea de la mejora de las características nutricionales de los alimentos se ha desarrollado el apartado Experimental 3. En él se describe la influencia de la suplementación de la dieta de vacuno lechero con Se orgánico, con la finalidad de aumentar su concentración en leche y su posible repercusión sobre el contenido de los oligoelementos Zn, Cu, Co y I. Su ingesta regular permitirá una nutrición más equilibrada. El ensayo fue realizado con tres dosis diferentes de Se: D0 o grupo sin suplementación (grupo control), D1, D2 y D3 con contenidos crecientes de Se en la ración. Para el control de metales traza y I, se puso a punto una metodología que lleva asociado el ataque por MW para eliminar la materia orgánica de las muestras de leche y el posterior análisis mediante ICP-MS. Para los metales traza se utilizó un método de digestión de MW ácido y para el I básico. El método fue validado mediante el análisis de un material de referencia certificado. Los resultados mostraron que el contenido en Se experimenta una rápida respuesta, aumentando rápidamente y alcanzando el séptimo día de ensayo el 100% del nivel de estabilización para D1 y el 80% de D2. Sin embargo, para el grupo D3 con dosis más alta, los niveles de Se aumentan hasta el final del experimento. Los grupos con dosis D2 y D3 obtienen recuperaciones de Se que alcanzan en la primera semana



del ensayo el 15% de la CDR para este elemento. En cuanto al Co, Zn y I, no mostraron efectos significativos para la interferencia con Se a ninguna de las dosis estudiadas, sin embargo, se observa que el contenido en Cu total experimenta un descenso a medida que se incrementa la concentración de Se en leche.

En la sección Experimental 4 se describe el desarrollo y la evaluación de modelos quimiométricos NIRS para la caracterización de la leche de vaca a pie de campo. La finalidad es desarrollar una metodología analítica basada en la tecnología NIRS que permita establecer un control de calidad "in-situ" y a tiempo real de las producciones lecheras a nivel de explotación. Empleando un espectrofotómetro portátil MicroPHAZIR, se llevó a cabo la puesta a punto y optimización de la recogida de información espectral, se ensayaron diferentes pretratamientos de las muestras de leche y se optimizaron las condiciones instrumentales de medida con el objetivo de obtener una señal espectral satisfactoria. Se desarrollaron ecuaciones de calibración NIRS, realizando un pretratamiento de la señal espectral y aplicando modelos de regresión lineales multivariantes. Los mejores resultados se obtuvieron recogiendo el espectro de la leche sin pretratamiento utilizando una cubeta de 17 mm. Las condiciones instrumentales más adecuadas fueron 80 barridos a promediar por espectro y tres espectros por muestra de leche. Los estadísticos de las ecuaciones de calibración desarrolladas ponen de manifiesto que es posible la predicción cuantitativa del contenido en grasa, proteína y el ESM.

Posteriormente, se evaluó la transferencia de los modelos desarrollados en el equipo MicroPhazir, Master, a otro equipo similar, Satélite. Se evaluaron diferentes matrices de estandarización con diversos grupos de muestras en función de la distancia al centro poblacional y se desarrollaron los correspondientes algoritmos de clonación hasta conseguir el mejor ajuste posible de los espectros del equipo satélite a los del master. En términos del estadístico RMS(C) los mejores resultados los mostró la matriz desarrollada con 10 espectros de muestras de leche. La evaluación de la transferencia se llevó a cabo sobre una colección de 40 muestras de leche. Los SED (errores estándar de las diferencias) entre los dos equipos alcanzaron una gran reducción que oscila entre más del 85% para la grasa, el 40% para proteína y casi el 30% para lactosa y ESM.

RESUMEN (en Inglés)

The connection of food, animal health, animal nutrition and healthy animal products, as cow milk, involves a complex multidisciplinary research. In this sense, milk fatty acids presence has acquired enormous interest due to their positive effects on human health.

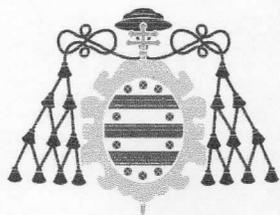
Experimental part 1 of the present Doctoral Thesis consists in the implementation of a methodology to achieve the goal previously proposed for milk fatty acid analysis. The study covers lipid fraction separation by centrifugation and ultracentrifugation and transmethylation/extraction optimization under acidic and basic catalysis and different temperatures. Both processes were validated against reference methodology that applies organic solvents for lipid fraction extraction.

GC-MS program used for chromatographic analyses was optimized for resolution of the fatty acids of interest in the research project associated to this study. The results obtained showed no temperature effect on the fatty acids of interest, but on reproducibility. Room temperature methodology met precision and accuracy criteria established by ISO15885/IDF184, after its validation using a reference material.

In the experimental part 2, a one-step transmethylation/extraction methodology applying microwave energy was developed as an alternative to conventional processes. Acidic (AD) and basic (BD) digestions were tested on two types of samples: liquid milk and lipid fraction aliquots for the acidic digestion and lipid fraction aliquots for basic digestion. Experimental conditions were optimized in operation sequence, temperature, time and finally sample/solvent ratio.

Results were statistically analyzed and the best conditions were chosen for AD and BD. Precision and accuracy were evaluated by comparison with a reference material (butter fat). From the basis of the results so obtained, BD methodology was selected and its reproducibility was tested meeting the goals established by the ISO 15885/IDF184 norm.

Experimental part 3 focuses on improving human diet nutritional improvement, specifically for elder people. The influence of organic Selenium dairy ration supplementation in milk was



studied concluding that its consumption will help to obtain a more equilibrated nutrition. The effect of this Se supplementation on other trace elements in milk, as Zn, Cu, Co and I was also studied.

This study was carried out with four different Se supplementation dosages: D0 without Se supplementation (control group), D1, D2 and D3 with increasing Se supplementation on total mixed ration. The methodology applied for the analysis consisted on a microwave basic or acidic digestion (in order to remove organic matter) followed by ICP-MS quantification. Basic digestion was applied for I and acidic for Co, Cu, Se and Zn. Method validation was carried out using a certified reference material. The results showed that the average Se content in milk rose quickly reaching on day 7, 100 % on D1 and 80% on D2 of steady-state level. Nevertheless, for the highest D3 dosage, Se level increased until the end of the experiment after 63 days of Se supplementation. D2 and D3 dosages groups reached 15% of RDV for Se in the first experiment (8.3 μg Se /100 ml milk). The Co, Zn and I contents did not show significant effects at any Se supplementation level, however, Cu level decreased when Se concentration in milk increased.

Experimental part 4 is carried out in order to develop and evaluate NIRS models for milk characterization in-situ (on-line). Portable MEMS-NIRS sensors are useful tools for the Precision Dairy Farming concept based on managing production optimization in dairy farming. NIRS technology stands out as a high potential tool with high sensor capabilities.

Samples of raw milk were used for the scanning optimization. Different simple milk pre-treatments were tested and instrumental conditions were optimized in order to get optimal spectra information. Scanning was carried out with a portable spectrophotometer MicroPHAZIR (1596 a 2396 nm) with 1mm wide cuvette and 17mm wide cuvette reflective aluminum.

NIR calibration equations were developed with spectra pretreatment and linear multivariate regression models. The best results were obtained using the 17mm wide cuvette, averaged of 80 scans and 3 spectra per sample. Equations statistics so obtained showed good prediction for fat, protein and fat free dry matter. Lactose presented the lowest RSQ due to its narrow variability range. After calibrations models were obtained, the transference from MicroPhazir SERIDA instrument (Master one) to another similar MicroPhazir from the University of Cordoba (slave one). Several cloning sets were developed in order to get the best spectral adjustment between Master and Slave instruments, using 20 milk samples. Different sample groups were used focusing on their GH, with only one sample (GH=0), with 10 and 20 samples. In terms of RMS(C) values, 10 samples group showed the best results. Transfer evaluation was carried out with 40 milk samples group. Standard error of differences (SED) were reduced in 85% for fat, 40% for protein and around 30% for lactose and free fat dry matter.

To summarize, the present work can be considered a summary of different analytical strategies for characterization of milk, a basic component of human diet.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA _____

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL AVANZADO _____

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
I. INTRODUCCIÓN	16
I.1. HISTORIA.....	17
I.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA LECHE Y NUTRICIÓN HUMANA.....	20
1.2.1. GRASA	21
1.2.2. PROTEINAS.....	26
1.2.3. ENZIMAS.....	28
1.2.4. HIDRATOS DE CARBONO.....	28
1.2.5. VITAMINAS.....	29
1.2.6. MINERALES.....	30
I.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LA LECHE	32
1.3.1. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.....	38
1.3.2. ANÁLISIS DE METALES TRAZA	45
I.4. FUNDAMENTOS DE LA TECNOLOGÍA NIRS	55
I.5. QUIMIOMETRÍA Y SU APLICACIÓN EN LA TECNOLOGÍA NIRS	59
1.5.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO	61
I.6. CLONACIÓN DE INSTRUMENTOS	66
I.7. AUTOMATIZACIÓN DE LA GESTIÓN ANIMAL MEDIANTE SENSORES NIRS.....	68
II. OBJETIVOS	73
III. EXPERIMENTAL	75
III.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AG EN LECHE DE VACA.....	76
III.1.1. IMPORTANCIA DE LOS AG EN LA SALUD.....	76
III.1.2. MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO EN AG DE LA LECHE MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN.....	78
III.1.3. ANÁLISIS DE AG EN LECHE: PROBLEMÁTICA.	82
III.1.4. DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN-METILACIÓN PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE MEDIANTE CG-MS.	86
III.2. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA METILACIÓN DE AG BASADO EN EXTRACCIÓN-METILACIÓN MEDIANTE MICROONDAS (MW).	113
III.2.1. INTRODUCCIÓN.....	113
III.2.2. OBJETIVO	115
III.2.3. MUESTRAS	115
III.2.4. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS	115

III.2.5. Obtención de esteres metílicos de AG.....	117
III.2.6. Resultados y discusión.....	124
III.2.7. MAED vs. metodología de referencia.....	130
III.3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO Y ESTUDIO DE SU REPERCUSIÓN EN LOS NIVELES DE ELEMENTOS TRAZA EN LECHE DE VACA.....	133
III.3.1. INTRODUCCIÓN.....	133
III.3.2. OBJETIVO.....	142
III.3.3. METODOLOGÍA ESTUDIADA.....	142
III.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	149
III. 4. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS NIRS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA LECHE DE VACA A PIE DE CAMPO.....	158
III.4.1. INTRODUCCIÓN.....	158
III.4.2. OBJETIVO.....	160
III.4.3. METODOLOGÍA ESTUDIADA.....	160
III.4.4. PUESTA A PUNTO Y OPTIMIZACIÓN DE LA RECOGIDA DE ESPECTROS DE CALIDAD DE LECHE DE VACA.....	164
III.4.5. CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS ESPECTRAL NIRS CON MUESTRA DE LECHE EN SU ESTADO NATURAL.....	170
III.4.6. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS PARA LA PREDICCIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS EN LECHE: GRASA, PROTEÍNA, LACTOSA Y EXTRACTO SECO.....	173
III.4.7. TRANSFERENCIA DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS ENTRE INSTRUMENTOS MEMS- NIRS.....	177
III.4.8. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS TRANSFERIDOS.....	180
IV. CONCLUSIONES.....	183
V. RESUMEN/SUMMARY.....	187
RESUMEN.....	188
SUMMARY.....	193
VI. TRABAJOS FUTUROS.....	197
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	200

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AAS (atomic absorption spectrometry): Espectrometría de absorción atómica,

AC: Corriente alterna

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Ácidos grasos

AGI: Ácidos grasos insaturados

AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: Ácidos grasos poli-insaturados

AGS: Ácidos grasos saturados

Ag⁺-SPE: Extracción en fase sólida mediante ión plata (Solid Phase Extraction)

Ag⁺-HPLC: Extracción en fase sólida mediante cromatografía líquida iónica

BH: Biohidrogenación

c/c: Isómero *cis/cis* de ácido graso diinsaturado

CDR: Cantidad Diaria Recomendada

CID: Disociación inducida por colisiones

CLA: Ácido linoleico conjugado

cs: Células somáticas

c/t: Isómero *cis/trans* de ácido graso diinsaturado

CV: Coeficiente de variación

CP: Componentes principales

DC: Corriente continua

dL: decilitro

DT: Detrend

DTS: espectroscopía digital

ECV: Enfermedades cardiovasculares

ESM: Extracto seco magro

FAAS (flame atomic absorption spectrometry): Espectrometría de absorción atómica de llama

FAD: U S Food and Drug Administration

FAME (Fatty Acid Methyl Ester):Ésteres metílicos de ácidos grasos

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FIR: Espectroscopia en el infrarrojo lejano

FTIR: Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier

GC: Cromatografía de gases

GFAAS (graphite furnace atomic absorption spectrometry): Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito

HGAAS (hydride generation atomic absorption spectrometry): Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros,

HPLC (high performace liquid chromatography): Cromatografía líquida de alta resolución

ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry): Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente

ICP-MS (inductively coupled plasma spectrometry coupled to mass detector): Plasma de acoplamiento inductivo con detección masas

ICP-OES (inductively coupled plasma optic emission spectrometry): Plasma de acoplamiento inductivo de emisión óptica

IR: Infrarrojo

KED: Discriminación de energías cinéticas.

Kg: kilogramo

L: litro

LBD: Lipoproteínas de baja densidad

LC-MS/MS: Cromatografía de líquidos con detector masas/masas

LILA: Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias

MEMS: sistemas microelectromecánicos

mg: Miligramo

µg: Microgramo

MIR: Espectroscopia en el infrarrojo medio

mL: Mililitro

MLR: Regresión lineal múltiple

MRI: material de referencia interno

MSC: Multiplicative scatter correction

m/z: Relación carga/masa

MW: microondas

ng: Nanogramo

NIRS: Espectroscopia en el infrarrojo cercano

PCA: Regresión por componentes principales

PDF (Precision Dairy Farming): Ganadería de precisión

PDF (precision dairy feeding): Gestión de una alimentación de precisión

PLF: Precision Livestock Farming /Smart Livestock Farming

PLS: Regresión por mínimos cuadrados parciales

PLTL: Power Level Too Low

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

R²C: *Coefficiente de determinación de la calibración*

RER: relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para la población de calibración y el error típico de validación cruzada

RPS: Relaciona la desviación típica de los datos de referencia para la población de validación y el error típico de validación cruzada o de predicción

SEC: Error estándar de calibración

SECV: Error estándar de validación cruzada

SEP: Error estándar de predicción

SNV: standard normal variate

SNV&D: Standard normal variate transformation and detrending

T: Temperatura

T_r: Tiempo de retención

1-VR: Coeficiente de determinación para la validación cruzada

ω3 y ω6: Ácidos grasos omega 3 y omega 6

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Vista de una ubre seccionada. 1. Cisterna de la ubre. 2. Cisterna del pezón. 3. Canal del pezón. 4. Alvéolos. (Fuente: <i>Manual de Industrias Lácteas 1996</i>).....	18
Figura 1.1.2. Evolución de la producción de leche en España (1961-2013)(Fuente: <i>FAO,2015</i>).....	19
Figura 1.3.1. Regiones del espectro electromagnético (Fuente: <i>Pavia et al. ,2000</i>).....	35
Figura 1.3.1.1. Absorbancia promedio (log (1/R) del espectro NIR para leche líquida (a) y deshidratada (b) (Fuente: <i>Coppa et al., 2010</i>).....	43
Figura 1.3.2.1. Ejemplo de la señal ICP-MS para el azufre en leche materna durante distintos días de lactación (A) y distintas leche fórmula (B) previa separación cromatográfica. (Fuente: <i>de la Flor St. Remy et al., 2004</i>).....	45
Figura 1.3.2.2. a) Límites de detección típicos para las principales técnicas espectrométricas b) Sistemas típicos de costo para los sistemas espectométricos atómicos.....	46
Figura 1.3.2.3. Esquema analizador de masas de sector magnético de doble enfoque. (Fuente: <i>Ruth E. Wolf, 2005</i>).....	49
Figura 1.3.2.4. Configuraciones instrumentales de ICP-MS (Fuente: <i>Aebersold y Mann, 2003</i>).....	49
Figura 1.3.2.5. Detección de Se empleando un sistema ICP-MS con celda de reacción (a) vs. ICP-QQQ (b).).....	54
Figura 3.3.1. Fenómenos de interacción entre la radiación electromagnética y la materia. (Fuente: <i>adaptado de Clinuvel Pharmaceuticals, 2010</i>).....	56
Figura 3.3.2. Vibraciones moleculares de dos átomos frente a un átomo central.....	57
Figura 3.3.3. Esquema de modos de análisis NIRS: A) Reflectancia B) Transmitancia C) Transreflectancia D) Interactancia. (Fuente: <i>Zamora, 2013</i>).....	59
Figura 1.5.1.1. Esquema de desarrollo de un modelo de predicción NIRS.....	64
Figura 1.7.1. Esquema de concepto de la ganadería de precisión. (Fuente: <i>adaptado de Telecommunications Software System Group (TSSG), centro de excelencia de Tecnología de Información y Comunicación (Information and Communications Technologies (ICT)</i>).....	69
Figura 3.1.2.1. Esquema de la digestión de la grasa por los rumiantes (Fuente: <i>adaptada</i>	

de Chamberlain y Wilkinson, 1996).....	79
Figura 3.1.2.2. Ruta de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados (AGI): linoleico, linolénico y oleico (<i>Fuente: Adaptado de Harfoot y Hazlewood, 1988</i>).....	80
Figura 3.1.2.3. Principales vías de síntesis de ácido vaccénico y ácido ruménico en vacuno de leche (<i>Fuente: Adaptada de Chilliard et al., 2001a</i>).....	81
Figura 3.1.4.3.1. Equipo VARIAN 4000GC-MS y CombiPAL Autosampler Control.....	87
Figura 3.1.4.4.1.1. Cromatograma de la mezcla FAME y ésteres metílicos de ácidos ruménico y vaccénico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.4.4.1.1. y columna CP SIL 88 30m.....	89
Figura 3.1.4.4.1.2. Cromatograma de la mezcla FAME y ésteres metílicos de ácidos ruménico y vaccénico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.4.4.1.2. Columna CP SIL 88 100m.....	90
Figura 3.1.4.4.1.3. Cromatograma mezcla FAME y mezcla de ésteres metílicos del ácido trans-vaccénico y ruménico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.3. Columna CP SIL-88 100m.....	92
Figura 3.1.4.4.1.4. Comparación de la elución del ácido trans-vaccénico en las condiciones seleccionadas (tabla 3.1.4.4.1.2) y según método B (tabla 3.1.4.4.1.3).....	92
Figura 3.1.4.4.2.2.1. Esquema general del proceso de preparación de ésteres metílicos, según el proceso de extracción.....	97
Figura 3.1.4.4.2.2.2. Diluciones empleadas para el análisis mediante GC-MS de los extractos de ésteres metílicos obtenidos mediante distintos tipos de extracción.....	98
Figura 3.1.4.4.2.3.1. Esquema analítico seguido para la selección de las condiciones experimentales de metilación.....	100
Figura 3.1.4.4.2.3.2. Perfil cromatográfico del análisis de muestras de leche con extracción lipídica mediante centrifugación (Método a – Feng, 2004) y mediante extracción con hexano/isopropanol (Método b – Hara y Radin, 1978) a T ambiente..	101
Figura 3.1.4.4.2.4.1 Evolución del coeficiente de variación (CV) en función del porcentaje de AG cuantificado (%AG) en muestras de leche.....	105
Figura 3.1.4.4.2.5.1. Metodología seleccionada para el análisis rutinario de muestras de leche.....	111

Figura 3.2.1.1. Radiación Microondas y su efecto en las moléculas.....	115
Figura 3.2.4.1. Detalle del termopar y sensor de T en el interior del horno MW.....	116
Figura 3.2.4.2. Recipiente de digestión o "bomba" de MW.....	116
Figura 3.2.5.1. Estrategia analítica seguida para la optimización de las condiciones experimentales con MW, tanto mediante catálisis básica ó ácida. <i>dvte:disolvente</i>	118
Figura 3.2.5.4.1. Cromatogramas correspondientes a los distintos programas de temperatura evaluados según Kramer et al., (2008) y el programa optimizado seleccionado para el análisis.....	122
Figura 3.3.1.1. Estructura molecular de la Vitamina B12 (Cobalamina).....	136
Figura 3.3.1.2. Concentración de Se en leche en función del tipo de suplementación y semana de tratamiento. (Fuente: Orffa/Excential).....	138
Figura 3.3.1.3. Ruta metabólica del Se (Fuente: adaptada de Suzuki, 2005).....	140
Figura 3.3.1.4. Diferencia entre selenoproteínas, proteínas que contienen Se y metaloproteínas. (Fuente: adaptada de Suzuki, 2005).....	141
Figura 3.3.3.1.1. Sistema automatizado de ordeño del rebaño experimental de leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes de SERIDA. 1: Robot de ordeño; 2: Vaca en ordeño; 3: Muestreador automático.....	143
Figura 3.3.3.1.2. Muestreo de leche llevado a cabo durante 9 semanas en el rebaño de leche.....	144
Figura 3.3.3.2.1. Sección del equipo ICP-MS con celda de colisión/reacción (ORC) Agilent 7500c.....	146
Figura 3.3.4.3.1. Contenido de elementos traza en muestras de leche expresado en base 100 para diferentes dosis de suplementación de Se en diferentes días de muestreo.....	154
Figura 3.3.4.4.1. Interrelaciones entre elementos minerales. (Fuente: IX Seminario de Pastos y Forrajes 2005.....	157
Figura 3.4.3.2.1. Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 1mm para acople a microPHAZIR.....	162

Figura 3.4.3.2.2. Equipo portátil microPHAZIR. (a) Esquema de modo de incidencia de la luz sobre la muestra y (b) Adaptador para líquidos acoplado a microPHAZIR.....	162
Figura 3.4.3.2.3. Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 17 mm FOSS....	163
Figura 3.4.3.2.4. Equipos on-line FOSS NIRSystems 6500 y cápsula para líquidos opaco.....	163
Figura 3.4.4.1.1. Espectros promedio de leche líquida y diluida recogidos en el equipo MicroPhazir.....	167
Figura 3.4.4.1.2. Espectros promedio de leche líquida, diluida y filtrada recogidos en el equipo MicroPhazir.....	167
Figura 3.4.4.1.3. Espectros promedio de leche líquida sin pretratamiento recogidos en el equipo de referencia FOSS NIRSystem.....	168
Figura 3.4.4.1.4. Espectros promedio de leche líquida recogidos con diferentes cubetas e instrumentos: A) MicroPHAZIR cubeta 1mm y adaptador; B) MicroPHAZIR cubeta 17 mm sin adaptador; C) Referencia FOSS NIRSystem cubeta 17 mm.....	169
Figura 3.4.5.1. Recogida de muestras y análisis NIRS de leche en el equipo MicroPhazir.....	170
Figura 3.4.5.1.1. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para grasa.....	172
Figura 3.4.5.1.2. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para proteína.....	172
Figura 3.4.5.1.3. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para células somáticas.....	173
Figura 3.4.6.1.1. Correlación entre los valores de referencia vs predichos NIRS para los parámetros de grasa y proteína en leche líquida.....	175
Figura 3.4.6.1.2. Correlación entre los valores de referencia vs predichos NIRS para los parámetros de lactosa y ESM en leche líquida.....	176

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.1. Países con mayor producción láctea mundial 2011-2013 (datos en miles de toneladas).....	19
Tabla 1.2.1 Constantes físicas de la leche de vaca.....	20
Tabla 1.2.2. Componentes mayoritarios de la leche de vaca.....	21
Tabla 1.2.1.1. Constituyentes de la fracción lipídica de la leche de vaca.....	21
Tabla 1.2.1.2. Acciones atribuidas a los CLA y $\omega 3$ en el organismo humano.....	24
Tabla 1.2.1.3. Composición promedio de AG(%) de la leche de vaca.....	25
Tabla 1.2.2.1. Concentración de las diferentes proteínas en la leche de vaca.....	27
Tabla 1.2.5.1. Contenido vitamínico en la leche de vaca.....	29
Tabla 1.2.6.1. Contenido en minerales y oligoelementos en la leche de vaca (mg L ⁻¹)	31
Tabla 1.3.1 Resumen de metodologías normalizadas para determinación de componentes mayoritarios.....	34
Tabla 1.3.2 División de la región Infrarroja.....	35
Tabla 1.3.1.1. Estadísticos para la predicción NIRS y MIR de AG en leche fresca (g 100g ⁻¹ ; g kg ⁻¹).....	44
Tabla 1.3.2.1. Técnicas de análisis de minerales y elementos traza en distintos alimentos.....	47
Tabla 3.1.4.4.1.1. Programa de temperatura óptimo para columna CPSIL88 30m.....	89
Tabla 3.1.4.4.1.2. Programa de temperatura óptimo para columna CPSIL88 100m.....	90
Tabla 3.1.4.4.1.3. Programa de temperatura Método B (Alves y Bessa, 2007)	91
Tabla 3.1.4.4.1.4. Condiciones cromatográficas seleccionadas.....	93
Tabla 3.1.4.4.1.5. Esteres metílicos de AG identificados en su orden de elución.....	94
Tabla 3.1.4.4.2.1.1. Metodologías de extracción lipídica y su viabilidad según diferentes autores.....	95
Tabla 3.1.4.4.2.3.1. Relación de AGS y AGI estudiados en el marco de este trabajo.....	99

Tabla 3.1.4.4.2.3.2. Promedio del porcentaje de AG sobre AG totales en condiciones de reproducibilidad, según la extracción lipídica: Método a(Feng, 2004) vs. b (Hara y Radin, 1978).....	102
Tabla 3.1.4.4.2.4.1. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del %AG sobre AG totales, en experimentos con muestras reales de leche a temperatura ambiente para operadores A y B , en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.....	103
Tabla 3.1.4.4.2.4.2. Valores de los experimentos con muestras de leche a temperatura ambiente (T0) para los operadores A y B, mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Repetibilidad.....	106
Tabla 3.1.4.4.2.4.3. Valores de los experimentos con muestras de leche a 80°C (T1) para los operadores A y B mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Repetibilidad.....	107
Tabla 3.1.4.4.2.4.4. Tabla 3.1.4.4.2.4.4. Valores de los experimentos con muestras de leche a temperatura ambiente (T0) para el promedio de los operadores A y B mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Reproducibilidad intermedia.....	108
Tabla 3.1.4.4.2.4.5. Valores de los experimentos con muestras de leche a 80°C (T1) para el promedio de los operadores A y B (P) mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Reproducibilidad intermedia.....	109
Tabla 3.1.4.4.2.5.1. Valores correspondientes al material de referencia (grasa de mantequilla) y valores de dispersión aceptados (según norma ISO15885/FIL 184)....	112
Tabla 3.1.4.4.2.5.2. Análisis de grasa de mantequilla como material de referencia para los AG con valores de referencia C18:1, C18:2 y C18:3.....	112
Tabla 3.1.4.4.2.5.3. Comparativa entre el valor teórico del material de referencia y resultados experimentales.....	113
Tabla 3.2.4.1. Valores de AG de referencia de la muestra de grasa de mantequilla.	117
Tabla 3.2.5.2.1. Optimización de parámetros MW bajo condiciones ácidas/básicas a una potencia de 700W.....	119
Tabla 3.2.5.4.1. Programas de temperatura GC-MS evaluados para la optimización del método según Kramer <i>et al.</i> , 2008.....	121

Tabla 3.2.5.4.2. Programa optimizado de temperatura para análisis de AG mediante GC-MS.....	123
Tabla 3.2.6.1. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto de la temperatura del proceso MW en el perfil de AG en leche.....	126
Tabla 3.2.6.2. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto del tiempo de reacción del proceso MW en el perfil de AG en leche.....	127
Tabla 3.2.6.3. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto del ratio muestra/disolvente del proceso MW en el perfil de AG en leche.....	129
Tabla 3.2.7.1. Evaluación de la exactitud para la determinación de AG en leche mediante metilación por MW y empleando catálisis ácida (AD) o básica (BD).....	131
Tabla 3.2.7.2. Evaluación de la precisión para la determinación de AG en leche mediante metilación por MW y empleando catálisis ácida (AD) o básica (BD).....	132
Tabla 3.3.1.1. Concentraciones de Cu, Co, I, Se y Zn en leche de vaca en el noroeste de España ($\mu\text{g L}^{-1}$).....	134
Tabla 3.3.1.2. Cantidades Diarias Recomendadas (CDR) para Co, Cu, I, Se y Zn.....	137
Tabla 3.3.3.2.1. Condiciones experimentales de medida en ICP-MS para la determinación simultánea de elementos traza en muestras de leche.....	146
Tabla 3.3.3.4.1. Condiciones experimentales de mineralización MW para la determinación simultánea de elementos traza en muestras de leche.....	148
Tabla 3.3.4.1.1. Producción y composición de la leche en los tres tratamientos de ensayo.....	150
Tabla 3.3.4.2.1. Valores de recuperación obtenidos para Se, Cu, Co, I y Zn mediante ICP-MS para el material de referencia BCR 063R ($\mu\text{g g}^{-1}$).....	151
Tabla 3.3.4.3.1. Concentración de Se, Cu, Co, I y Zn en muestras de leche pertenecientes a los distintos grupos de suplementación (ng g^{-1} leche).....	152
Tabla 3.3.4.3.2. Concentración en Se, Cu, Co, I y Zn en muestras de leche pertenecientes a los distintos grupos de suplementación, referidos al valor del control como base 100.....	153
Tabla 3.4.3.2.1. Principales características de los instrumentos utilizados.....	161

Tabla 3.4.4.1. Metodologías de análisis instrumental evaluadas con el sensor portátil NIRS MicroPHAZIR para optimizar la recogida de datos espectrales en leche líquida..	165
Tabla 3.4.4.2. Modos de análisis desarrollados para el instrumento microPHAZIR, para realizar medidas sobre muestras de leche cruda de vaca y sus características.....	170
Tabla 3.4.4.1.1. Raíz cuadrática media de la diferencia entre espectros corregido por el bias (RMSC) para evaluar la precisión del análisis NIRS en muestras de leche líquida, empleando dos instrumentos y dos tipos de cubetas.....	170
Tabla 3.4.5.1.1. Composición media en parámetros físico-químicos y microbiológicos de la leche.....	171
Tabla 3.4.6.1.1. Variabilidad poblacional y estadísticos de calibración y validación en muestras de leche líquida para determinar su composición.....	174
Tabla 3.4.7.2.1. Raíz cuadrática media de las diferencias espectrales corregida por el bias (RMSC) para las muestras de evaluación de la transferencia, tras la aplicación de matrices de estandarización.....	180
Tabla 3.4.8.2.1. Valores de los errores estándar de predicción (SEP) en el equipo máster (SERIDA) y el satélite (UCO) para componentes mayoritarios en leche líquida, tras la aplicación de matrices de estandarización.....	181
Tabla 3.4.8.2.2. Valores de los errores estándar de las diferencias (SED) de las predicciones en el equipo máster (SERIDA) y el satélite (UCO) para los componentes mayoritarios de la leche líquida, tras la aplicación de matrices de estandarización.....	182

I. INTRODUCCIÓN

I.1. HISTORIA

El **consumo humano de la leche** de origen animal comenzó hace más de 11000 años con la domesticación del ganado durante el llamado óptimo climático. Este proceso se dio en especial en oriente medio, impulsando la revolución neolítica. El primer animal que se domesticó fue la vaca, a partir del *Bos primigenius*, después la cabra, aproximadamente en las mismas fechas, y finalmente la oveja. Existen hipótesis que afirman que esto supuso un cambio fundamental en los hábitos alimentarios de las poblaciones cazadoras-recolectoras, que pasaron de alimentarse con ingestas abundantes pero esporádicas, a recibir aportes diarios de carbohidratos. Hay teorías que plantean que este cambio hizo que las poblaciones euro-asiáticas se volvieran más resistentes a la diabetes tipo dos y más tolerantes a la lactosa, en comparación con otras poblaciones humanas, que sólo más recientemente, conocieron los productos derivados de la ganadería. La revolución industrial en Europa, alrededor de 1830, trajo la posibilidad de transportar la leche fresca desde las zonas rurales a las grandes ciudades, gracias a las mejoras en los transportes. Con el tiempo, han ido apareciendo nuevos instrumentos en la industria de procesado de la leche. Uno de los más conocidos es el de la pasteurización, sugerida para la leche por primera vez en 1886 por el químico agrícola alemán, Franz von Soxhlet. Estas innovaciones han conseguido que la leche tenga unos tiempos de conservación más predecibles y un procesado más higiénico (Wilbey, 1993).

La **leche** es el único alimento de los animales mamíferos durante el primer período de sus vidas. Les proporciona la energía y materiales estructurales esenciales para su crecimiento. La primera secreción que produce la vaca tras el parto se denomina calostro y difiere bastante en composición de la leche que excretará cuatro o cinco días después del parto. El calostro contiene anticuerpos que protegen al ternero de posibles infecciones, hasta que su propio sistema inmunológico se haya desarrollado. Un ternero necesita aproximadamente unos 1000 L de leche para su crecimiento, siendo ésta la cantidad de leche que producían las vacas primitivas (Manual de Industrias Lácteas, 1996). Hoy en día, la mejora genética ha dado lugar a vacas con producciones incluso superiores a 9000 L de leche en cada período de lactación, habiendo ejemplares que llegan a alcanzar los 14000 L (Walsh *et al.*, 2011). Una ternera alcanza su madurez sexual entre los siete u ocho meses. Es fertilizada entre los catorce y los dieciocho meses con un período de gestación de nueve meses (promedio de 285 días). Solamente después del primer parto comenzará a producir leche, ésta es secretada en la ubre de la vaca (figura 1.1.1), compuesta de tejido glandular que contiene un gran número de diminutas vejigas (alrededor de dos mil millones) llamadas

alvéolos. En las paredes de estos últimos se encuentran las células productoras de leche. Los capilares que salen de los alvéolos convergen en conductos de leche que aumentan de tamaño progresivamente y que fluyen hasta una cavidad situada encima del pezón, denominada cisterna de la ubre. Ésta puede llegar a contener hasta el 30% de la leche total de la ubre. Esta cisterna tiene una extensión que recorre el interior del pezón, llamada cisterna del pezón. Este canal está cerrado entre los ordeños mediante un esfínter que evita el goteo de leche y la entrada de bacterias en la ubre.

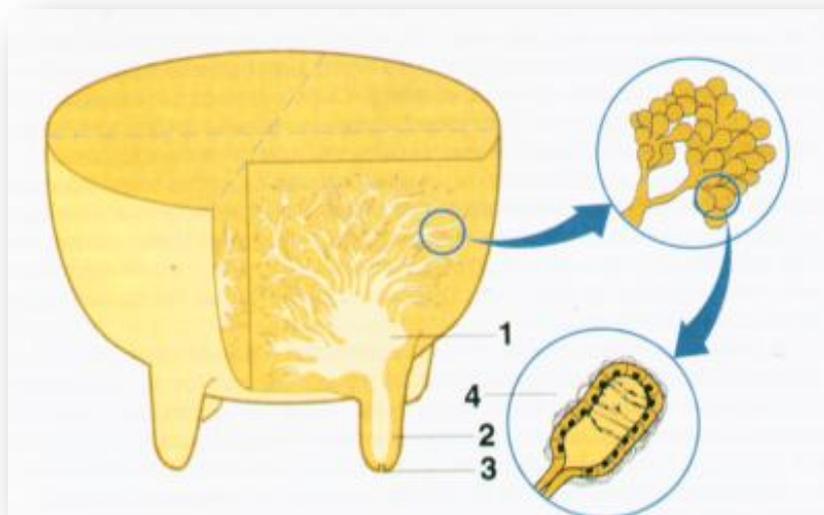


Figura 1.1.1. Vista de una ubre seccionada. 1. Cisterna de la ubre. 2. Cisterna del pezón. 3. Canal del pezón. 4. Alvéolos. (Fuente: *Manual de Industrias Lácteas* 1996).

En cuanto a la **producción mundial de leche**, según la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2015), en el año 2013 ésta alcanzó los 636 millones de toneladas, siendo Estados Unidos y la India los mayores productores, aportando el 14,4% y el 9,5% de la producción total mundial. En la tabla 1.1.1 pueden verse los datos correspondientes a los diez mayores productores mundiales de leche, en toneladas, desde 2011 a 2013, que abarcan el 56,1% mundial.

Tabla 1.1.1. Países con mayor producción láctea mundial 2011-2013 (datos en miles de toneladas).

Productores	2011	2012	2013
Estados Unidos	89,015	90,865	91,271
India	57,770	59,805	60,600
China	36,929	37,784	35,670
Brasil	32,096	32,304	34,255
Alemania	30,323	30,507	31,122
Federación Rusa	31,386	31,501	30,286
Francia	24,361	23,998	23,714
Nueva Zelanda	17,339	19,129	18,883
Turquía	13,802	15,978	16,655
Inglaterra	13,849	13,843	13,941
Producción mundial	616,956	630,184	635,576

(Fuente: FAO,2015)

La figura 1.1.2, muestra la evolución de la producción de leche en España desde los años 60 hasta el año 2013. Ésta ascendió desde 2,947,114 toneladas en 1961, hasta 6,559,175 toneladas en el año 2013, suponiendo un incremento mayor del 100%.

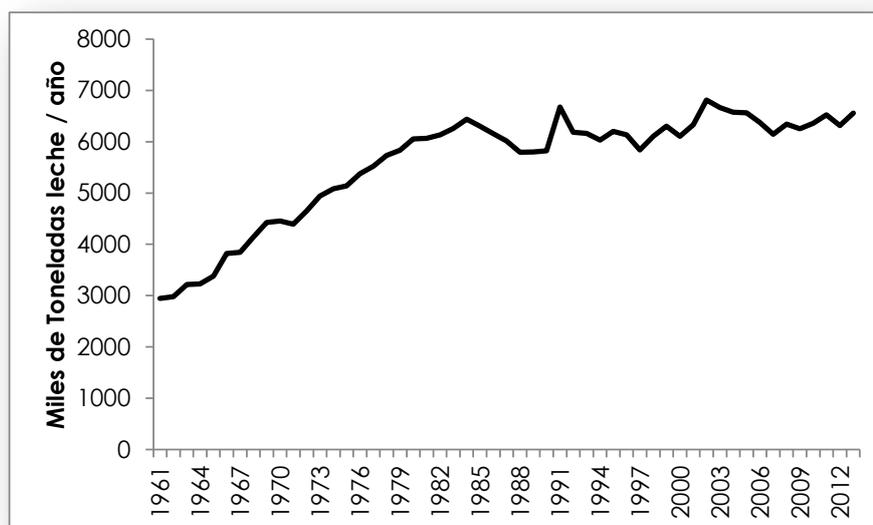


Figura 1.1.2. Evolución de la producción de leche en España (1961-2013)(Fuente: FAO,2015)

Más de seis billones de personas en el mundo consumen leche y productos lácteos. Éste consumo es mayor en los países desarrollados, incrementándose el doble desde los años 60 hasta la actualidad. Sin embargo, la diferencia respecto a países en vías de desarrollo cada vez es más estrecha, debido al crecimiento de la población, la urbanización y el cambio de las dietas. Esta tendencia es acusada en el Este y Sudeste asiático, particularmente en países con elevada población como China, Indonesia y

Vietnam. Pueden establecerse, según la FAO, tres niveles de consumos de leche *per capita*:

- Alto (mayor de 150 kg/capita/año) en Argentina, Armenia, Australia, Costa Rica, Europa, Israel, Kyrgyzstan, América del Norte y Pakistan.
- Medio (30 -150 kg/capita/año) en India, Irán, Japón, Kenia, Mongolia, Nueva Zelanda, Norte y Sur de África, la mayoría de América Latina, y el Caribe.
- Bajo (menos 30 kg/capita/año) en Vietnam, Senegal, centro de África, y la mayoría del Este y Sudeste de Asia.

Este consumo implica que la leche proporciona el 3% del aporte energético, el 6-7% del aporte proteico y el 6-8% del aporte de grasa en Asia y África, comparado con el 9%, el 19% y el 11-14% respectivamente, en Europa y Oceanía.

I.2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LA LECHE Y NUTRICIÓN HUMANA.

La leche de forma genérica puede definirse como un líquido endocrino de color blanco opaco, ligeramente amarillento en función del contenido de β -carotenos de la materia grasa, sensiblemente viscoso y con un gusto variable dependiendo de la especie animal de la que proceda, siendo normalmente agradable y dulzón (Luquet, 1991). En la tabla 1.2.1 se recogen algunos de los valores de constantes físicas más utilizadas para el control de la calidad de la leche de vaca.

Tabla 1.2.1 Constantes físicas de la leche de vaca

Constantes Físicas	Valores
pH (20 °C)	6,5 - 7,0
Acidez valorable	15 - 18 °D *
Densidad	1,028 - 1,036 g/mL
Temperatura de congelación	-0,51 a -0,55°C

* °D: grados Dornic; 1 °D se corresponde a 0,1 g de ácido láctico por litro de leche.
(Fuente: Luquet, 1991)

Desde un punto de vista químico, la leche de vaca es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases (Manual de Industrias Lácteas, 1996):

- Solución: minerales e hidratos de carbono en agua.
- Suspensión: sustancias proteicas en agua

- Emulsión: grasa en agua

Al hablar de la **composición de la leche de vaca**, debemos tener en cuenta que la proporción de los componentes principales de la misma varían de unas razas a otras e incluso entre individuos de la misma raza. La tabla 1.2.2 (Haug *et al.*, 2007) muestra los valores promedio de los principales componentes de la leche de vaca, el porcentaje de contribución a las cantidades diarias recomendadas (CDR) mediante una ingesta de 0,5 L diarios y algunos de los efectos en la salud humana. Gran parte de las propiedades que presenta la leche, así como su calidad nutricional, están determinadas por su composición química.

Tabla 1.2.2. Componentes mayoritarios de la leche de vaca

Componente	Concentración	% CDR* (0,5L)	Efectos en la salud
Grasa	33 g l ⁻¹		Energía
AGS	19 g l ⁻¹		Inhibición virus y bacterias
Oleico	8 g l ⁻¹		Prevención ECV
Laurico	0,8 g l ⁻¹		Antiviral, antibacteriano
Mirístico	3 g l ⁻¹		Aumenta LDL y HDL
Palmítico	8 g l ⁻¹		Aumenta LDL y HDL
Linoleico	1,2 g l ⁻¹		ω6
α-Linolenico	0,75 g l ⁻¹		ω3
Proteína	32 g l ⁻¹	30-40%	Aminoácidos esenciales
Lactosa	53 g l ⁻¹		Productos lactosilación
Calcio	1,1 g l ⁻¹	40-50%	Huesos, dientes, presión sanguínea, control peso
Magnesio	100 mg l ⁻¹	12-16%	Asma en la tercera edad
Zinc	4 mg l ⁻¹	18-25 %	Función inmune
Selenio	37 μg l ⁻¹	30%	Previene cáncer, alergias, ECV
Vitamina E	0,6 mg l ⁻¹	2%	antioxidante
Vitamina A	280 μg l ⁻¹	15-20%	Mejora visión, diferenciación celular
Folato	50 μg l ⁻¹	6%	Síntesis DNA, división celular, metabolismo aminoácidos
Riboflavina	1,83 mg l ⁻¹	60-80%	Prevención ariboflavinosis
Vitamina B ₁₂	4,4 μg l ⁻¹	90%	Papel clave en el metabolismo del folato.

*% CDR: % contribución a la CDR de una ingesta de leche diaria de 0,5L. AGS: ácidos grasos saturados. (Fuente: Insel *et al.*, 2004; USDA,2007)

1.2.1. GRASA

La grasa es el principal componente energético, responsable de muchas de las propiedades físicas y cualidades organolépticas de la leche y los productos lácteos. Está compuesta por triglicéridos (componentes mayoritarios), di- y mono-glicéridos, ácidos grasos (AG), esteroides, carotenoides, vitaminas (A, D, E y K) y otros elementos

traza y componentes minoritarios. Los glóbulos de grasa no sólo son las partículas más grandes de la leche, sino también las más ligeras (0,93 g cm⁻³ a 15,5 °C).

La leche es el alimento que tiene la **composición lipídica más compleja** (Jensen, 2002). Los triglicéridos están compuestos por un alcohol llamado glicerol y distintos AG. Éstos representan más del 98% de la grasa de la leche (tabla 1.2.1.1). Cada molécula de glicerol puede unirse a tres moléculas de AG y como no tienen que ser el mismo, la variedad de glicéridos presentes en la leche es muy amplia. Concretamente, la grasa de la leche de los rumiantes se estima que está constituida por alrededor de 400 AG diferentes, y esto se relaciona en gran parte con el extenso metabolismo de lípidos que ocurre en el rumen (Jensen, 2002). Los más abundantes son el ácido mirístico, el palmítico, el esteárico y el oleico.

Tabla 1.2.1.1. Constituyentes de la fracción lipídica de la leche de vaca

Lípido	% total de lípidos
Fosfolípidos	1,11
Colesterol	0,46
Triacilglicerol	95,80
1,2- Diacilglicerol	2,25
Ácidos grasos libres	0,28
Monoacilglicerol	0,08
Esteres de colesterol	0,02
Hidrocarburos	trazas

Fuente: adaptada de Jensen y Newberg (1995)

Los AG (bien libres o unidos al glicerol) se clasifican en función del número de carbonos de su cadena en tres grupos (Alvarez Nogal, 2004):

- de cadena corta: de 4 a 10 átomos de carbono.
- de cadena intermedia: de 12 a 16 átomos de carbono.
- de cadena larga: más de 18 átomos de carbono.

Obsérvese que hablamos siempre de un número par de átomos de carbono. Ello se debe a que los AG de cadena corta y aproximadamente la mitad de los de cadena intermedia se generan en las células epiteliales mamarias mediante la neosíntesis, en la que subyace también la formación de grasa en el tejido adiposo. En ella el acetato y β -hidroxibutirato de origen ruminal actúan como principales precursores y como proveedor de átomos de carbono para el alargamiento de las cadenas hasta un máximo de 16 carbonos (ácido palmítico C16:0) en las células mamarias y de 18 carbonos (ácido esteárico C18:0) en los adipocitos (Salter *et al.*, 2002). La otra mitad

de los AG de cadena intermedia y todos los de cadena larga llegan a la glándula mamaria vía sanguínea desde una doble fuente: tisular y alimenticia (Bauman y Griinari, 2001). Es decir, movilización de tejido adiposo y digestión intestinal de los lípidos de los alimentos.

Los **dos principales** AGS sintetizados en el tejido adiposo son el palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0), una proporción de los cuales es objeto de desaturación y transformación en sus correspondientes insaturados (AGI), palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1) (Salter *et al.*, 2002). Los AG también pueden llegar a la glándula mamaria a través de la alimentación, ya que tras procesos enzimáticos de hidrólisis y posterior absorción en el intestino delgado, son transportados vía linfática al hígado y desde allí, a través de la sangre a las distintas partes del cuerpo, entre ellas la glándula mamaria. Como norma general, puede considerarse que el 50 % de los AG de la leche proceden de la neosíntesis a partir del acetato (40 %) y β -hidroxibutirato (10 %). El porcentaje restante procederá de los triglicéridos plasmáticos, de los cuales los quilomicrones y las lipoproteínas de baja densidad son los principales componentes (Moore y Christie, 1981), de ahí que haya también AG de cadena impar.

El conocimiento de la **función** de ciertos AG en la salud y el bienestar nutricional y de cómo ejercen sus efectos, ha tenido un importante desarrollo en la última década. Los AG son nutrientes clave que afectan con el tiempo al crecimiento, desarrollo inicial y las enfermedades crónicas nutricionales (FAO, 2008). Dentro de los AG poliinsaturados (AGPI), existen dos grandes familias, omega 3 (ω 3) y omega 6 (ω 6). Los ω 6, son AGI que poseen el primer doble enlace en la posición 6 de la cadena carbonada contando a partir del carbono del metilo, los ω 3 en la posición 3. Los ω 6, tienden a consumirse en exceso en las dietas modernas, sobre todo por su inclusión en productos de comida elaborada. Es bien conocido que los AGPI (por ejemplo los ω 3) juegan un importante papel en la salud humana (tabla 1.2.1.2) y que los AGI que tienen uno o más dobles enlaces en posición *trans* están asociados con alto riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares. Así mismo, se han descrito los beneficios sobre la salud humana de isómeros del ácido linoleico conjugado o CLA, que se encuentran en su mayoría en la carne y los lácteos procedentes de rumiantes. Diversos estudios han demostrado que ambos AG no sólo hay que tomarlos en cantidades suficientes, sino que también hay que guardar una cierta proporción entre ambos (Simopoulos, 2002). De ahí la importancia en la caracterización de la composición de la grasa láctea.

Tabla 1.2.1.2 Acciones atribuidas a los CLA y $\omega 3$ en el organismo humano

CLA

Acción anticancerígena: inhibición del crecimiento tumoral

Acción antiaterogénica: protección contra la aterosclerosis

Acción antilipogénica: limitación acumulación de grasas de reserva (efecto antiobesidad)

Acción antidiabética: normalización de la tolerancia a la glucosa

Acción inmunomoduladora: mejora la respuesta inmunitaria

Acción mineralizadora del esqueleto

AG $\omega 3$

Acción protectora frente a ciertos tumores comunes (mama y colon)

Acción reguladora de los niveles plasmáticos de colesterol: prevención de las enfermedades cardiovasculares

Propiedades antiinflamatorias

(Fuente: Álvarez Nogal, 2004)

Las **cantidades relativas** de cada AG pueden variar considerablemente entre razas e incluso entre individuos de una misma raza. En la tabla 1.2.1.3 (Jensen, 2002) puede verse el contenido promedio en AG de la leche de vaca en Europa y en América, observando como hay diferencias en su contenido en función de la estación y del tipo de alimentación de los animales. Las diferencias en la composición afectarán a distintos factores físicos, como por ejemplo a la dureza de la grasa. La grasa con un contenido elevado de AG de alto punto de fusión, como el palmítico (16:0), será dura, mientras que la grasa con alto contenido en AG de bajo punto de fusión como el oleico (C18:1) tendrá una consistencia más blanda.

Tabla 1.2.1.3. Composición promedio de AG(%) de la leche de vaca

AG	Europa verano	Europa Invierno	USA
C4:0	3,79	3,85	4,5
C5:0	0,02	0,02	-
C6:0	2,10	2,37	2,3
C7:0	0,02	0,03	-
C8:0	1,19	1,39	1,3
C9:0	0,02	0,04	-
C10:0	2,44	3,03	2,7
C10:1	0,27	0,27	-
C11:0	0,04	0,06	0,3
C12:0	2,98	3,57	3,0
C12:1	0,08	0,09	-
C13iso	0,14	0,13	-
C13aiso	0,02	-	-
C13:0	0,08	0,10	0,2
C14iso	0,16	0,10	0,1
C14:0	9,75	11,11	10,6
C14:1	1,08	1,07	-
C14:1n5	-	-	0,9
C15iso	0,43	0,29	0,7
C15aiso	0,74	0,50	-
C15:0	1,35	1,17	1,0
C15:1	-	-	0,3
C16iso	0,30	0,22	-
C16:0	23,46	30,30	28,2
C16:1	2,00	2,03	-
C16:1n7	-	-	1,8
C17iso	0,65	0,55	0,7
C17aiso	0,55	0,52	-
C17:0	0,72	0,64	0,6
C17:1	0,39	0,36	0,4
C18iso	0,05	0,08	-
C18:0	10,58	9,42	12,6
C18:1 t4	0,02	0,01	-
C18:1 t5	0,02	0,01	-
C18:1 t6/7/8	0,26	0,21	-
C18:1 t9	0,27	0,17	-
C18:1 t10	0,29	0,25	-
C18:1 t11	3,82	1,11	-
C18:1 t12	0,33	0,27	-
C18:1 t13/14	0,34	0,24	-
C18:1 t15	0,51	0,38	-
C18:1 t16	0,26	0,19	-
C18:1 t(total)	6,12	2,84	1,7
C18:1 c9	19,44	17,28	-
C18:1 c11	0,55	0,53	-
C18:1 c12	0,10	0,14	-
C18:1 c13	0,06	0,08	-
C18:1 c15	0,02	0,03	-
C18:1 ctotal (no c9)	0,73	0,78	-
C18:1n9	-	-	21,4
C18:1n7	-	-	-
C18:2 (total)	2,17	2,18	3,3
C18:3 c9/12/15	0,61	0,42	-
C18:3n3	-	-	0,3
C19:0	0,09	0,05	-
C20:0	0,16	0,15	0,2

Tabla 1.2.1.3. Composición promedio de AG(%) de la leche de vaca (cont)

AG	Europa verano	Europa Invierno	USA
C20:1	0,31	0,22	-
C20:1n9	-	-	0,6
C20:4	0,09	-	-
C20:4n6	-	-	0,2
C22:0	0,07	0,06	-
C22:1	0,03	-	-
C24:0	0,04	0,04	-

(Fuente: Jensen, 2002. Adaptado de Precht y Molketin, 1999)

1.2.2. PROTEINAS

La leche bovina contiene de promedio 32 g l⁻¹ de proteínas. Aproximadamente el 95% del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína. Las proteínas están constituidas por α -aminoácidos, compuestos que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo en el mismo átomo de carbono, denominado carbono- α . De los veinte aminoácidos que constituyen las proteínas, dieciocho se encuentran en la leche y desde el punto de vista de la nutrición, es importante destacar que ocho (nueve en los niños) de esos veinte, no pueden ser sintetizados por el organismo humano. Dado que son esenciales para mantener un adecuado metabolismo, se denominan aminoácidos esenciales y se encuentran todos presentes en las proteínas de la leche. La leche contiene una amplia gama de proteínas con actividad biológica que abarca desde las antimicrobianas hasta aquellas que facilitan la absorción de nutrientes, así como las que actúan como factores de crecimiento, hormonas, enzimas, anticuerpos e inmuno estimulantes (Clare y Swaisgood, 2000; Haug *et al.*, 2007).

La leche contiene **cientos de tipos distintos de proteínas**, muchas de las cuales se encuentran en muy pequeñas cantidades. Pueden clasificarse de diversas formas según sus propiedades físicas o químicas, o sus funciones biológicas. En la tabla 1.2.2.1 se muestra una lista abreviada de las proteínas de la leche, excluyendo los grupos que se encuentran en muy pequeña proporción. Los tres principales grupos de proteínas presentes en la leche se distinguen por su diferente comportamiento y por su forma de existencia.

Tabla 1.2.2.1. Concentración de las diferentes proteínas en la leche de vaca

Proteínas	Concentración en leche (g kg ⁻¹)	% de proteína total
α_{s1} caseína	10,0	30,6
α_{s2} caseína	2,6	8,0
β -caseína(*)	10,1	30,8
κ -caseína	3,3,	10,1
Total Caseína	26,0	79,5
α -lactoalbúmina	1,2	3,7
β -lactoalbúmina	3,2	9,8
Albumina del suero sanguíneo	0,4	1,2
Inmunoglobulinas	0,7	2,1
Otras (incluyendo peptona-proteasa)	0,8	2,4
Total seroproteínas	6,3	19,3
Proteínas membrana del glóbulo de grasa	0,4	1,2
Proteína total	32,7	100

(*) incluyendo γ -caseína ;(Fuente: Manual de Industrias Lácteas, 1996)

- Las **caseínas** representan el 80% de las proteínas lácteas. Su función biológica se basa en el transporte de calcio y fosfato y la formación de coágulo en el estómago para una digestión eficiente. Son fácilmente precipitadas en la leche por diversos procedimientos, mientras que las proteínas del suero permanecen en solución. Forman fácilmente polímeros que contienen diversos grupos de moléculas idénticos o diferentes y una solución coloidal que puede ser observada en la leche desnatada por su apariencia azul blanquecina. Estos complejos moleculares se conocen como micelas de caseína, pudiendo medir hasta 0,4 micras.

- Si la caseína se elimina de la leche desnatada por algún método de precipitación, como la acción de ácidos minerales, queda en solución un grupo de proteínas que se denominan **proteínas del suero** de la leche (seroproteínas). Son proteínas globulares y sus principales fracciones son la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, la seroalbúmina bovina y las inmunoglobulinas. Estas proteínas en general y la α -lactoalbúmina en particular, son de alto valor nutritivo. Su composición en aminoácidos es muy cercana a la que es considerada como biológicamente óptima. Las proteínas del suero son consideradas como proteína de rápida digestión, proporcionando alta concentración de aminoácidos en el plasma postprandial (Nilsson *et al.*, 2007). Los preparados de proteína de suero son muy utilizados en la industria alimentaria.

- Las **proteínas de la membrana del glóbulo graso** se adhieren, como su nombre indica, a la superficie de dichos glóbulos grasos y solamente pueden separarse mediante acciones mecánicas, tales como el batido de la nata en la fabricación de la mantequilla. Constituyen un grupo que se caracteriza por formar una capa protectora alrededor de los glóbulos de grasa que consigue estabilizar la emulsión. La

consistencia de estas proteínas de membrana puede ser desde suave y gelatinosa, hasta bastante firme y fuerte en otras.

1.2.3. ENZIMAS

Las enzimas son un grupo de proteínas producidas por organismos vivos. Tienen capacidad de provocar reacciones químicas y de afectar el curso y la velocidad de tales reacciones. Las presentes en leche pueden tener su origen en la ubre de la vaca (originales) o en las bacterias (bacterianas). Algunas de estas enzimas se emplean en controles de calidad de la leche.

- **Peroxidasa:** transfiere oxígeno desde el peróxido de hidrógeno a sustancias oxidables. Se desnaturaliza a 80°C en pocos segundos, y por tanto se emplea para comprobar si la temperatura de pasteurización ha superado o no 80°C (test de peroxidasa de Storch).

- **Catalasa:** desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. La leche de ubres enfermas contiene un mayor contenido en catalasa, la leche de ubres sanas contiene solamente una pequeña cantidad. Se destruye por calentamiento a 75°C durante 60s.

- **Fosfatasa:** desdobla ciertos ésteres del ácido fosfórico en ácido fosfórico y los correspondientes alcoholes. Se desnaturaliza a 75°C durante 15-20 s, por lo que puede utilizarse para determinar si se ha alcanzado la temperatura de pasteurización (test de la fosfatasa de Scharer).

- **Lipasa:** desdobla la grasa en glicerol y ácidos grasos libres. El exceso de ácidos grasos libres en la leche da lugar a un sabor rancio. Su acción es débil en la mayoría de los casos.

1.2.4. HIDRATOS DE CARBONO

La **lactosa** es un disacárido presente en la leche de los mamíferos que supone la mayor fuente de hidratos de carbono durante la lactancia. Está formada por los monosacáridos glucosa y galactosa. Su concentración varía entre 3,6-5,5%. Cuando la lactosa es atacada por las bacterias lácticas, se desdobla en sus dos monosacáridos (glucosa y galactosa), que a su vez son atacados por otras enzimas de las bacterias lácticas produciendo principalmente ácido láctico (leche agriada). La leche calentada a alta temperatura adquiere un color oscuro y un sabor a caramelo debido a un proceso químico denominado caramelización, que tiene lugar entre la lactosa y las proteínas (reacción de Maillard). La lactosa es soluble en agua y se presenta como una solución molecular en la leche. En la elaboración del queso, la mayor parte de la lactosa, queda disuelta en el queso. Comparativamente con otros

azúcares es menos dulce (por ejemplo, treinta veces menos dulce que el azúcar de caña).

1.2.5. VITAMINAS

Las vitaminas son compuestos **imprescindibles para la vida**, encargadas de promover un correcto funcionamiento fisiológico. La gran mayoría no pueden ser sintetizadas por el organismo humano, por lo que su ingesta adecuada es fundamental. La leche es una fuente importante de vitaminas. Las vitaminas no se sintetizan en la glándula mamaria, luego las presentes en la leche de vaca se absorben de la sangre. Las vitaminas liposolubles (A, D, E y K) están asociadas al componente graso, mientras que las hidrosolubles (complejo B y vitamina C) se encuentran en la parte no grasa. La concentración de vitaminas liposolubles depende de su presencia en la dieta animal, mientras que las hidrosolubles y la vitamina K, en condiciones normales, no dependen de la misma, al poder ser sintetizadas por la flora ruminal (Mc Donald *et al.*, 2006). En la tabla 1.2.5.1 se detalla el contenido vitamínico de la leche de vaca.

Tabla 1.2.5.1. Contenido vitamínico en la leche de vaca

Vitaminas	mg L ⁻¹ leche	Vitaminas	mg L ⁻¹ leche
A (retinol)	0,33	B ₁₂	0,0043
A (β-caroteno)	0,2	C	21,1
D	0,0006	K	0,04
B ₁ (Tiamina)	0,44	E	0,98
B ₂ (Riboflavina)	1,8	Ác. Fólico	0,05
B ₆ (Piridoxina)	0,64	Ác. Pantoténico	3,46
Biotina	0,031		

(Fuente: González Iglesias, 2010)

- **Vitamina A y E.** Las vitaminas A y E son importantes antioxidantes. El contenido en vitamina E suele ser inferior a 1 mg L⁻¹, sin embargo su contenido en leche puede incrementarse hasta tres y cuatro veces mediante la alimentación. Su ingesta diaria recomendada es de 15 mg al día (Insel *et al.*, 2004). La vitamina E no es un solo compuesto, sino que abarca tocoferoles y tocotrienoles. Existen estudios que asocian las dietas con un consumo elevado de vitamina E, con un descenso del riesgo de padecer cáncer y enfermedades cardiovasculares (ECV), ya que al estimular las células T incrementa la defensa por parte del sistema inmune. La concentración de vitamina A en leche es de 280 µg L⁻¹ y su ingesta recomendada es de 700-900 µg al día (Insel *et al.*, 2004). Tiene su papel en la visión, crecimiento adecuado, reproducción e

inmunidad, diferenciación celular y en mantener huesos sanos, así como la piel y las membranas mucosas.

- **Folato.** El folato está presente en leche en una concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ y la forma más común es el 5-metil-tetrahidrofolato (Forsen *et al.*, 2000). La ingesta diaria recomendada es de $400 \mu\text{g}$ al día y su deficiencia es considerada como la más común de las deficiencias vitamínicas. La suplementación de folato previa a la concepción y en los primeros meses de embarazo reduce ciertos riesgos fetales y su aumento en la dieta se asocia con un descenso de la hipertensión, particularmente en mujeres jóvenes (Forman *et al.*, 2005). Tiene un metabolismo complicado y el 5-metil-tetrahidrofolato, junto con el dihidrofolato, se consideran compuestos activos en la inhibición del crecimiento de las células en el cáncer de colon (Akoglu *et al.*, 2001).

- **B12 y riboflavina.** La leche es también una buena fuente de vitamina B12 y riboflavina ($4,4 \mu\text{g L}^{-1}$ y $1,8 \text{mg L}^{-1}$, respectivamente). Las ingestas diarias recomendadas son $2,4 \mu\text{g}$ para la vitamina B12 y para la riboflavina $1,1 \text{mg}$ al día para las mujeres y $1,3 \text{mg}$ al día para los hombres. La vitamina B12 se encuentra solamente en los alimentos de origen animal y juega un papel central en el metabolismo del folato y la homocisteína, por transferencia de grupos metilo. La riboflavina es parte de importantes coenzimas que participan en numerosas rutas metabólicas celulares y tiene un papel en la función antioxidante de la glutatión peroxidasa y la ruta de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), vía ribonucleotido reductasa.

1.2.6. MINERALES

La concentración de sales minerales en leche no supera el 1%. Las sales minerales se encuentran disueltas en el suero o formando compuestos con la caseína, siendo las sales más importantes las de calcio, sodio, potasio y magnesio, que se encuentran como fosfatos, cloruros, citratos y caseinatos.

La leche contiene además oligoelementos (elementos traza - mg L^{-1} y ultratraza - $\mu\text{g L}^{-1}$) y está demostrado que juegan un papel primordial en conocidas funciones vitales de sistemas biológicos. En los humanos se consideran esenciales el Fe, Cu, Zn, Se, I, Cr y Co, pues su deficiencia ocasiona trastornos de funciones biológicas bien determinadas. La leche es un alimento clave en el aporte de estos compuestos, ya que no sólo los proporciona, sino que lo hace en la forma físico química adecuada para su absorción. En la tabla 1.2.6.1 aparecen los niveles normales de concentración de minerales presentes en leche de vaca. Los minerales pasan de la sangre a la leche mediante sistemas de transporte activo, lo que explica la diferencia de concentración y sus variaciones están asociadas a cambios de alimentación y a aportes externos.

Tabla 1.2.6.1. Contenido en minerales y oligoelementos en la leche de vaca (mg L⁻¹)

Elemento	mg L ⁻¹ leche	Elemento	mg L ⁻¹ leche
Calcio	1200	Hierro	0,3-0,4
Fósforo	1000	Cobre	0,2-0,3
Potasio	1500-1550	Zinc	3-4
Cloro	950-1000	Selenio	0,01-0,03
Sodio	500-510	Yodo	0,09-0,1
Magnesio	120	Manganeso	0,016

(Fuente: González Iglesias, 2010)

- **Calcio.** El aporte de calcio de la leche es de promedio 1g L⁻¹ y la ingesta diaria de leche y productos lácteos tiene un papel clave en asegurar la CDR (en adultos, 1g al día). En la dieta humana tiene un papel esencial, para asegurar unos huesos y dientes sanos, y también ayuda a prevenir la hipertensión, disminuir la incidencia de cáncer de pecho y de colon, mejorar el control de peso y reducir el riesgo de desarrollar cálculos en el riñón (Insel *et al.*, 2004). Las sales de calcio, junto con las de potasio son las más abundantes en la leche.

- **Magnesio.** La leche es una fuente de magnesio importante, ya que contiene 100 mg L⁻¹ siendo la CDR de 400 mg al día para los hombres y 310 mg al día para las mujeres (Insel *et al.*, 2004). Tiene distintas funciones en el organismo, participando en más de 300 reacciones. Su deficiencia está relacionada con la arterioesclerosis y también con trastornos renales. Esta deficiencia suele observarse en la vejez debido a un apetito pobre o una dieta desequilibrada. También juega un papel importante en la reducción del asma (Cheuk *et al.*, 2005).

- **Zinc.** Es parte esencial de varias enzimas y metaloproteínas y tiene diversas funciones en el organismo como la reparación del ADN, el crecimiento y la replicación celular, la expresión génica, el metabolismo de proteínas y lípidos y función inmune y hormonal, entre otras. La leche es una fuente de zinc importante conteniendo entre 3 y 4 mg L⁻¹. La CDR es de 8 y 11 mg al día para mujeres y hombres adultos, respectivamente. La biodisponibilidad del Zn en la leche es mayor que en los vegetales, por lo que la inclusión de la leche en la dieta mejora la disponibilidad total de este elemento (Hansen *et al.*, 1996).

- **Yodo.** Es el componente esencial de la hormona tiroidea, que controla la tasa metabólica, la regulación de la temperatura, la reproducción y el crecimiento. La ingesta de medio litro de leche diario implicaría un consumo de yodo de aproximadamente el 50% de la CDR, que se establece en 150 µg al día en los adultos (Insel *et al.*, 2004). Sin embargo hay que tener en cuenta la gran variación en el contenido de yodo en leche en función de la estación.

- **Selenio.** La concentración de selenio en el organismo está directamente relacionada con su ingesta. Es importante en la salud humana, teniendo diferentes funciones en los sistemas inmune y antioxidante y en la síntesis y reparación del ADN (Dodig y Cepelak, 2004). Protege contra muchos tipos de cáncer y su deficiencia parece estar ligada al agravamiento de los síntomas del asma (Allam y Lucane, 2004) y de los estados anímicos adversos (Rayman, 2002). Forma parte de enzimas involucrados en el metabolismo de la hormona tiroidea. La CDR de selenio es de 55µg (Insel *et al.*, 2004), luego si la leche tuviera entre 50-100 µg L⁻¹, sería una fuente de selenio importante.

I.3. ANÁLISIS QUÍMICO DE LA LECHE

El análisis de la composición de la leche abarca desde la química clásica a los últimos avances instrumentales, empleando desde el análisis gravimétrico hasta la cromatografía de líquidos con detector masas/masas (LC-MS/MS). La mayoría de los ensayos de control de calidad rutinario incluye el análisis de componentes mayoritarios: proteína, grasa, humedad, lactosa, sólidos totales y cenizas. Menos frecuentes son los análisis macroelementales para calcio, magnesio, sodio, potasio, fosfato, nitrato y nitrito, y otra área de análisis mira hacia los elementos a otro nivel, como los elementos traza, las vitaminas y componentes minoritarios como los ácidos grasos y colesterol.

La necesidad de establecer un estricto control analítico de la leche obedece a diferentes motivos:

- Conocer sus características nutricionales
- Controlar la veracidad del etiquetado
- Seguridad alimentaria
- Cumplimiento de la normativa vigente
- Establecer un estándar de composición láctea
- Medir la composición de la leche fresca que llega a las fábricas
- Proveer de la información necesaria para la mejora del ganado nacional

Así mismo, es importante destacar que el pago de la producción láctea se hace en base a unos **parámetros de calidad**, que pueden generar un aumento o una penalización del precio de pago al ganadero. El valor estándar en materia grasa y proteína es de 3,7% y 3,1% respectivamente, y se pagará o descontará por cada décima o fracción que exceda o no alcance el estándar (CLAS, 2015). Se penaliza el precio de la leche recogida que no sea homologada, siendo esta aquella que

presenta ≤ 100000 gérmenes mL^{-1} y ≤ 400000 células somáticas (c.s.) mL^{-1} . El precio también se ve penalizado cuando hay presencia de inhibidores, cuando el punto crioscópico es menor de 510 (lo que indica la presencia de agua añadida) o cuando se trata de leche inestable (leche ácida) que precipita con alcohol de 80°.

Los **métodos normalizados** de análisis para los componentes mayoritarios, basados en metodologías clásicas, pueden ser en algunos casos métodos largos y tediosos, que resultan inviables para el procesado de un número elevado de muestras o bien para obtener resultados en tiempos breves. Pueden verse como métodos "anticuados". Sin embargo, sus resultados llevados a cabo en un determinado número de muestras son la base de datos de referencia para el desarrollo de la calibración para otros métodos más rápidos (por ejemplo los análisis mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano NIRS o análisis en el infrarrojo por Transformada de Fourier FTIR. Su exactitud y precisión son de enorme importancia, ya que de ello dependen los parámetros básicos que caracterizarán los modelos de predicción de estos métodos secundarios. La tabla 1.3.1 muestra esquemáticamente estas metodologías más tradicionales.

Las metodologías detalladas en la tabla 1.3.1 se vuelven inviables como vías de control de calidad si tenemos en cuenta una serie de consideraciones: la producción mundial de leche ha ascendido desde 314 millones de toneladas en 1961 hasta 636 millones de toneladas en 2013 (FAO, 2015). La mayor parte de esta leche se consume en forma líquida y es una fuente importante de la nutrición a nivel mundial, aunque grandes volúmenes de leche también son procesados para generar una amplia gama de alimentos e ingredientes de otros alimentos sólidos y semisólidos. Por consiguiente, la realización de controles analíticos rápidos y fiables para determinar la composición y calidad de la leche son imprescindibles. Y por ello, en las últimas décadas, el desarrollo tecnológico ha posibilitado el reemplazo de los métodos de referencia descritos anteriormente, por otros más automatizados que posibilitan la realización de los análisis físico-químicos de forma rápida y minimizando la generación de residuos contaminantes (Iñón, 2004).

Tabla 1.3.1 Resumen de metodologías normalizadas para determinación de componentes mayoritarios

Componente	Norma	Principio
Grasa (Rose-Gottlieb) (método referencia)	UNE EN ISO 1211:2010	Extracción disolución etanólica amoniacal para análisis con éter de petróleo/dietílico en tubo monjonier (a). Eliminación de disolventes por evaporación o destilación y determinación de masa de sustancias extraídas.
		
Grasa (Gerber) (Método alternativo a Rose-Gottlieb que requiere comparaciones periódicas)	UNE 34898:1986	Separación de la materia grasa por centrifugación en un butirómetro (b) y posterior disolución de las proteínas mediante ácido sulfúrico. La separación se favorece por adición de alcohol isoamílico. El butirómetro permitirá la lectura directa.
		
Extracto Seco	UNE 34-824-83	Dsecación a temperatura constante de una cantidad conocida de muestra hasta masa constante.
Proteína (Kjeldahl) (N calculado en base al amoniaco producido)	ISO 8968-1:2014 IDF 20-1	Digestión con una mezcla de ácido sulfúrico concentrado/sulfato potásico y sulfato de cobre (III) como catalizador, para convertir todo el N orgánico en sulfato amónico. Se añade un exceso de hidróxido sódico, liberándose el amoniaco que se destila a vapor sobre un exceso de ácido bórico, valorando con disolución patrón de ácido clorhídrico
PB = %N x 6,38		
Lactosa	UNE 34-826-83 FIL-28A:1974	Determinación indirecta después de la desproteínización, por valoración de la cantidad de halógeno reducido en el curso de la reacción entre la lactosa y el conjunto yoduro potásico-cloraminaT

Dentro del campo de la lactología, y en concreto, para el análisis de leche, se han utilizado métodos basados en la turbidez y en la fijación de colorantes para la determinación de grasa y proteína respectivamente (O'Sullivan *et al.*, 1999), pero la

técnica que verdaderamente revolucionó los laboratorios de lactología fue la **espectroscopía en el infrarrojo (IR) medio** (ver figura 1.3.1).

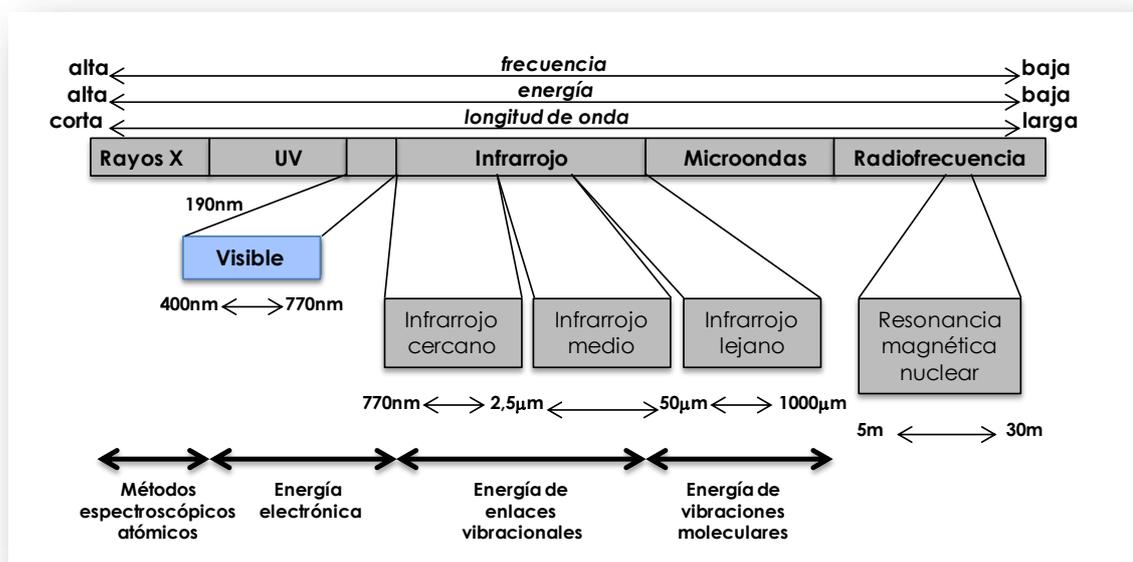


Figura 1.3.1. Regiones del espectro electromagnético (Fuente: Pavia et al., 2000)

Fue Goulden en 1964 (Goulden, 1964) el primero que utilizó el IR medio (tabla 1.3.2) para el análisis de grasa, proteína y lactosa en leche. Posteriormente, en 1974 Foss Electric desarrolló el Milko Scan, con un espectrómetro de doble haz para la medida de grasa, proteína, lactosa y agua en leche (Grappin y Ribadeau-Dumas, 1992).

Tabla 1.3.2 División de la región Infrarroja (IR)

Región	Transiciones características	Intervalo de λ (nm)
Infrarrojo cercano (NIR)	Sobretonos, combinaciones	700-2500
Infrarrojo medio (MIR)	Vibraciones fundamentales	2500-50000
Infrarrojo lejano	Rotaciones	$5 \cdot 10^4$ - 10^6

(Fuente: adaptada O`Sullivan et al., 1999)

Lanher (1996) describió la evaluación de las aplicaciones de la transformada de Fourier en el analizador. FTIR hace referencia al modo en que los datos son tomados y convertidos en un espectro. Comparado con otros instrumentos, los métodos basados en FTIR tienen la ventaja de proveer una relación señal/ruido elevada, medidas de frecuencia exactas y un rápido escaneo que permite el uso de un espectro completo en lugar de unas determinadas longitudes de onda seleccionadas (Sanders, 1984). Se diseñaron distintos instrumentos basados en este método, como el Aegys Mi 600 (para

análisis de alimentos) y el 740 FTIR Nicolet Instrument, este último fue comparado con el instrumento convencional (Milko-Scan 605) (Lefier *et al.*, 1996). Dicha comparación concluyó que aunque con mayor bias y desviación estándar para el análisis de grasa, con una calibración sencilla, el funcionamiento del FTIR era significativamente mejor, simplemente porque proporcionaba mayor información espectral para cada muestra de leche.

Por otro lado, una de las áreas más exitosa hasta la fecha en la automatización del análisis de alimentos, ha sido la **espectroscopía en el infrarrojo cercano** (NIRS, tabla 1.3.2) que ofrece muchas posibilidades. Esta tecnología se basa en la absorción de radiación por parte de ciertos tipos de enlaces químicos, a frecuencias específicas, comprendidas entre 700-2500 nm. Es una técnica más desarrollada hacia la medida cuantitativa que cualitativa, haciéndola ideal para medidas rápidas, necesitando escasa o nula preparación de la muestra, y midiendo distintos parámetros de forma simultánea, es decir, es una técnica multiproducto y multiatributo (Whetsel, 1968). El espectro de la radiación nos proporciona información relacionada con la interacción del hidrógeno y el carbono con otros elementos y puede determinarse la cantidad de enlaces N-H, O-H y C-H presentes en un producto, aunque no fija absorciones específicas que proporcionen información estructural. Además, la tecnología NIRS se encuadraría dentro de la definición de "smart sensors" debido a sus principales características: alta velocidad de respuesta, bajo coste analítico por muestra, facilidad de uso en rutina, técnica no destructiva, versatilidad, elevada reproducibilidad y repetibilidad, técnica limpia, capacidad de incorporación en línea/*in situ* para posibilitar el análisis a gran escala. El análisis NIRS, tal como es entendido hoy en día, es una síntesis de espectroscopía, matemática, estadística e instrumentación. En este sentido, se define la **quimiometría** como el uso de métodos matemáticos, estadísticos y computerizados que permiten extraer información relevante de la composición de la muestra. Dicha extracción no es tarea sencilla puesto que el espectro NIR recoge además información sobre otras características físico-químicas de la misma, tales como el tamaño de partícula, densidad del material, textura, desviaciones de la línea de base, fenómenos de radiación difusa (scatter), etc. (Handbook of Near Infrared Spectroscopy, 1992).

En el **desarrollo de cualquier aplicación NIRS** es esencial establecer como punto de partida que garantice el éxito de la misma, una metodología óptima de recogida de la información espectral, influenciada por las características del producto a analizar (tamaño de partícula, homogeneidad, composición, etc.), instrumento a utilizar (rango de medida, área de análisis, forma de interacción radiación-muestra, tiempo de

análisis, repetibilidad de la medida, etc.) y por las condiciones o la accesibilidad al punto de medida, de especial relevancia cuando se habla de medidas “in-situ”.

Existen numerosas razones que explicarían la ausencia de la tecnología NIRS como herramienta de uso habitual, pero fundamentalmente puede atribuirse al hecho de ser una tecnología secundaria que requiere el **desarrollo de modelos de predicción** para su uso, basados en herramientas de análisis multivariante, a veces bastante complejas. El desarrollo de calibraciones estables y robustas implica un importante esfuerzo económico y requiere, normalmente, un periodo de tiempo prolongado puesto que, para cada una de las muestras de la base de datos de calibración hay que realizar el correspondiente análisis, mediante una metodología de referencia y para cada uno de los parámetros cuantificados. Dado que para determinados parámetros ya se dispone de calibraciones previas de las características reseñadas, obtenidas con equipos NIRS de laboratorio (at-line), es importante disponer de procedimientos que permitan el ajuste de la respuesta espectral obtenida con distintos instrumentos y la transferencia de bases de datos, evitando así la necesidad de empezar de cero (Bouveresse y Massart, 1996; Zamora *et al.*, 2012). Para conseguir con garantías la clonación instrumental y transferencia de las bases de datos espectrales obtenidas en un instrumento “master” a otro instrumento “satélite” para análisis de diferentes prestaciones ópticas y modos de análisis, se plantea la aplicación de algoritmos de clonación de ajuste espectral, tales como DS (estandarización directa), PSD (estandarización paso a paso) y el algoritmo de clonación de Shenk y Westerhaus, siguiendo la metodología propuesta, entre otros, por Pérez-Marín *et al.* (2006 a,b), para transferencia con muestras intactas y heterogéneas.

Para el análisis concreto de la leche, una de las complejidades que se plantean es la **heterogeneidad de la muestra** (Schmilovich *et al.*, 2000, Tsenkova *et al.*, 2000) y su elevado contenido en agua. Aunque existen publicaciones que ponen de manifiesto la utilidad de la tecnología NIRS para predecir parámetros de calidad y microbiológicos en muestra intacta (Tsenkova *et al.*, 1999; Drackova *et al.*, 2008), estas evaluaciones se han realizado con equipos NIRS de laboratorio con amplio rango espectral y diversas posibilidades de presentación de muestra. En lo referente a la caracterización de las producciones lácteas como alimento funcional, como puede ser la determinación de los ácidos grasos insaturados, investigaciones preliminares han puesto de manifiesto la viabilidad de cuantificación de AG en leche con coeficientes de correlación de 0,9 para alguno de los ácidos grasos de interés (CLA) (De la Roza-Delgado *et al.*, 2010), analizando la leche en estado líquido. Más aún, los resultados obtenidos por Coppa *et al.* (2010) muestran modelos quimiométricos capaces de predecir, en algunos casos 50 ácidos grasos, pero con mejores resultados en leche

desechada que líquida. Sin embargo, ambas investigaciones se han realizado utilizando para ello un equipo FossNIRSystem 6500, que trabaja en el rango de medida 400-2500 nm y procedimiento *at-line*. En lo relacionado con la determinación *on-site*, Kawasaki *et al.*, (2008), desarrollaron un sensor NIRS que ubicaron en un robot de ordeño para controlar de manera directa la calidad de la producción láctea.

A pesar de la rapidez del análisis NIRS, su forma tradicional de aplicación (***at-line***) produce una demora entre el proceso de producción de la leche y la obtención del resultado, lo que en muchas ocasiones no permite un uso adecuado de la información así producida en la toma de decisiones en los diferentes niveles de la cadena de producción (Brennan *et al.*, 2003, Garrido y Pérez-Marín, 2007 y Pérez-Marín *et al.*, 2007). Sin embargo, la instrumentación NIRS está evolucionando muy rápidamente. Una tendencia generalizada es el diseño de instrumentos portátiles ligeros, de alta velocidad de respuesta (milisegundos) y de bajo coste, que pueden ser instalados en diferentes puntos de la cadena alimentaria, para el análisis denominado *on-site*.

Existe un amplio marco normativo comunitario relativo a los métodos de muestreo y análisis, y a los protocolos de trabajo correspondientes, para el control oficial de alimentos. Teniendo en cuenta el desarrollo NIRS, hay en la actualidad tecnología suficiente para modernizar numerosos aspectos del control de calidad en alimentos, entre éstos, se encuentran los sensores NIRS.

1.3.1. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

Dada la importancia de los AG en cuanto al conocimiento de sus funciones y el bienestar nutricional, una de las determinaciones más requeridas en el análisis de leche y productos lácteos es su análisis. La atención sobre los AG surge de su papel positivo y negativo desde un punto de vista nutricional, según sus características químicas, como número de átomos de carbono de la cadena, número de dobles enlaces y posición, entre otros (Cabassi *et al.*, 2013).

La **grasa** de leche de vaca es uno de los alimentos más complejos en lo que se refiere al análisis de AG porque abarca un gran número y muy diferentes tipos de AG (se han llegado a identificar más de 400AG; Jensen, 2002) por ello, son necesarias poderosas herramientas de separación para su cuantificación. La cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son las técnicas más comunes en el análisis de ácidos grasos (Chen *et al.*, 2007). En ambos casos, las metodologías descritas para tal fin pueden resultar tediosas al necesitar numerosas y críticas etapas de análisis como: a) extracción de los lípidos, b) metilación de los AG para transformarlos en los correspondientes ésteres metílicos de AG (FAME, de sus siglas en

inglés *Fatty Acids Methyl Esters*) (compuestos volátiles), c) extracción de los ésteres de los ácidos grasos formados y finalmente d) el análisis de los ésteres metílicos mediante una técnica cromatográfica que permita la separación de los distintos AG y su cuantificación (Araujo *et al.*, 2008).

La **extracción de los lípidos** forma parte del proceso de preparación de la muestra para el análisis, existiendo distintas estrategias analíticas descritas en la bibliografía (Molto-Puigmartí *et al.*, 2007). Puede realizarse mediante cloroformo:metanol 2:1 siguiendo la metodología de Folch *et al.* (1957) o mediante diclorometano:metanol 2:1 descrita por Chen *et al.* (1981). A este amplio abanico de técnicas de extracción se fueron incorporando los avances técnicos que van surgiendo, como el microondas o la extracción mediante fluidos supercríticos.

La Norma ISO (International Standardization Organization) 14156:2001 (*Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds*) describe la metodología de extracción de la grasa láctea, siguiendo las etapas que a continuación se describen:

- Extracción inicial con la mezcla etanol:amoníaco
- Adición de una mezcla de éter dietílico y n-pentano.
- Separación de la fase orgánica.
- Eliminación de agua.
- Evaporación hasta obtener residuo seco.

Sin embargo, esta metodología requiere un tiempo de proceso que la convierte en inviable cuando el número de muestras a analizar es elevado.

Independientemente de la técnica utilizada en el análisis de AG, CG o HPLC, se requiere una **metilación** de los ácidos grasos previa al análisis. Para llevarla a cabo, existen diversas metodologías empleando procesos de metilación basados en catálisis básica o ácida. La norma UNE-EN ISO 12966 (Directrices sobre cromatografía de gases moderna de los ésteres metílicos de ácidos grasos) describe distintos procesos de obtención de dichos compuestos. En cada caso existen pros y contras, que llevan a elegir una u otra en función de la matriz a tratar y los compuestos de interés a estudiar. No existe ningún método simple o combinación de métodos que permita preparar todos los ésteres metílicos de las diferentes clases de lípidos presentes y que al mismo tiempo no afecte a los dienos conjugados (AGPI) (Kramer *et al.*, 1997).

No sólo existe una gran variedad en la longitud de la cadena de carbonos (C4-C26), incluyendo AG ramificados, sino que también contiene diversos isómeros posicionales de los mono-, di-, y tri- ácidos grasos insaturados, algunos de ellos en muy baja

concentración. De ahí la dificultad de preparar de forma cuantitativa los ésteres metílicos de los ácidos grasos presentes en la gran diversidad de lípidos de la leche.

La **catálisis ácida** usando trifluoruro de boro, ácido sulfúrico o bien ácido clorhídrico permite la metilación de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triacilglicerol. Sin embargo tiene ciertos inconvenientes. El uso de trifluoruro de boro requiere altas temperaturas y elevados tiempos de reacción para metilar los AG de la leche, con la consiguiente isomerización de los AG cis a trans y la formación de artefactos metoxi (Molto-Puigmarti *et al.*, 2007). El tándem ácido clorhídrico/metanol permite la metilación a temperatura ambiente de patrones, pero son condiciones muy suaves para muestras reales, que requieren elevar la temperatura a 80°C y el tiempo de reacción a 30 ó incluso 60 min. Con ello se consigue la metilación, pero también la isomerización y la formación de artefactos metoxi. A mayor tiempo y mayor temperatura de reacción, mayor porcentaje de isomerización (Park *et al.*, 2001).

Por el contrario, la **catálisis básica** se usa principalmente para la metilación de los triacilglicerol. El tándem metilato de sodio/metanol tiene la ventaja de no producir isomerizaciones ni artefactos metoxi, pero estas condiciones son tan suaves que no permiten la formación de los ésteres metílicos de todo tipo de lípidos presentes en matrices reales (Kramer *et al.*, 1997).

Otras estrategias analíticas utilizan combinaciones de metodologías, empleando una catálisis básica inicial con metilato de sodio/metanol a 80 °C durante 10min, seguida de una catálisis ácida con trifluoruro de boro /metanol a 80 °C durante 3min. De este modo se consigue una metilación más completa sin formación de artefactos metoxi y con un porcentaje de isomerización estimado en un 3%. Ello se debe a que el primer paso de la metilación permite convertir parte de los ácidos grasos en ésteres haciéndolos menos susceptibles a las condiciones ácidas (Molto-Puigmarti *et al.*, 2007).

En cuanto al **análisis** de los esteres metílicos obtenidos, la CG es la técnica más empleada. Existen diferentes tipos de columnas capilares con fase estacionaria no polar, polar y muy polar que pueden ser usadas en el análisis de FAME. Las columnas altamente polares de cianoalquil polisiloxano han sido muy utilizadas en el análisis de mezclas complejas de isómeros posicionales y geométricos de ácidos grasos poli insaturados. La fase estacionaria 100% cianopropil con base de siloxano es la más usada de todas ellas. La principal ventaja de estas fases estacionarias de alta polaridad es su elevada capacidad de resolución para ésteres metílicos de ácidos grasos insaturados, en especial, para la separación de isómeros cis y trans (Alves y Bessa, 2009). Sin embargo, la polaridad de este tipo de columnas muestra una fuerte dependencia de la temperatura, teniendo como desventaja una menor estabilidad térmica en comparación con otras fases estacionarias comunes (Mjos, 2005). Más

recientemente, se han diseñado columnas para el análisis de ésteres metílicos de AG ω_3 y ω_6 como las fases polietilenglicol enlazadas (Omegawax 250 y 320), que combinan las ventajas de una relativa alta resolución con una mayor estabilidad térmica. Comparando los resultados obtenidos en ambos tipos de columnas para una mezcla de FAME, se puede observar que existe una elevada correlación entre ambas columnas para la cuantificación de los AG totales y los AG mayoritarios (coeficientes de determinación $r^2 > 0,99$). Sin embargo, existen diferencias en la cuantificación de algunos AG, en particular los isómeros *cis*-, *trans* C18:1.

Aunque la **CG** es la técnica de análisis más empleada, la complejidad de la mezcla de AG presentes en leche requiere la combinación de distintos procedimientos analíticos para separar, identificar y cuantificar los AG de forma detallada y exhaustiva. Este conjunto de técnicas complementarias está generalmente compuesto por un fraccionamiento previo de AG y un posterior análisis de dichas fracciones por CG (Dreiucker y Vetter, 2011; Rui-Rodríguez *et al.*, 2010; Kramer *et al.*, 2008). El fraccionamiento previo puede llevarse a cabo bien mediante un extracción en fase sólida mediante ión plata (Ag^+ -SPE) o bien mediante cromatografía líquida iónica (Ag^+ -HPLC), que proporciona mayor resolución, especialmente empleada para el análisis de los isómeros del ácido linolénico conjugado. La elución de la mezcla de FAME previamente separada, con mezclas de hexano:acetona en proporción creciente de esta última, permite la elución de los AG saturados (99:1), AGMI *trans* más los isómeros t/t del CLA (96:4), AGMI *cis* y los isómeros c/t del CLA (90:10) y los AG diinsaturado (0:100). La elución a continuación con mezclas acetona:acetonitrilo permitirá la elución de AG triinsaturados (97:3) y los AG tetrainsaturados (94:6) (Kramer *et al.*, 2008).

Otra alternativa más reciente es el desarrollo de **técnicas en el IR** para la determinación de perfiles de AG en leche. Estas técnicas, comparadas con la metodología de referencia por CG, son rápidas, baratas (el coste del análisis es de 1:100 IR:CG) y multiparamétricas, al ser usadas rutinariamente para análisis de grasa, proteína y otros parámetros considerados cuando se fija el precio de pago de la leche (Bogomolov *et al.*, 2012).

El método IR más empleado es el análisis en el **IR medio (MIR)**, que puede analizar un gran número de muestras al día (más de 500 muestras/hora). Sin embargo, son instrumentos preparados únicamente para el análisis de leche líquida y costosos, con lo cual, sólo se consiguen análisis a un coste razonable cuando el número de muestras a analizar diariamente es elevado. Por el contrario, la **tecnología NIRS** permite un menor número de análisis al día (150-200 muestras / día), pero el coste del equipo es menor (1:20 NIR:MIR) y no es específico de un solo producto (Coppa *et al.*, 2014).

Soyeurt *et al.* (2011) han obtenido ecuaciones de predicción de AG (expresados como g/dL leche) mediante calibración de modelos MIR en un gran número de muestras individuales de leche de granjas comerciales. Estas ecuaciones fueron validadas en diferentes ganaderías (Eijndhoven *et al.*, 2013). Rutten *et al.* (2009) comparó las predicciones MIR en el contenido de ciertos AG en muestras de leche fresca según las estaciones, expresada en g dL⁻¹ de leche o en g AG 100g⁻¹ AG. Las ecuaciones de predicción de AG expresadas en g dL⁻¹ muestran mejores resultados quizás porque la predicción de AG mediante MIR es el efecto combinado de predecir el contenido de grasa y la composición de AG en el mismo espectro (Soyeurt *et al.*, 2011). En esta región es posible distinguir las bandas C=O, C-O de los ésteres, por ejemplo, y hasta cierto punto determinar la longitud de las cadenas y el grado de insaturación (Kaylegian 2009a)b).

También se han desarrollado ecuaciones de predicción del contenido en AG mediante NIR, expresados en g 100g⁻¹ (Coppa *et al.*, 2010). Estos resultados muestran modelos quimiométricos capaces de predecir hasta 50 AG. Otras investigaciones preliminares han puesto de manifiesto la viabilidad de cuantificación de AG en leche con coeficientes de determinación de 0,9 para algunos AG de interés (CLA, ácido linoleico conjugado) (de la Roza *et al.*, 2010). Así mismo, se empleó la correlación de AG específicos en reflectancia difusa para el análisis NIRS de muestras de leche líquida en el rango espectral de 1000 a 2500 nm, para el desarrollo de modelos cualitativos con la finalidad de diferenciar entre la leche orgánica y la producida por métodos convencionales (Aulrich y Molkentin, 2009). Los resultados sugirieron que la tecnología NIRS tenía alto potencial para ser utilizado como un sistema de cribado comercial para clasificación de la leche según modelos de producción.

Las aplicaciones NIRS a la leche líquida son complejas debido a que la presencia de un alto porcentaje de agua en la muestra interfiere en los análisis, debido a la fuerte banda de absorción que presenta este componente en la región de absorción de los analitos, superponiéndose y limitando su detección. Además, la energía absorbida por el agua es termo-dependiente, debido a los enlaces mediante puente de hidrógeno entre moléculas, que alteran la constante de los enlaces covalentes O-H y la frecuencia de la banda de absorción. Un incremento de la temperatura causa una ruptura de los enlaces de hidrógeno por colisiones térmicas, resultando en un cambio del perfil de absorción (Thyholt e Isaksson, 1997). Probablemente, los métodos de regresión clásicos no sean la opción óptima para el desarrollo de los modelos de predicción, pudiendo ser necesario el uso de herramientas especiales de ajustes, basadas en métodos de calibración avanzados (Pérez-Marin *et al.*, 2007).

Para eliminar este problema la solución propuesta fue la deshidratación de las muestras, obteniéndose mejores resultados, en detrimento del tiempo de análisis que implica una media de 24 horas debido al secado (Coppa *et al.*, 2010; Andueza *et al.*, 2013). En la figura 1.3.1.1 pueden verse los espectros NIRS promedio para leche líquida y deshidratada. El espectro de leche líquida (a) presenta dos bandas de absorción máxima a 1940 y 1450 nm, que son características del espectro del agua (Osborne y Fearn, 1988). En el espectro de la leche deshidratada (b) los máximos están localizados a 1734, 1764, 2310 y 2344 nm y están relacionados con las bandas de absorción de AG. Los resultados mostraron que la tecnología NIRS puede emplearse para predecir sumas de AG y ratios (por ejemplo AGS, AGMI, AGPI, *trans*-AG totales, *trans*-C18:1 totales, *cis*-C18:1 totales, CLA totales).

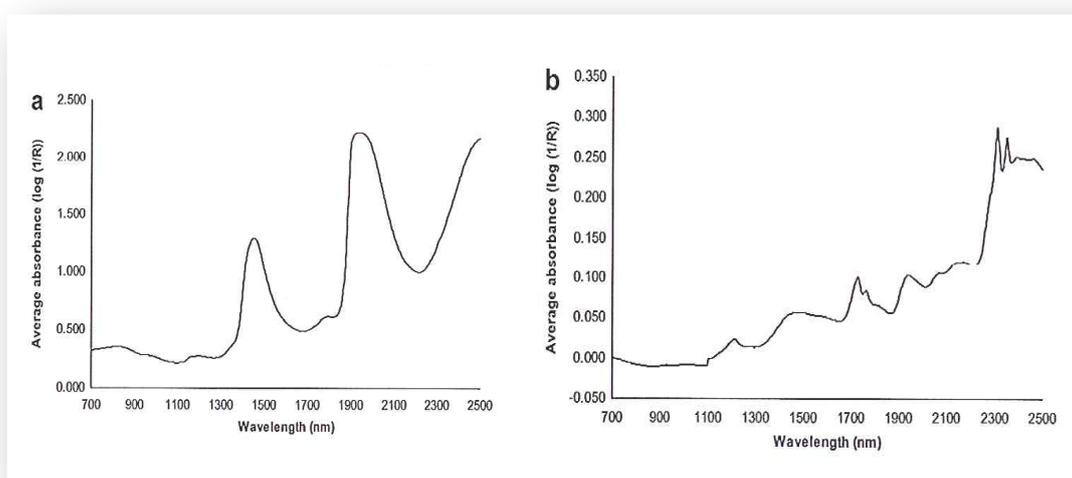


Figura 1.3.1.1. Absorbancia promedio (log (1/R)) del espectro NIR para leche líquida (a) y deshidratada (b) (Fuente: Coppa *et al.*, 2010)

Se obtienen también buenos resultados para AG presentes en concentración media-alta (por ejemplo caproico, caprílico, caprico, láurico, mirístico,...), pero la predicción empeora para los AG presentes en concentraciones bajas o muy bajas. La deshidratación de las muestras mejora la exactitud de la predicción, incluso se han empleado modelos NIRS en leche de vaca para predecir la composición de AG en leche deshidratada de cabra (Andueza *et al.*, 2013). Sin embargo, el análisis NIRS puede considerarse factible en leche líquida cuando el objetivo es predecir el contenido en unos AG concretos no presentes en concentraciones muy bajas (AGS, AGMI, palmítico y oleico). También se han dado estudios de análisis mediante NIRS empleando una extracción previa sencilla para determinar AGS, AG monoinsaturados (AGMI), AGPI y los *trans* en leche líquida (Cabassi *et al.*, 2013).

Cuando se considera la concentración de AG expresada en g 100g⁻¹ AG (tabla 1.3.1.1) la predicción MIR es similar a la NIRS en leche deshidratada para la suma de los AG saturados pares e impares, los totales saturados (AGS), los insaturados (AGI), los ω 3, el ratio C18:1c9/C16 y los CLA totales, para leche fresca y descongelada. Así mismo, la predicción NIR en leche deshidratada es mejor que la MIR en lo que respecta a los AG monoinsaturados, ratio ω 6/ ω 3 y en especial para los poliinsaturados (PUFA), C18:1cis y ω 6, mientras que se observa la tendencia contraria en la suma de los AG ramificados. Una razón posible para estos resultados podría ser la contribución del espectro visible (400-760 nm), especialmente en leche fresca. El intervalo del espectro visible juega un papel clave en la discriminación por NIRS, para determinar diferentes contenidos en AG en leche (Coppa *et al.*, 2012).

Tabla 1.3.1.1. Estadísticos para la predicción NIRS y MIR de AG en leche fresca (g 100g⁻¹; g kg⁻¹)

AG	Valores NIR calibración (g 100g ⁻¹)		
	SECV	RPD	R ² CV
AGS	0,91	4,20	0,94
	1,03	3,85	0,94
AGPI	0,46	2,47	0,48
	0,49	2,15	0,82
AGI	0,95	3,91	0,94
	1,04	3,70	0,93
C18:1cis	1,12	2,07	0,77
	0,96	2,33	0,82
C18:1trans	0,50	2,18	0,79
	0,34	3,40	0,91
AG trans	0,76	2,45	0,84
	0,62	3,28	0,91
ω 6	0,38	1,54	0,58
	0,40	1,47	0,54
ω 3	0,18	2,50	0,84
	0,18	2,35	0,82
ω 6/ ω 3	0,77	2,05	0,77
	0,80	1,99	0,75
C18:1c9/C16:0	0,06	2,49	0,84
	0,05	3,27	0,91
Total CLA	0,21	2,63	0,86
	0,18	3,23	0,91

n (número de muestras)=190-198; SECV: error estándar de validación cruzada; RPD: ratio desviación estándar/SECV; R²CV: coeficiente de determinación en validación cruzada. Los valores sombreados corresponden a la predicción MIR (Fuente: adaptada de Coppa *et al.*, 2014)

1.3.2. ANÁLISIS DE METALES TRAZA

Elementos esenciales como hierro, cobre o zinc presentes en la leche, están involucrados en la formación de metaloproteínas y enzimas que juegan papeles claves en procesos bioquímicos de la vida humana. Pero al mismo tiempo la leche puede ser una fuente de exposición a elementos nocivos con posibilidad de tener efectos a largo plazo (Astrup, 1991; Orkarsson *et al.*, 1995; Rey-Crespo *et al.*, 2013). Todo ello explica el interés en la determinación de elementos traza en la leche, dada su importancia en la salud humana (Mckinstry *et al.*, 1999; Prohaska *et al.*, 2000).

Un aspecto importante a reseñar, es que la **biodisponibilidad** de los elementos traza presentes en los alimentos, depende fuertemente de la forma química en la que se encuentren (especiación) (de la Flor St. Remy *et al.*, 2004(a); Michalke, 2006; Fernández-Sánchez *et al.*, 2012). De ahí la importancia de llevar a cabo estudios de especiación de los elementos traza presentes, más que de la cuantificación total de los mismos. Los estudios de especiación, enfocados en obtener información completa sobre la forma química de los elementos traza, son requisitos obligados en el campo nutricional (Rivero Martino *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2011). Estos estudios en leche se llevan a cabo acoplando "on-line" una potente técnica de separación (por ejemplo la cromatografía líquida), con una técnica de detección sensible y específica como la espectrofotometría de absorción atómica (AAS), el plasma de acoplamiento inductivo de emisión óptica (ICP-OES) y el plasma de acoplamiento inductivo con detección masas (ICP-MS). La figura 1.3.2.1 muestra un ejemplo de la distribución del perfil de proteínas y de la señal ICP-MS obtenida para las especies en las que se presenta el azufre, tanto en leche materna en diferentes días de lactación, como en distintas leches fórmula comerciales.

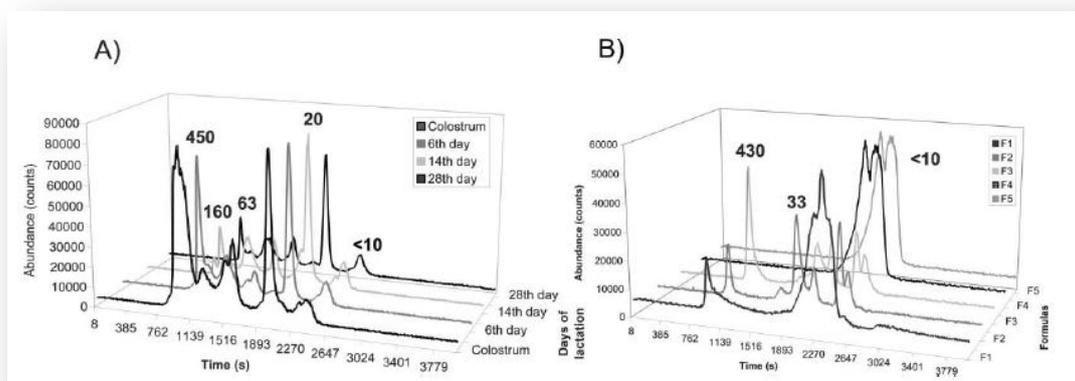


Figura 1.3.2.1. Ejemplo de la señal ICP-MS para el azufre en leche materna durante distintos días de lactación (A) y distintas leche fórmula (B) previa separación cromatográfica. (Fuente: de la Flor St. Remy *et al.*, 2004).

Para la cuantificación total de metales traza, la mayoría de los **métodos espectroscópicos** requieren de una mineralización de la muestra para eliminar la materia orgánica de los alimentos. El método más frecuentemente utilizado es la calcinación, ya sea por vía seca o por vía húmeda, con agentes oxidantes. La vía húmeda puede realizarse en vasos abiertos o sistemas cerrados bajo presión.

Las técnicas convencionales de calcinación por vía húmeda en vasos abiertos involucran el calentamiento de la muestras en ácido por períodos largos. Las mezclas más comúnmente utilizadas son $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ y $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$. Sin embargo, estos sistemas también tienen una serie de desventajas: se requieren largos períodos de calentamiento y grandes cantidades de ácidos y existe un riesgo de contaminación y pérdidas durante la mineralización.

Estas desventajas han llevado al desarrollo de sistemas cerrados, donde la descomposición puede realizarse bajo temperatura y presión elevadas. Se reduce significativamente el tiempo de digestión, se necesitan solo cantidades pequeñas de ácidos y se elimina el riesgo de pérdida de elementos volátiles o contaminación aérea. En la actualidad, se encuentran disponibles diversos sistemas que utilizan bombas calentadas con microondas, las cuales permiten una rápida digestión (10-20 min) de la mayoría de los alimentos, usando sólo HNO_3 y H_2O_2 (Kingston y Jassie, 1988; Knapp, 1991).

En la actualidad, está disponible una **amplia variedad de métodos analíticos** para el análisis de minerales y elementos traza en los alimentos. Los métodos más frecuentemente utilizados se incluyen en la tabla 1.3.2.1. La elección del método analítico, por lo general, depende de la instrumentación disponible, la experiencia del laboratorio y los niveles de concentración del analito (figura 1.3.2.2).

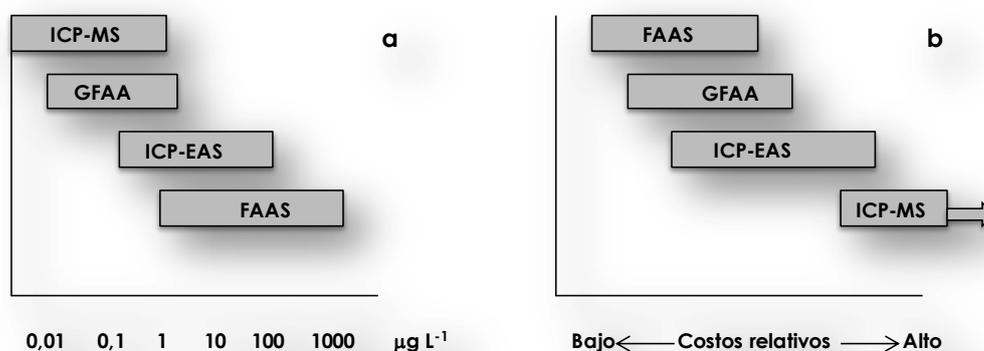


Figura 1.3.2.2. a) Límites de detección típicos para las principales técnicas espectrométricas b) Sistemas típicos de costo para los sistemas espectrométricos atómicos.

Tabla 1.3.2.1. Técnicas de análisis de minerales y elementos traza en distintos alimentos

Técnica	Elemento	Matriz	Referencia
Fluorimetría	Se	Miel	Costa-Silva <i>et al.</i> , 2011
Espectrofotometría UV-VIS	As	Agua, bebidas, arroz	Gurkan <i>et al.</i> , 2015
Espectrometría de absorción atómica de llama, FAAS (flame atomic absorption spectrometry)	Cd (II), Pb(II)	Alubias, frutas, bebidas, especias, carne, verduras	Dasbasi <i>et al.</i> , 2015
Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, GFAAS (graphite furnace atomic absorption spectrometry)	As, Cd, Cu, Mn, Pb, Zn	Aceite vegetal	Zhuravlev <i>et al.</i> , 2015
Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros, HGAAS (hydride generation atomic absorption spectrometry)	Se	Nueces de Brasil, melocotón, alubia blanca, harina de arroz, leche en polvo	Cabral de Lima <i>et al.</i> , 2013
Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)	Na, K, Ca, Mg, Al, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Li, Pb, Zn, Ni, Sr, V.	Yogurt	Luis <i>et al.</i> , 2015
Espectrometría de masa de plasma acoplado Inductivamente, ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry)	Ba, Cr, Cu, Mn, Ni, Rb, Sr, Zn, Se, Be, Bi, Co, Cs, Ga, Li, U, V, As, Cd, In, Pb, Tl	Yogurt, leche	Khan <i>et al.</i> , 2014

El **ICP-MS** se ha convertido en una técnica analítica estándar para el análisis rápido multielemental de muestras biológicas (Sarmiento-González *et al.*, 2008) incluida la leche, debido a sus capacidades multielementales, extrema sensibilidad y selectividad

(Rivero Martino *et al.*, 2001, de la Flor St. Remy *et al.*, 2004a,b; González Iglesias, 2010), además de rapidez.

Los instrumentos ICP-MS constan de una fuente de ionización (plasma), un analizador de masas (que mide el ratio masa/carga, m/z , de los analitos ionizados) y un detector (que registra el número de iones para cada valor del ratio m/z). A estos tres elementos hay que unir, un sistema de introducción de muestra, una interfase y una serie de sistemas de lentes que completan el equipo (Aebersold y Mann, 2003).

La **introducción** de la muestra depende del tipo de matriz. Las muestras líquidas se introducen en forma de un fino aerosol (formado en el sistema de nebulización) a través del canal central de la antorcha, en el plasma. Las muestras sólidas requieren un sistema específico, como por ejemplo la ablación láser. En el caso de las muestras líquidas, cuando una gota del aerosol entra en contacto con el plasma, tiene lugar la desolvatación, vaporización, atomización y una ionización de los analitos.

El **analizador de masas** es una pieza clave dentro del sistema. Idealmente, un analizador debería ser capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían permitir el paso del suficiente número de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles. Sin embargo, estas dos propiedades no son totalmente compatibles y siempre se debe llegar a un compromiso en el diseño. En la figura 1.3.2.3 y 1.3.2.4 pueden verse distintas configuraciones instrumentales de MS existentes, las cuales se describen a continuación:

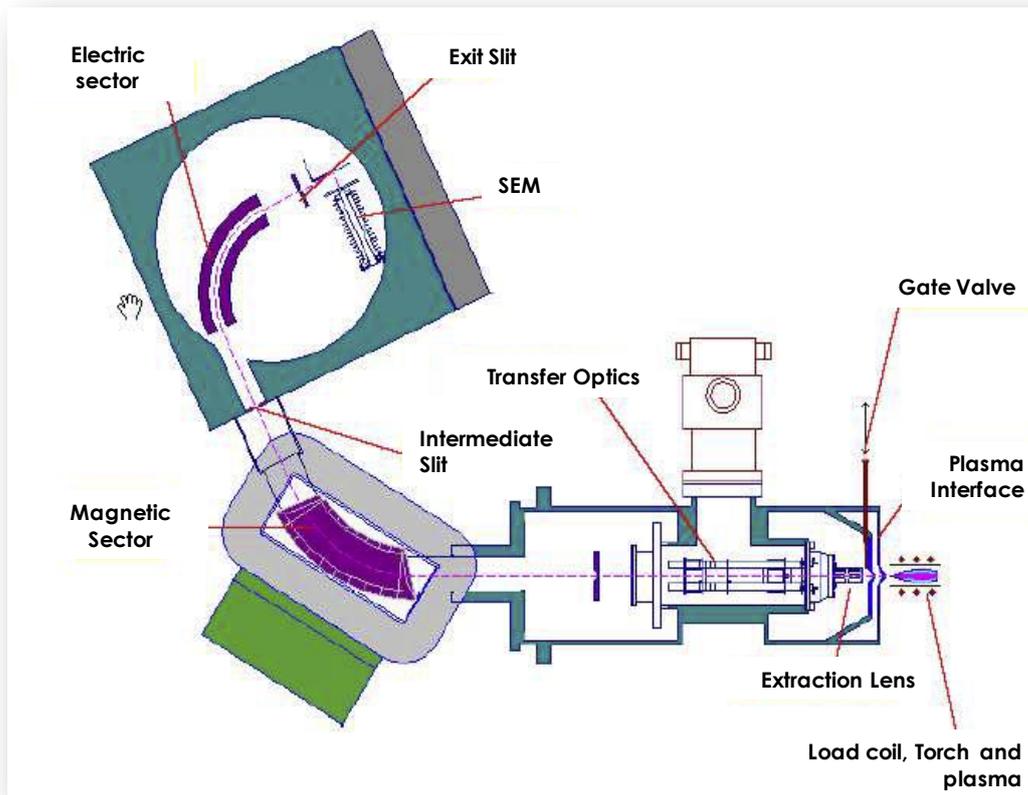


Figura 1.3.2.3. Esquema analizador de masas de sector magnético de doble enfoque.
(Fuente: Ruth E. Wolf, 2005)

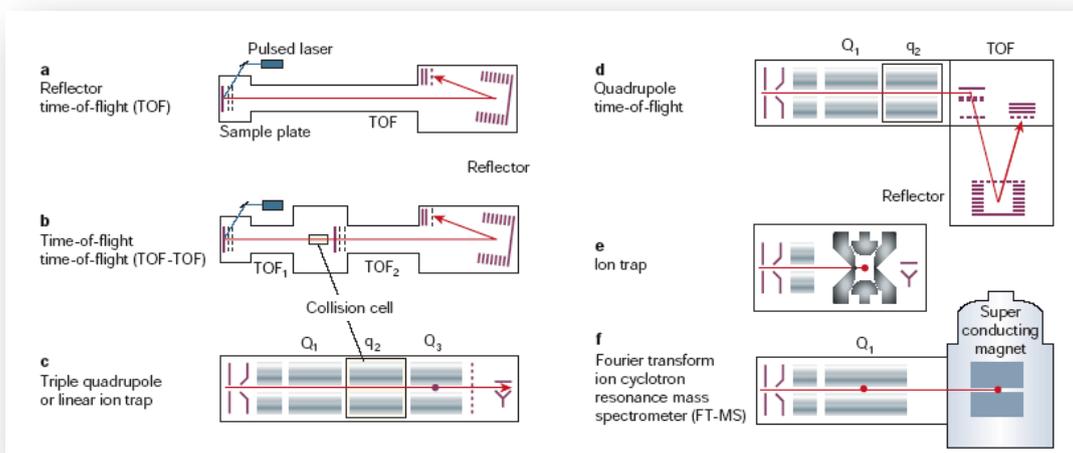


Figura 1.3.2.4. Diversas configuraciones instrumentales de ICP-MS (Fuente: Aegersold y Mann, 2003)

Los **analizadores de sector magnético** (figura 1.3.2.3) utilizan un imán permanente o un electroimán para hacer que el haz de iones de la fuente se mueva en una trayectoria circular de 180, 90 o 60 grados. Esta terminología se utiliza porque un conjunto de iones que salen de la fuente con la misma relación masa/carga, pero con una distribución

direccional algo divergente, estarán afectados por el campo magnético de tal manera que se produce una distribución direccional convergente cuando los iones dejan el campo. Con el objeto de medir las masas atómicas y moleculares con una precisión de unas pocas partes por millón, es necesario diseñar instrumentos que corrijan tanto las distribuciones direccionales como las de energía de los iones que dejan la fuente. El término doble enfoque se aplica a los espectrómetros de masas en los cuales las aberraciones direccionales y las aberraciones de energía de una población de iones se minimizan simultáneamente. El doble enfoque se consigue utilizando combinaciones seleccionadas cuidadosamente de campos magnéticos (deflectores magnéticos) y electrostáticos (sectores electrostáticos). Normalmente para conseguir alta resolución se coloca antes o después del sector magnético un analizador electrostático que enfoca a la rendija de salida solo los iones portadores de una energía translacional en un margen muy cercano y rechaza los iones cuyas energías son distintas a las seleccionadas. Los iones de energía correcta describirán una trayectoria de radio "r" que les permite atravesar la rendija de salida, mientras que los iones de energía diferente seguirán trayectorias de menor o mayor radio, por lo que serán rechazados. Otro analizador de masas basado en este sistema es el ICP-MS multicolector. Este equipo se ha diseñado y desarrollado para el análisis isotópico de alta precisión. Se trata de un sistema de doble enfoque con 5-10 detectores situados en torno a la rendija de salida, pudiendo ser detectados simultáneamente los isótopos de un mismo elemento, dando así lugar a una técnica de gran precisión.

Un **cuadrupolo** (figura 1.3.2.4) es parecido a un filtro de banda estrecha variable, ya que en unas determinadas condiciones de operación transmite sólo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z. Son cuatro barras de metal que se encuentran paralelas y equidistantes al eje. A cada pareja de polos se le aplica un potencial constante, mediante corriente continua (DC) y simultáneamente un potencial oscilante mediante corriente alterna (AC). De esta forma se consigue crear una distribución de campo en el espacio interior a los 4 polos. Una partícula i sometida a la acción del campo cuadrupolar, describe una trayectoria definida por las ecuaciones de movimiento de Mathieu. Estas trayectorias definen los iones que van a ser capaces de atravesar el cuadrupolo y llegar al sistema de detección. De esta forma, variando los potenciales U y V aplicados a los polos, podemos "sintonizar" una determinada masa y medir la señal que de ella llega al detector. Todos los otros iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga. Debido a que los cuadrupolos funcionan por eliminación selectiva de iones, se llaman a menudo filtros de masas, en vez de analizadores de masas.

El **analizador ion-trap o trampa de iones** (figura 1.3.2.4), captura o atrapa inicialmente los iones durante un cierto intervalo de tiempo, para luego someterlos a un análisis de masas o masas-masas. Son sensibles y robustos y relativamente asequibles desde el punto de vista económico (Aebersold y Mann, 2003). Consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia se aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabilizan, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas, los iones quedan atrapados en el interior de la trampa mediante la aplicación de los voltajes y radiofrecuencias adecuados, pudiéndose de esta forma hacer experimentos con ellos. Se extraen los iones que no interesan de la trampa y dejamos el que interesa estudiar, colisionando con He, llevando a cabo estudios masas/masas.

El **analizador de transformada de Fourier** (figura 1.3.2.4), es también un analizador de trampa, aunque atrapa los iones bajo alto vacío y elevado campo magnético. Proporciona una alta sensibilidad, exactitud y resolución, aunque tiene un coste elevado y un funcionamiento complejo. La parte fundamental de un instrumento de transformada de Fourier es una trampa de iones en la cual los iones circulan en órbitas bien definidas durante largos periodos. Tales cavidades se construyen aprovechando el fenómeno de resonancia iónica ciclotrónica. Es posible alcanzar una resolución extremadamente elevada dado que las medidas de frecuencia se pueden realizar con elevada precisión.

En los instrumentos de **tiempo de vuelo** (Time Of Flight – TOF, figura 1.3.2.4), los iones son acelerados por un impulso de campo eléctrico de 10³ a 10⁴ V que tiene la misma frecuencia, pero retrasada, que el impulso de ionización. Las partículas aceleradas pasan entonces a un tubo analizador de un metro de longitud sobre el que no actúa ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo tienen idealmente la misma energía cinética, sus velocidades en el tubo deberán variar de modo inverso a sus masas, y por tanto las partículas ligeras llegarán antes al detector que las pesadas. Los tiempos de vuelo típicos están entre 1 y 30 μ s. Desde el punto de vista de la resolución y reproducibilidad, los instrumentos que utilizan separadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como los magnéticos y de cuadrupolo. Sin embargo, algunas ventajas compensan parcialmente estas limitaciones como son la simplicidad

y la robustez, el fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas.

En cuanto al **detector del ICP-MS**, en los primeros años predominaban los multiplicadores de electrones de detección puntual situados en el ambiente de alto vacío del espectrómetro. Más tarde fueron apareciendo nuevos desarrollos para detección puntual, como los detectores "Channeltron" de bajo coste y uso general, y los sistemas de conversión fotónica más sofisticados, sensibles y duraderos. También han aparecido sistemas de detección simultánea, tales como baterías de micromultiplicadores multicanal (Microchannel Plate o Multichannel Multiplier Array Detector), combinadas normalmente con posterior centelleo o conversión fotónica, cuya aportación a los nuevos desarrollos instrumentales en Espectrometría de Masas ha sido importante.

Si bien, el ICP-MS es una poderosa técnica analítica multielemental, sin embargo, sufre de interferencias espectrales y no espectrales, que pueden ser especialmente problemáticas en el análisis de muestras complejas y variadas (García R., 2011). Las interferencias espectrales, se producen por solapamiento del pico con el analito de interés, generando resultados inexactos y usualmente errores por exceso. Las interferencias no espectrales son debidas a la matriz de la muestra, generan un aumento o pérdida de sensibilidad, resultados inexactos (malas recuperaciones) y una precisión pobre y deriva en los resultados.

Existen dos fuentes principales de **interferencias espectrales**: presencia de otros elementos (solapamiento de más de un elemento compartiendo la misma masa nominal o especies doblemente cargadas) y especies moleculares (solapamiento de un ión molecular con el analito de interés, casi siempre compuesta de dos elementos ArO^+ y ArCl^+ y derivadas de los gases del plasma, solvente y matriz).

Existe distintas estrategias para eliminar los problemas de interferencias espectrales:

- Elegir el mejor isótopo para la muestra en cuestión.
- Reducir o eliminar la interferencia eliminando su fuente.
- Adaptar la etapa de preparación de la muestra. Utilizar ecuaciones de corrección matemáticas.
- Eliminar la interferencia con la tecnología de la celda de colisión/ reacción.

Estas últimas consisten en una celda presurizada colocada entre la interfase del ICP-MS y el analizador de cuadrupolo del espectrómetro de masas. La celda contiene una guía de iones multipolar: cuadrupolo (2º orden con 4 barras, similar al analizador de cuadrupolo) o bien octopolo (4º orden con 8 barras). Los voltajes RF en las barras focalizan y guían los iones y la celda actúa como guía cuando no está presurizada y

cuando sí lo está, los iones interactúan con el gas de la celda. El analito, matriz e iones interferentes entran en la celda y las condiciones de la celda deben eliminar de forma efectiva las interferencias sin reducir excesivamente la transmisión del analito.

Cuando la **celda** funciona en **modo reacción**, se emplean como gas reactivo H_2 , CH_4 , NH_3 , He/H_2 u O_2 . El mecanismo principal de eliminación del interferente es una reacción. Pueden darse dos situaciones: que el poliatómico interferente sea más reactivo que el analito con el gas reactivo elegido, permitiendo la eliminación preferente del interferente; o bien, (menos común) que el analito sea más reactivo y se transforma en una nueva especie de masa diferente.

Cuando la **celda** funciona en **modo colisión**, el gas inerte de la celda es He. La eliminación del interferente es mediante dos mecanismos no-reactivos, la disociación inducida por colisiones (CID) y la discriminación de energías cinéticas (KED), sin conversión de especies, pudiendo ser aplicado a muchos poliatómicos sin crear nuevos iones (interferentes potenciales). Se usa la colisión con un gas inerte de las especies poliatómicas basándose en su tamaño, en lugar de su reactividad relativa con un gas. Dado que las interferencias poliatómicas son mayores que los iones de analito de la misma masa, su mayor sección implica que sufrirán mayor número de colisiones con el gas de la celda y perderán más energía en su trayectoria hacia la región presurizada. Al alcanzar la celda de salida tendrán menor energía que los iones del analito, pudiendo frenarlas usando una barrera de voltaje que permita llegar al analizador únicamente el analito.

Este mecanismo tiene una serie de ventajas (García, 2013):

- He es inerte, no se generan nuevas interferencias en la celda con la matriz de la muestra.
- He no reacciona con el analito ni con el estándar interno, ni causa pérdida de señal.
- No es un sistema específico de una interferencia en concreto, luego pueden eliminarse distintas interferencias de un mismo analito o de diferentes analitos simultáneamente.
- No se requiere un conocimiento previo de la matriz de la muestra, ni desarrollo metodológico, contrariamente a lo que ocurre en el modo de reacción.
- Se puede aplicar a toda muestra y matriz, empleando las mismas condiciones (flujo de gas).
- No es necesario optimizar voltajes.
- No se usan ecuaciones de corrección.

En el análisis a nivel de ultratrazas, la **celda de reacción** permite una eficaz eliminación de interferencia, mediante el sistema denominado ICP-QQQ (triple cuadrupolo) que consiste en la combinación de dos cuadrupolos y una celda de reacción (Agilent Technologies, 2015). Un ejemplo del mismo puede verse en la figura 1.3.2.5, en la que se esquematiza la detección de Se empleando un sistema ICP-MS con cuadrupolo y celda de reacción convencional (a) comparado con el citado ICP-QQQ (b). El primer cuadrupolo Q1, actúa como filtro de masas, permitiendo que pasen únicamente los iones con un determinado ratio m/z a la celda de reacción. En ellas tiene lugar la reacción del analito generando otros compuesto de masa distinta a los interferentes, que son entonces rechazados en el segundo cuadrupolo.

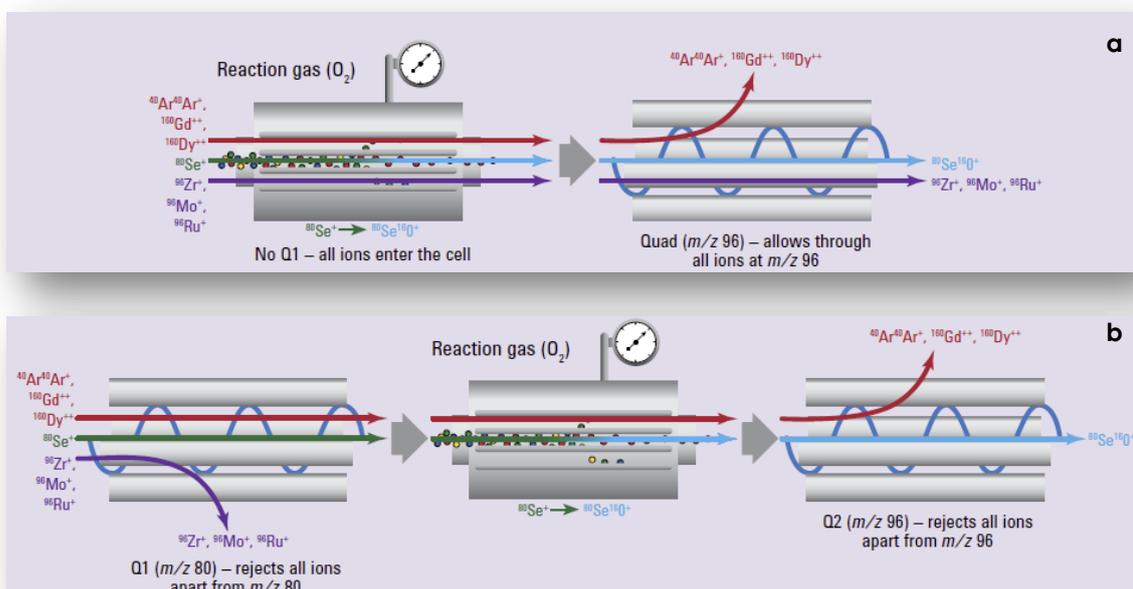


Figura 1.3.2.5. Detección de Se empleando un sistema ICP-MS con celda de reacción (a) vs. ICP-QQQ (b)

En cuanto a las **interferencias no espectrales o de matriz**, podemos destacar el efecto de los altos sólidos disueltos que generan supresión de la señal, depósitos en los conos y depósitos en la óptica iónica. Algunas de las estrategias para la eliminación de estas interferencias de matriz son:

- Trabajar a mayores potencias RF (>1500) para una mayor temperatura del plasma
- Trabajar con una mayor distancia de muestreo (que maximiza el tiempo de residencia de la matriz en el plasma).
- Usar antorcha de 2,5mm diámetro interno

-
- Trabajar con flujos bajos de carrier y muestra (para crear condiciones de ionización más robustas).
 - Diluir muestras con muy alto contenido en matriz.
 - Usar siempre un estándar Interno.
 - Interfase HMI (high matrix introduction), que diluye la muestra utilizando un flujo de argon, añadido después de la cámara de nebulización, optimizando parámetros del plasma.
 - Análisis por adiciones estándar o dilución isotópica.

I.4. FUNDAMENTOS DE LA TECNOLOGÍA NIRS

El descubrimiento de la **radiación infrarroja** fue realizado por Friedrich Wilhelm Herschel en el año 1800 cuando estudiaba el color responsable del calor de la luz solar dentro del rango visible del espectro electromagnético. Para ello, equipado con un termómetro y un prisma con el que separar los colores de la luz solar, pudo apreciar un incremento de la temperatura al colocar el termómetro más allá de la región del color rojo del espectro visible. A esta radiación invisible la denominó radiación infrarroja (Barton, 2002). No se desarrolló tecnológicamente e instrumentalmente hasta la década de los sesenta del siglo XX, por el grupo de investigación de Karl Norris en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Norris y Hart, 1965). La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) es una técnica espectroscópica vibracional basada en la región espectral del infrarrojo cercano que va desde los 770 hasta los 2500nm (longitudes de onda) o lo que es lo mismo desde los 12900 cm^{-1} hasta los 4000 cm^{-1} (número de onda), que consiste en la emisión de un haz de radiación sobre la muestra.

Las **longitudes de onda** correspondientes al infrarrojo cercano son las más energéticas de todo el rango del infrarrojo y por lo tanto, sus frecuencias características le proporcionan una serie de propiedades específicas. La figura 3.3.1, muestra los distintos fenómenos que se producen cuando la energía radiante interactúa con la materia. Estos pueden ser fenómenos de absorción en los que la energía es absorbida por la materia, de reflectancia difusa cuando parte de la luz incidente que llega a la superficie, penetra en la muestra y es reflectada (contiene información sobre la muestra) o de transmisión, cuando parte de la radiación atraviesa la muestra

completamente, saliendo por el lado opuesto a la fuente de luz. No obstante, también ocurren fenómenos de pérdida de energía por refracción, reflexión especular, en la que la radiación llega a la superficie y es reflejada sin llegar a penetrar en la muestra y por tanto no tiene información sobre la misma al no interactuar con sus moléculas, y/o por último fenómenos de radiación dispersa (*scatter*) cuando la radiación no reflejada que penetra la muestra es dispersada en múltiples direcciones, viéndose afectada por el tamaño de partícula y el índice de refracción (Siesler *et al.*, 2002).

La técnica NIRS, como técnica espectroscópica vibracional, se basa en vibraciones moleculares que se producen al incidir una determinada frecuencia en la molécula; esa frecuencia activadora dependerá de la fuerza del enlace químico entre átomos (fundamentalmente CH, NH, OH y CO), sus masas atómicas y las interacciones intermoleculares.

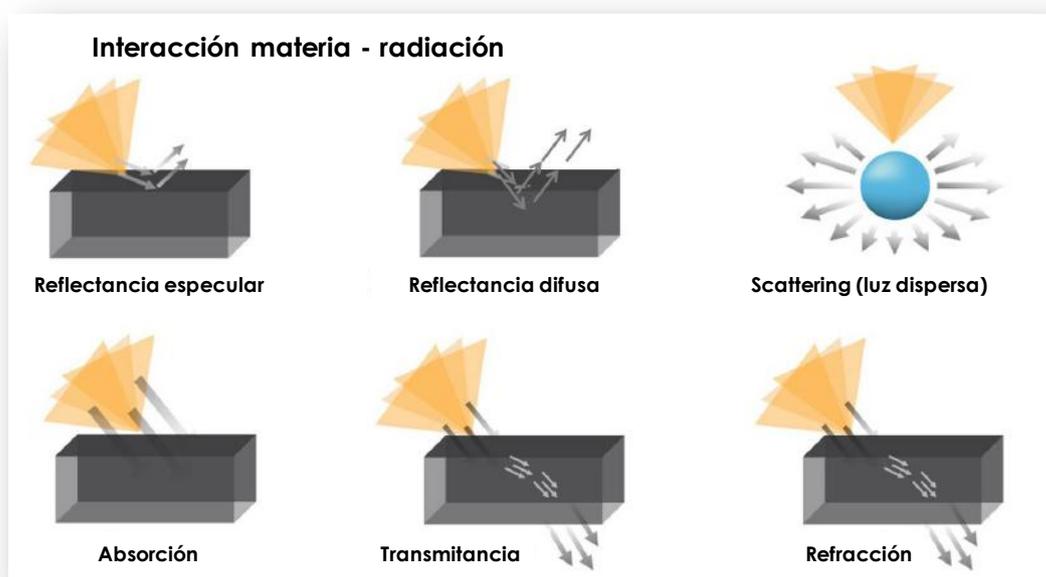


Figura 3.3.1. Fenómenos de interacción entre la radiación electromagnética y la materia. (Fuente: adaptado de Clinuvel Pharmaceuticals, 2010).

Los **modos de vibración** más importantes se engloban en dos grandes grupos: aquellas vibraciones de tensión (*stretching*), tanto simétricas como asimétricas y las vibraciones de flexión o deformación (*bending*), ya sean en el mismo plano o fuera de él. En la figura 3.3.2 aparecen esquematizados algunos modos de vibración.

La energía absorbida incrementa la energía de los modos de vibración de las moléculas a través de tres mecanismos diferentes:

- Sobretonos o armónicos de las vibraciones fundamentales existentes en la región del infrarrojo medio, los cuales son múltiplos aproximados de las vibraciones fundamentales.
- Combinación de dos o más vibraciones fundamentales del infrarrojo medio.
- Absorciones electrónicas, debidas al movimiento de electrones entre diferentes niveles energéticos.

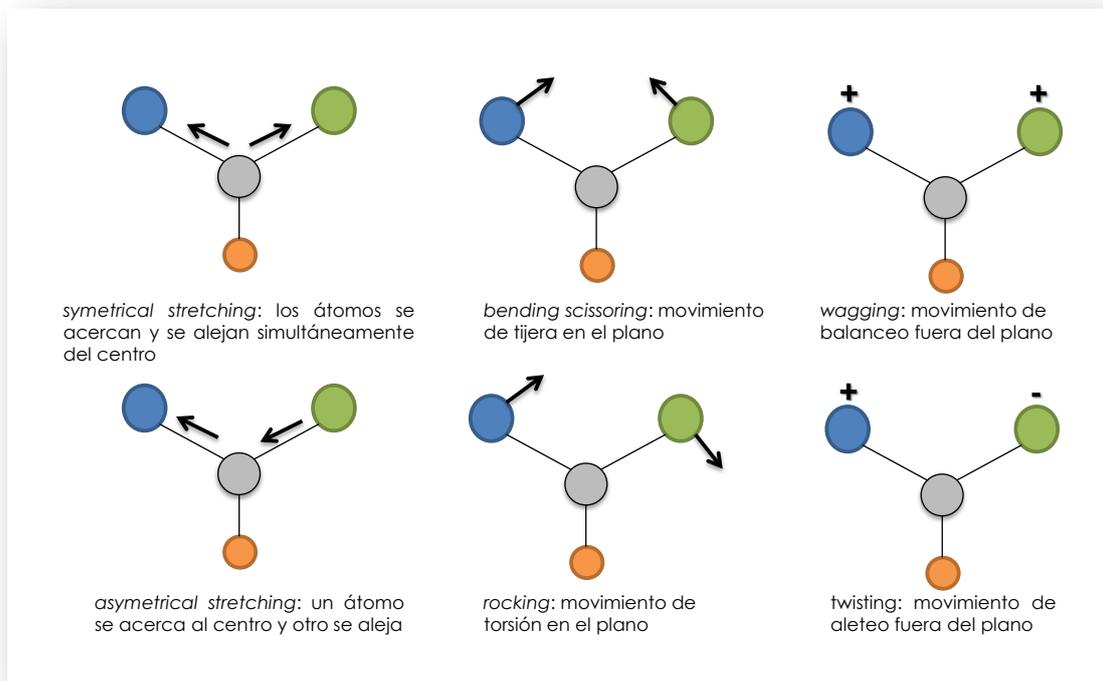


Figura 3.3.2. Vibraciones moleculares de dos átomos frente a un átomo central.

Un **espectro NIR** es una representación gráfica de la intensidad reflejada o transmitida por la muestra en función de las longitudes de onda. Dicho espectro está compuesto básicamente, por sobretonos y combinaciones de bandas que se caracterizan por ser bandas anchas, solapadas y de baja intensidad, que a diferencia de la región del infrarrojo medio, no pueden ser interpretadas o asignadas a un compuesto químico determinado. No obstante, las bandas en la región NIR están dominadas por enlaces moleculares del tipo X-H donde X puede ser un átomo de C, un nitrógeno N, un oxígeno O, un azufre S o grupos C=O, que dan una huella físico química única para cada material analizado (Williams y Norris 2001; Osborne *et al.*, 1993). Sin embargo, dos espectros de un mismo material pueden presentar ligeras diferencias debido a factores como la temperatura, humedad, cristalinidad, tamaño de partícula, etc que pueden producir efectos multiplicativos y/o curvaturas de la línea de base. Por otra parte, el espectro puede estar sometido a otras fuentes de error, las relacionadas con el instrumento (relación señal/ruido, precisión en la longitud de onda, linealidad de la

señal, tipo de cápsula, etc) y operacionales (preparación de la muestra, estrategia de calibración, modelos quimiométricos, etc) aparte de las anteriormente citadas, relacionadas con la muestra.

En una situación ideal, la señal medida por un instrumento debería ser el espectro de absorción de la muestra, sin embargo, la mayoría de los espectrofotómetros miden la radiación no absorbida, ya que sólo en el caso de que las medidas de absorción se realicen de manera adecuada, se obtendrán espectros válidos. El objetivo es la medida con precisión de la absorción relativa respecto a una referencia estable y la aplicación de la ley de Lambert-Beer que define la correlación entre la concentración de un analito y su absorbancia a una determinada longitud de onda. Aunque teóricamente no es exacta para la espectroscopía NIR, dado que sólo es válida en ausencia de luz dispersa en la muestra (Osborne, 2000) ha sido y es ampliamente utilizada. Se mide la transmitancia o reflectancia difusa para correlacionarla con la luz absorbida según la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = \log \left(\frac{I_0}{I_t} \right) = -\log T = \epsilon (\lambda) * b * c$$

$$\text{Absorbancia} = \log \left(\frac{I}{R} \right) = -\log \left(\frac{I_0}{I_r} \right) = \frac{\epsilon (\lambda) * c}{S}$$

Donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente, I_t se refiere a la intensidad transmitida a través de la muestra, T es la transmitancia, R la reflectancia, I_r corresponde con la intensidad reflejada, ϵ es el coeficiente de absorción molecular como función de la longitud de onda (λ), b es el paso óptico de la luz a través de la muestra, S es el coeficiente de dispersión y c es la concentración de las moléculas absorbentes. El paso óptico es un factor a controlar en las medidas dada su importancia en la ecuación. En transmitancia se define como el espesor de cubeta, mientras en reflectancia es función de la estructura microscópica del material analizado.

Hay cuatro **modos de análisis NIRS** principales: reflectancia, transmitancia, interactancia y transreflectancia (Shrenk y Westerhaus, 1995, figura 3.3.3) cada uno tiene sus ventajas y sus limitaciones: reflectancia (muestras sólidas y semisólidas) es el modo que mide la reflectancia difusa, luz reflejada que ha penetrado en la superficie de la muestra. La transmitancia (muestras gaseosas, líquidas, semilíquidas y sólidas)

mide la luz que ha atravesado la muestra y es detectada en el lado opuesto a la fuente de radiación. La transreflectancia (para muestras líquidas y semilíquidas) es un híbrido de las dos anteriores, en el cual la radiación atraviesa la muestra, es reflejada en una superficie reflectante (generalmente aluminio u oro) en contacto con la misma, vuelve a atravesar la muestra y es, entonces, cuando llega al detector. La interactancia se basa en una sonda de fibra óptica donde el detector está separado de la fuente de radiación, pero ambos en contacto directo con la superficie del producto (Osborne, 2000).

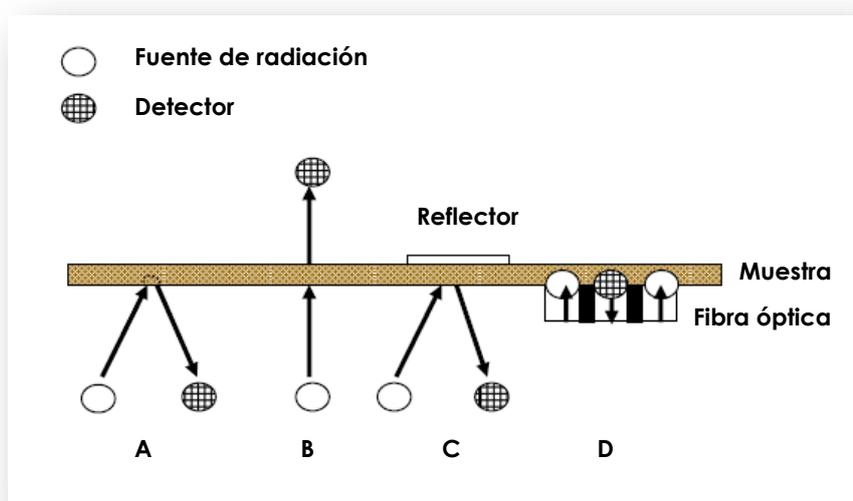


Figura 3.3.3. Esquema de modos de análisis NIRS: A) Reflectancia B) Transmitancia C) Transreflectancia D) Interactancia. (Fuente: Zamora, 2013)

I.5. QUIMIOMETRÍA Y SU APLICACIÓN EN LA TECNOLOGÍA NIRS

La **quimiometría** es un término introducido por Wold (1972), que fue definida como la disciplina de la química analítica que mediante el uso de métodos estadísticos, matemáticos y otros de lógica formal, diseña o selecciona procedimientos y experiencias óptimos de medida y/o trata de obtener la máxima información química relevante a partir de datos químicos.

En la tecnología NIRS, la gran superposición de las bandas de absorción de los diferentes constituyentes presentes en la muestra, la gran cantidad de datos existentes, la elevada información redundante (colinealidad), provoca una baja selectividad de los datos espectrales NIRS. Por ello es muy poco útil la aproximación univariante tradicionalmente empleada en el resto de técnicas espectroscópicas (Osborne *et al.*, 1993; Naes *et al.*, 2002). Además de dichos factores, la extracción de información relevante de los espectros NIR se complica debido a la presencia de numerosas

fuentes de error que afectan al dato espectral, que según Williams (1996), pueden estar relacionadas con el instrumento, con la muestra y con las operaciones de preparación de muestra para el análisis. Todo ello provoca que sea necesario emplear herramientas quimiométricas complejas en el tratamiento de los datos espectrales con el fin de obtener la información relevante (Geladi y Dåbakk, 1995), entre las cuales destacan los métodos de análisis multivariante, que en el caso de la tecnología NIRS, se emplearán para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-química, fundamentalmente) a partir de múltiples variables espectrales (valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda).

El procesado de los datos espectrales requiere de la aplicación de algunas **transformaciones matemáticas** capaces de eliminar cambios de línea de base, cambios de pendiente y curvilinearidad de espectros, es decir, reducir la influencia de determinados factores físicos en el espectro. Las transformaciones matemáticas que generalmente se aplican incluyen el cálculo de:

- Primera y segunda derivada (Osborne *et al.*, 1993). Aplicando el concepto matemático de derivada a los datos espectrales, se reduce el efecto del tamaño de partícula, simplificando la correlación entre los datos espectrales a diferentes longitudes de onda y corrigiendo la línea de base del espectro.
- Detrend (DT, Barnes *et al.*, 1993) – Es la aplicación de una función polinómica de segundo grado sobre los valores de reflectancia en $\log 1/R$, para eliminar la curvatura lineal y cuadrática de cada espectro debidas a las diferentes presiones de empaquetamiento.
- Standard normal variate (SNV, Barnes *et al.*, 1993) – Es la transformación matemática de los espectros en $\log 1/R$, cuya finalidad es reducir el efecto del tamaño de partícula y la dispersión, que consiste en restar a cada valor original de absorbancia la media del espectro y dividir este resultado por la desviación típica del mismo.
- Standard normal variate transformation and detrending (SNV&D, Barnes *et al.*, 1989). Combinando los dos anteriores, corrige la línea de base y elimina las interferencias entre espectros correspondientes a muestras de similar composición química, pero con tamaño de partícula diferentes y
- Multiplicative scatter correction (MSC, Isaksson y Naes, 1988). Su finalidad es reducir o eliminar las diferencias asociadas con la radiación difusa entre las muestras antes de efectuar la calibración. Consiste en una regresión lineal entre los valores espectrales de cada muestra, cuyas absorbancias son valoradas de acuerdo con su desviación estándar, y el espectro promedio. A cada valor de $\log 1/R$ se le resta la

constante de intersección y se le divide por la pendiente de la recta de regresión estimada.

Los datos espectrales obtenidos de un instrumento NIRS, sometidos o no a algún tipo de tratamiento de los descritos previamente, pueden ser empleados tanto en análisis cuantitativo como en cualitativo.

1.5.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO

Este es el análisis más extendido dentro de las aplicaciones de la tecnología NIRS y **estima la concentración de una analito** en una determinada muestra. Implica el desarrollo de una ecuación matemática, mediante el establecimiento de una relación entre los valores espectrales expresados como $\log(1/T)$ o $\log(1/R)$ y los de un método analítico de referencia, en muestras de composición conocida. Este proceso se conoce con el nombre de etapa de calibración, a la relación matemática desarrollada se le denomina ecuación de calibración y el grupo de muestras de composición conocida se designa como colectivo de calibración o aprendizaje. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permite predecir el contenido de otras muestras de características similares a las incluidas en el grupo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1995 a)b) y 1996). La obtención de las ecuaciones de calibración globales o universales, de amplio uso, requieren el seguimiento de determinadas estrategias, que exigen un conocimiento científico específico, gran carga de trabajo y elevado coste inicial.

Una etapa de gran importancia en el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS es la **selección de muestras** que van a constituir el colectivo de calibración, para que quede representada la variabilidad, tanto espectral como química del colectivo, existiendo numerosos métodos que permiten una correcta selección de muestras. La mayoría de dichas herramientas se basan en la realización de un análisis de componentes principales (CP), seguido del cálculo de distancias entre muestras (espectros) en un espacio n-dimensional, a través generalmente de la distancia de Mahalanobis (Shenk y Westerhaus, 1995 a)b) y 1996).

Una vez seleccionadas las muestras de calibración, éstas deben ser analizadas mediante el método de referencia y NIRS. A continuación, hay que seleccionadas las variables espectrales a considerar (longitudes de onda seleccionadas, componentes principales, etc.) para desarrollar **el modelo matemático** que relacione ambos tipos de datos. Para ello existen diferentes métodos de regresión (Naes *et al.*, 2002), siendo los más utilizados en las aplicaciones cuantitativas NIRS:

- Regresión lineal múltiple (MLR)

-
- Regresión por componentes principales (PCA)
 - Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La **regresión MLR**, lleva a cabo una regresión a partir de un pequeño número de variables espectrales seleccionadas de entre todo el espectro NIR. Dichas longitudes de onda, seleccionadas mediante un test F, son aquellas que presentan una mayor correlación entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de composición química.

Los métodos de regresión **PCA y PLS** se asemejan en sus fundamentos ya que mediante ambos métodos se pretende generar nuevas variables, combinación lineal de los datos espectrales originales y emplear estas nuevas variables en el desarrollo de la ecuación de regresión (Shenk a)b) y Westerhaus, 1995; Martens y Martens, 2000). Así, únicamente es considerada en el desarrollo de la regresión aquella información presente en los datos espectrales realmente relevante. La principal diferencia entre ambos se basa en el tipo de combinaciones lineales que se construyen a partir de los datos originales.

El análisis de **regresión** por componentes principales (**PCA**) emplea los valores de las componentes principales que es un procedimiento matemático que calcula vectores ortogonales (independientes), llamados factores o condiciones, para modelar los datos espectrales. La combinación lineal de varios términos permite una descripción completa de los espectros. En la práctica, las componentes principales describen la forma de los espectros.

El análisis de **regresión** por mínimos cuadrados parciales (**PLS**) construye unos factores, los cuales se seleccionan de tal forma que expliquen el mayor porcentaje de variabilidad, no solo en los datos espectroscópicos, como en el caso de PCA, sino asimismo la mayor variabilidad en los datos de composición química (Shenk y Westerhaus, 1995; Naes et al., 2002).

Es decir, PCA utiliza la información espectral sin tener en cuenta las características químicas relacionado con el espectro y PLS para el cálculo de las componentes principales de los espectros utiliza además la composición química de las muestras.

En algunos casos, no es posible encontrar una respuesta lineal, por lo que es necesario recurrir a métodos de regresión no lineales.

Durante el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS, siempre se observa la presencia de determinadas muestras que, por diversos motivos, presentan un comportamiento diferente al resto de muestras presentes en el colectivo de

calibración. Siendo un paso fundamental durante el proceso de calibración, la **detección de outliers o muestras "atípicas"**, que se agrupan en dos grandes categorías: anómalos espectrales y anómalos químicos.

Para la **detección de anómalos espectrales**, entre los métodos más empleados se encuentra el cálculo de distancias en espacios n-dimensionales, como puede ser la distancia de Mahalanobis o el estadístico leverage, y el cálculo de residuales en los datos espectrales, es decir, espectros o datos espectrales que presenten una parte importante de su variabilidad sin explicar por el modelo generado (Shenk y Westerhaus, 1995 a)b). Shenk y Westerhaus (1991 b) desarrollaron el algoritmo CENTER, incluido en paquete estadístico WinISI (Intrasoft International, Port MATilda, PA,USA) que permite calcular la *distancia H estandarizada*, una variante de la distancia de Mahalanobis (Mahalanobis, 1936), a partir de un análisis de componentes principales de los datos espectrales. En este nuevo espacio vectorial, cada uno de los espectros vendrá definido por un punto con sus coordenadas (scores) sobre cada uno de los ejes definidos por los componentes principales considerados. La finalidad de esta etapa es reducir la dimensionalidad de una población, para evaluar la presencia de muestras anómalas espectrales en dicho conjunto, mediante el cálculo de la distancia H de cada muestra al centro de la población. Se recomienda el uso de un valor de H límite ($H < 3$).

Ambos tipos de estadísticos (distancias en espacios n-dimensionales y residuales) pueden ser también empleados en la detección de anómalos químicos. Sin embargo, la más extendida es el cálculo de residuales, en este caso, en los datos de composición es empleando un test similar a la T de Student. Compara para cada muestra, el valor del constituyente obtenido mediante el método de referencia y el valor predicho por la ecuación NIRS. Se consideran muestras atípicas con respecto a su composición química aquellas que presentan valores de $T > 2,5$.

Y finalmente, hay un tercer test de outliers (*Outliers X*), o *test RMS*. Solamente tiene sentido cuando para cada análisis se toma más de una submuestra, lo que se recomienda para productos que son muy variados en su composición, como es el caso de los materiales naturales no molidos. Es una medida del error estándar de la diferencia entre dos espectros registrados en el mismo equipo (RMS). Los resultados se optimizarán a medida que los valores de RMS disminuyan (ISI, 1999).

Después de haber desarrollado una ecuación de calibración mediante alguno de los métodos de regresión existentes, es esencial determinar su **capacidad de predicción** de muestras que no hayan intervenido en la calibración. Este proceso se denomina etapa de validación (o validación externa,) mientras que las muestras empleadas en

dicha etapa se designan como colectivo de validación. Desde el punto de vista estadístico, la etapa de validación consiste en la comparación, mediante diferentes criterios estadísticos, del valor de referencia y el valor estimado NIRS (Massart *et al.*, 1988).

La siguiente figura 1.5.1.1 esquematiza las diferentes etapas para el desarrollo de un modelo de predicción NIRS.

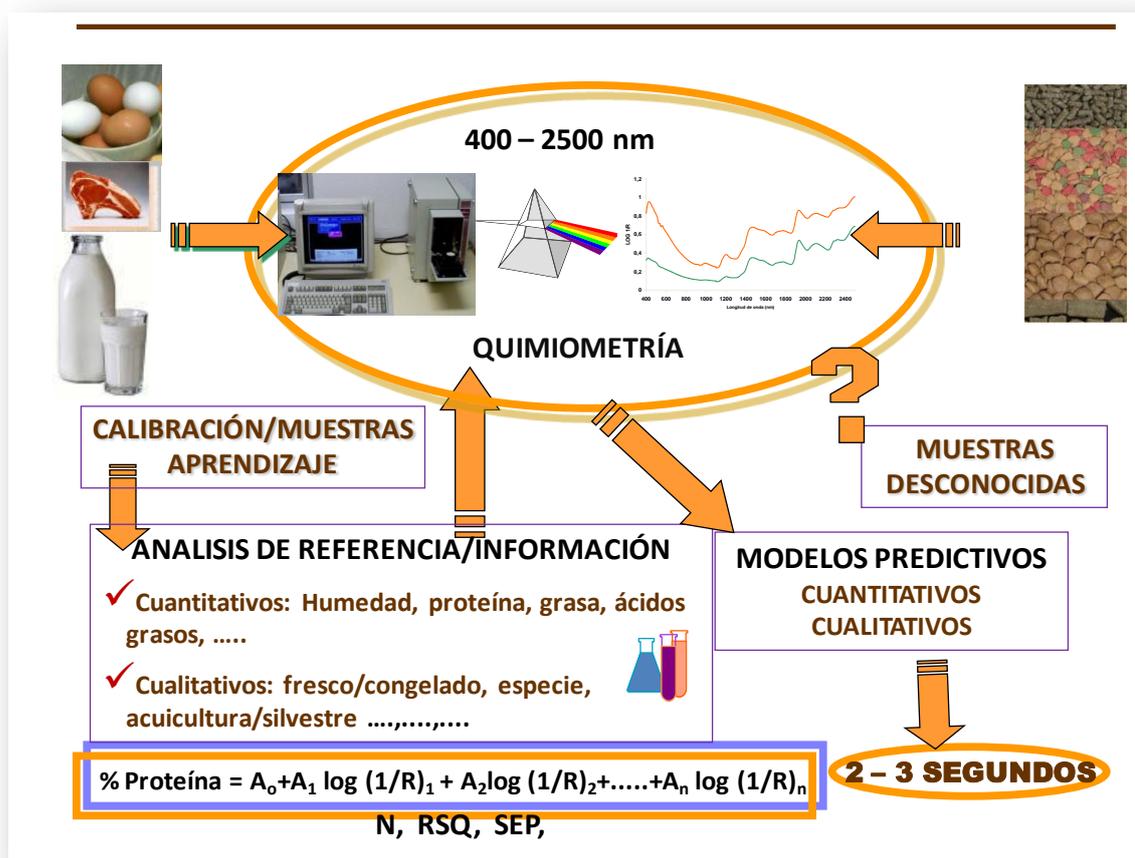


Figura 1.5.1.1. Esquema de desarrollo de un modelo de predicción NIRS

Los criterios estadísticos más importantes para evaluar el error o la capacidad de predicción de un procedimiento analítico, en este caso el modelo de predicción NIRS, son la exactitud y precisión (Massart *et al.*, 1988). La exactitud se entiende como los diferencia entre el valor de referencia y el valor estimado para un conjunto de muestras, mientras que la precisión se refiere a las diferencias existentes entre medidas de unas mismas muestras (Naes *et al.*, 2002).

Además del tratamiento matemático de los datos y de modelo de regresión elegido, la exactitud de la ecuación de calibración está determinada por la elección del

número óptimo de términos de la misma (este es el que no implique un sobreajuste) y una serie de **parámetros estadísticos**, que se describen brevemente a continuación:

- *Coefficiente de determinación de la calibración (RSQ)* – Medida de la bondad del ajuste del modelo de regresión utilizado, que establece una correlación entre los datos obtenidos por el método de referencia (vía húmeda) y los predichos por las ecuaciones de calibración para un determinado parámetro.
- *Error estándar de calibración (SEC)* – Se define como la desviación típica de los residuales, es decir el error asociado a las diferencias entre los resultados obtenidos por el método de referencia y el valor estimado por la ecuación NIRS, para los parámetros analíticos determinados en las muestras utilizadas en la calibración.

$$SEC = [\sum(Y_i - Y'_i)^2 / (n - p - 1)]^{0.5}$$

- o Y_i valor mediante método de referencia para muestra i
 - o Y'_i valor mediante NIRS para muestra i
 - o n número de muestras
 - o p número de términos de la ecuación
- *Coefficiente de determinación para la validación cruzada (1-VR)* – Medida de la correlación entre los datos del método de referencia y predichos por las ecuaciones de calibración, cuando la ecuación se desarrolla dividiendo el conjunto de muestras de calibración en varios grupos de validación cruzada, de forma que uno se reserva para validar mientras los restantes se usan para calibrar, hasta que todos los grupos hayan participado una vez en la validación.
 - *Error estándar de validación cruzada (SECV)*- Error asociado a las diferencias entre los resultados obtenidos por el método de referencia y los análisis NIRS para los parámetros analíticos determinados en las muestras utilizadas en la validación cruzada.
 - *Error estándar de predicción (SEP)* – Desviación típica de las diferencias, para un colectivo de validación o error asociado a las diferencias entre los resultados obtenidos por método de referencia y el valor estimado mediante el análisis NIRS, utilizando una ecuación de calibración específica sobre muestras que no hayan intervenido en la calibración.
 - RPD – Relaciona la desviación típica de los datos de referencia para la población de validación y el error típico de validación cruzada o de

predicción. Este estadístico, junto con el CV, facilita la comparación de los resultados obtenidos con diferentes colectivos de validación. Williams (2001), recomienda que su valor debe ser al menos igual a 3,0, aunque un valor de 2,5 es aceptable (Williams y Sobering, 1996)

RPD= Desviación típica / SECV

- RER – Al igual que el anterior, este estadístico facilita la comparación de los resultados obtenidos con diferentes colectivos de validación. Es la relación entre el intervalo de composición de los datos de referencia para la población de calibración y el error típico de validación cruzada. Williams (2001), recomienda que su valor debe ser al menos igual a 10.

RER= Rango / SECV

I.6. CLONACIÓN DE INSTRUMENTOS

Un factor importante para la implantación de la tecnología NIRS a nivel de la industria y de los laboratorios, es el desarrollo de ecuaciones de calibración robustas y globales (Shenk y Westerhaus, 1995 a)b) es decir, ecuaciones obtenidas a partir de un número elevado de muestras que pueden ser empleadas para predecir con precisión y exactitud la mayor parte de las muestras de una población y que mantengan su precisión y exactitud a lo largo del tiempo. Dichas ecuaciones tienen un elevado valor científico, así como económico. Por ello, lo ideal sería que, una vez obtenidas, pudieran ser empleadas en **diferentes instrumentos** (en el mismo o distintos emplazamientos). Para ello, es necesario que el espectro de una misma muestra obtenido en el instrumento donde fueron generadas las ecuaciones (instrumento Máster) sea lo más parecido posible al espectro obtenido en aquel instrumento NIR hacia el cual se desean transferir las ecuaciones (instrumento satélite). Sin embargo, a pesar del avance instrumental, los espectros obtenidos con distintos instrumentos, incluso del mismo fabricante, presentan diferencias derivadas de la configuración o de la óptica, rangos de medida, etc, lo que hace imposible la transferencia directa de ecuaciones para ser utilizadas con la misma exactitud y precisión que el instrumento Máster (Bouveresse *et al.*, 1996; Pérez Marín *et al.*, 2005; Soldado *et al.*, 2009)

Tradicionalmente, el método empleado para resolver el problema de la **transferencia de ecuaciones** era el ajuste, mediante corrección de la pendiente y/o sesgo (Osborne y Fearn, 1993). Sin embargo, a lo largo de los años se han desarrollado numerosas

herramientas quimiométricas para poder realizar la estandarización o clonación entre instrumentos NIR y la posterior transferencia de ecuaciones (Bouveresse y Massart, 1996; Fearn, 2001; Naes *et al.*, 2002; Dardenne, 2004).

Entre ellos se pueden citar el método DS y PDS descrito por Wang *et al.* (1991), aquel que emplea OSC (Ortogonal signal correction) propuesto por Wold *et al.*, (1998), así como la estandarización mediante redes neuronales (Despaigne *et al.*, 1998). Sin embargo, desde el punto de vista práctico, uno de los métodos de estandarización más utilizado sigue siendo el descrito por Shenk y Westerhaus, el cual patentado por los autores en su versión a partir de un conjunto de 30 muestras selladas de diferentes productos agro-ganaderos como cereales, alimentos proteicos, piensos, forrajes, etc. (Shenk y Westerhaus, 1989), realiza una corrección univariante del espectro completo mediante dos etapas independientes. Una primera etapa de corrección de las longitudes de onda y una segunda de corrección de los valores de absorbancias.

La **corrección de las longitudes de onda** individuales entre los espectros de los dos instrumentos, transformados por un pretratamiento previo de la primera derivada, se realiza buscando la longitud de onda del instrumento satélite para la que sus valores de absorbancia estén más correlacionadas con cada una de las del Máster. A continuación se ajusta, mediante un modelo cuadrático, a la longitud de onda con la máxima correlación y sus dos longitudes de onda más próximas. Las distintas localizaciones de los modelos cuadráticos obtenidos para cada longitud de onda del instrumento Máster se consideran las longitudes de onda del instrumento satélite que mejor se ajustan a las correspondientes longitudes de onda del instrumento Máster. A continuación se ajusta un nuevo modelo cuadrático que relaciona las longitudes de onda del instrumento Máster con sus correspondientes longitudes de onda en el instrumento satélite, obteniéndose de este modo los valores definitivos para las longitudes de onda del instrumento satélite correspondientes a las longitudes de onda del instrumento Máster.

La **corrección de los valores de absorbancia** se obtiene mediante regresión lineal de las respuestas del instrumento satélite obtenidas por interpolación a cada longitud de onda seleccionada, sobre las respuestas del instrumento Máster a la correspondiente longitud de onda. Una a una, se ajusta la respuesta del instrumento satélite con los correspondientes coeficientes de regresión.

Según Fearn (2001) existen tres maneras de abordar el problema de la transferencia: (i) obtener calibraciones robustas no sensibles a las diferencias espectrales entre instrumentos, (ii) ajustar los espectros de un instrumento de manera que se parezcan a

los espectros del otro instrumento y (iii) ajustar las ecuaciones de calibración desarrolladas en un equipo para que puedan ser usadas en el otro.

Modelos de calibración robustos que no sean sensibles a las respuestas instrumentales pueden conseguirse empleando pretratamientos adecuados (Feudale *et al.*, 2002), seleccionando las longitudes de onda (Swierenga *et al.*, 1998) o incluyendo diversos instrumentos en el set de calibración (Büchmann, 2000; Tillmann, 2000). Sin embargo, el pretratamiento es solamente adecuado cuando el problema está relacionado con derivas en la absorbancia y las diferencias instrumentales son pequeñas. Seleccionar las longitudes de onda que son robustas frente a diferencias instrumentales, no es apropiado para corregir diferencias de intensidad o ensanchamientos de pico en el espectro, y el método de la corrección de la pendiente y el bias para ajustar calibraciones, funciona bien cuando se corrigen derivas de absorbancia o diferencias de intensidad lineal en el espectro, pero no soluciona el ensanchamiento de pico (Alamar *et al.*, 2007) Para corregir efectos más complicados en los casos de grandes diferencias entre los instrumentos, se necesitan procesos de estandarización.

I.7. AUTOMATIZACIÓN DE LA GESTIÓN ANIMAL MEDIANTE SENSORES NIRS.

Las explotaciones lecheras sufren actualmente estrechos márgenes de beneficio. Al mismo tiempo, los ganaderos deben tener en cuenta la demanda de los consumidores por alimentos de calidad y seguros, el bienestar animal, la reducción de los tratamientos médicos y un impacto medioambiental aceptable de la producción (Berckmans 2003, 2004).

La **estructura de las granjas de vacuno** de leche ha cambiado sustancialmente en los últimos veinte años, lo que ha conducido a un menor número de explotaciones, de mayor tamaño, más intensivas y con un mayor rendimiento animal. Cuanto mayor es el tamaño del rebaño, menor es la posibilidad de una observación e identificación individualizada de los animales, por lo que el ganadero debe apoyarse en el uso de las nuevas tecnologías, que no sólo le pueden ayudar a evitar trabajos pesados y repetitivos, sino también a gestionar el rebaño, a detectar precozmente cualquier anomalía, a favorecer un ordeño rápido y seguro para el animal, o a alimentar a cada animal según sus necesidades y, por ello, de forma más eficiente. Por otra parte, en la producción intensiva de leche se ven con creciente preocupación el impacto ambiental de las granjas, la incidencia de patologías de diverso tipo (mamitis, cojeras,

etc), el bienestar de las vacas y la salud alimentaria, al mismo tiempo que hay que cumplir con la normativa existente. Por ello, es preciso que las granjas de vacuno de leche y en general, las explotaciones ganaderas, asuman nuevos desafíos y afronten el futuro mediante una correcta modernización de sus instalaciones y un uso intenso de nuevas tecnologías, tanto las que ya están disponibles como las que están por llegar, con el fin de gestionar eficazmente el conjunto de su explotación a través de una mejor gestión individual de cada animal.

El término que se viene empleando desde hace algunos años para definir el uso de estas tecnologías es el de **ganadería de precisión (precisión livestock farming, PLF)**, que podría definirse como una metodología de manejo y de gestión que utiliza sensores y tecnologías de la información para monitorizar y optimizar la contribución de cada animal a la producción, la salud, el impacto ambiental, el gasto energético y el bienestar en tiempo real, de forma automática y continua (figura 1.7.1).



Figura 1.7.1. Esquema de concepto de la ganadería de precisión. (Fuente: adaptado de Telecommunications Software System Group (TSSG), centro de excelencia de Tecnología de Información y Comunicación (Information and Communications Technologies (ICT)).

El principal objetivo de estas tecnologías aplicadas a la **ganadería de precisión** es maximizar el potencial individual del animal, mantener un buen estado sanitario del ganado, conseguir los mejores índices reproductivos, longevidad, así como un óptimo y rentable rendimiento productivo y una buena calidad de producto final. Para ello, es necesario observar a los animales con detenimiento, proporcionar una alimentación adecuada y reaccionar con rapidez a los cambios en el estado sanitario. Esta

monitorización y control implica la medición de indicadores biométricos (fisiológicos y morfológicos), de comportamiento, de consumos o de producción, de forma individual en cada animal con el objeto de promover, implementar y mejorar estrategias de manejo, de gestión y el rendimiento de la explotación (Bewley, 2010).

Dentro de este mismo enfoque podemos hablar de la gestión de una **alimentación de precisión o “precision dairy feeding”, PDF** (Cerosaletti, 2008). Se puede definir como un proceso continuo de proporcionar al animal los nutrientes adecuados (no un exceso) a través de los alimentos de cosecha propia, mediante la integración de un sistema de gestión de alimento y forraje, con el propósito de mantener una sostenibilidad económica y medioambiental. Se pueden fijar metas en tres áreas determinadas:

- Mejorar: Eficiencia de los nutrientes, uso de alimentos de cosecha propia e ingresos de producción láctea por encima de los costes de alimentación.
- Optimizar: la compra de nutrientes importados y la producción propia.
- Reducir/minimizar: exceso de nutrientes en la ingesta y en la excreción.

Algunos de los pasos propuestos a seguir por el sistema PDF para alcanzar estos retos son: ingesta de fibra neutro detergente (FND) $\geq 0,9\%$ del peso corporal; $\geq 60\%$ de forraje en la dieta; $\geq 60\%$ de alimentos de cosecha propio; $< 16,5\%$ proteína cruda, entre otros. Una elevada producción láctea requiere en su ración una proporción de proteína elevada, alimentos bajos en fibra altamente digestible y un mínimo de fibra obtenida de los forrajes (henos, ensilados y pastos), así como alimentos ricos en fibra no digestible (Mertens, 2010)

Si hay un concepto a destacar en la estrategia planteada anteriormente, es la necesidad del **control**. En consecuencia, esto conduce a la necesidad de una instrumentación robusta que sirva como soporte. PDF no es solamente un conjunto de programas y robots automáticos, sino que está cambiando la manera de gestionar los animales, monitorizando al animal para mejorar su alimentación y su salud. La nutrición y la gestión de las prácticas alimenticias del ganado permite repercutir en la composición de la leche obtenida, aunque la relación entre alimentos-composición láctea es compleja. Los mayores cambios en respuesta a la dieta se observan en el contenido en grasa, seguidos a distancia de la proteína o lactosa.

Si bien, es enorme el potencial de la tecnología NIRS para dar respuestas a las demandas de control del sector agroalimentario, aún existe una amplia necesidad de generación de conocimiento multidisciplinar para ampliar las posibilidades de uso real de estos sensores a nivel **“on site”**, es decir, en explotaciones, campo, plantas industriales, etc., de forma tal que permitan la toma de decisiones en tiempo real.

Una vez consolidado el conocimiento científico de la teoría y aplicación de la reflectancia difusa para el análisis instantáneo de diversos tipos de muestras (sólidas, líquidas, pastosas, etc.), la tecnología NIRS ha evolucionado vertiginosamente en los referente a la instrumentación disponible. Esto es fácilmente entendible, ya que los componentes básicos de un instrumento NIRS (fuente de luz, elementos ópticos de dispersión de la radiación en longitudes de onda determinadas, lentes, detectores, fibras ópticas, etc.) pertenecen todos ellos al campo de la fotónica, uno de los campos de mayor crecimiento económico en el último medio siglo.

Entre los avances más destacables en instrumentación NIRS en los últimos 10 años, se encuentran los de disminución considerable del tamaño y peso de los equipos, la disponibilidad de instrumentos portátiles, la rapidez en la adquisición de espectros, y en el tratamiento y transmisión de la señal, el desarrollo de software de tratamiento más potentes y versátiles, la disponibilidad de sondas de fibra óptica de gran longitud, las mejoras en los diseños ópticos para incrementar la relación señal/ruido, etc. (O'Brien *et al.*, 2012; Korayem, 2013; Swarbrick, 2014).

La tecnología NIRS se podría encuadrar dentro de la definición de **“Smart sensors”** consecuencia de los principales atributos que la caracterizan como son su alta velocidad de respuesta, su bajo coste analítico por muestra, facilidad de uso en rutina, su carácter no destructivo, su versatilidad para el análisis de muy diversos productos y parámetros, su elevada reproducibilidad y repetibilidad, el ser una técnica limpia que no utiliza reactivos y que, por tanto, no produce residuos, así como su aptitud para su incorporación en línea/in situ y posibilitar el análisis a gran escala. No está siendo considerada como herramienta en la ganadería de precisión, fundamentalmente por ser una tecnología que requiere el desarrollo de modelos de predicción para su uso, basados en herramientas de análisis multivariante, a veces bastante complejas, y un conocimiento profundo del mercado y uso potencial de la variedad de sensores NIRS disponibles (en precio, prestaciones, soporte técnico, etc.).

La **implementación de la tecnología NIRS** no es tarea sencilla. Conlleva una enorme carga de trabajo en las etapas iniciales, en la recogida de espectros y obtención de datos de referencia (generalmente mediante laboriosas metodologías clásicas por vía húmeda), el tratamiento de la información espectral (mediante tratamientos matemáticos, detección de outliers y modelos de regresión), la obtención de modelos de calibración y la validación de los mismos (mediante diferentes estadísticos). Así mismo, estos modelos deben de ser revisados y actualizados, incorporando nuevas muestras a la población, manteniendo su exactitud y su precisión. Por otro lado, todo este proceso, sería “más productivo” si se pudiera transferir directamente de un

instrumento a otro, sin embargo uno de los mayores inconvenientes es la transferencia (clonación) de modelos de calibración de los equipos donde se han desarrollado (instrumento Máster) a otros instrumentos (instrumento satélite). Es necesario añadir, que generalmente los modelos de calibración se desarrollan en instrumentos at-line, cuyo uso a pie de campo o en línea de producción no es viable, necesitándose modelos de calibración en instrumentos que permitan medidas on-line, permitiendo un control in-situ de los parámetros a medir. Unos de los objetivos más importantes de cara al convencimiento del sector industrial para la implantación de métodos in-situ y on-line es el poder aprovechar bases de datos espectrales obtenidas durante años para ser utilizadas en nuevos instrumentos que aparecen en el mercado. Por ejemplo, transferir bases de datos y calibraciones desarrolladas en instrumentos de altas prestaciones científico-técnicas como monocromadores a equipos MEMS-NIRS. Para ello, es necesaria la transferencia de modelos de calibración entre ambos equipos NIRS, o lo que es lo mismo, la estandarización de ambos instrumentos (tengan las mismas características de diseño o difieran en ellas) para que los espectros tomados en ellos sean similares. De este modo, se pone en valor todo el trabajo realizado previamente en un determinado equipo sin la necesidad de partir de cero cada vez que se quiera implementar un nuevo avance en cuanto a instrumentación (Zamora Rojas, 2013), y se abriría un claro futuro para la integración de forma genérica de esta tecnología, a través de los sensores NIRS portátiles, en las explotaciones, para aplicar su máximo potencial en PLF. Ello contribuiría, sin duda alguna, a optimizar la práctica de la alimentación en las explotaciones agroganaderas y por ende su rentabilidad, manteniendo una sostenibilidad económica y medioambiental.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Con el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se pretende desarrollar, evaluar y validar estrategias analíticas para el establecimiento de controles de calidad y trazabilidad en las producciones lecheras, incidiendo también en la integración de los sensores NIRS como sistemas de ayuda a la toma de decisiones en las explotaciones ganaderas de vacuno lechero.

Los objetivos planteados se establecen a continuación:

- ✓ Desarrollo e implementación de una metodología analítica GC-MS para el análisis del contenido de AG en leche, compatible con su aplicación para el análisis en rutina de un número elevado de muestras diarias.
- ✓ Desarrollo y validación de una metodología de MW para la extracción /derivatización de AG en leche y productos lácteos.
- ✓ Evaluación del efecto del enriquecimiento natural de la leche de vaca mediante suplementación con Se en la ración sobre el contenido de oligoelementos Zn, Cu, Co y I, mediante la técnica de ICP-MS.
- ✓ Puesta a punto, desarrollo y evaluación de metodologías NIRS para la caracterización físico-química de leche mediante el empleo de sensores MEMS-NIRS portátiles y su integración como sistemas de ayuda a la decisión en explotaciones ganaderas de vacuno de leche, para el control in-situ de calidad de la producción láctea.

III. EXPERIMENTAL

III.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AG EN LECHE DE VACA

III.1.1. IMPORTANCIA DE LOS AG EN LA SALUD

Actualmente, en la nutrición humana, se enfatiza la importancia de mantener una dieta equilibrada para reducir la incidencia de enfermedades no contagiosas, como la obesidad, la diabetes, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Leaf *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2004). Por ello, las características nutricionales de los alimentos que componen la dieta humana, cada vez son más tenidas en cuenta como estrategia para mejorar la salud (Parodi, 1999; Bauman *et al.*, 2006). Más aún, este hecho, ha potenciado el interés de los consumidores por dietas enriquecidas en nutrientes con efectos demostrados en la prevención de enfermedades.

En este contexto, los lípidos adquieren una notable importancia como constituyente de la dieta humana actual. Ésta tiende a ser hipercalórica, fundamentalmente debido al exceso de grasas, además ricas en AGS que son factores de riesgo para ECV (Ascherio *et al.*, 1996; Williams, 2000). Existe, por ello, una mala apreciación del consumidor hacia los productos de los rumiantes, entre ellos la leche, por asumir que tienen un alto contenido de grasa. La grasa de la leche y los productos lácteos contribuye de modo importante al consumo de AG y vitaminas en la dieta humana, y juega un papel crítico en los atributos sensoriales de estos alimentos (Demment y Allen, 2004; Chen *et al.*, 2004; Chilliard y Ferlay, 2004). La leche siempre ha sido uno de los alimentos naturales más completos desde el punto de vista nutritivo. Sin embargo, desde el punto de vista médico dietético, su valoración ha sido baja por la correlación establecida entre ECV y el consumo de grasas de origen animal, esto es, grasas saturadas. Entre ellas, la grasa láctea destaca por su alto contenido en AGS como el láurico, mirístico y palmítico conocidos por su acción hipercolesteromiante debido a la elevación en los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LBD) (Grundy, 1994). La grasa en leche, típicamente contiene una alta proporción de AGS (70-75 %), AG monoinsaturados (AGMI) (20-25 %) y cantidades pequeñas de AGPI (5 %) (Lock y Shingfield, 2004). Menos del 40 % de los AGS están considerados dentro de la categoría de ser poco saludables (Elgersma *et al.*, 2006).

Sin embargo, esta valoración pudiera ser otra si tenemos en cuenta los **atributos positivos** de la grasa de la leche desde el punto de vista de la salud humana (FAO, 2008). Se debe a la acción hipocolesteromiante de sus AGI, en especial el oleico y el linoleico (Grundy, 1994). El interés por las posibles propiedades metabólicas del ácido vacénico en función del tipo de isómero del que se trate, también ha ido en aumento

(Shingfield *et al.*, 2008), de hecho se han publicado recientemente los posibles beneficios del consumo de este ácido (Gebauer *et al.*, 2011; Aldai *et al.*, 2013). También por la potencial acción anticancerígena del ácido butírico y de los esfingolípidos, según se desprende de las investigaciones realizadas con modelos animales (Parodi, 1999). Así mismo, los CLA y los AG ω 3 suscitan enorme interés en la actualidad, por sus efectos beneficiosos que se reseñan a continuación.

La acción **antiaterogénica** se fundamenta en la reducción que ocasionan en el nivel plasmático de las LBD (McGuire y McGuire, 2000), cuya oxidación contribuye junto con otros eventos fisiopatológicos al desarrollo de la aterosclerosis, la más frecuente de las causas subyacentes en la mortalidad asociada a las ECV. La acción **anticancerígena** se vincula de manera explícita al cis-9,trans-11,CLA (Ip *et al.*, 1999), también llamado ácido ruménico, del mismo modo que al trans-10,cis-12, CLA se le relaciona con la acción antilipogénica (Park *et al.*, 1999). Ambos son el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos ruminales sobre los lípidos ingeridos por los animales a través de la ración diaria (Bauman *et al.*, 2001). Por esta razón, aparecen en los alimentos provenientes de rumiantes, especialmente en la leche, que constituye como tal o como derivado lácteo, la principal fuente de CLA para el ser humano.

Dentro de los AGPI, existen dos grandes familias, **ω 3 y ω 6**. Los ω 6, tienden a consumirse en exceso en las dietas modernas, sobre todo por su inclusión en productos de comida elaborada. Diversos estudios han demostrado que ambos tipos de AG no sólo hay que tomarlos en cantidades suficientes, sino que también hay que guardar una cierta **proporción** entre ellos (Simopoulos, 2002)

Se viene aconsejando duplicar la ingestión de ácidos ω 3, para que la relación ω 6 / ω 3, de la dieta humana se acerque al valor recomendado de 4-5/1 bastante distante del actual 20-30/1 en los países occidentales por el alto consumo de ω 6 (en especial ácido linoleico). Esta relación desbanca a la clásica AGPI/AGS como indicativa de la calidad de la grasa de los alimentos para el ser humano. El enriquecimiento de la leche bien con CLA, bien con ω 3, permitiría elevar la ingestión de ambos nutrientes en el ser humano, y por otro lado revalorizar las virtudes nutritivas de este alimento, potenciando su consumo.

Dado que los alimentos provenientes de los rumiantes (carne y productos lácteos) son la mejor fuente del isómero cis-9,trans-11,C18:2 (>90%) para humanos (Chouinard *et al.*, 1999a; Larsen *et al.*, 2003), la atención actual está en **incrementar** la concentración de AG deseables en productos de los rumiantes. En principio, alterando el perfil de AG de la grasa consumida se disminuiría el consumo de AGS indeseables, y con ello se reduciría el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Elgersma *et al.*, 2006).

La manipulación de la dieta del animal ha sido el punto clave para incrementar el contenido en CLA de los productos de los rumiantes (Jiang *et al.*, 1996; Jahries *et al.*, 1997; Lawless *et al.*, 1998; Dhiman *et al.*, 2000), en leche (Kay *et al.*, 2004; Khanal *et al.*, 2003, Morales-Almaraz *et al.*, 2009), carne (Griswold *et al.*, 2003; Sackman *et al.*, 2003) y huevo (Watkins *et al.*, 2003; Cachaldora *et al.*, 2008; Woods y Fearon, 2009), entre otros alimentos. Esto ha impulsado a los investigadores y a la industria láctea al desarrollo de estrategias para modificar la composición de la grasa láctea, disminuyendo su concentración de AGS, particularmente C12:0, C14:0 y C16:0, e incrementando la de cis-9, C18:1, AGPI ω 3 y CLA (Dewhurst *et al.*, 2006). Una parte importante de estas investigaciones se han centrado en el efecto del pastoreo como sistema de producción sostenible de las vacas lecheras frente a otros sistemas más intensivos, constituidos por forrajes conservados y mezclas o raciones completas mezcladas (TMR), como fuente natural para el enriquecimiento en ciertos AG de la leche producida (Morales -Almaraz *et al.*, 2008; Vanhatalo y Shingfield, 2009).

III.1.2. MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO EN AG DE LA LECHE MEDIANTE LA ALIMENTACIÓN

La proporción de AG en la leche está influenciada por factores intrínsecos del animal (especie, raza, genotipo, estado de lactación y preñez) y extrínsecos (alimentación, medio ambiente, manejo, etc.). Estos últimos incluyen el manejo post-cosecha del forraje (Khanal y Olson, 2004; Chilliard *et al.*, 2004).

La única capacidad de maniobra para influir sobre la composición de los AG de la leche, más concretamente, sobre los AGI es la **alimentación del ganado**, ya que es responsable del aporte lipídico diario a las vacas productoras de leche. Los principales tipos de lípidos de la dieta son los triglicéridos, fosfolípidos y galactolípidos. Los triglicéridos son el principal tipo de lípidos en la grasa de la mayoría de los cereales (90 % de los AG) y aceite de semillas (>95 %), mientras que en los forrajes se encuentran en forma de galactoglicéridos (McDonald *et al.*, 1995).

Una vez que la grasa llega al rumen sufre importantes cambios químicos realizados por la población microbiana. El primero es la lipólisis o desdoblamiento por parte de las lipasas microbianas dando AG libres y glicerol (figura 3.1.2.1). El glicerol es fermentado para producir principalmente ácido propiónico, que será absorbido junto con el resto de los ácidos grasos volátiles (AGV) a través de la pared ruminal. Los AGI, que predominan en los alimentos de origen vegetal para rumiantes, son tóxicos para la población microbiana ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1997). Se encarga ella misma de la detoxicación mediante un proceso de hidrogenación (Doreau *et al.*, 1999). Esta

reacción afecta a una elevada proporción de los AGI que llegan al rumen. Lo abandonan una vez saturados siendo esto determinante de la peculiar solidez de las grasas corporales de los rumiantes en general. Los AGI que no son hidrogenados atraviesan intactos el rumen y llegan al intestino delgado donde son absorbidos con los demás AG y el resto de nutrientes digestibles. A continuación pueden llegar a la glándula mamaria explicando así la aparición en la grasa de la leche de AGI idénticos a los existentes en otros ingredientes alimenticios.



Figura 3.1.2.1. Esquema de la digestión de la grasa por los rumiantes (Fuente: adaptada de Chamberlain y Wilkinson, 1996).

La biohidrogenación (BH) más estudiada y mejor conocida es la de los dos AGPI mayoritarios en la fracción lipídica de los alimentos vegetales para el ganado, el ácido linoleico y el ácido linolénico. Su desarrollo conforma dos rutas metabólicas (Bauman *et al.*, 2001) que denominamos ordinaria y alternativa. La primera es la que prevalece con una ingestión diaria constante a una frecuencia y horario de alimentación regulares, es decir condiciones que permiten el desarrollo de una flora bacteriana característica y equilibrada en el rumen. En ella partiendo del ácido linoleico (figura 3.1.2.2) tienen lugar dos reacciones, la primera es una reacción de isomerización del doble enlace cis-12 a trans-11 por la enzima cis-9 trans-11 isomerasa o linoleato isomerasa. Conduce a la formación de uno de los isómeros del ácido linoleico conjugado, el cis-9, trans-11, C18:2 (ruménico). Esta isomerización es extremadamente rápida (Kepler *et al.*, 1966). La segunda reacción es la reducción del cis-9 trans-11 C18:2 a trans-11 C18:1 o ácido vaccénico y también cis-11 C18:1 en menor medida (Fellner *et al.*, 1995).

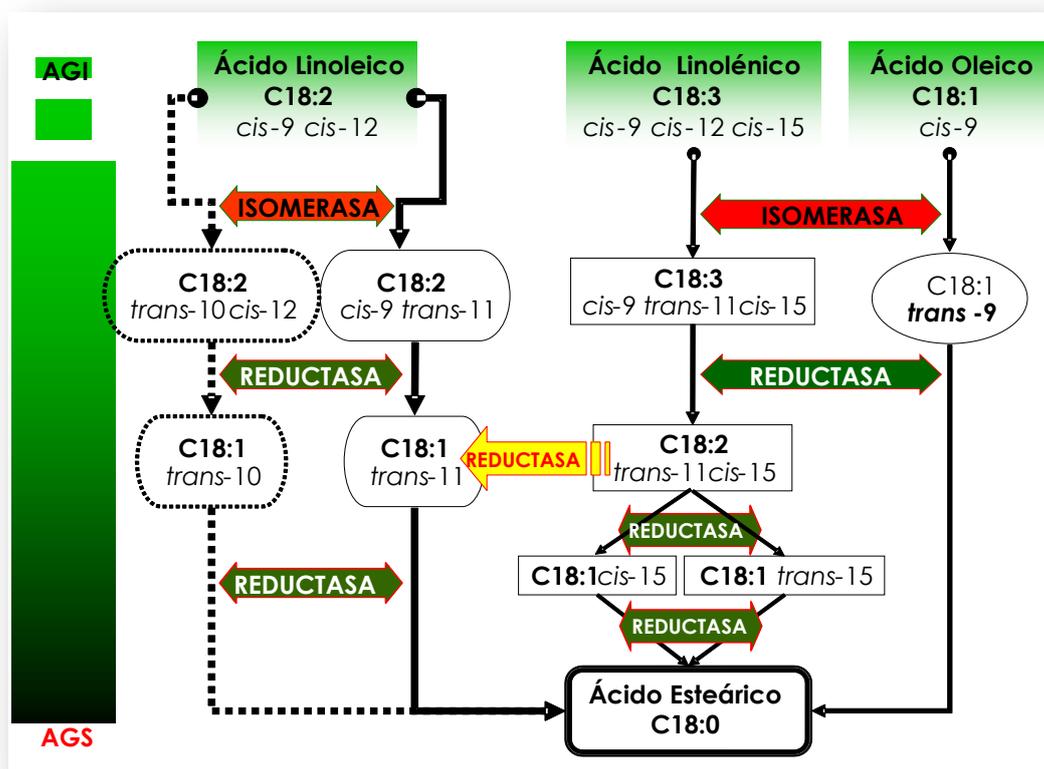


Figura 3.1.2.2. Ruta de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados (AGI): linoleico, linolénico y oleico (Fuente: Adaptado de Harfoot y Hazlewood, 1988).

Cuando se parte del ácido linoleico, sus dos isómeros cis (α -linolénico o cis-9, cis-12 cis-15 C18:3 y γ -linolénico o cis-6, cis-9, cis-12 C18:3) son isomerizados en el doble enlace cis-12 a trans-11 seguido de una reacción de los dobles enlaces cis hasta formar trans-11 C18:1 cis-15 C18:1 ó trans-15 C18:1 y cis-15 C18:1. La segunda etapa de la BH convierte los isómeros C18:1 a ácido esteárico. Esta etapa se realiza de una manera más lenta. Por lo tanto, puede tener lugar en el rumen un incremento de productos intermedios, ácido vaccénico principalmente. Ello facilita que se pueda absorber una mayor cantidad del mismo en el intestino (Bauman *et al.*, 1999). Se ha observado que el ácido trans-11 C18:1 es el isómero trans predominante en la BH del ácido linoleico (Bauman y Griinari, 2001).

De la BH se pueden destacar una serie de puntos:

- La BH de los AGI no tiene que ser completa, lo que significa que hay metabolitos intermedios que abandonan el rumen como tales y llegan al intestino delgado donde son absorbidos.
- Durante la BH del ácido linoleico se produce la formación de sus dos isómeros más relevantes el cis-9 trans-11 CLA y el trans-10 cis-12 CLA.

- Se produce la formación de dos isómeros C18:1 de interés el trans-11 C18:1 o ácido vaccénico, y el trans-10 C18:1. Ambos se forman a partir de AGPI, pero siguiendo rutas metabólicas diferentes.

Diversos estudios han demostrado que existe una relación lineal entre la concentración del ácido vaccénico y del ácido cis-9 trans-11 C18:2 en la leche de vaca (Chilliard *et al.*, 2001); Wijesundera *et al.*, 2003), hecho que está relacionado con la síntesis de cis-9 trans-11 C18:2 a partir de ácido vaccénico. En efecto, el cis-9 trans-11 C18:2 puede originarse en la glándula mamaria gracias a la acción de la esteril CoA Desaturasa (Δ^9 -desaturasa), una enzima que actúa sobre el trans-11 C18:1 introduciendo un doble enlace cis en la posición del carbono 9 (Bauman *et al.*, 1999), tal como indica la figura 3.1.2.3.

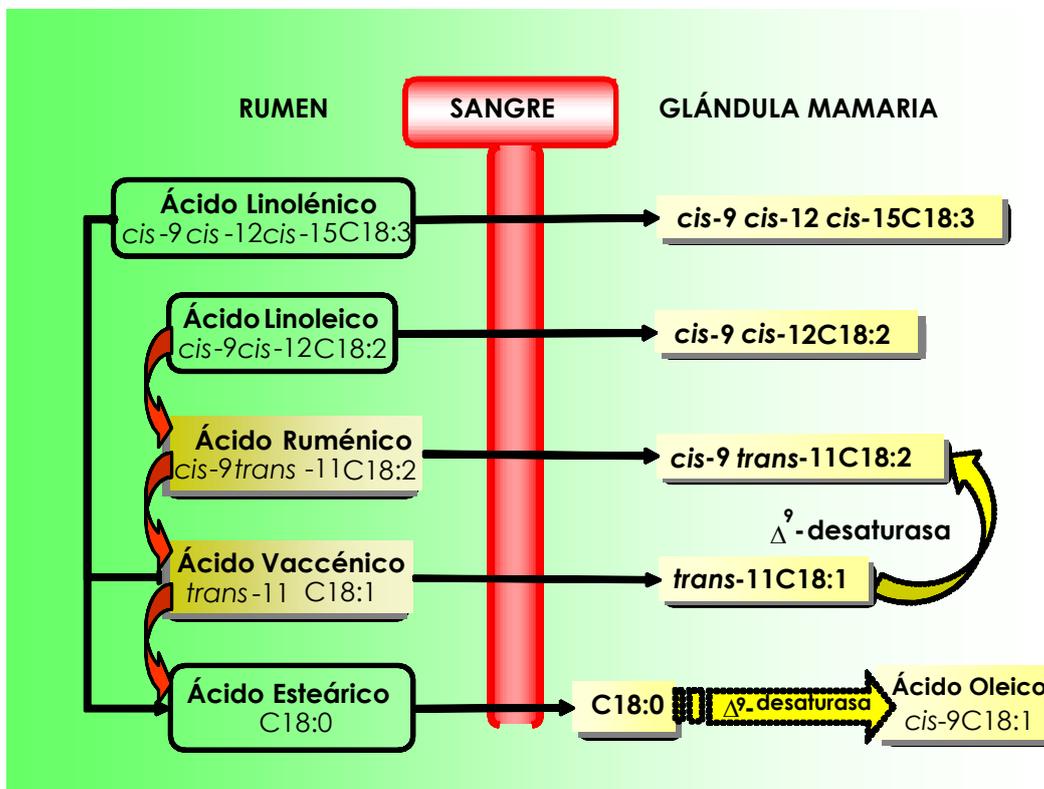


Figura 3.1.2.3. Principales vías de síntesis de ácido vaccénico y ácido ruménico en vacuno de leche (Fuente: Adaptada de Chilliard *et al.*, 2001)

También el ácido cis-9 trans-11 C18:2, el más frecuente entre todos los isómeros del CLA en la leche (Pariza *et al.*, 2000; Mir *et al.*, 2000), es parcialmente absorbido a través de la pared intestinal tras la isomerización del ácido linoleico que tiene lugar en el rumen. Posteriormente llega a la glándula mamaria para ser excretado en la leche. Aún así, parece que la mayor parte (75 %) del ácido **ruménico** presente en la leche proviene de la desaturación del ácido **vaccénico** en la glándula mamaria (Chilliard *et*

al., 2001). Por tanto, las consideraciones anteriores evidencian que la alimentación de las vacas es el medio más natural para el enriquecimiento de la leche en AGI. La clave está en saber escoger los componentes de la dieta más apropiados.

Se han publicado distintos estudios en los que se observa un incremento del contenido de C18:0 y la concentración total de isómeros trans cuando se incluye en la dieta un suplemento de semillas de lino extrusionado (Kliem *et al.*, 2009; Hurtaud *et al.*, 2010). La inclusión de semillas de lino disminuye el contenido en AGS y aumenta los AGPI ω 3 (Livingstone *et al.*, 2015).

Otros trabajos han demostrado que los contenidos en ácidos ruménico y vaccénico de la leche de vacas en pastoreo, eran superiores a los de las vacas estabuladas consumiendo forrajes conservados (de Wit *et al.*, 2006; Morales-Almaraz *et al.*, 2008 Mohamed *et al.*, 2009). También, se han observado variaciones en el contenido en CLA y ω 3 producidas, por ejemplo, por la influencia estacional en la composición del forraje o la diferencia genética entre animales (De Wit y de Vries, 2008).

Estas investigaciones abren una nueva estrategia a la modificación de AG de la leche. Más aún, se está evaluando una modificación del contenido de AG de orden genético, vía animales transgénicos (siendo esta una vía futurista y especulativa hoy en día) o vía selección asistida, en la que una vez localizada la base genética de un determinado rasgo, se emplean como progenitores reproductores a los portadores de los genes en cuestión, que traspasarán a la descendencia. Por todo ello, se hace necesario disponer de herramientas analíticas capaces de controlar eficazmente la caracterización de los alimentos en su aspecto cuantitativo, como la composición en AG de la leche, que tras las etapas de investigación previa, desarrollo y optimización, garantizan, entre otras, la veracidad de la composición en los productos alimenticios enriquecidos que han sido lanzados al mercado y que representan un plus para el consumidor.

III.1.3. ANÁLISIS DE AG EN LECHE: PROBLEMÁTICA.

Podría decirse que el análisis de AG en leche ha sido y es un reto analítico por la complejidad que presenta. Schröder y Vetter (2013) identificaron aproximadamente 430 AG en mantequilla, algunos de los cuales estaban presentes en muy pequeña cantidad (<0.01% del total de AG). Estos AG difieren en estructura (número de átomos de carbono de la cadena, ramificación, dobles enlaces,...) y también en composición (mayoritarios o minoritarios). Debido a su complejidad es uno de los más importantes campos analíticos para los científicos que trabajan en el estudio fisiológico de la producción de grasa láctea y su modificación (de la Fuente *et al.*, 2015).

El análisis clásico de AG en leche, consta de tres puntos fundamentales, cada uno de ellos con sus problemática y connotaciones.

- Extracción de la fracción lipídica
- Obtención de los ésteres metílicos (FAME, de sus siglas en inglés Fatty Acids Methyl Esters)
- Análisis de los FAME

Existen distintas estrategias analíticas para llevar a cabo la **extracción lipídica**, descritas en la bibliografía (Shingfield *et al.*, 2008 *et al.*, 2006). Tradicionalmente estas extracciones se realizan mediante mezclas de disolventes orgánicos, como cloroformo:metanol 2:1 siguiendo la metodología de Folch *et al* (1957) o mediante diclorometano:metanol 2:1 descrita por Chen *et al.* (1981). La Norma ISO (International Standarization Organization) 14156:2001 describe la metodología de extracción de la grasa láctea, tal como ya se expresó con anterioridad.

Todas estas extracciones implican procesos largos y tediosos, además de trabajar con disolventes organoclorados y una abundante generación de residuos.

A este amplio abanico de técnicas de extracción se fueron incorporando los avances técnicos que van surgiendo en el campo científico, como la extracción mediante fluidos supercríticos en sólidos lácteos (Spence *et al.*, 2009).

La segunda etapa de pretratamiento de la muestra en la cuantificación de AG es la **obtención** de los **ésteres metílicos** de la fracción lipídica y entraña también su problemática. Como se ha detallado anteriormente, la elección de una catálisis ácida o básica o una combinación de las mismas, implica pros y contras en ambos casos y es importante tener en cuenta que no existe ningún método simple o combinación de métodos que permita preparar todos los ésteres metílicos de las diferentes clases de lípidos presentes y que al mismo tiempo no afecte a los dienos conjugados (AGPI) (Kramer *et al.*, 1997). La catálisis ácida (trifluoruro de boro, ácido sulfúrico o clorhídrico) permite la metilación de ácidos grasos libres, fosfolípidos y triacilgliceroles, sin embargo, la necesidad de elevar la temperatura durante un periodo de tiempo prolongado (incluso 60min) genera abundantes isomerizaciones de dobles enlaces cis a trans (Park *et al.*, 2001) y la formación de artefactos metoxi (Molto-Puigmarti *et al*, 2007). Por el contrario, la catálisis básica se usa principalmente para la metilación de los triacilgliceroles. El tándem metilato de sodio/metanol tiene la ventaja de no producir isomerizaciones ni artefactos metoxi, pero estas condiciones son tan suaves que no permiten la formación de los ésteres metílicos de todo tipo de lípidos presentes en matrices reales (Kramer *et al.*, 1997). Otras estrategias analíticas utilizan

combinaciones de metodologías, empleando una catálisis básica inicial seguida de una catálisis ácida (Molto-Puigmarti *et al.*, 2007).

El método de análisis más común para el **análisis de los esteres metílicos** (FAME) es la CG. A pesar que las columnas de fase polar (cianoalquilpolisiloxano, como CPSIL-88) de 100m son las más empleadas para este análisis (Contarini *et al.*, 2013; De la Fuente y Juárez, 2009), presentan limitaciones, principalmente en la resolución de la zona de AGMI y la región de los CLA (de la Fuente *et al.*, 2015). Por nombrar algunos, trans6-trans7-trans8 - C18:1, cis6-cis7-cis8 - C18:1, o trans7-cis9 y cis9-trans11 - C18:2, así como algunas coeluciones de isómeros posicionales y geométricos de los C18:2, C18:3 y C20:1.

Para afrontar estas limitaciones existen distintas alternativas. Se han propuesto combinaciones consecutivas de dos programas de análisis diferentes de la misma muestra (distinto programa de temperatura) mediante CG (Kramer *et al.*, 2008). Ello permite la identificación de la mayoría de los FAME, bien en una elución o en otra, ya que la temperatura altera la polaridad de la fase cianopropilsiloxano lo que se traduce en un cambio de la elución de los compuestos.

Otra alternativa es la combinación de dos tipos diferentes de columnas. Por ejemplo una columna de 30m tipo "Carbowax" (polietilenglicol enlazadas, como Omegawax 250 y 320), que combinan las ventajas de una relativa alta resolución con una mayor estabilidad térmica, con una columna de 100m de tipo cianopropilsiloxano. La primera proporciona la separación de los FAME basándose en la longitud de la cadena y el número de los dobles enlaces y la segunda proporciona una composición más detallada de los isómeros C18:1 y C18:2 (Alves y Bessa, 2009).

Un extracción en fase sólida (Ag⁺-SPE) previa (Kramer *et al.*, 2008) o un fraccionamiento mediante cromatografía en capa fina (Ag⁺-TLC) (Precht & Molquentin, 2000, 2003; Cruz-Hernandez *et al.*, 2004) previo al análisis mediante CG son otras de las alternativas. Sin embargo, son procedimientos largos, que permiten, en el caso de Ag⁺-TLC, separar los isómeros cis y trans de AGMI y no los isómeros trans de los AGPI.

Más recientes, son los desarrollos de nuevas fases estacionarias conteniendo líquidos iónicos que se han comercializado, proporcionando distintas polaridades. Dentro de esta gama, la SLB-IL111 se ha empleado con éxito en la separación de FAME, isómeros geométricos y posicionales C18:1, C18:2 y 18:3 (Delmonte *et al.*, 2011). Se conocen pocos detalles de la estructura química de esta fase (Supelco Ionic Liquid GC Columns), Introduction to the Technology, 2010. Sigmaaldrich com/il-gc (accessed 09.08.10.) y cómo interacciona con los dobles enlace presentes en los FAME para proporcionar diferentes/mejores selectividades o si los efectos estéricos afectan las

propiedades de elución. Las fases iónicas ofrecen una naturaleza dual en la selectividad de la retención, que les permite separar compuestos polares y no polares. Comparada con la cianopropilsiloxano de igual longitud, estas fases estacionarias tienen mayor polaridad. Incluso estudios realizados con esta columna de longitud 200m, la consideran como la mejor opción (Delmonte *et al.*, 2012), ya que en un solo análisis muy pocos FAME permanecen sin resolver, eliminando la necesidad de fraccionamientos o separaciones previas. En otros casos, se propone la combinación de estas dos fases, CPSIL-88 (cianopropilsiloxano) y SBL IL para llevar a cabo un análisis más completo de la composición de la muestra, manteniendo la primera como principal referencia y completando los resultados con la información proporcionada por la segunda (de la Fuente *et al.*, 2015).

Es importante tener en cuenta en el análisis de los FAME, los posibles AG de interés presentes en la muestra a analizar. Más aún, cuando en este tipo de investigaciones es necesario analizar un gran número de muestras y el barrido completo y exhaustivo de todos los AG exige, por un lado, inyectar fracciones más concentradas y más diluidas que permitan la cuantificación de los AG minoritarios y mayoritarios, respectivamente. Y por otro lado, aplicar programas de temperatura lentos que consecuentemente van asociados a largos tiempos de retención (t_r). Por todo ello, es imprescindible la interrelación entre el experto / investigador en nutrición animal y el investigador que desarrolla la metodología eficaz, capaz de dar solución a la problemática empleada.

Considerando estos puntos clave, han de tenerse en cuenta los siguientes criterios en la selección del método analítico (Compañó Beltrán y Ríos Castro, 2002):

- Tipo de información requerida: cualitativa o cuantitativa
- Niveles de concentración de los analitos
- Exactitud y precisión requeridas
- Disponibilidad de la instrumentación
- Coste económico
- Seguridad de las personas y conveniencia medioambiental

Es importante tener en cuenta dichos criterios a la hora de establecer un método analítico que, sea exacto y preciso en la información requerida, pero que al mismo tiempo sea viable, por ejemplo cuando el laboratorio requiere el procesado de un número elevado de muestras, en cortos periodos de tiempo.

III.1.4. DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN-METILACIÓN PARA ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE MEDIANTE GC-MS.

III.1.4.1. Objetivo

El objetivo principal del presente capítulo es el desarrollo y la posterior implementación de una metodología analítica GC-MS para el análisis del contenido en AG de la leche que sea viable para el análisis diario de un número elevado de muestras.

Para llevar a cabo dicho objetivo se estudiaron los siguientes puntos:

- Optimización de las condiciones cromatográficas de análisis.
- Extracción de la fracción lipídica de las muestras de leche mediante distintas metodologías, comparando manipulación, tiempo, reactivos y eficacia.
- Extracción y metilación de los ácidos grasos mediante catálisis básica y efecto de la temperatura.
- Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico.

III.1.4.2. Muestras

La leche utilizada para el trabajo procede del rebaño experimental de vacas Frisonas de la unidad de Leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA (Villaviciosa). Toda la actividad experimental se enmarca en el desarrollo de la investigación contemplada en el marco de los proyectos de I+D de los Planes Nacionales y Regionales respectivamente, PCTIPC06-006 e INIA-RTA2007-00058 C02-01.

En caso de que las muestras no pudieran ser procesadas en el día, se llevó a cabo una centrifugación (17800xg, 4°C durante 30min) y primera separación de capa de nata que se conservó a -40°C en tubos Eppendorf.

III.1.4.3. Instrumentación y reactivos

GC-MS: VARIAN 4000GC-MS. 3800 GC Control y 240 MS/4000 Mass Spec Control. Varian Inc. MS Workstation System Control Version 6.9.2. (figura 3.1.4.3.1) Detector Ion Trap con fuente de ionización Impacto electrónico (EI) y rango de masas m/z 50-500 trabajando en modo Scan. El cromatógrafo está dotado de un módulo de inyección CombiPAL Autosampler, con jeringa de inyección de 10µL. que realiza dos lavados pre y post inyección, empleando hexano como disolvente de lavado.

Columna CP SIL 88 (VARIAN): Fase estacionaria cianopropil de alta polaridad, altamente sustituida y no enlazada químicamente para separación de esteres metílicos de AG o FAME en el rango C6-C26 y separación de isómeros FAME cis / trans. 30 y 100 m, 0,25 mmd.i., y 0,2µm de espesor. Con temperatura máxima de 225°C en régimen isocrático y de 240°C en régimen programado.



Figura 3.1.4.3.1. Equipo VARIAN 4000GC-MS y CombiPAL Autosampler Control

Para las operaciones de almacenamiento de muestras, separación de fase lipídica, agitación de muestras, proceso de metilación a 80°C y evaporación de disolvente, se han empleado los equipos auxiliares que a continuación se enumeran: congelador (-40°C), centrifuga y ultracentrifuga Eppendorf, balanza analítica, agitador de tubos Minishaker, estufa y rotavapor con baño digital.

Centrifuga: Biofuge Stratos. Heraeus Instrument (Heraeus, Hanau, Alemania)

Estufa: Heraeus Function line (Heraeus, Hanau, Alemania)

Ultracentrifuga: Eppendorf Centrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Rotavapor: Heidolph Laborota 4011 Digital (Schwabach, Alemania).

Agitador: Minishaker MS 3 basic (IKA, IKA Works GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania).

Balanza Analítica: XS105DU (Mettler Toledo, Ohio, USA)

Para el proceso de metilación y extracción de esteres metílicos se han utilizado además tubos de pyrex de 20mL con tapón de teflón con septum de goma, jeringas de 2,5mL, filtros de PTFE 0,25µm y 25mm de diámetro y micropipetas de 200µL, 1000µL y 5000µL.

Los reactivos empleados y su calidad, se relacionan a continuación:

- Hexano J.T. Baker 95% pureza para análisis HPLC 2,5L. Ref. 9304
- 2-Propanol (IPA) para HPLC LiChrosolv (Merck) 2,5L. Ref. 1.01040.2500
- Sulfato de Sodio anhidro para análisis. 1 kg. Merck. Ref.: 1.06649.1000

-
- Metilato de Sodio (solución al 30% en Metanol) para síntesis. Merck. Ref. 8.18194.1000
 - Acetato de Metilo para síntesis. Merck. Ref.8.09711.1000
 - Reactivo de terminación: Ácido Oxálico dihidrato para análisis. Merck. Ref. 1.00495.0100. Eter dietílico para análisis. Merck. Ref. 1.00921.1000. Proporción: 1g de ácido oxálico en 30mL de dietil éter
 - Compounds FAME mix 10mg/mL en diclorometano (pureza en el intervalo 99,0-99,9%). SUPELCO. Ref.: 47885-U. Contiene 36 FAMEs.
 - *Trans* -11, C18:1 ester metílico (99,9% pureza) 10000 ppm en n- Heptano. SUPELCO. Ref.: 46905-U. Ester metílico del ácido *trans*-vaccénico.
 - Methyl 9(Z),11(E) - octadecadienoate 98% pureza 25mg. MATREYA LLC. Ref.: MT-001255. Ester metílico del ácido ruménico.

III.1.4.4. Resultados y discusión

Para la optimización de las condiciones cromatográficas, se utilizó la mezcla comercial de 36 ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME), así como una mezcla realizada en el laboratorio a partir de los ésteres metílicos comerciales del ácido ruménico y vaccénico. Se seleccionan estas mezclas patrón de AG porque permiten resolver aquellos AG de interés en los proyectos PCTIPC06-006 e INIA-RTA2007-00058 C02-01. Entre ellos, los C18:1 (t9C18:1, elaidico; c9C18:1, oleico; t11C18:1, *trans*-vaccénico), C18:2 (c9c12C18:2, linoleico; c9t11C18:2, ruménico) y C18:3 (c9c12c15C18:3, linolénico).

Tras revisar bibliográficamente distintas posibilidades se seleccionó la columna capilar CP-SIL 88 para la separación de los AG de la leche. Diferentes trabajos de investigación avalan el empleo de esta columna (Alves y Bessa, 2009; de la Fuente *et al.*, 2015) y han puesto de manifiesto que constituyen las fases más adecuadas para la resolución de los distintos ésteres metílicos de ácidos grasos y su gran diversidad de isómeros.

III.1.4.4.1. Selección de la fase estacionaria y condiciones cromatográficas

Primeramente, se evaluó la capacidad de llevar a cabo la separación de los 38 AG presentes en las mezclas de patrones, ensayando diferentes gradientes de temperatura con la columna CP SIL 88 de 30m. Se seleccionó el programa de temperatura que se muestra en la tabla 3.1.4.4.1.1 como el más adecuado para la separación cromatográfica. Utilizando este programa se obtuvo la separación cromatográfica de 33 de los 38 ésteres de AG presentes en la mezcla FAME y la mezcla de patrones preparada con ésteres metílicos de ácido ruménico y vaccénico (figura 3.1.4.4.1.1).

Tabla 3.1.4.4.1.1. Programa de temperatura óptimo para columna CPSIL88 30m

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Isocrático (min)	Tiempo (min)
140		2	2
280	5	20	50

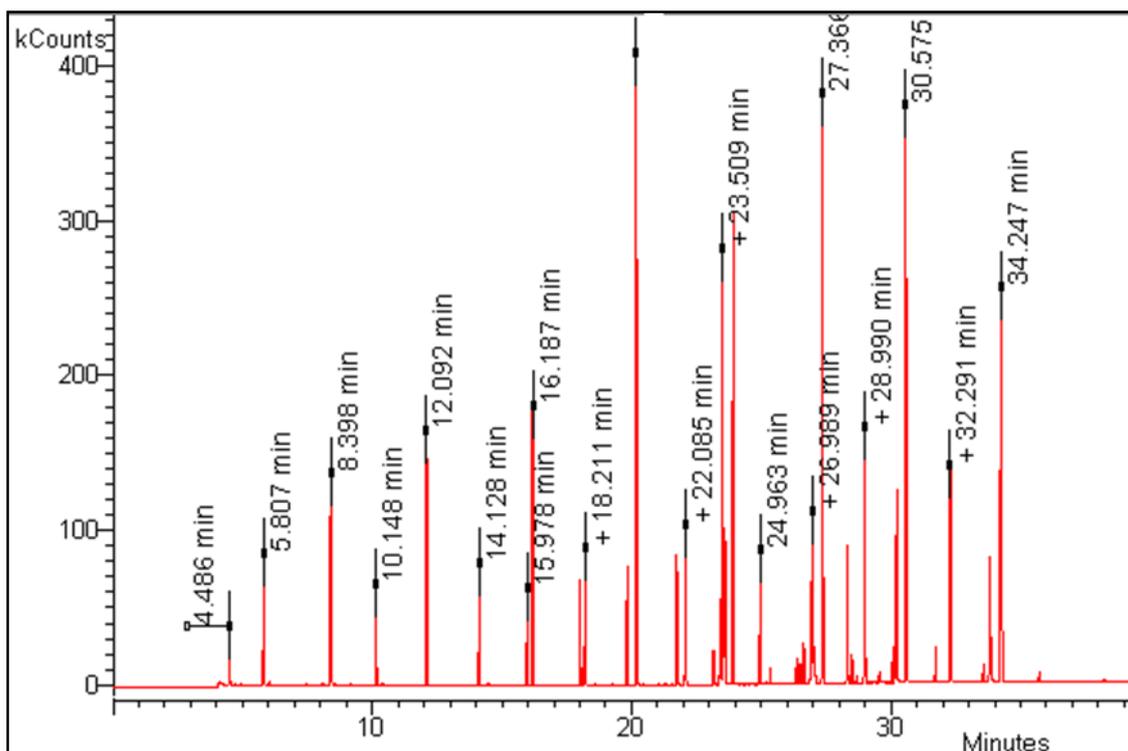


Figura 3.1.4.4.1.1. Cromatograma de la mezcla FAME y ésteres metílicos de ácidos ruménico y vaccénico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.4.4.1.1. y columna CP SIL 88 30m

Con la finalidad de obtener resolución de un mayor número de compuestos de la mezcla patrón, se cambió la columna CP SIL 88 de 30m por otra de 100m y a continuación, se llevó a cabo la optimización del programa térmico para realizar la separación de los ésteres de AG con ésta última. Tras ensayar diferentes programas, la mejor resolución cromatográfica se obtuvo con las condiciones que se detallan en la tabla 3.1.4.4.1.2. Así mismo, en la figura 3.1.4.4.1.2 se muestra el cromatograma obtenido para la separación de 37 de los 38 ésteres metílicos presentes en la mezcla patrón FAME (36) y la mezcla de patrones preparada con ésteres metílicos de ácido ruménico y vaccénico, con una única coelución de los ésteres metílicos de los ácidos lignocérico e eicosapentaenoico.

Tabla 3.1.4.4.1.2. Programa de temperatura óptimo para columna CPSIL88 100m

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Isocrático (min)	Tiempo (min)
40	0	1,2	1,2
140	30	5,0	9,53
190	2	10,0	44,53
225	2	10,0	72,03
240	20	5,0	77,78

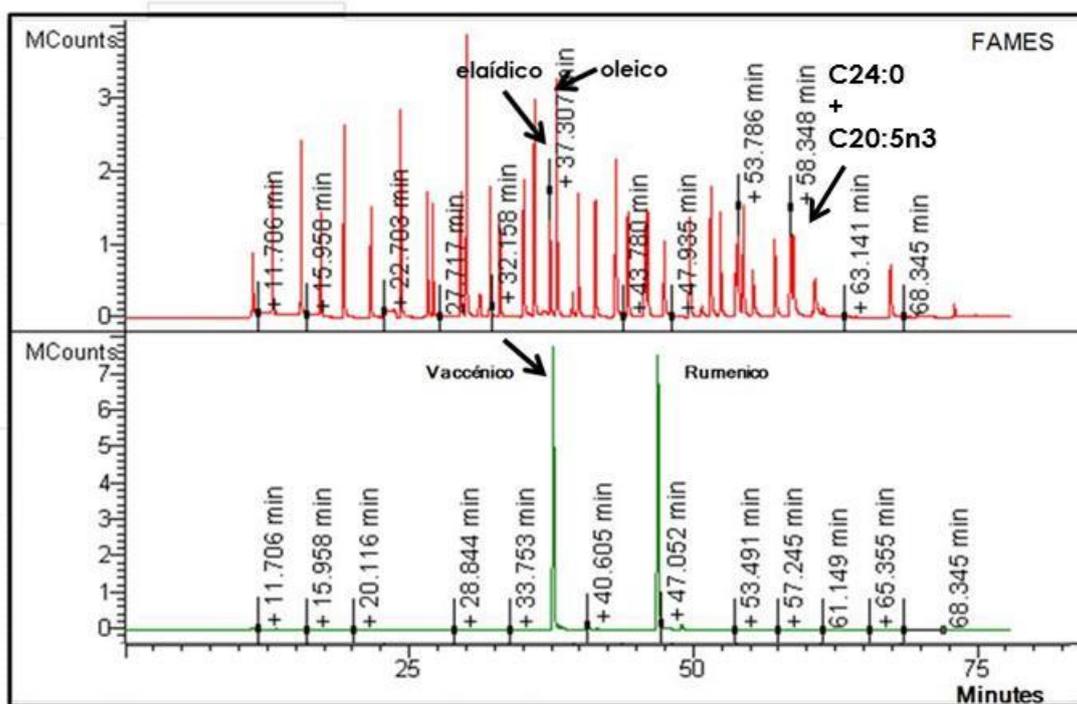


Figura 3.1.4.4.1.2. Cromatograma de la mezcla FAME y ésteres metílicos de ácidos ruménico y vaccénico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.4.4.1.2. Columna CP SIL 88 100m.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, la columna de 100m proporcionó mayor resolución en detrimento del tiempo de análisis (50 min columna 30m vs. 77,78 min columna 100m). A pesar del incremento del tiempo de análisis, se seleccionó la columna de 100m para realizar un estudio más completo de los posibles compuestos presentes en las muestras reales, ya que se obtiene mayor grado de información sobre la composición de isómeros individuales presentes en la mezcla. La metodología cromatográfica desarrollada, ha permitido llevar a cabo la separación de 37 AG en 70 minutos. Así mismo, es importante destacar que se ha conseguido una buena

resolución entre los compuestos ácido eláidico, ácido trans-vaccénico y ácido oleico (figura 3.1.4.4.1.2.).

Para poder comparar estos resultados con los obtenidos por otros investigadores (Alves y Bessa, 2007) que han llevado a cabo la separación de los mismos ésteres metílicos de AG con la columna CP SIL 88 100m (método B), se aplicó el gradiente térmico utilizado por estos autores y descrito en la tabla 3.1.4.4.1.3. La comparación de este gradiente con el optimizado en el presente estudio muestra que la temperatura máxima del programa es de 200°C frente a los 240°C alcanzados en el programa optimizado en este trabajo y que las rampas de temperatura son más suaves que las del método B (por ejemplo 10°C/min en el método B frente a 30°C/min en el programa optimizado). El cromatograma obtenido se muestra en la figura 3.1.4.4.1.3.

Tabla 3.1.4.4.1.3. Programa de temperatura Método B (Alves y Bessa, 2007)

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Isocrático (min)	Tiempo (min)
100	0	15,0	15,0
150	10	5,0	25,0
158	1	30,0	63,0
200	1	65,0	170,0

Como puede observarse, comparando estas condiciones con las optimizadas en el presente trabajo, la diferencia de tiempos de análisis es notable, incluso siendo el tiempo de retención del último compuesto de la elución de 130 min, según el método B, frente a los 70min de la metodología puesta a punto.

Si además seleccionamos la zona de elución del éster metílico del ácido trans-vaccénico en ambos programas (figura 3.1.4.4.1.4), se puede observar que el éster del ácido transvaccénico coeluye en el método B con el ácido eláidico, mientras que se resuelve sin problemas eluyendo entre los ácidos eláidico y oleico con el método seleccionado en este trabajo (programa térmico descrito en la tabla 3.1.4.4.1.2 y cromatograma obtenido en la figura 3.1.4.4.1.2), hecho que evidencia la mejor resolución del método que se propone con un ahorro de más de 90 min en el tiempo empleado.

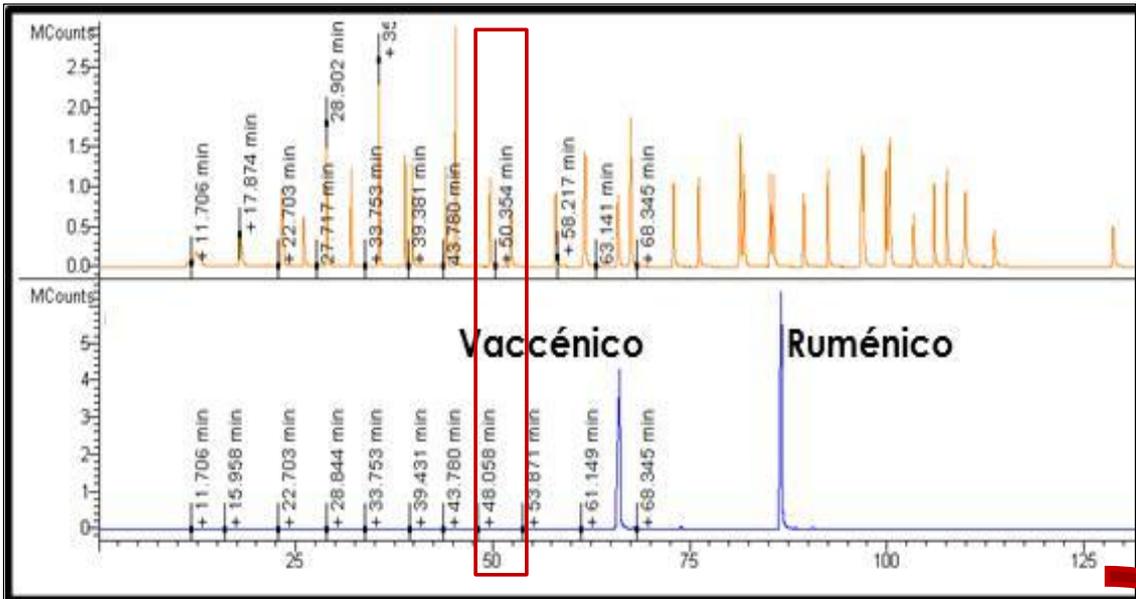


Figura 3.1.4.4.1.3. Cromatograma mezcla FAME y mezcla de ésteres metílicos del ácido trans-vaccénico y ruménico correspondiente al programa de temperatura de la tabla 3.1.4.4.1.3. Columna CP SIL-88 100m.

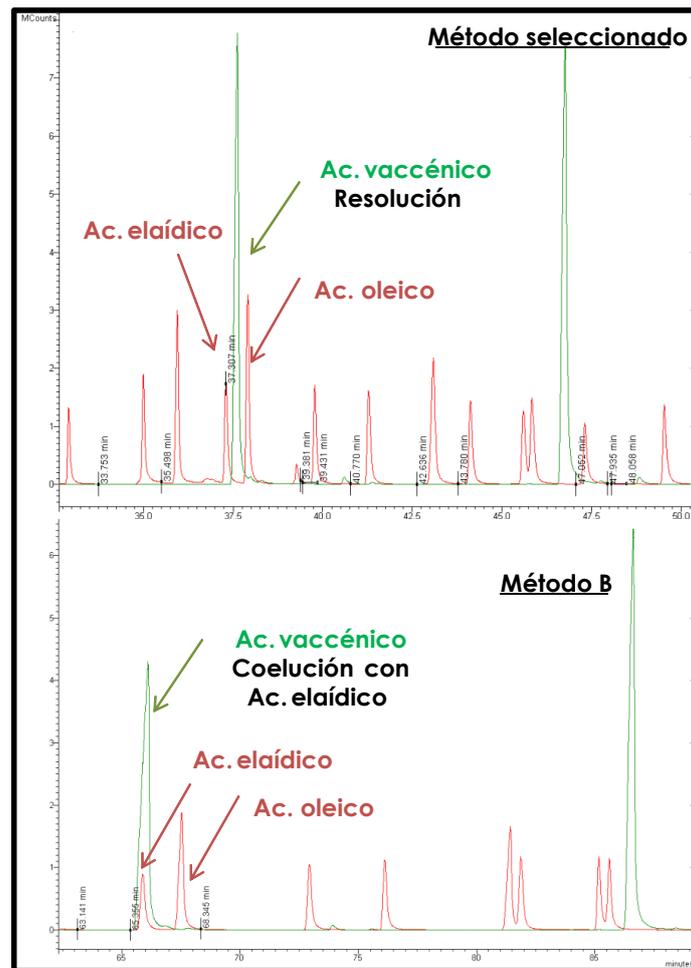


Figura 3.1.4.4.1.4. Comparación de la elución del ácido trans-vaccénico en las condiciones seleccionadas (tabla 3.1.4.4.1.2) y según método B (tabla 3.1.4.4.1.3).

A modo de resumen, en la tabla 3.1.4.4.1.4 quedan recogidas las condiciones cromatográficas seleccionadas para la determinación de ácidos grasos en leche mediante GC-MS, según los resultados de optimización obtenidos.

Tabla 3.1.4.4.1.4. Condiciones cromatográficas seleccionadas

Elemento	Detalles			
Columna capilar	CP SIL 88 100m, 0,25 mm d.i. x 0,20mm film			
Gas portador	Helio flujo 1mL/min			
Volumen inyectado	1 µL ; Split 1:100			
Temperatura Inyector	225 °C			
Temperatura horno	Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Isocrático (min)	Tiempo (min)
	40	0	1,2	1,2
	140	30	5,0	9,53
	190	2	10,0	44,53
	225	2	10,0	72,03
240	20	5,0	77,78	
Detector Masas Ion Trap	Temperatura trampa 230°C			
	Temperatura línea de transferencia: 230°C			
	Temperatura manifold 60 °C			

A continuación, en la tabla 3.1.4.4.1.5. se relacionan de menor a mayor número de átomos de C todos los AG e isómeros individuales identificados en el análisis de GC-MS, en su orden de elución con el método propuesto.

Tabla 3.1.4.4.1.5. Esteres metílicos de AG identificados en su orden de elución

Compuesto

Ester Metílico Ácido Caproico (C6:0)
 Ester Metílico Ácido Caprílico (C8:0)
 Ester Metílico Ácido Cáprico (C10:0)
 Ester Metílico Ácido Undecanoico (C11:0)
 Ester Metílico Ácido Laúrico (C12:0)
 Ester Metílico Ácido Tridecanoico (C13:0)
 Ester Metílico Ácido Mirístico (C14:0)
 Ester Metílico Ácido Miristoleico (C14:1)
 Ester Metílico Ácido Pentadecanoico (C15:0)
 Ester Metílico Ácido cis-10-Pentadecenoico (C15:1)
 Ester Metílico Ácido Palmítico (C16:0)
 Ester Metílico Ácido Palmitoleico (C16:1)
 Ester Metílico Ácido Heptadecanoico (C17:0)
 Ester Metílico Ácido cis-10 Heptadecenoico (C17:1)
 Ester Metílico Ácido Esteárico (C18:0)
 Ester Metílico Ácido Elaídico (C18:1n9t)
 Ester Metílico Ácido Oleico (C18:1n9c)
 Ester Metílico Ácido 4-Linolelaídico (C18:2n6t)
 Ester Metílico Ácido Linoleico (C18:2n3)
 Ester Metílico Ácido Araquídico (C20:0)
 Ester Metílico Ácido Gamma-Linolénico (C18:3n6)
 Ester Metílico Ácido cis-11-Eicosenoico (C20:1)
 Ester Metílico Ácido Linolénico (C18:3n3)
 Ester Metílico Ácido Heneicosanoico (C21:0)
 Ester Metílico Ácido trans-Vaccénico (C18:1t11)
 Ester Metílico Ácido Ruménico (C18:2c9t11)
 Ester Metílico Ácido cis-11,14-Eicosadienoico (C20:2)
 Ester Metílico Ácido Behénico (C22:0)
 Ester Metílico Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienoico (C20:3n6)
 Ester Metílico Ácido Erúcico (C22:1n9)
 Ester Metílico Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienoico (C20:3n3)
 Ester Metílico Ácido Arachidónico (C20:4n6)
 Ester Metílico Ácido Tricosanoico (C23:0)
 Ester Metílico Ácido cis-13,16-Docosadienoico (C22:2)
 Ester Metílico Ácido Lignocérico (C24:0)
 Ester Metílico Ácido cis-5, 8, 11,14, 17-Eicosapentaenoico (C20:5n3)
 Ester Metílico Ácido Nervónico (C24:1)
 Ester Metílico Ácido cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico (C22:6n3)

Co-elución

III.1.4.4.2. Obtención de ésteres metílicos.

La obtención de los ésteres metílicos a partir de la leche de vaca, como ya se ha citado anteriormente, exige primeramente una extracción lipídica para posteriormente llevar a cabo una metilación de los mismos. A continuación se detallan pormenorizadamente cada una de estas etapas.

III.1.4.4.2.1. Extracción lipídica

Para llevar a cabo esta etapa existen diferentes alternativas recogidas en diversas normas oficiales y publicaciones, tal y como se detalla en la tabla 3.1.4.4.2.1.1.

Tabla 3.1.4.4.2.1.1. Metodologías de extracción lipídica y su viabilidad según diferentes autores.

Metodología	Etapas	Evaluación	
Norma ISO: 14156	Extracción EtOH/NH ₃	Inviabile para un número elevado de muestras	✘
	Extracción fase orgánica eter dietílico+pentano		
	Eliminación agua Na ₂ SO ₄ + evaporación		
Folch <i>et al.</i> , 1957	Extracción cloroformo:MeOH 2:1	Inviabiles para un número elevado de muestras	✘
Chen <i>et al.</i> , 1981	Extracción diclorometano:MeOH 2:1	Toxicidad de disolventes	✘
Hara y Radin 1978	Centrifugación inicial	Estudio de viabilidad para número elevado de muestras	✓
Chouinard <i>et al.</i> , 1999	Extracción Hexano:isopropanol 3:2		
Feng <i>et al.</i> , 2004	Centrifugación + Ultracentrifugación		

En el presente trabajo se han comparado dos tipos de extracción por considerarse las menos tediosas y las que no implican el uso de disolventes clorados altamente contaminantes.

- Extracción mediante centrifugación y ultracentrifugación.
- Extracción mediante centrifugación y posterior empleo de la mezcla de disolventes hexano/isopropanol 3/2.

a) Extracción mediante centrifugación y ultracentrifugación (Feng *et al.*, 2004).

Es necesario llevar a cabo una primera centrifugación de leche a 17800xg durante 30 minutos a 4°C, para obtener la capa sólida de nata. A continuación, 1g de esta capa superior, se somete a ultracentrifugación a 19300xg durante 20 minutos a temperatura

ambiente. Este proceso da lugar a la formación de tres fases: la capa superior de lípidos, la capa intermedia de proteína, grasa y otros sólidos insolubles y la capa inferior de agua. El proceso de metilación se llevará a cabo a partir de una alícuota (40 ± 5 mg) tomada la capa superior de lípidos.

b) Extracción mediante centrifugación inicial y posterior empleo de la mezcla de disolventes hexano/isopropanol 3/2 (Hara y Radin, 1978; Chouinard et al. 1999b).

Para la extracción de la fracción lipídica que contiene los AG de la leche, es necesaria una primera etapa de centrifugación de leche a $17800 \times g$ durante 30 minutos a 8°C , que permite la separación de la fracción sólida de la capa superior (nata). A continuación, se pesan 6 ± 1 g de dicha nata, se realiza la extracción lipídica utilizando una disolución de la mezcla hexano/isopropanol 3/2 (v/v) en la proporción 18mL de disolución / g grasa. Se realizaron cuatro extracciones sucesivas con la mezcla hexano/isopropanol.

Para eliminar posibles componentes no lipídicos en el extracto orgánico así obtenido, se llevó a cabo una extracción con una disolución de sulfato de sodio preparada con 1g de sal / 15mL de agua.

Una vez separada la fase orgánica, esta se llevó a sequedad con la ayuda del rotavapor y se redisolvió en 200mL de hexano. Esta disolución contiene los AGs de la leche y en una fracción de la misma se procederá a realizar la metilación.

III.1.4.4.2.2. Metilación

Teniendo en cuenta la composición lipídica de la leche: 98% de triacilglicéridos, 1% de fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina, aproximadamente la misma proporción), 0,3% de colesterol, 0,3% de diacilgliceroles y trazas de colesteril ásteres y AG libres (Kramer et al., 1997), y las alternativas existentes para la obtención de los ésteres metílicos (catálisis ácida y básica), ya descritas anteriormente en el apartado III.1.3, se seleccionó la catálisis básica como procedimiento de metilación eficaz para la formación de los ésteres metílicos a partir de los triacilglicéridos. Esta metilación básica (Christie et al., 1982) es menos agresiva que la ácida y minimiza las isomerizaciones y la formación de artefactos metoxi (característicos de la metilación ácida). En función de la metodología empleada en la extracción lipídica (a ó b) se actuará de una manera u otra según se describe en la figura 3.1.4.4.2.2.1.

Se evaluó el efecto que la temperatura ejerce sobre la reacción de metilación, ensayando dos temperaturas diferentes:

- Reacción de metilación a temperatura ambiente (10 minutos)

- Reacción de metilación a 80°C (10 minutos).

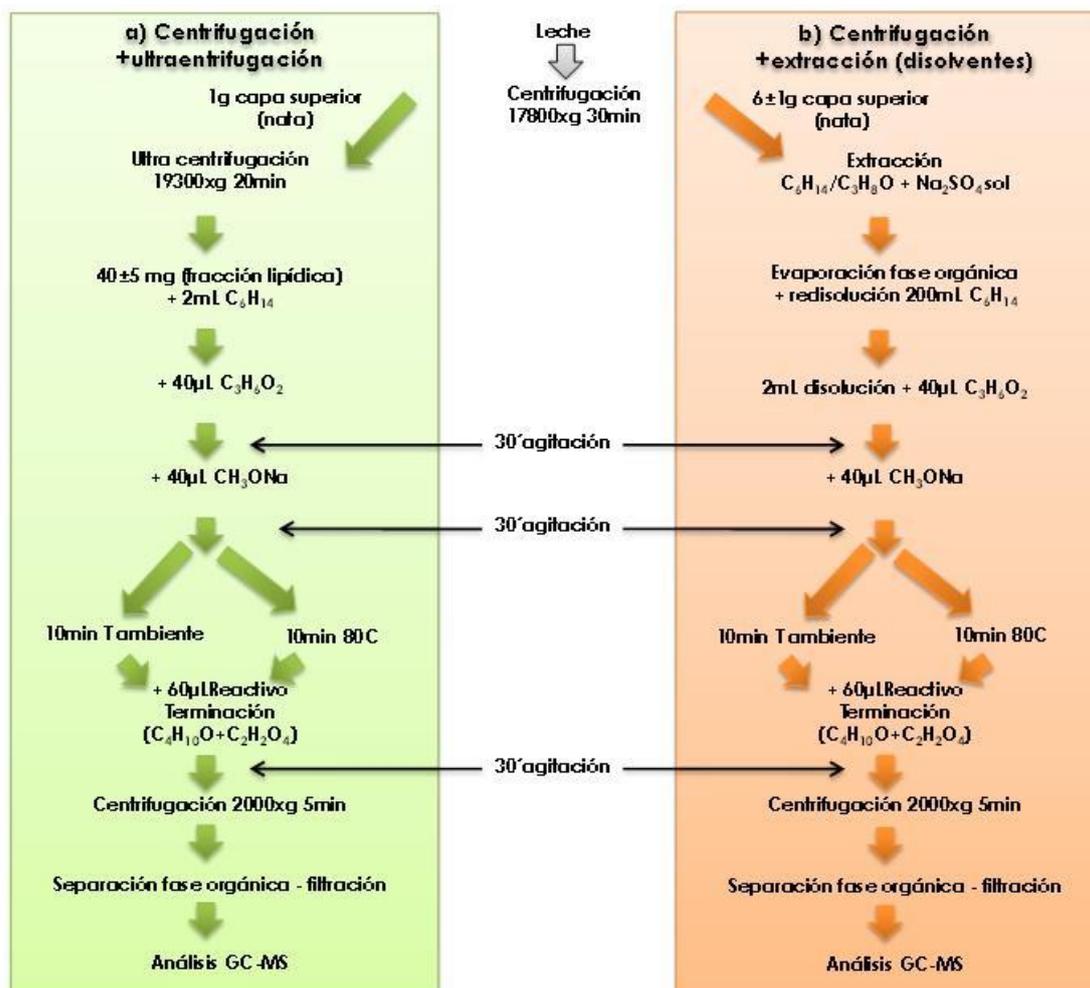


Figura 3.1.4.4.2.2.1. Esquema general del proceso de preparación de ésteres metílicos, según el proceso de extracción.

Como se muestra en la figura 3.1.4.4.2.2.1, a las dos alícuotas anteriores obtenidas bien por centrifugación y ultracentrifugación (a) o por centrifugación y extracción (b), se les adicionó 40 µL de acetato de metilo y se agitaron 30 segundos. Seguidamente se adicionaron 40 µL de metilato de sodio y se agitaron durante 30 segundos para dejar reposar durante 10 minutos. Se observó en este punto la turbidez que adquiere la disolución debido a la precipitación de los derivados sodio-glicerol. El acetato de metilo se adiciona para minimizar la competencia de las reacciones de hidrólisis irreversibles. En ambos casos, la reacción se finalizó por adición de 60 µL del reactivo de terminación, consistente en ácido oxálico y dietil éter, seguida de una agitación durante 30 segundos.

Posteriormente, se realizó una centrifugación durante 5 min a 2000xg y 5°C y se separó la capa orgánica superior, a continuación se filtró a través de filtros de jeringa de PTFE

0,25 µm y 25mm de diámetro. Finalmente se realizaron las diluciones necesarias para el análisis de los FAME mediante GC empleando (figura 3.1.4.4.2.2.1): 30 µL del extracto de ésteres metílicos en 4mL de disolución en el caso de haber partido de nata (a) y con 50 µL de extracto de ésteres metílicos en 4mL de disolución si se había partido de la disolución del residuo obtenido con hexano / isopropanol (b).

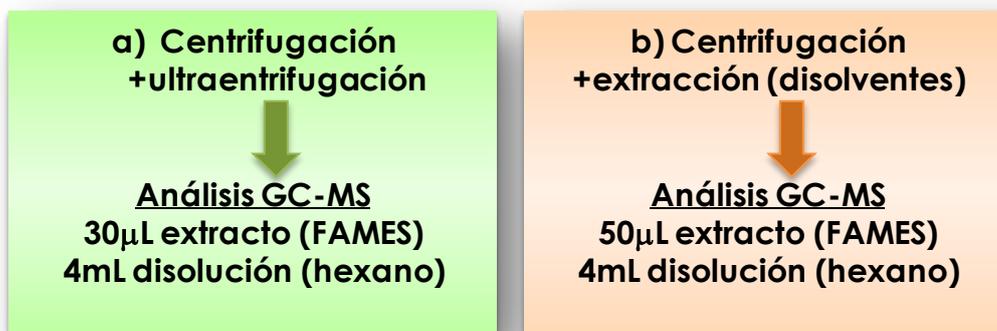


Figura 3.1.4.4.2.2. Diluciones empleadas para el análisis mediante GC-MS de los extractos de ésteres metílicos obtenidos mediante distintos tipos de extracción

Estas diluciones se establecieron como solución de compromiso para obtener un buen resultado cromatográfico, sin picos distorsionados por saturación y con la detección del mayor número de compuestos presentes inyectando una sola muestra por duplicado. Es necesario señalar que en la leche existe una gran variabilidad, tanto en el número como en la concentración no solo de compuestos, sino también de la proporción en la que se encuentran los AG. Para realizar un análisis exhaustivo de la composición en ácidos grasos de la leche, serían necesarias varias diluciones capaces de cubrir todo el intervalo de concentración y para obtener un buen perfil cromatográfico de componentes tanto mayoritarios como minoritarios.

III.1.4.4.2.3. Efecto de la temperatura

Siguiendo la metodología descrita en el apartado III.1.4.4.2.2, se realizó un estudio para evaluar el efecto del tratamiento de metilación a 80°C frente a la metilación llevada cabo a temperatura ambiente. Con el fin de controlar posibles procesos de **isomerización** de los AG de las muestras de leche de vaca, tras la extracción se compararon los resultados del proceso de metilación a las dos temperaturas seleccionadas: temperatura ambiente y 80°C. La evaluación se llevó a cabo calculando el porcentaje de cada AG sobre la suma de todos los AG identificados y

cuantificados, tomada como base 100%, centrándonos en los que hemos seleccionado para el estudio.

Para realizar el análisis de los resultados obtenidos, se seleccionaron como más significativos, los compuestos mayoritarios presentes en leche, sus correspondientes insaturados, y compuestos minoritarios de interés para el desarrollo de la investigación llevada a cabo en el marco de los proyectos PCTIPC06-006 e INIA-RTA2007-00058 C02-01, cuyo objetivo principal y común ha sido estudiar la modificación en el perfil de ácidos grasos insaturados en leche, en función de la combinación de los sistemas de manejo del vacuno lechero, adicionando al estudio el ácido ruménico por el gran interés que suscita por su implicación en los efectos beneficiosos para la salud humana (tabla 3.1.4.4.2.3.1.).

Para evaluar la precisión del proceso analítico, el ensayo fue realizado por dos operadores (A y B) y cada uno de ellos realizó tres repeticiones e inyectó cada muestra por duplicado, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio.

Tabla 3.1.4.4.2.3.1. AGS y AGI de referencia para la evaluación de la calidad del método analítico

Saturados	Insaturados
Ácido Mirístico C14:0	Ácido Miristoleico C14:1
Ácido Palmítico C16:0	Ácido Palmitoleico C16:1
Ácido Esteárico C18:0	Ácido Oleico C18:1
	Ácido Linoleico C18:2
	Ácido Ruménico C18:2
	Ácido Linolénico C18:3

Para evaluar la **repetibilidad y reproducibilidad** del método, se han seguido los criterios de aceptación y rechazo reflejados en la norma ISO 15885/FIL 184 (Milk fat - Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography), que son los siguientes:

- Repetibilidad del método: 5% del valor medio de cada componente con una diferencia máxima de 1%, excepto para los componentes de concentración menor o

igual a 5% que se admite una diferencia relativa del 12%, con una diferencia máxima absoluta de 0,5%.

- Reproducibilidad del método: 15% del valor medio de cada componente con una diferencia máxima de 4%, excepto para los componentes de concentración menor o igual a 5% que se admite una diferencia relativa del 20%, con una diferencia máxima absoluta de 1%.

A continuación, en la figura 3.1.4.4.2.3.1, se muestran el número total de muestras analizadas y la metodología seguida. Como se puede observar, para cada procedimiento de metilación y temperatura concreta, la muestra es analizada seis veces (y cada una de ellas se analiza por duplicado en el GC-MS), correspondiendo al siguiente diseño: 2 analistas x 3 repeticiones x 2 inyecciones/repetición.

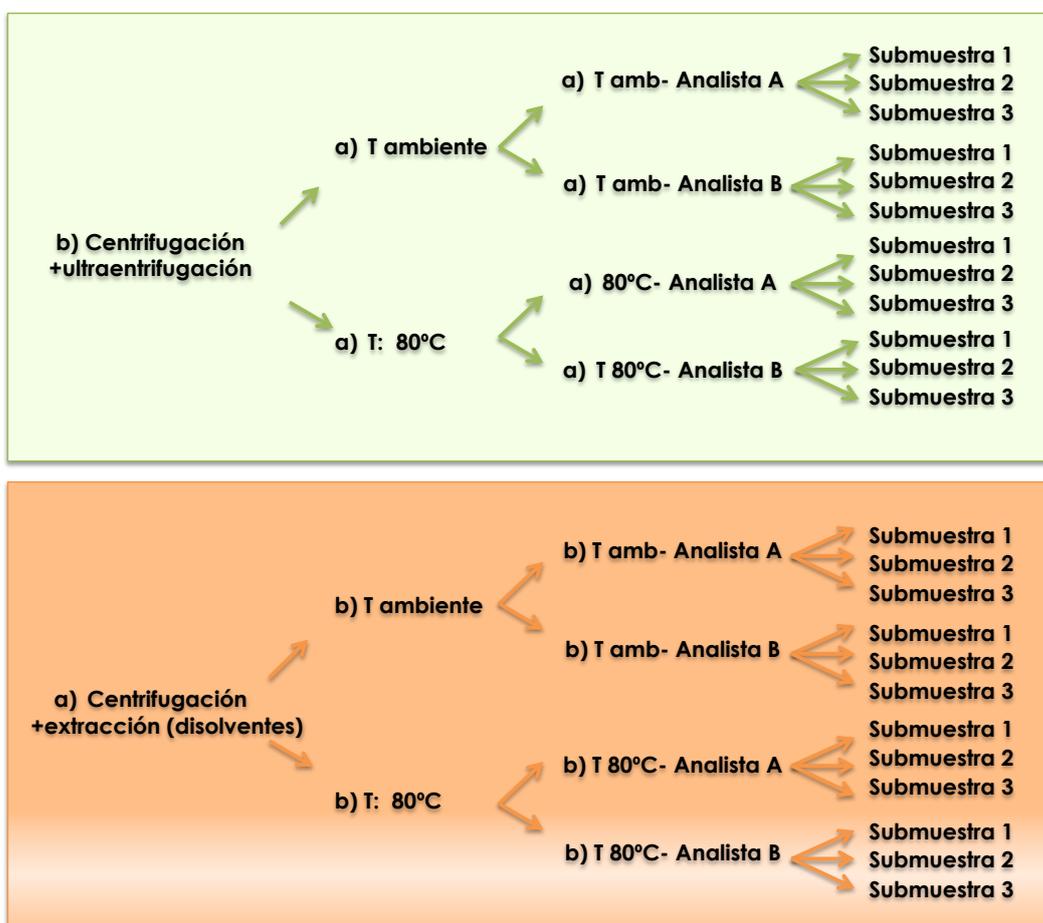


Figura 3.1.4.4.2.3.1. Esquema analítico seguido para la selección de las condiciones experimentales de metilación.

En la figura 3.1.4.4.2.3.2, se recogen los cromatogramas obtenidos mediante las dos extracciones lipídicas evaluadas. Cualitativamente observamos en la figura que, en ambos casos se identifican los mismos compuestos, tanto siguiendo la extracción

según Feng (Método a - Feng, 2004) como siguiendo la extracción según Hara y Radin (Método b - Hara y Radin, 1978), ambas a T ambiente. Sin embargo, es el análisis cuantitativo el que pone de manifiesto la ventaja y/o inconvenientes del empleo de una u otra metodología analítica.

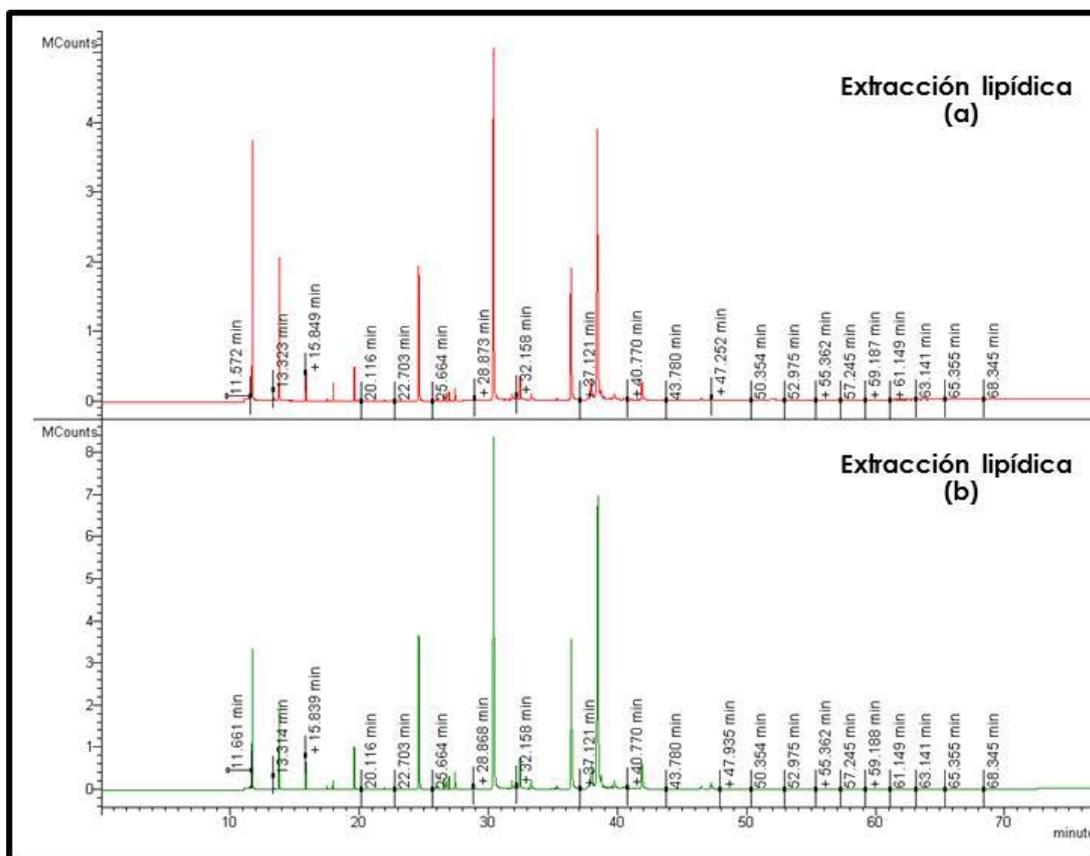


Figura 3.1.4.4.2.3.2. Perfil cromatográfico del análisis de muestras de leche con extracción lipídica mediante centrifugación (Método a - Feng, 2004) y mediante extracción con hexano/isopropanol (Método b - Hara y Radin, 1978) a T ambiente.

En la tabla 3.1.4.4.2.3.2, se detallan los porcentajes de AG sobre el total de AG estudiados expresados como promedios (P) para ambos operadores A y B, y obtenidos a las dos temperaturas evaluadas. Se observa que la extracción llevada a cabo mediante hexano/isopropanol proporciona mayores porcentajes, salvo los ésteres metílicos del ácido palmítico a temperatura ambiente (37,00 vs. 35,41 %) y de los ácidos palmítico y oleico a 80°C. Sin embargo estas diferencias no son muy elevadas, siendo la máxima de 2,17% unidades porcentuales para el ácido palmítico a 80°C (37,78 vs. 35,41 %) y cumpliendo en todos los casos los criterios de reproducibilidad establecidos según la norma de referencia.

Tabla 3.1.4.4.2.3.2. Promedio del porcentaje de AG sobre AG totales en leche en condiciones de reproducibilidad intermedia, según la extracción lipídica: Método a (Feng, 2004) vs. b (Hara y Radin, 1978).

Compuesto	T0 (Tambiente) - Método (a)			T0 (Tambiente) - Método (b)		
	AG (%)	σ	CV	AG (%)	σ	CV
Ac. Mirístico(C14:0)	13,61	0,19	1,39	13,63	0,10	0,72
Ac. Miristoleico (C14:1)	0,91	0,03	3,66	1,06	0,02	1,62
Ac. Palmítico (C16:0)	37,00	0,50	1,36	35,41	0,31	0,88
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,13	0,02	12,23	0,19	0,02	8,07
Ac. Esteárico (C18:0)	14,76	0,36	2,44	14,98	0,22	1,44
Ac. Oleico (C18:1)	30,32	0,39	1,27	30,64	0,19	0,61
Ac. Linoleico(C18:2)	2,24	0,10	4,40	2,62	0,05	1,92
Ac. Linolénico (C18:3)	0,27	0,04	14,72	0,38	0,03	8,08
Ac. Ruménico (C18:2)	0,83	0,14	16,76	1,14	0,05	4,34
Compuesto	T1 (T 80°C) - Método (a)			T1 (T 80°C) - Método (b)		
	AG (%)	σ	CV	AG (%)	σ	CV
Ac. Mirístico(C14:0)	13,41	0,18	1,33	13,87	0,10	0,75
Ac. Miristoleico (C14:1)	0,85	0,05	6,22	1,07	0,02	1,56
Ac. Palmítico (C16:0)	37,78	0,72	1,90	35,48	0,28	0,78
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,07	0,02	20,95	0,11	0,02	21,13
Ac. Esteárico (C18:0)	14,51	0,29	2,00	14,87	0,12	0,82
Ac. Oleico (C18:1)	30,71	0,30	0,98	30,71	0,19	0,63
Ac. Linoleico(C18:2)	1,93	0,15	7,72	2,54	0,05	2,01
Ac. Linolénico (C18:3)	0,18	0,02	13,81	0,34	0,02	5,42
Ac. Ruménico (C18:2)	0,58	0,08	13,22	1,03	0,04	4,01

Método (a): extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropanol; T0: Temperatura ambiente; T1: 80°C.

Estos resultados son concordantes con los resultados existentes en la bibliografía, en los que se buscan metodologías de extracción menos tediosas que disminuyan los tiempos de análisis eliminando las etapas que constituyen auténticos cuellos de botella en el proceso de análisis de un número elevado de muestras (Molto-Puigmarti *et al*, 2007; Luna *et al.*, 2005).

III.1.4.4.2.4. Repetibilidad y reproducibilidad

En la tabla 3.1.4.4.2.4.1 se detallan los valores promedios, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación para los experimentos realizados a temperatura ambiente y a 80°C, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intermedia.

En primer lugar, se observa que los valores de desviaciones estándar para ambos operadores son semejantes tanto a temperatura ambiente como a 80°C. La dispersión entre las determinaciones se evaluó mediante el coeficiente de variación (CV). Las mayores diferencias se encuentran en los CV para AG en concentraciones bajas, independientemente de la metodología de extracción y de la temperatura de metilación.

Tabla 3.1.4.4.2.4.1. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del %AG sobre AG totales, en experimentos con muestras de leche a temperatura ambiente para operadores A y B, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intermedia.

T0 (T ambiente) - Método (a)						
Compuesto	T0- A (%)	σ_{T0_A}	CV_T0_A	T0- B (%)	σ_{T0_B}	CV_T0_B
Ac. Mirístico(C14:0)	13,58	0,18	1,32	13,63	0,21	1,54
Ac. Miristoleico (C14:1)	0,93	0,03	3,39	0,89	0,03	3,22
Ac. Palmítico (C16:0)	36,69	0,49	1,34	37,31	0,29	0,78
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,13	0,02	14,20	0,14	0,01	10,83
Ac. Estéarico (C18:0)	14,96	0,40	2,67	14,56	0,17	1,18
Ac. Oleico (C18:1)	30,24	0,48	1,59	30,40	0,29	0,94
Ac. Linoleico(C18:2)	2,32	0,09	3,75	2,17	0,02	0,72
Ac. Linolénico (C18:3)	0,31	0,02	5,51	0,23	0,01	2,59
Ac. Ruménico (C18:2)	0,98	0,09	9,70	0,73	0,02	2,80
T0 (T ambiente) - Método (b)						
Compuesto	T0- A (%)	σ_{T0_A}	CV_T0_A	T0- B (%)	σ_{T0_B}	CV_T0_B
Ac. Mirístico(C14:0)	13,65	0,09	0,64	13,61	0,12	0,90
Ac. Miristoleico (C14:1)	1,07	0,02	1,49	1,05	0,02	1,9
Ac. Palmítico (C16:0)	35,32	0,19	0,54	35,50	0,43	1,21
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,19	0,01	3,95	0,18	0,02	11,96
Ac. Estéarico (C18:0)	14,96	0,13	0,84	14,99	0,32	2,10
Ac. Oleico (C18:1)	30,66	0,16	0,53	30,63	0,25	0,81
Ac. Linoleico(C18:2)	2,64	0,03	1,17	2,61	0,07	2,58
Ac. Linolénico (C18:3)	0,40	0,04	9,52	0,37	0,02	5,25
Ac. Ruménico (C18:2)	1,17	0,05	4,13	1,12	0,05	4,32
T1 (T 80°C)- Método (a)						
Compuesto	T1- A (%)	σ_{T1_A}	CV_T1_A	T1- B (%)	σ_{T1_B}	CV_T1_B
Ac. Mirístico(C14:0)	13,43	0,25	1,87	13,40	0,08	0,60
Ac. Miristoleico (C14:1)	0,86	0,02	2,01	0,83	0,07	8,62
Ac. Palmítico (C16:0)	37,84	0,73	1,93	37,73	0,77	2,04
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,08	0,02	23,62	0,07	0,01	16,98
Ac. Estéarico (C18:0)	14,42	0,12	0,87	14,60	0,39	2,66
Ac. Oleico (C18:1)	30,72	0,38	1,22	30,70	0,24	0,79
Ac. Linoleico(C18:2)	1,93	0,12	6,07	1,94	0,19	9,70
Ac. Linolénico (C18:3)	0,18	0,02	9,45	0,18	0,03	17,80
Ac. Ruménico (C18:2)	0,58	0,06	9,89	0,59	0,10	16,99
T1 (T 80°C)- Método (b)						
Compuesto	T1- A (%)	σ_{T1_A}	CV_T1_A	T1- B (%)	σ_{T1_B}	CV_T1_B
Ac. Mirístico(C14:0)	13,92	0,12	0,86	13,82	0,07	0,53
Ac. Miristoleico (C14:1)	1,07	0,02	1,48	1,06	0,02	1,52
Ac. Palmítico (C16:0)	35,42	0,34	0,97	35,54	0,25	0,70
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,11	0,02	18,89	0,12	0,03	25,17
Ac. Estéarico (C18:0)	14,86	0,13	0,89	14,88	0,14	0,93
Ac. Oleico (C18:1)	30,76	0,28	0,90	30,66	0,11	0,34
Ac. Linoleico(C18:2)	2,52	0,04	1,47	2,55	0,07	2,61
Ac. Linolénico (C18:3)	0,33	0,03	7,54	0,34	0,01	3,07
Ac. Ruménico (C18:2)	1,01	0,04	4,02	1,04	0,05	4,48

Método (a) extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropano ;T0-A, T0-B, T1-A y T1-B: valores en porcentaje de AG/total AG de los distintos compuestos para los operadores A, B a Temperatura (T0) y 80°C (T1); σ : desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En lo referente a la precisión de las metodologías desarrolladas, señalar que las desviaciones estándar de la cuantificación de los AG minoritarios (considerando como tales los de un contenido 5%) son idénticas para ambos tipos de extracciones (a y b) y las dos temperaturas ensayadas (ambiente y 80°C), y oscilan entre un 0,01% y el 0,12%. Con respecto a los AG mayoritarios (> 5%), los resultados muestran desviaciones estándar entre 0,08 y 0,48 para los dos tipos de extracción (a y b) a temperatura ambiente. Con respecto a la temperatura de 80°C, señalar que en el método a de

centrifugación/ultracentrifugación, se observa la mayor dispersión de los resultados con desviaciones estándar $>0,70\%$ para ambos operadores A y B.

En términos generales se observa que a temperatura ambiente los valores de σ y CV son más bajos que a 80°C . Este hecho, probablemente esté relacionado con que pueda tener lugar la evaporación del disolvente en los tubos de reacción durante el tratamiento térmico a 80°C . Este es un proceso no controlado que genera mucha variabilidad entre muestras, entendiendo como tal, cada tubo de reacción.

Centrándonos en el tipo de extracción lipídica, puede observarse que los métodos (a), basado en la centrifugación y ultracentrifugación y (b) basado en extracción con disolventes, presentan, en general, desviaciones estándar similares a T ambiente, sin embargo a 80°C las σ y CV son más elevados en el método b que en el a. Esta diferencia se puede explicar teniendo en cuenta que en el caso de la extracción mediante hexano/isopropanol, se trabaja con alícuotas tomadas de una disolución, por lo cual se parte de una matriz homogénea, mientras que en el caso de la centrifugación, se trabaja a partir de una matriz sólida de 40 mg de fracción lipídica que debe de disolverse con la adición de los 2 mL de hexano. Esta posible heterogeneidad pudiera ser la causa que explicaría estas diferencias. Además, y de acuerdo con lo descrito por otros autores en la bibliografía (Araujo *et al.*, 2008), en el análisis de AG en diferentes matrices, al igual que en cualquier analítica, la homogeneidad de la muestra es un factor crucial para el éxito de los métodos.

En la figura 3.1.4.4.2.4.1 puede verse la representación de la evolución del coeficiente de variación frente a las concentraciones de los compuestos analizados sobre las muestras de leche. De acuerdo con Horwitz (1982), se observa que, como ocurre en todos los métodos en mayor o menor medida, este valor se mantiene relativamente estable hasta alcanzar un punto donde la precisión, comienza a deteriorarse más rápidamente.

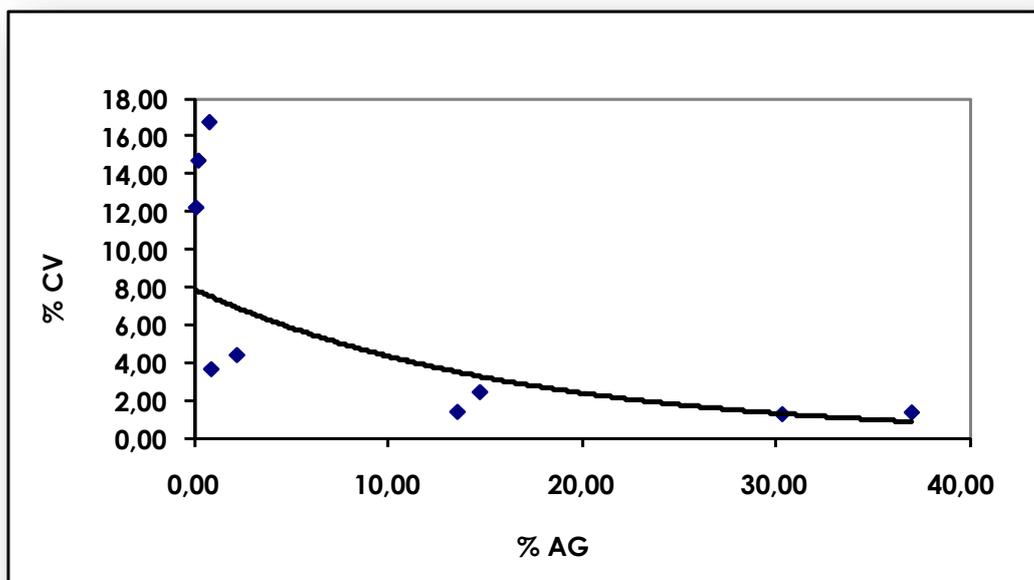


Figura 3.1.4.4.2.4.1 Evolución del coeficiente de variación (CV) en función del porcentaje de AG cuantificado (%AG) en muestras de leche

Siguiendo los criterios anteriormente descritos en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad, reflejados en la norma ISO 15885/FIL 184, se realizó un análisis de los resultados obtenidos en el ensayo con muestras de leche que se han reflejado en las siguientes tablas 3.1.4.4.2.4.2, 3.1.4.4.2.4.3, 3.1.4.4.2.4.4 y 3.1.4.4.2.4.5.

Tabla 3.1.4.4.2.4.2. Valores de los experimentos con muestras de leche a temperatura ambiente (T0) para los operadores A y B, mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Repetibilidad.

T Ambiente - Método (a)	Valores experimentales		Valores permitidos				Max Dif valores T0-A	Valor Max T0-A	Valor Min T0-A	Valores experimentales		Valores permitidos				Max Dif valores T0-B	Valor Max T0-B	Valor Min T0-B
	T0-A	%	5% T0-A	12% T0-A	Max Int	Min Int				T0-B	%	5% T0-B	12% T0-B	Max Int	Min Int			
Compuesto																		
Ac. Mirístico (C14:0)	13,58		0,68	14,26	12,90	13,40	13,79	13,40	13,40	13,63	0,68	14,31	12,95	0,58	13,88	13,31		
Ac. Miristoleico C14:1)	0,93		0,11	1,04	0,81	0,88	0,95	0,88	0,88	0,89		1,00	0,79	0,07	0,94	0,86		
Ac. Palmítico(C16:0)	36,69		1,83	38,52	34,85	36,06	37,45	36,06	36,06	37,31	1,87	39,18	35,45	0,75	37,80	37,04		
Ac. Palmítoleico (C16:1)	0,13		0,02	0,14	0,11	0,11	0,15	0,11	0,11	0,14		0,15	0,12	0,03	0,15	0,12		
Ac. Estéarico (C18:0)	14,96		0,75	15,71	14,22	14,58	15,62	14,58	14,58	14,56	0,73	15,29	13,83	0,50	14,88	14,37		
Ac. Oleico (C18:1)	30,24		1,51	31,76	28,73	29,91	31,20	29,91	29,91	30,40	1,52	31,92	28,88	0,71	30,74	30,03		
Ac. Linoleico (C18:2)	2,32		0,28	2,60	2,04	2,21	2,45	2,21	2,21	2,17		2,43	1,91	0,04	2,18	2,14		
Ac. Linolenico (C18:3)	0,31		0,04	0,34	0,27	0,29	0,34	0,29	0,29	0,23		0,26	0,21	0,01	0,24	0,23		
Ac. Ruménico (C18:2)	0,98		0,12	1,09	0,86	0,92	1,12	0,92	0,92	0,73		0,82	0,64	0,05	0,76	0,71		
T Ambiente - Método (b)																		
Compuesto																		
Ac. Mirístico (C14:0)	13,65		0,68	14,34	12,97	13,57	13,74	13,57	13,57	13,61	0,68	14,29	12,93	0,22	13,69	13,47		
Ac. Miristoleico C14:1)	1,07		0,13	1,20	0,94	1,05	1,08	1,05	1,05	1,05		1,18	0,93	0,03	1,07	1,04		
Ac. Palmítico(C16:0)	35,32		1,77	37,08	33,55	35,20	35,54	35,20	35,20	35,50	1,77	37,27	33,72	0,77	35,99	35,22		
Ac. Palmítoleico (C16:1)	0,19		0,02	0,22	0,17	0,19	0,20	0,19	0,19	0,18		0,20	0,16	0,03	0,20	0,16		
Ac. Estéarico (C18:0)	14,96		0,75	15,71	14,22	14,89	15,11	14,89	14,89	14,99	0,75	15,74	14,24	0,58	15,35	14,77		
Ac. Oleico (C18:1)	30,66		1,53	32,19	29,12	30,54	30,84	30,54	30,54	30,63	1,53	32,16	29,10	0,45	30,92	30,47		
Ac. Linoleico (C18:2)	2,64		0,32	2,96	2,32	2,62	2,68	2,62	2,62	2,61		2,92	2,29	0,12	2,69	2,57		
Ac. Linolenico (C18:3)	0,40		0,05	0,45	0,35	0,38	0,44	0,38	0,38	0,37		0,42	0,33	0,03	0,39	0,36		
Ac. Ruménico (C18:2)	1,17		0,14	1,31	1,03	1,12	1,22	1,12	1,12	1,12		1,26	0,99	0,10	1,17	1,07		

Método (a): extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropanol; A, B: operadores; T0-A%, T0-B%: porcentaje del éster metílico de AG para el operador A y el B a temperatura ambiente; 5% T0-A, 12%T0-B, 12%T0-A y 12% T0-B: porcentaje de aceptación según norma para los valores de AG detectados en el ensayo por los distintos operadores a temperatura ambiente (T0); Max Int y Min Int: límites del intervalo de aceptación según los criterios de la norma en función del 5% ó 12%; Max Dif: valores T0-A y T0-B; Máxima Diferencia entre los valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo por los distintos operadores a temperatura ambiente (T0); Valor Max y Valor Min T0-A y T0-B: Valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo por los distintos operadores a temperatura ambiente (T0). Los valores en rojo indican rechazo según criterio de la norma.

Tabla 3.1.4.4.2.4.3. Valores de los experimentos con muestras de leche a 80°C (T1) para los operadores A y B mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Repetibilidad

T 80°C - Método (a)	Valores experimentales		Valores permitidos						Valores experimentales		Valores permitidos						Max Dif valores T1-B		Valor Min T1-B								
	T1-A	%	5% T1-A	12% T1-A	Max Int	Min Int	13,43	0,86	37,84	0,08	14,42	30,72	1,93	0,18	0,58	13,67	Max T1-A	Min T1-A	13,40	0,67	14,07	Max Int	Min Int	0,20	13,48	Max T1-B	Min T1-B
Compuesto																											
Ac. Mirístico (C14:0)	13,43		0,67	14,10	12,76	0,65	13,02	13,40	0,67	14,07	12,73	0,20	13,48	13,29													
Ac. Mirístico (C14:1)	0,86		0,10	0,97	0,76	0,05	0,84	0,83	0,10	0,93	0,73	0,18	0,90	0,73													
Ac. Palmítico (C16:0)	37,84		1,89	39,73	35,94	1,87	36,99	37,73	1,89	39,62	35,85	1,96	38,97	37,00													
Ac. Palmítico (C16:1)	0,08		0,01	0,09	0,07	0,04	0,06	0,07	0,01	0,08	0,06	0,03	0,08	0,05													
Ac. Estéarico (C18:0)	14,42		0,72	15,14	13,70	0,31	14,28	14,60	0,73	15,33	13,87	0,99	15,03	14,04													
Ac. Oleico (C18:1)	30,72		1,54	32,26	29,19	0,90	31,03	30,70	1,53	32,23	29,16	0,68	31,04	30,37													
Ac. Linoleico (C18:2)	1,93		0,23	2,16	1,70	0,33	2,07	1,94	0,23	2,17	1,70	0,43	2,13	1,70													
Ac. Linoleico (C18:3)	0,18		0,02	0,20	0,15	0,04	0,19	0,18	0,02	0,20	0,16	0,09	0,22	0,14													
Ac. Ruménico (C18:2)	0,58		0,07	0,65	0,51	0,16	0,65	0,59	0,07	0,66	0,52	0,26	0,69	0,43													
T 80°C - Método (b)																											
Compuesto																											
Ac. Mirístico (C14:0)	13,92		0,70	14,61	13,22	0,24	14,04	13,82	0,69	13,82	13,82	0,14	13,90	13,75													
Ac. Mirístico (C14:1)	1,07		0,13	1,20	0,95	0,03	1,09	1,06	0,13	1,19	0,93	0,03	1,07	1,04													
Ac. Palmítico (C16:0)	35,42		1,77	37,19	33,65	0,63	35,82	35,54	1,78	35,54	35,54	0,50	35,80	35,30													
Ac. Palmítico (C16:1)	0,11		0,01	0,12	0,09	0,04	0,12	0,12	0,01	0,13	0,10	0,06	0,15	0,09													
Ac. Estéarico (C18:0)	14,86		0,74	15,60	14,11	0,25	15,00	14,88	0,74	14,88	14,88	0,27	15,00	14,72													
Ac. Oleico (C18:1)	30,76		1,54	32,29	29,22	0,50	31,07	30,66	1,53	30,66	30,66	0,21	30,76	30,55													
Ac. Linoleico (C18:2)	2,52		0,30	2,83	2,22	0,07	2,56	2,49	0,31	2,86	2,25	0,13	2,63	2,50													
Ac. Linoleico (C18:3)	0,33		0,04	0,37	0,29	0,05	0,36	0,34	0,04	0,39	0,30	0,02	0,35	0,33													
Ac. Ruménico (C18:2)	1,01		0,12	1,14	0,89	0,08	1,05	1,04	0,12	1,16	0,91	0,09	1,08	0,99													

Método (a): extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropanol; A, B: operadores; T1-A%, T1-B%: porcentaje del éster metílico de AG para el operador A y el B a 80°C (T1); 5% T1-A y 12% T1-B: porcentaje de aceptación según norma para los valores de AG defectados en el ensayo por los distintos operadores a 80°C (T1); Max Int y Min Int: límites del intervalo de aceptación según los criterios de la norma en función del 5% ó 12%; Max Dif. valores T1-A y T1-B: Máxima Diferencia entre los valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo por los distintos operadores a 80°C (T1); Valor Max y Valor Min T1-A y T1-B: Valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo por los distintos operadores a 80°C (T1). Los valores en rojo indican rechazo según criterio de la norma.

Tabla 3.1.4.4.2.4.4. Valores de los experimentos con muestras de leche a temperatura ambiente (T0) para el promedio de los operadores A y B mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Reproducibilidad intermedia.

T Ambiente - Método (a)	Valores experimentales	Valores permitidos						
Compuesto	T0 %	15% T0	20% T0	Max Int	Min Int	Max Dif valores T0	Valor Max T0	Valor Min T0
Ac. Mirístico (C14:0)	13,61	2,04		15,65	11,56	0,65	13,67	13,02
Ac. Mirístoleico C14:1)	0,91		0,18	1,09	0,73	0,18	0,90	0,73
Ac. Palmítico(C16:0)	37,00	5,55		42,55	31,45	1,98	38,97	36,99
Ac. Palmítoleico (C16:1)	0,13		0,03	0,16	0,10	0,05	0,10	0,05
Ac. Estearico (C18:0)	14,76	2,21		16,98	12,55	0,99	15,03	14,04
Ac. Oleico (C18:1 c)	30,32	4,55		34,87	25,77	0,91	31,04	30,14
Ac. Linoleico (C18:2)	2,24		0,45	2,69	1,79	0,43	2,13	1,70
Ac. Linolenico (C18:3)	0,27		0,05	0,32	0,21	0,09	0,22	0,14
Ac. Ruménico (c9,t11C18:2)	0,83		0,17	1,00	0,66	0,26	0,69	0,43

T Ambiente - Método (b)	Valores experimentales	Valores permitidos						
Compuesto	T0 %	15% T0	20% T0	Max Int	Min Int	Max Dif valores T0	Valor Max T0	Valor Min T0
Ac. Mirístico (C14:0)	13,63	2,04		15,68	11,59	0,27	13,74	13,47
Ac. Mirístoleico C14:1)	1,06		0,21	1,28	0,85	0,05	1,08	1,04
Ac. Palmítico(C16:0)	35,41	5,31		40,72	30,10	0,79	35,99	35,20
Ac. Palmítoleico (C16:1)	0,19		0,04	0,22	0,15	0,03	0,20	0,16
Ac. Estearico (C18:0)	14,98	2,25		17,22	12,73	0,58	15,35	14,77
Ac. Oleico (C18:1 c)	30,64	4,60		35,24	26,05	0,45	30,92	30,47
Ac. Linoleico (C18:2)	2,62		0,52	3,15	2,10	0,12	2,69	2,57
Ac. Linolenico (C18:3)	0,38		0,08	0,46	0,31	0,08	0,44	0,36
Ac. Ruménico (c9,t11C18:2)	1,14		0,23	1,37	0,91	0,15	1,22	1,07

Método (a): extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropanol; T0% porcentaje del éster metílico de AG para el promedio de operadores A y B a temperatura ambiente; 15% T0, 20%T0: porcentaje de aceptación según norma para los valores de AG detectados en el ensayo para el promedio de operadores A y B a temperatura ambiente (T0); Max Int y Min Int: límites del intervalo de aceptación según los criterios de la norma en función del 15% ó 20%; Max Dif. valores T0: Máxima Diferencia entre los valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo para el promedio de operadores A y B a temperatura ambiente (T0); Valor Max y Valor Min: Valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo para el promedio de operadores A y B a T ambiente (T0). Los valores en rojo indican rechazo según criterio de la norma.

Tabla 3.1.4.4.2.4.5. Valores de los experimentos con muestras de leche a 80°C (T1) para el promedio de los operadores A y B (P) mediante extracción lipídica método (a) y (b). Intervalos de aceptación y rechazo: Reproducibilidad intermedia.

T 80°C - Método (a)	Valores experimentales	Valores permitidos						
Compuesto	T1 %	15% T1	20% T1	Max Int	Min Int	Max Dif valores T1	Valor Max T1	Valor Min T1
Ac. Mirístico (C14:0)	13,41	2,01		15,43	11,40	0,65	13,67	13,02
Ac. Mirístoleico C14:1)	0,85		0,17	1,02	0,68	0,18	0,90	0,73
Ac. Palmítico(C16:0)	37,78	5,67		43,45	32,12	1,98	38,97	36,99
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,07		0,01	0,09	0,06	0,05	0,10	0,05
Ac. Estéarico (C18:0)	14,51	2,18		16,69	12,33	0,99	15,03	14,04
Ac. Oleico (C18:1 c)	30,71	4,61		35,31	26,10	0,91	31,04	30,14
Ac. Linoleico (C18:2)	1,93		0,39	2,32	1,55	0,43	2,13	1,70
Ac. Linolenico (C18:3)	0,18		0,04	0,21	0,14	0,09	0,22	0,14
Ac. Ruménico (c9,t11C18:2)	0,58		0,12	0,70	0,47	0,26	0,69	0,43

T 80°C - Método (b)	Valores experimentales	Valores permitidos						
Compuesto	T1 %	15% T1	20% T1	Max Int	Min Int	Max Dif valores T1	Valor Max T1	Valor Min T1
Ac. Mirístico (C14:0)	13,87	2,08		15,95	11,79	0,29	14,04	13,75
Ac. Mirístoleico C14:1)	1,07		0,21	1,28	0,85	0,05	1,09	1,04
Ac. Palmítico(C16:0)	35,48	5,32		40,80	30,16	0,63	35,82	35,19
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,11		0,02	0,13	0,09	0,06	0,15	0,08
Ac. Estéarico (C18:0)	14,87	2,23		17,09	12,64	0,28	15,00	14,72
Ac. Oleico (C18:1 c)	30,71	4,61		35,31	26,10	0,52	31,07	30,55
Ac. Linoleico (C18:2)	2,54		0,51	3,05	2,03	0,14	2,63	2,49
Ac. Linolenico (C18:3)	0,34		0,07	0,41	0,27	0,05	0,36	0,31
Ac. Ruménico (c9,t11C18:2)	1,03		0,21	1,23	0,82	0,11	1,08	0,97

Método (a): extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación; Método (b): extracción lipídica mediante hexano/isopropanol; T1 %: porcentaje del éster metílico de AG para el promedio de operadores A y B a 80°C (T1); 15% T1, 20%T1: porcentaje de aceptación según norma para los valores de AG detectados en el ensayo para el promedio de operadores A y B a 80°C (T1); Max Int y Min Int: límites del intervalo de aceptación según los criterios de la norma en función del 15% ó 20%; Max Dif. valores T1: Máxima Diferencia entre los valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo para el promedio de operadores A y B a 80°C (T1); Valor Max y Valor Min T1: Valores máximo y mínimo obtenidos en el ensayo para el promedio de operadores A y B a 80°C (T1). Los valores en rojo indican rechazo según criterio de la norma.

Teniendo en cuenta toda la información contenida en las tablas 3.1.4.4.2.4.2, 3.1.4.4.2.4.3, 3.1.4.4.2.4.4 y 3.1.4.4.2.4.5 se observa que "a priori" los experimentos realizados a 80°C presentan mayor número de rechazos según los criterios descritos en el apartado III.1.4.4.2.3 (valores marcados en rojo) que los experimentos realizados a temperatura ambiente, tanto para la repetibilidad (operadores A y B en método (a) y (b)) como para la reproducibilidad intermedia (promedio de operadores P en método (a) y (b)). Por otro lado, para la misma temperatura en el ensayo realizado con la extracción lipídica (a) basada en la centrifugación y ultracentrifugación, el número de rechazos es mayor que para el basado en la extracción lipídica (b) mediante hexano/isopropanol.

Si se analiza cuáles son los compuestos que no han cumplido los criterios, puede observarse que se trata de los compuestos minoritarios, ruménico y palmitoleico, en los que los coeficientes de variación son más elevados, con la excepción de los ésteres

metílicos del ácido esteárico y oleico en el ensayo a temperatura ambiente y extracción lipídica en base a centrifugación para el operador A. Como se ha citado al analizar los valores de desviación estándar y coeficientes de variación, esta diferencia puede explicarse teniendo en cuenta la diferencia en la homogeneidad de las matrices de partida.

III.1.4.4.2.5. Metodología seleccionada. Exactitud y validación.

A la vista de los resultados obtenidos, parece claro que un aumento de la temperatura no favorece el proceso de metilación. En principio, los dos métodos de extracción proporcionan resultados similares en cuanto a repetibilidad y reproducibilidad, cumpliéndose, en general, los criterios de la norma ISO 15885/FIL184. Por ello, tomando como base la implementación de la metodología en un laboratorio con elevado número de muestras a analizar, es importante no perder de vista cuál es el objetivo: el presente estudio, busca una **metodología analítica** que permita un **análisis** diario de **elevado número de muestras, minimizando** el **pretratamiento** de las mismas y **el tiempo de análisis**. La centrifugación reduce sensiblemente el tiempo de procesado de las muestras, resultando preferible cuando hay que trabajar con un número elevado de muestras.

En la figura 3.1.4.4.2.5.1 se esquematiza la metodología final seleccionada para la determinación de AG en leche: extracción mediante centrifugación y ultracentrifugación y metilación básica a T ambiente.

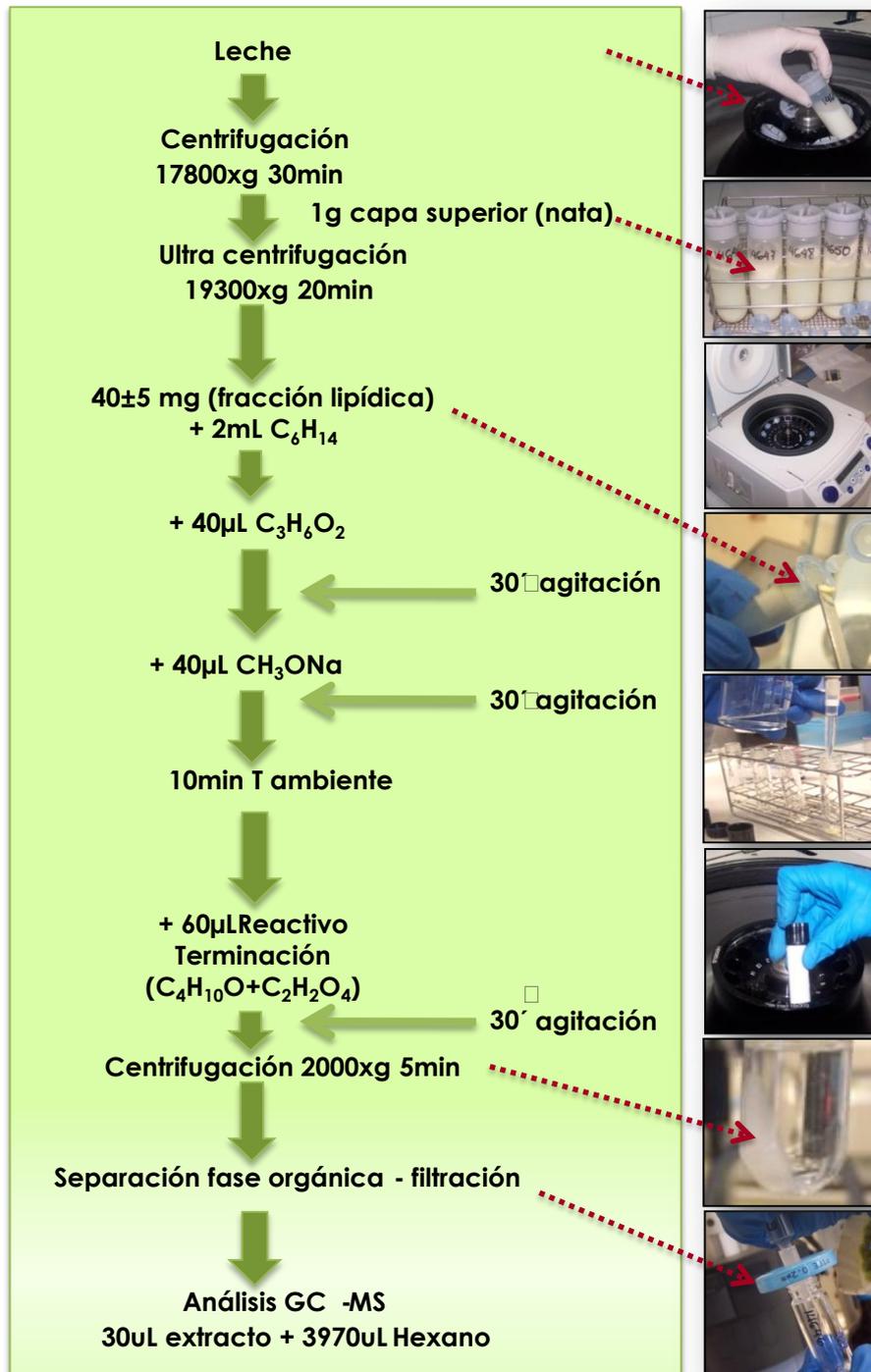


Figura 3.1.4.4.2.5.1. Metodología seleccionada para el análisis rutinario de muestras de leche.

Con la finalidad de determinar la exactitud y validar finalmente la metodología anteriormente descrita, se realizó un ensayo de análisis de AG con material excedente de un ensayo intercomparativo, correspondiente a grasa de mantequilla. Este material tiene asignados valores de referencia (tabla 3.1.4.4.2.5.1) para la determinación de los

siguientes AG: isómeros C18:1, C18:2 y C18:3 que incluyen el ácido oleico (C18:1), linoleico y ruménico (C18:2) y linolénico (C18:3).

En la tabla 3.1.4.4.2.5.1 se presentan los valores de referencia para el material excedente de intercomparaciones (MRI), así como la dispersión admitida según norma ISO15885/FIL 184.

Tabla 3.1.4.4.2.5.1. Valores correspondientes al material de referencia (grasa de mantequilla) y valores de dispersión aceptados (según norma ISO15885/FIL 184)

AG	%AG/AG Total	Repetibilidad				Reproducibilidad			
		5% Ref	12% Ref	Max	Min	15% Ref	20% Ref	Max	Min
ΣC18:1	23,08	1,15		24,23	21,93	3,46		26,54	19,62
ΣC18:2	3,02		0,36	3,38	2,66		0,6	3,62	2,42
ΣC18:3	0,38		0,05	0,43	0,33		0,08	0,46	0,3

5%, 12%, 15% y 20% Ref.: Variabilidad máxima para el MRI, según los criterios de repetibilidad (5 y 12%) y reproducibilidad (15 y 20%) de la Norma ISO 15885/FIL 184

Los resultados reflejados en la tabla 3.1.4.4.2.5.2, son los resultados experimentales obtenidos para la validación del método.

Tabla 3.1.4.4.2.5.2. Análisis de grasa de mantequilla como material de referencia para los AG con valores de referencia C18:1, C18:2 y C18:3.

AGs	Repetibilidad		Reproducibilidad
	%AG/AG total A	%AG/AG total B	%AG/AG total
ΣC18:1	22,8	23,17	22,96
ΣC18:2	2,8	2,54	2,64
ΣC18:3	0,4	0,36	0,4

% AG/AG totales A, B: porcentaje de AG frente al % total de AG cuantificados para los operadores A y B

Según se puede observar en los resultados recogidos en la tabla 3.1.4.4.2.5.2, los isómeros C18:1, C18:2 y C18:3 del MRI, cumplen los criterios de aceptación para precisión, tanto en términos de repetibilidad como de reproducibilidad, lo que refleja la validez de la metodología analítica empleada en el proceso, en cuanto a la valoración de este parámetro.

Si se analiza la exactitud del método (tabla 3.1.4.4.2.5.3) se puede observar que la mayor diferencia respecto al valor de referencia lo presenta el grupo de isómeros C18:2, siendo de un 0,38%, seguida de los C18:1 con 0,12% y finalmente los C18:3, que son los que presentan mayor exactitud con una diferencia de 0,02%. Estos resultados se corresponden con los promedios de los dos operadores y presentan unos porcentajes de recuperación en el rango de 87,42% - 99,48%, que resultan satisfactorios para la implementación de la metodología en el laboratorio de rutina.

Tabla 3.1.4.4.2.5.3. Comparativa entre el valor teórico del material de referencia y resultados experimentales.

Compuestos	%AG/AG Total Mat Ref	%AG/AG Total LAB	Diferencias absolutas	% Recuperación
TOTAL C18:1	23,08	22,96	0,12	99,48
TOTAL C18:2	3,02	2,64	0,38	87,42
TOTAL C18:3	0,38	0,4	0,02	94,74

% AG/AGtotales: porcentaje de AG frente al % total de AG cuantificados

También se llevó a cabo una estimación de los límites de detección y cuantificación teóricos, estimados como tres y diez veces respectivamente la desviación estándar del ruido instrumental, siendo los valores obtenidos de 6 ppb como límite de detección y 20ppb como límite de cuantificación.

A la vista de los resultados obtenidos puede establecerse, que la metodología basada en la centrifugación de leche y ultracentrifugación de nata para la obtención de la capa lipídica, seguida de una transmetilación/extracción a T ambiente y análisis mediante CG-MS según las condiciones detalladas, permite un análisis de AG cumpliendo los criterios de repetibilidad y reproducibilidad de la Norma ISO15885/FIL 184. Así mismo, se cumplen igualmente los criterios de exactitud, al ser validada para los compuestos de interés mediante un material de referencia interno, excedente de un ejercicio de intercomparación. Todo ello, permite la aplicación de dicha metodología como análisis de rutina en laboratorios donde se requiere procesar un número elevado de muestras, escenario que convierte en inviable la aplicación de metodologías clásicas.

III.2. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA METILACIÓN DE AG BASADO EN EXTRACCIÓN-METILACIÓN MEDIANTE MICROONDAS (MW).

III.2.1. INTRODUCCIÓN

Tal y como se ha detallado en el apartado anterior, la extracción-metilación de AG implica un gran número de etapas difíciles de minimizar. En consecuencia, en los últimos años, dado el número de pasos que implica la cuantificación de AG, se han intentado desarrollar procedimientos analíticos que permitan la extracción y esterificación simultánea de AG (Liu *et al.*, 2012). Sin embargo, la aplicación de la energía MW para aumentar la eficacia de estos protocolos de análisis, ha tenido un uso y una aceptación limitadas, hasta el momento, en la comunidad científica.

Se empleó por primera vez a comienzos de los 90, principalmente en el control toxicológico clínico y forense y control del dopaje, aunque hay ejemplos relacionados con el análisis de muestras de alimentos o medioambientales (Söderholm *et al.*, 2010). Los métodos de digestión y extracción con MW se han usado durante muchos años, y hoy en día se consideran procedimientos estándar en muchos laboratorios, y su uso en la preparación de FAME se aplica a distintos tipos de muestras biológicas (Khoomrung *et al.*, 2012). Sin embargo, no se han encontrado hasta el momento métodos referenciados que empleen la energía MW para la preparación de FAME en muestras de leche.

Aprovechando la eficacia de los mecanismos de calentamiento dieléctrico del MW, los tiempos de reacción pueden reducirse de horas a minutos, usando recipientes de digestión herméticos (Söderholm *et al.*, 2010). La principal ventaja de esta técnica es la capacidad de la energía MW de incrementar rápidamente la temperatura de la mezcla empleada como disolvente en la reacción. En los procesos convencionales, un período de tiempo determinado se invierte en calentar el recipiente que contiene la mezcla de reacción, antes de que el calor sea transmitido desde el recipiente a esta última, mientras que este paso se elimina empleando la energía MW. Ello reduce el gradiente de temperatura al mínimo y acelera la velocidad de calentamiento.

El principio de esta técnica, se basa en el efecto directo de la energía MW en las moléculas (figura 3.2.1.1), mediante la conducción iónica y la rotación dipolar (Eskilsson y Bjorklund, 2000). En muchas aplicaciones, estos dos mecanismos tienen lugar simultáneamente. Las muestras pueden estar inmersas en un solo disolvente o una mezcla de disolventes que absorben la energía MW (mecanismo I) o en una combinación de disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica mezclados en distintas proporciones (mecanismo II), o bien cuando la muestra tiene una alta pérdida dieléctrica, puede estar inmersa en un disolvente transparente (mecanismo III). En el caso que nos ocupa, tendremos mezclas de disolventes constituidas por disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica, mezclados en distintas proporciones, con lo cual aplicaría un mecanismo II.

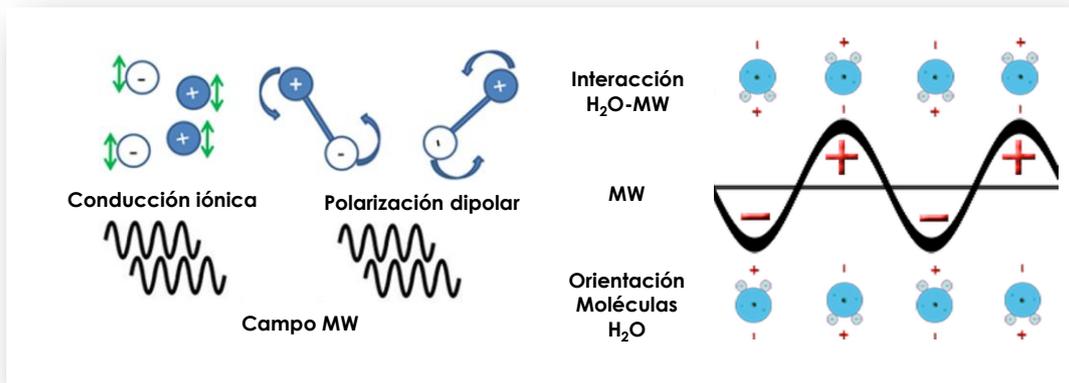


Figura 3.2.1.1. Radiación Microondas y su efecto en las moléculas

III.2.2. OBJETIVO

El objetivo principal del presente capítulo es desarrollar un procedimiento de extracción-metilación de AG en leche, mediante el empleo del MW como alternativa para la extracción y derivatización convencionales y la combinación de estos dos procesos.

III.2.3. MUESTRAS

La leche utilizada para el trabajo procede del rebaño experimental de vacas Frisonas de la unidad de Leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA (Villaviciosa).

III.2.4. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

Para el desarrollo del presente trabajo, además de los instrumentos detallados en la sección III.1.4.3. se ha empleado el equipo MW descrito a continuación.

Microondas ETHOS One (Milestone, Srl, Sorisole, Italia): equipado con un rotor para diez recipientes de digestión de teflón TFM (PTFE modificado químicamente), también denominados "bombas de microondas". Equipado con un sensor de temperatura (ATC-400). El termopar se sitúa en la bomba de referencia, simplemente deslizándola dentro de una vaina de HTC (nuevos plásticos de altas prestaciones) que posee dicho recipiente. Ello permite que el sensor esté totalmente introducido en la bomba de referencia (figura 3.2.4.1. y 3.2.4.2).



Figura 3.2.4.1. Detalle del termopar y sensor de T en el interior del horno MW

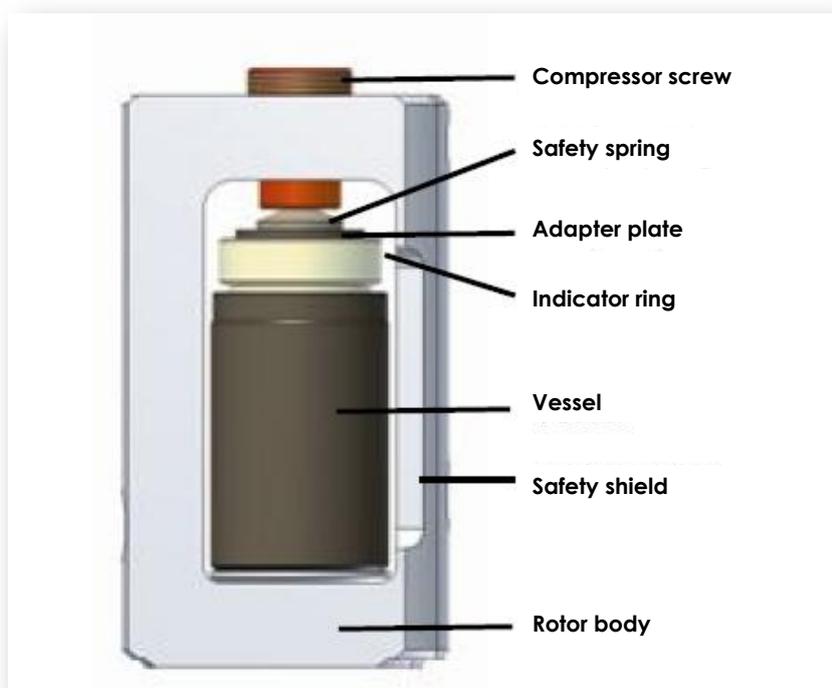


Figura 3.2.4.2. Recipiente de digestión o "bomba" de MW

Las muestras de leche fueron analizadas empleando catálisis ácida y básica, aplicando la energía MW, y los resultados fueron comparados con la metodología de referencia validada en el capítulo anterior.

Los reactivos empleados en la catálisis básica fueron los mismos que se emplearon en el ensayo anterior y que están detallados en el apartado III.1.4.3. Los reactivos empleados en la catálisis ácida fueron:

- Ácido clorhídrico metanólico (10%) preparado a partir de cloruro de acetilo (98%, para síntesis, Sigma-Aldrich, Inc., St Louis, MO 63178, USA) en Metanol (95%, grado HPLC, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., London, UK).
- Carbonato Potásico (6%, para síntesis, Merck, Hohenbrunn, Alemania).
- Sulfato de sodio anhidro (para análisis, Merck, Hohenbrunn, Alemania).

En el análisis mediante GC-MS, se emplearon como patrones:

- Ester metílico del ácido ruménico Methyl 9(Z),11(E) - octadecadienoate 98% pureza 25mg. MATREYA LLC. Ref.: MT-001255.
- NuCheck GLC Reference Standards 463. Mezcla de 52 ésteres metílicos.

Como material de referencia, para control de la metodología y estimación de la exactitud de la metodología propuesta, se empleó grasa de mantequilla con valores de referencia para los AG siguientes: caprílico (C8:0), mirístico (C14:0), α -linoleico (9c12c-C18:2) y linolenico (9c12c15cC18:3). Dicho material fue distribuido por el Laboratorio Español de Referencia para Leche y Productos Lácteos, cuya calidad y eficiencia ha sido demostrada a través de la acreditación en la norma UNE-EN ISO17025 (ENAC, no. 517/LE1040). Los valores de referencia para dicha grasa de mantequilla se muestran en la tabla 3.2.4.1.

Tabla 3.2.4.1. Valores de AG de referencia de grasa de mantequilla

Compuesto	Valor Ref^a (%)	MIN	MAX
C8:0	1,4	1,12	1,68
C14:0	10,94	9,3	12,58
9c 12c -18:2	3,02	2,42	3,62
9c 12c 15c -18:3	0,38	0,3	0,46

^a Valores de referencia proporcionada por el Laboratorio Español de Referencia para Leche y Productos Lácteos (ENAC, no. 517/LE1040)

III.2.5. Obtención de esteres metílicos de AG.

La fracción lipídica fue obtenida siguiendo la metodología de Feng *et al.* (2004) descrita anteriormente (III.1.4.4.2.1), basada en la centrifugación y ultracentrifugación. La obtención de los FAME se llevó a cabo mediante dos estrategias: una catálisis básica (Christie, 1982) sobre una alícuota tomada de la capa lipídica y una catálisis ácida (adaptada por Palmquist y Jenkins, 2003) sobre muestra de leche líquida o sobre una alícuota tomada de la capa lipídica, como en el caso anterior. En el caso de la catálisis básica, la muestra de partida fue siempre la capa lipídica porque no hay estudios sobre metodologías basadas en catálisis básica sobre leche líquida, sin una obtención previa de la capa lipídica.

En la figura 3.2.5.1 se muestra la estrategia analítica seguida para la optimización de las condiciones experimentales y la correspondiente caracterización de las diferentes metodologías propuestas. Todos los ensayos llevados a cabo con MW, se realizaron con potencias máximas de 700W y para la optimización se fue variando el tiempo y la temperatura del proceso, empleando en todos los casos tres submuestras.

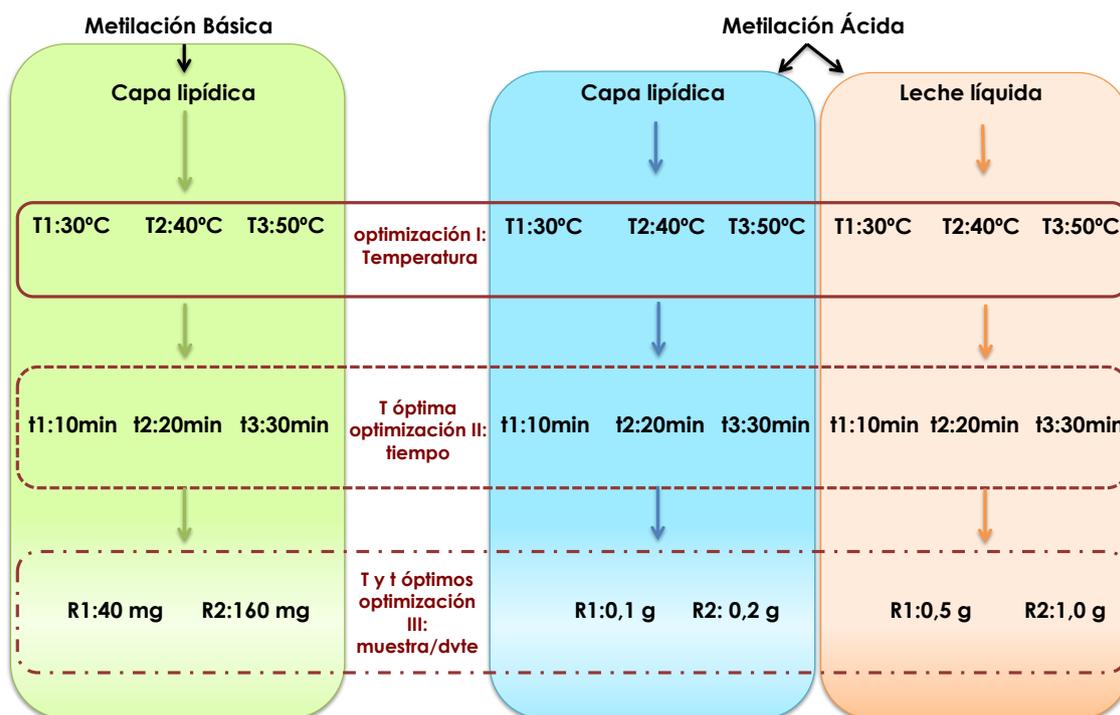


Figura 3.2.5.1. Estrategia analítica seguida para la optimización de las condiciones experimentales con MW, tanto mediante catálisis básica ó ácida. *dvte*:disolvente.

III.2.5.1. Transesterificación ácida

Diferentes alícuotas de $0,5 \pm 0,05$ g ó $1 \pm 0,1$ g de leche y $0,1 \pm 0,05$ ó $0,2 \pm 0,05$ g de capa lipídica fueron pesados en el interior del recipiente de digestión del MW. A continuación, se adicionaron 4mL de clorhídrico metanólico y 4 mL de hexano. Las bombas se cerraron y fueron sometidas a distintas condiciones de temperatura variable entre 30°C y 50°C (tabla 3.2.5.2.1), de tiempo entre 10 min y 30 min y de ratios muestra/disolvente, con el fin de optimizar secuencialmente cada uno de los parámetros experimentales (primero T, a continuación t y finalmente ratio muestra/disolvente). Tras el tratamiento con MW, se adicionan 6mL de carbonato potásico al 6% (neutralización) y 2 mL de hexano. La mezcla se trasvasa a un tubo pyrex con tapón y septum de Teflón y se centrifuga (1500 r.p.m, 30min, T ambiente). La capa orgánica superior se separa a otro tubo conteniendo 0,5 g de sulfato sódico anhidro (para eliminar el agua de la capa orgánica). Se agita y se deja reposar durante una hora. Se centrifuga de nuevo (1500 r.p.m, 5 min, T ambiente) y la capa orgánica se transfiere a un tubo spider del rotavapor para la evaporación a sequedad. Se adicionan 2mL de hexano y se filtra a través de filtros de jeringa de PTFE $0,2 \mu\text{m}$. Este extracto se diluye previamente al análisis mediante GC-MS:

Leche líquida: 1) 950µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para 0,5±0,05 de muestra; 2) 1300µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para 1±0,1g de muestra.

Capa lipídica: 1) 300µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para 0,1±0,05 g de muestra; 2) 200µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para 0,2 ± 0,05 g de muestra.

III.2.5.2. Transesterificación básica

Diferentes alícuotas de 40±5 mg y 160±10mg de la capa lipídica fueron pesados con exactitud en el interior del recipiente de digestión del MW. Se adicionan 8mL de hexano, 160µL de acetato de metilo y 160µL de metilato sódico. Las bombas se cierran y se someten a distintas condiciones de T variable entre 30°C y 50°C (tabla 3.2.5.2.1), de tiempo entre 10 min y 30 min y de ratios muestra/disolvente, con el fin de optimizar secuencialmente cada uno de los parámetros experimentales (primero T, a continuación t y finalmente ratio muestra/disolvente). Tras el tratamiento con MW, la mezcla se trasvasa a un tubo pyrex con tapón y septum de Teflón y se adiciona 240µL de disolución saturada de ácido oxálico (reactivo de terminación) y se agita. Las muestras se centrifugan (1500 r.p.m, 5 min, T ambiente) y la capa orgánica se transfiere a un tubo spider del rotavapor para la evaporación a sequedad. Se adicionan 2mL de hexano y se filtra a través de filtros de jeringa de PTFE 0,2 µm. Este extracto se diluye previamente al análisis mediante GC-MS de acuerdo al siguiente criterio.

Para 40±5 mg muestra de capa lipídica 30µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para de muestra; para 160±10mg de capa lipídica: 10µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano)

Tabla 3.2.5.2.1. Optimización de parámetros MW bajo condiciones ácidas/básicas a una potencia de 700W

I		II		III
Temperatura		Tiempo		Muestra/disolvente
tiempo (min)	T (°C)	tiempo (min)	T seleccionada (°C)	
				50°C - 30 min - ácida
1	30	5	50	0,5-1,0g leche líquida
6	30	15	50	0,1-0,2g capa lipídica
				50°C - 10 min - básica
7	40	25	50	
12	40	35	50	
13	50			
18	50			40-160 mg capa lipídica

I-II: programas MW para optimización de T y tiempo; III: optimización del ratio muestra/disolvente bajo las condiciones ácidas y básicas seleccionadas.

III.2.5.3. Método de referencia.

El método de referencia empleado en la obtención de FAME está descrito en la norma ISO 15884/IDF182 (Milk fat - Preparation of fatty acid methyl esters) empleando ácido oxálico saturado, según la metodología de Christie (1982) y modificación de Chouinard *et al.* (1999b). Este método ya ha sido descrito en detalle en la sección III.1.4.4.2.2.

El material de referencia interno (grasa de mantequilla) se analizó siguiendo este procedimiento. Se pesaron 40mg de grasa de mantequilla y se les adicionó 40µL de acetato de metilo, a continuación se agitó 30 segundos. Seguidamente se adicionaron 40 µL de metilato de sodio y se agitó durante 30 segundos para dejar reposar durante 10 minutos. Después se adicionaron 60 µL del reactivo de terminación y se agitó durante 30 segundos. La mezcla se centrifugó (1500 r.p.m., 5min, 5°C) separando la capa orgánica superior y filtrándola a través de filtros de jeringa de PTFE 0,2 µm. El extracto final se diluyó para su posterior análisis mediante GC-MS (30µL del extracto conteniendo los FAME en 4mL disolución (hexano) para 40±5 mg de muestra).

III.2.5.4. Análisis mediante GC-MS.

El método de análisis se modificó respecto al descrito en la tabla 3.1.4.4.1.2, debido a la necesidad de incluir nuevos AG en la cuantificación de acuerdo a los nuevos objetivos de I+D en el grupo de trabajo. Este método de análisis fue previamente optimizado, tomando como base el método antes citado y las optimizaciones descritas en Kramer *et al.* (2008), en el que se combinan los resultados obtenidos en diferentes programas de T para lograr mayor número de compuestos resueltos. La tabla 3.2.5.4.1 muestra algunos de estos programas. La figura 3.2.5.4.2. muestra el cromatograma de los diferentes métodos ensayados y el método optimizado seleccionado. Finalmente el programa empleado fue el establecido en la tabla 3.2.5.4.2. Los AG fueron separados y analizados usando helio como gas portador a un flujo de 1mL/min. La temperatura del detector y el inyector fue fijada en 250°C. El programa de temperatura fue el siguiente (tabla 3.2.5.4.2): inicio a 40°C durante 1,20min; de 40°C a 140°C a 30°C min⁻¹; isocrático a 140°C durante 25min; de 140°C a 190°C a 1°C min⁻¹; isocrático a 190°C durante 15 min; de 190°C a 215°C a 1°C min⁻¹; isocrático a 215°C durante 8min; y finalmente de 215°C a 240°C a 30°C min⁻¹ e isocrático durante 1min. El detector masas trabajó en modo full scan desde 50 a 500m/z. Los picos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención y el espectro de masas obtenido en las muestras y los estándares previamente descritos.

Tabla 3.2.5.4.1. Programas de temperatura GC-MS evaluados para la optimización del método según Kramer *et al.*, 2008.

Descripción	A	B	C
T inicial (°C)	45	45	45
Tiempo (min)	4	4	4
Primera rampa (°C/min)	13	13	13
Isocrático (T)	175	163	150
Tiempo (min)	27	37	47
Segunda rampa (°C/min)	4	4	4
T final (°C)	215	215	215
Tiempo (min)	35	40	35
Tiempo total (min)	86	103,8	110,33

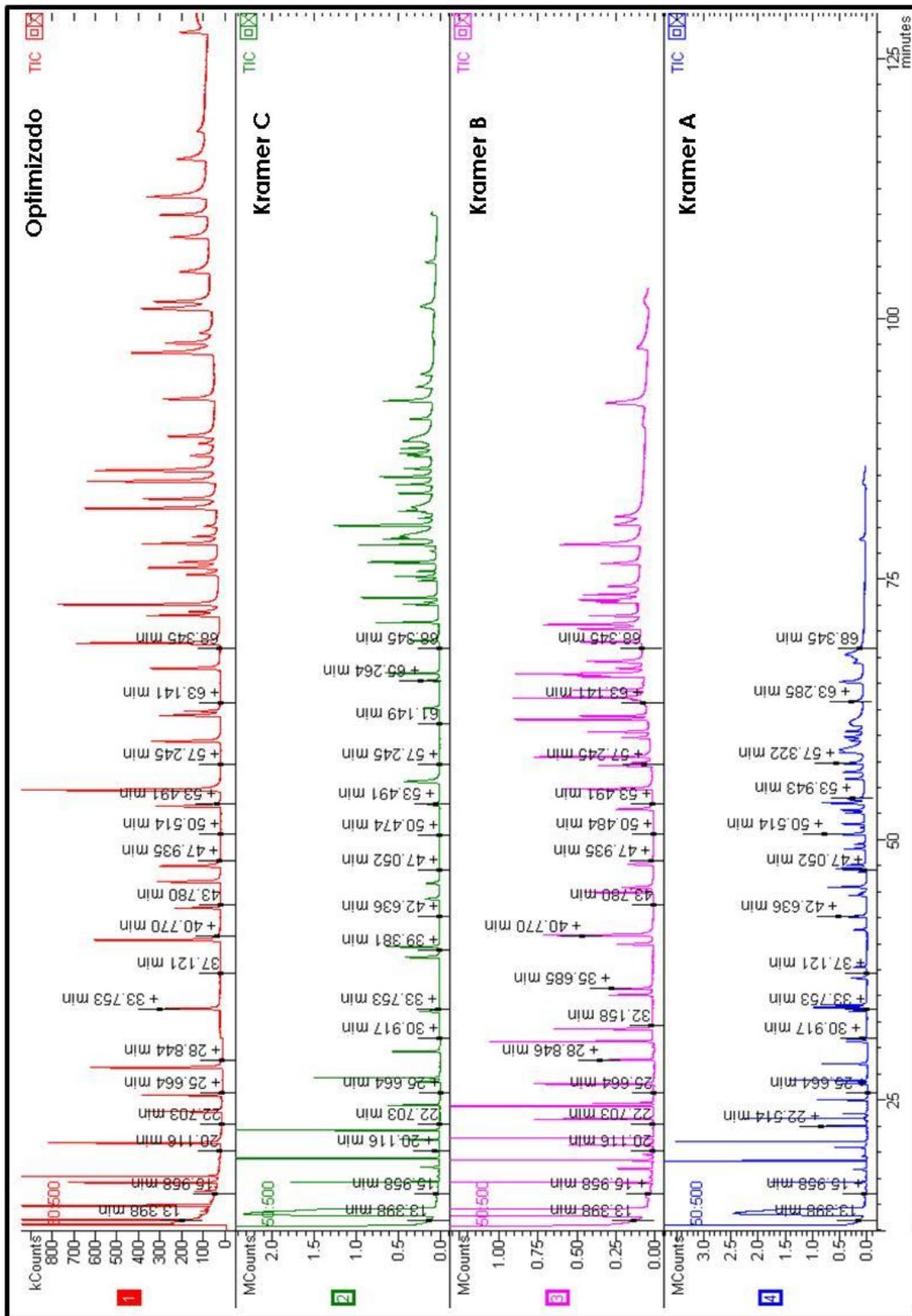


Figura 3.2.5.4.1. Cromatogramas correspondientes a los distintos programas de temperatura evaluados según Kramer et al., (2008) y el programa optimizado seleccionado para el análisis.

Tabla 3.2.5.4.2. Programa optimizado de temperatura para análisis de AG mediante GC-MS

Temperatura (°C)	Rampa (°C/min)	Isocrático (min)	Tiempo (min)
40	0	1,2	1,2
140	30	25,0	29,5
190	1	15,0	94,5
215	1	8,0	127,5
240	30	1,0	129,33

III.2.5.5. Optimización de los parámetros experimentales en MW.

Como punto de partida para la selección de los parámetros a optimizar para realizar la extracción-metilación mediante MW, es necesario tener en cuenta una serie de consideraciones relacionadas con las propiedades de absorción MW: la interacción de los disolventes con la matriz, la solubilidad del analito y la compatibilidad del disolvente de extracción con el método analítico empleado en el paso de análisis final. Por ejemplo, el agua posee excelentes propiedades como disolvente extractivo mediante MW comparado con otros disolventes, sin embargo, su presencia en las reacciones de esterificación podría afectar el rendimiento de la reacción. En el estudio que se detalla a continuación, los disolventes empleados son compatibles con el proceso MW y con aquellos usados en las metodologías ácidas y básicas utilizadas en la obtención de los FAME. El hexano es transparente desde el punto de vista del MW y se usa en el proceso para mantener la solubilidad de los lípidos y atrapar los FAME tras la transesterificación. Sin embargo, la combinación de disolventes implica un mecanismo II descrito anteriormente en el apartado III.2.1 (mezcla de disolventes con alta y baja dielectric losses) o un mecanismo III, usando disolventes con constantes dieléctricas bajas pero matrices con alto contenido en agua, como la leche o la capa lipídica.

El primer paso para llevar a cabo la puesta a punto de la metodología de extracción-metilación mediante MW es la optimización de las condiciones experimentales tanto instrumentales (T y t) como químicas (ratio muestra/disolvente). La optimización se llevó a cabo secuencialmente, esto es, primeramente se evaluó la T, ensayando tres temperaturas diferentes, 30,40 y 50°C. Una vez seleccionada la T óptima, se evaluaron tres tiempos de proceso (10, 20 y 30min) y finalmente, una vez seleccionados T y t se evaluó el ratio muestra/disolvente, siguiendo la estrategia de optimización de los parámetros instrumentales, tal y como se muestra en la figura 3.2.5.1.

Para la optimización de la temperatura, nueve muestras (ocho muestras y un blanco) de leche o capa lipídica bajo condiciones ácida o básica de transesterificación, fueron sometidas a radiación MW (700W) durante cinco minutos a diferentes temperaturas (ver tabla 3.2.5.2.1). Los extractos obtenidos fueron analizados mediante GC-MS.

Una vez que la temperatura fue optimizada y seleccionadas las mejores condiciones, se estudió el tiempo de reacción. Las ocho muestras de leche o de capa lipídica y el blanco, bajo condiciones ácida o básica de transesterificación, fueron sometidas a radiación MW en las mejores condiciones de temperatura durante 10, 20 y 30 minutos (ver tabla 3.2.5.2.1). Los extractos obtenidos a diferentes tiempos se analizaron mediante GC-MS.

Finalmente, se llevó a cabo la optimización del ratio muestra /disolvente. Se estudiaron diferentes ratios. En las mejores condiciones de temperatura y tiempo de reacción, 0,5 y 1,0 g de leche y 0,1 y 0,2 g de capa lipídica en condiciones ácidas de transesterificación (adicionando 8mL de disolvente correspondientes a 4mL de ácido clorhídrico metanólico y 4mL de hexano) y 40 y 160mg de capa lipídica bajo condiciones básicas de transesterificación (adicionando 8,32mL de disolvente, correspondientes a 4mL de hexano, 160 μ L de acetato de metilo y 160 μ L de metilato de sodio), se sometieron a radiación MW (ver tabla 3.2.5.2.1). Los extractos obtenidos se analizaron mediante GC-MS.

III.2.5.6. Análisis estadístico.

Las diferencias en el contenido de FAME bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempo de reacción y ratio muestra/disolvente fueron examinadas usando el procedimiento GLM con LSmeans proporcionado por el análisis estadístico SAS (1999) de acuerdo al modelo $Y = a + \text{compuesto}_a + (b + \text{compuesto}_b) * \text{covariable} + E$, donde Y es el resultado del análisis mediante GC-MS para cada compuesto, a es el punto de corte, b es la pendiente de la recta, compuesto_a y compuesto_b es el efecto de cada FAME sobre a y b, las covariables son la temperatura (T), el tiempo (t), el ratio muestra/disolvente (R) y E_{ij} es el error residual.

III.2.6. Resultados y discusión.

El método ideal de preparación de la muestra para el análisis debe ser simple, rápido, preciso y exacto. Además de estos factores esenciales, la velocidad de preparación de muestras (número de muestras por hora y por día) es también importante a la hora de establecer la metodología de rutina. La radiación MW puede ser una alternativa para promover la extracción y derivatización y combinar estos dos pasos en uno solo,

denominado MAED (microwave-assisted one-step extraction-derivatization), para establecer una metodología que minimice las etapas de preparación de la muestra para el análisis, posibilitando el desarrollo de determinaciones rápidas de perfiles de AG en leche mediante GC.

Centrándonos en la optimización de los parámetros MW, los resultados obtenidos a diferentes **temperaturas** (30, 40 y 50°C) con cinco minutos como tiempo de reacción se recogen en la tabla 3.2.6.1. Como puede observarse, en condiciones de digestión ácida (AD), hay diferencias significativas en un mayor número de AG que bajo digestión básica (BD). Para la AD en muestras de leche líquida, hay un efecto negativo de la T sobre el ácido caprílico (C8:0; $P \leq 0,05$) que se reduce de 2,22% a 1,65%, y empleando muestra tomada de la capa lipídica, el mismo efecto negativo se observó para el ácido palmítico (C16:0; $P \leq 0,001$; 38,15 vs. 29,12%) y para el oleico (9c-C18:1; 10,43 vs. 8,41%). La influencia positiva de la T se detectó para otros compuestos del estudio, en su mayoría compuestos mayoritarios, con contenidos superiores al 7%. Por otro lado, bajo BD, las muestras tomadas de la capa lipídica no tuvieron influencia de la T, a excepción del ácido palmítico (C16:0; $P \leq 0,05$) que muestra un ligero descenso de 37,15% a 36,70% a 50°C.

Basándonos en los resultados de la tabla 3.2.6.1, 50°C fue seleccionada como la T más adecuada para las dos metodologías evaluadas (AD y BD). Esta T es menor que la empleada en otros ensayos publicados (Herzallah *et al.*, 2005; Giua *et al.*, 2013) que evaluaron el efecto MW en los FAME para evitar efectos no deseados en la distribución de los mismos, estudiando el efecto de distintos tratamientos térmicos, pasteurización (85°C), ebullición (96,3°C), UHT (140°C) y MW (95°C), obteniendo que éste último incrementa la formación de los isómeros trans. En el presente estudio se emplearon T inferiores a las citadas, para evitar este tipo de reacciones no deseadas.

Tabla 3.2.6.1. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto de la temperatura del proceso MW en el perfil de AG en leche

FAs	M-AD(%)						M-AD T
	T1 - 30°C		T2 - 40°C		T3 - 50°C		
	x	± s.e.	x	± s.e.	x	± s.e.	
C8:0	2,22	± 0,29	1,75	± 0,41	1,65	± 0,11	*
C10:0	7,67	± 0,24	7,21	± 0,38	7,51	± 0,62	NS
C12:0	7,16	± 0,14	6,95	± 0,26	7,50	± 0,41	NS
C14:0	15,57	± 0,49	16,25	± 0,50	17,51	± 0,27	***
9c-C14:1	0,92	± 0,08	0,93	± 0,08	1,09	± 0,02	NS
C15:0	1,05	± 0,11	1,17	± 0,04	1,31	± 0,07	NS
C16:0	36,40	± 0,95	38,36	± 0,81	37,40	± 0,67	**
9c-C16:1	0,48	± 0,12	0,48	± 0,07	0,54	± 0,15	NS
C17:0	0,30	± 0,04	0,29	± 0,04	0,34	± 0,09	NS
C18:0	8,30	± 0,47	8,98	± 0,73	9,54	± 0,45	***
9c-C18:1	9,97	± 0,16	9,85	± 0,54	9,72	± 0,14	NS
9c 12c-C18:2	0,89	± 0,36	0,84	± 0,23	1,01	± 0,35	NS
9c12c15c-C18:3	0,47	± 0,06	0,40	± 0,18	0,29	± 0,08	NS
11f-C18:1	0,72	± 0,08	0,80	± 0,03	0,97	± 0,15	NS
9c 11f-C18:2	0,38	± 0,10	0,43	± 0,11	0,48	± 0,14	NS
FAs	F-AD (%)						F-AD T
	T1 - 30°C		T2 - 40°C		T3 - 50°C		
	x	± s.e.	x	± s.e.	x	± s.e.	
C8:0	1,40	± 0,05	1,57	± 0,14	1,84	± 0,19	NS
C10:0	5,64	± 0,22	6,01	± 0,36	7,15	± 0,50	*
C12:0	5,85	± 0,16	6,30	± 0,40	7,52	± 0,44	**
C14:0	15,42	± 0,62	16,27	± 0,44	18,83	± 0,70	***
9c-C14:1	0,98	± 0,05	1,10	± 0,12	1,42	± 0,16	NS
C15:0	1,16	± 0,11	1,35	± 0,15	1,69	± 0,19	NS
C16:0	38,15	± 1,69	35,83	± 3,48	29,12	± 4,33	***
9c-C16:1	0,54	± 0,12	0,61	± 0,12	0,72	± 0,13	NS
C17:0	0,40	± 0,07	0,47	± 0,23	0,67	± 0,14	NS
C18:0	10,91	± 1,40	11,82	± 0,68	13,57	± 0,56	***
9c-C18:1	10,43	± 0,53	10,32	± 1,60	8,41	± 0,64	**
9c 12c-C18:2	0,93	± 0,42	1,07	± 0,28	1,04	± 0,38	NS
9c12c15c-C18:3	0,34	± 0,07	0,37	± 0,14	0,47	± 0,23	NS
11f-C18:1	1,04	± 0,23	1,31	± 0,32	1,88	± 0,22	NS
9c 11f-C18:2	0,47	± 0,15	0,68	± 0,23	0,97	± 0,28	NS
FAs	F-BD (%)						F-BD T
	T1 - 30°C		T2 - 40°C		T3 - 50°C		
	x	± s.e.	x	± s.e.	x	± s.e.	
C8:0	0,90	± 0,04	0,92	± 0,03	0,89	± 0,14	NS
C10:0	4,57	± 0,10	4,55	± 0,14	4,60	± 0,19	NS
C12:0	4,75	± 0,26	4,85	± 0,08	4,93	± 0,09	NS
C14:0	15,68	± 0,35	15,81	± 0,31	15,99	± 0,09	NS
9c-C14:1	1,03	± 0,06	1,03	± 0,08	1,07	± 0,09	NS
C15:0	1,38	± 0,03	1,33	± 0,02	1,36	± 0,06	NS
C16:0	37,15	± 1,48	37,41	± 0,71	36,70	± 1,26	*
9c-C16:1	0,67	± 0,03	0,64	± 0,03	0,67	± 0,04	NS
C17:0	0,70	± 0,03	0,66	± 0,03	0,72	± 0,06	NS
C18:0	14,31	± 0,35	14,17	± 0,11	14,35	± 0,50	NS
9c-C18:1	11,83	± 0,39	11,63	± 0,14	11,73	± 0,24	NS
9c 12c-C18:2	1,26	± 0,10	1,21	± 0,05	1,29	± 0,16	NS
9c12c15c-C18:3	0,50	± 0,06	0,43	± 0,02	0,50	± 0,14	NS
11f-C18:1	1,34	± 0,66	1,54	± 0,03	1,61	± 0,09	NS
9c 11f-C18:2	0,80	± 0,05	0,71	± 0,03	0,82	± 0,17	NS

Valores presentados como media±error standard de la media (n=9; tres T y tres réplicas para cada T). M leche, F capa lipídica, AD digestión ácida, BD digestión básica. NS no significativo P>0,05. *P≤0,05; **P≤0,01,***P≤0,001

Tras fijar en 50°C la temperatura óptima del proceso MW, se procedió a optimizar el **tiempo de reacción**, ensayándose el efecto del tiempo de acción de la energía MW durante 10, 20 y 30min. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.2.6.2.

Tabla 3.2.6.2. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto del tiempo de reacción del proceso MW en el perfil de AG en leche

FAs	M-AD (%)									M-AD
	t1 - 10min			t2 - 20min			t3 - 30min			
	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	
C8:0	1,45	±	0,36	1,16	±	0,38	1,06	±	0,62	NS
C10:0	7,57	±	0,16	6,94	±	0,26	7,07	±	0,36	NS
C12:0	7,69	±	0,44	7,41	±	0,28	7,88	±	0,09	NS
C14:0	16,52	±	1,17	16,95	±	0,61	17,87	±	0,33	***
9c-C14:1	1,18	±	0,10	1,15	±	0,08	1,30	±	0,02	NS
C15:0	1,24	±	0,08	1,38	±	0,04	1,44	±	0,03	NS
C16:0	32,75	±	1,43	33,33	±	0,87	31,93	±	1,39	**
9c-C16:1	0,76	±	0,03	0,77	±	0,02	0,80	±	0,01	NS
C17:0	0,40	±	0,05	0,47	±	0,04	0,51	±	0,03	NS
C18:0	9,06	±	0,36	9,83	±	0,37	10,01	±	0,24	**
9c-C18:1	11,14	±	0,15	11,32	±	0,27	11,57	±	0,37	NS
9c 12c-C18:2	1,82	±	0,14	1,79	±	0,05	1,98	±	0,05	NS
9c12c15c-C18:3	0,72	±	0,20	0,77	±	0,02	0,90	±	0,05	NS
11f-C18:1	1,02	±	0,08	1,11	±	0,11	1,17	±	0,02	NS
9c 11f-C18:2	0,62	±	0,08	0,62	±	0,01	0,74	±	0,03	NS
FAs	F-AD (%)									F-AD
	t1 - 10min			t2 - 20min			t3 - 30min			
	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	
C8:0	1,39	±	0,03	1,45	±	0,06	1,47	±	0,05	NS
C10:0	5,26	±	0,03	5,47	±	0,11	5,52	±	0,09	*
C12:0	5,53	±	0,04	5,77	±	0,11	5,84	±	0,12	*
C14:0	14,59	±	0,22	15,12	±	0,37	15,26	±	0,18	***
9c-C14:1	1,05	±	0,02	1,12	±	0,06	1,15	±	0,04	NS
C15:0	1,24	±	0,05	1,36	±	0,03	1,41	±	0,03	NS
C16:0	35,61	±	0,49	34,87	±	0,75	34,57	±	0,70	***
9c-C16:1	0,68	±	0,03	0,71	±	0,02	0,73	±	0,01	NS
C17:0	0,55	±	0,04	0,63	±	0,04	0,67	±	0,03	NS
C18:0	12,13	±	0,14	12,36	±	0,26	12,50	±	0,16	**
9c-C18:1	11,79	±	0,13	11,53	±	0,20	11,36	±	0,21	**
9c 12c-C18:2	1,47	±	0,13	1,48	±	0,07	1,48	±	0,04	NS
9c12c15c-C18:3	0,65	±	0,10	0,71	±	0,06	0,75	±	0,07	NS
11f-C18:1	1,39	±	0,08	1,51	±	0,06	1,55	±	0,03	NS
9c 11f-C18:2	0,84	±	0,10	0,92	±	0,07	0,97	±	0,07	NS
FAs	F-BD (%)									F-BD
	t1 - 10min			t2 - 20min			t3 - 30min			
	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	
C8:0	1,04	±	0,06	1,10	±	0,09	1,03	±	0,17	NS
C10:0	4,83	±	0,22	4,97	±	0,18	4,83	±	0,27	NS
C12:0	4,68	±	0,33	4,98	±	0,20	4,69	±	0,24	NS
C14:0	16,19	±	1,02	16,58	±	0,82	16,35	±	0,80	NS
9c-C14:1	1,12	±	0,07	1,12	±	0,10	1,13	±	0,11	NS
C15:0	1,47	±	0,08	1,46	±	0,11	1,42	±	0,10	NS
C16:0	35,12	±	3,53	33,93	±	2,83	34,90	±	2,89	NS
9c-C16:1	0,74	±	0,04	0,76	±	0,07	0,75	±	0,07	NS
C17:0	0,75	±	0,05	0,71	±	0,09	0,67	±	0,13	NS
C18:0	14,62	±	0,80	14,53	±	0,89	14,34	±	0,99	NS
9c-C18:1	12,10	±	0,67	12,46	±	0,60	12,50	±	0,58	NS
9c 12c-C18:2	1,22	±	0,10	1,16	±	0,10	1,11	±	0,20	NS
9c12c15c-C18:3	0,60	±	0,08	0,53	±	0,08	0,51	±	0,16	NS
11f-C18:1	1,41	±	0,10	1,52	±	0,20	1,33	±	0,17	NS
9c 11f-C18:2	0,85	±	0,09	0,78	±	0,09	0,72	±	0,21	NS

Valores presentados como media±error standard de la media (n=9; tres t y tres réplicas para cada t). M leche, F capa lipídica, AD digestión ácida, BD digestión básica. NS no significativo P>0,05. *P≤0,05; **P≤0,01;***P≤0,001.

Los resultados obtenidos mostraron que la AD tanto para muestras de leche líquida como de capa lipídica, presentan diferencias significativas en aquellos AG que también se vieron afectados por la variación de T, con la excepción del ácido caprílico (C8:0). En las muestras de leche líquida el aumento del tiempo de reacción ejerce un efecto positivo para el ácido mirístico (C14:0, $P \leq 0,001$), palmítico (C16:0, $P \leq 0,01$) y esteárico (C18:0, $P \leq 0,01$). En las muestras de la capa lipídica, el cáprico (C10:0), laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y esteárico (C18:0) están afectados positivamente, mientras que el palmítico (C16:0) y el oleico (9c-C18:1) están afectados negativamente. Con respecto a la BD, no mostró diferencias significativas para los diferentes tiempos de reacción en ninguno de los AG evaluados ($P > 0,05$).

Estudios anteriores, (Herzallah *et al.*, 2005; Giua *et al.*, 2013), observaron que el calentamiento por un tiempo prolongado, 30min a 63°C en condiciones aeróbicas, parece contribuir a la oxidación lipídica más que un calentamiento a mayor T durante menos tiempo (5min). Este resultado podría explicarse porque: el calentamiento a 63°C no es eficaz en la eliminación del oxígeno disuelto en la leche líquida, mientras que a 80°C, causa una eliminación de éste último. Sin embargo, este resultado no se observó en las condiciones experimentales del presente ensayo, debido a que la T de trabajo fue más suave (50°C máximo). De acuerdo con los resultados obtenidos, 30min fue seleccionado como tiempo óptimo de reacción en condiciones de AD y 10 min para BD.

Tras seleccionar 50°C y 30 min como condiciones óptimas para la AD y 50°C y 10min para la BD, se llevó a cabo la optimización del **ratio muestra/disolvente**. Se ensayaron dos ratios diferentes, en la AD para leche 0,5 y 1,0 g en 8mL de disolvente y 0,1 y 0,2 g para muestras de capa lipídica en 8mL de disolvente. Por su parte, para la BD, se ensayaron 40 mg y 160mg adicionando 8mL y 32mL de disolvente, respectivamente (ver detalles en el apartado III.2.5.1 y III.2.5.2). Los resultados obtenidos al realizar cada uno de estos ensayos se recogen en la tabla 3.2.6.3.

Tabla 3.2.6.3. Resultados del análisis estadístico de la evaluación del efecto del ratio muestra/disolvente del proceso MW en el perfil de AG en leche

FAs	M-AD (%)						F-AD (%)						F-BD (%)						M-AD	F-AD	F-BD
	R1(0,5g)			R2 (1,0g)			R1(0,1g)			R2 (0,2g)			R1 (40mg)			R2 (160mg)					
	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.	x	±	s.e.			
C8:0	1,36	±	0,06	2,27	±	0,05	1,54	±	0,04	1,48	±	0,05	1,12	±	0,03	1,25	±	0,04	**	NS	*
C10:0	6,53	±	0,04	7,95	±	0,11	5,16	±	0,14	4,91	±	0,11	5,25	±	0,05	5,38	±	0,10	***	NS	*
C12:0	6,18	±	0,48	6,79	±	0,11	4,79	±	0,21	4,51	±	0,33	5,42	±	0,08	5,49	±	0,07	NS	NS	NS
C14:0	14,91	±	0,57	12,82	±	0,24	14,06	±	0,40	13,54	±	0,36	15,84	±	0,03	15,86	±	0,25	***	**	NS
9c-C14:1	0,97	±	0,04	1,01	±	0,08	0,85	±	0,10	0,69	±	0,08	0,94	±	0,05	0,97	±	0,01	NS	NS	NS
C15:0	1,15	±	0,08	1,03	±	0,03	1,27	±	0,14	1,18	±	0,02	1,36	±	0,01	1,34	±	0,04	NS	NS	NS
C16:0	34,89	±	2,90	31,69	±	0,35	38,09	±	1,01	38,20	±	0,78	41,29	±	0,21	40,61	±	0,29	***	NS	***
9c-C16:1	0,73	±	0,01	0,75	±	0,05	0,63	±	0,05	0,62	±	0,02	0,67	±	0,01	0,67	±	0,02	NS	NS	NS
C17:0	0,38	±	0,03	0,37	±	0,03	0,49	±	0,13	0,44	±	0,07	0,61	±	0,01	0,59	±	0,04	NS	NS	NS
C18:0	9,46	±	0,54	8,56	±	0,16	12,53	±	0,52	12,54	±	0,20	11,25	±	0,14	11,12	±	0,14	*	NS	*
9c-C18:1	10,91	±	0,71	10,42	±	0,07	10,42	±	0,24	10,91	±	0,24	10,61	±	0,04	10,54	±	0,08	NS	*	NS
9c 12c-C18:2	2,22	±	0,07	2,69	±	0,12	1,10	±	0,09	1,27	±	0,05	0,87	±	0,02	0,84	±	0,03	NS	NS	NS
9c12c15c-C18:3	0,81	±	0,09	1,07	±	0,13	0,37	±	0,13	0,36	±	0,10	0,36	±	0,01	0,38	±	0,06	NS	NS	NS
11f-C18:1	1,07	±	0,06	1,14	±	0,19	0,98	±	0,13	0,87	±	0,07	1,26	±	0,04	1,26	±	0,04	NS	NS	NS
9c 11f-C18:2	0,73	±	0,05	0,87	±	0,06	0,37	±	0,08	0,34	±	0,04	0,30	±	0,02	0,35	±	0,09	NS	NS	NS

Valores presentados como media ± error standard de la media (n=6; dos ratios y tres réplicas por ratio). M leche, F capa lipídica, AD digestión ácida, BD digestión básica, R peso de muestra, NS no significativo (P>0,05)*P≤0,05; **P≤0,01;***P≤0,001

El ratio muestra/disolvente es un parámetro importante para que la reacción sea eficiente, puesto que el volumen de disolvente debe ser suficiente para asegurar que toda la muestra está inmersa en él, especialmente cuando la matriz de la muestra absorberá disolvente en el proceso. Investigaciones anteriores de Sparr y Björklund (2000), han puesto de manifiesto, que la proporción de muestra en la mezcla de reacción no debería exceder 30-34% (w/v). En las técnicas convencionales, un aumento del volumen de disolvente, incrementaría la recuperación, pero en MAED, podría generar menores recuperaciones, y por ello menor sensibilidad y precisión en el análisis. Este efecto podría deberse a una agitación inadecuada del disolvente en el MW. En este estudio, los ratios estudiados estaban comprendidos en el intervalo 0,5-12% y los resultados reflejan que para las muestras de leche, el ácido mirístico (C14:0; P≤0,001), ácido palmítico (C16:0; P≤0,001) y ácido esteárico (C18:0; P≤0,05) mostraron diferencias significativas con valores más altos para 0,5 g que para 1,0 g de muestra. Este efecto positivo significativo es observado para todos los compuestos mayoritarios, con un contenido superior al 9%, excepto para el ácido oleico (que no mostró significación). Solamente el ácido caprílico (C10:0; P≤0,001) presentó valores mayores para 1,0 g de muestra (2,27 vs. 7,95%) que para 0,5 g de muestra (1,36 vs. 6,53%).

En las muestras de capa lipídica y AD, sólo dos AG mostraron diferencias significativas. El contenido en ácido mirístico (C14:0; P≤0,01) fue mayor empleando 0,1 g que 0,2 g (13,54±0,36% vs. 14,06±0,40%) y el ácido oleico (9c-C18:2; P≤0,005) mostró un contenido de 10,91±0,24% para 0,2g y 10,42±0,24% usando 0,1g.

En las muestras tomadas en la capa lipídica y transesterificación mediante BD, los resultados mostraron que los ácidos caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) están en mayor porcentaje para 160mg que para 40mg (1,25 y 5,38% vs. 1,12 y 5,25% respectivamente) a un nivel de significación de $P \leq 0,05$. Como ocurre para leche líquida en AD, los compuestos con un porcentaje superior al 9% están afectados por el ratio muestra/disolvente, y mostraron valores más bajos para cantidades mayores de muestra, como el ácido palmítico (C16:0, $P \leq 0,001$) y el esteárico (C18:0, $P \leq 0,05$) con valores de 41,29% y 11,25% para 40 mg y 40,61% y 11,12 para 160 mg, respectivamente. Teniendo en cuenta estos resultados, se observan distintos efectos en los compuestos mayoritarios cuando los comparamos con otros AG más minoritarios. Un exceso de muestra podría dar lugar a un efecto de saturación y en consecuencia una disminución de la extracción y transesterificación de los AG mayoritarios. A la vista de estos resultados, 0,5 g de leche líquida y 1,0 g de capa lipídica fueron seleccionados como cantidades óptimas en condiciones AD y 40 mg de capa lipídica fue seleccionada como cantidad de muestra óptima para condiciones BD.

Resumiendo todos estos resultados obtenidos, las **condiciones experimentales óptimas** seleccionadas para el proceso MW fueron 50°C, 30 min y 0,5 g de muestra para leche líquida en condiciones de AD y 50°C, 10 min y 40 mg de muestra en forma de capa lipídica para las condiciones BD.

III.2.7. MAED vs. metodología de referencia.

Las condiciones seleccionadas para la metodología mediante MW se consideran adecuadas para el tratamiento de la muestra de referencia de grasa de mantequilla, es decir, 0,1 g en AD y 40 mg en BD. Este material ha sido descrito previamente en la sección III.2.4. Instrumentación y reactivos y los resultados obtenidos sobre dicho material se compararon con aquellos obtenidos mediante el empleo de la metodología de referencia.

Los valores límites de **repetibilidad** y **reproducibilidad** abarcan la preparación de los FAME y su análisis mediante GC-MS de acuerdo con la norma ISO15885/IDF184 y fueron evaluados según sus límites. El ácido cáprico (C6:0), no obstante, fue descartado del estudio, ya que eluía muy próximo al frente de disolvente en las condiciones cromatográficas seleccionadas para este ensayo.

La **exactitud** fue evaluada comparando los resultados obtenidos mediante la aplicación del método de referencia vs. la metodología MAED en condiciones BD y AD. Los resultados se muestran en la tabla 3.2.7.1. La metodología MW mediante BD

muestra una exactitud entre 80-120% para valores menores de 0,5%, entre 90-110% para valores entre 0,5-5% y entre 95-105% para valores superiores a 5%. Como puede observarse AD muestra valores supervalorados para C8:0, C10:0, C12:0, C16:0 e infravalorados para C17:0, C18:0, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2, 11f-C18:1 y 9c11f-C18:2 frente a BD.

Tabla 3.2.7.1. Evaluación de la exactitud para la determinación de AG en leche mediante metilación por MW y empleando catálisis ácida (AD) o básica (BD)

AG	MW-AD (%)		MW-BD (%)		Ref Method (%)		Exactitud(%)	
	media	s.e.	media	s.e.	media	s.e.	MW-AD	MW-BD
C8:0^a	1,53 ± 0,10		1,28 ± 0,06		1,30 ± 0,02		118	90
C10:0	5,27 ± 0,08		4,52 ± 0,15		4,35 ± 0,24		121	104
C12:0	6,39 ± 0,06		6,05 ± 0,10		5,83 ± 0,07		110	104
C14:0^a	12,42 ± 0,52		12,31 ± 0,31		12,18 ± 0,91		102	101
9c-C14:1	0,61 ± 0,30		0,75 ± 0,03		0,72 ± 0,03		85	104
C15:0	1,36 ± 0,20		1,58 ± 0,04		1,49 ± 0,02		91	106
C16:0	44,38 ± 0,99		41,57 ± 0,55		41,50 ± 0,63		107	100
9c-C16:1	0,75 ± 0,10		0,90 ± 0,02		0,83 ± 0,02		90	108
C17:0	0,43 ± 0,21		0,70 ± 0,03		0,62 ± 0,02		69	113
C18:0	12,00 ± 1,32		14,39 ± 0,19		13,89 ± 0,15		86	104
9c-C18:1	9,84 ± 0,42		10,56 ± 0,13		10,46 ± 0,12		94	101
9c 12c-C18:2^a	2,13 ± 0,43		2,76 ± 0,11		2,55 ± 0,07		84	108
9c 12c 15c-C18:3^a	0,27 ± 0,08		0,34 ± 0,03		0,33 ± 0,03		96	113
11f-C18:1	0,51 ± 0,02		0,63 ± 0,03		0,58 ± 0,02		88	109
9c 11f-C18:2	0,24 ± 0,01		0,35 ± 0,03		0,32 ± 0,02		75	109

AD-MW digestión ácida MW, BD-MW digestión básica MW, s.e. error estándar de la media (n=18; nueve muestras y dos réplicas); ^a AG con valores de referencia. Valores en rojo, no cumplen criterios de la Norma.

Finalmente, estas metodologías se compararon con los valores de referencia de la muestra de grasa de mantequilla (ver tabla 3.2.4.1) empleando como muestra a analizar dicho material. El procedimiento BD, proporciona mejores recuperaciones, definiendo estas como el ratio de los valores observados respecto al valor de referencia. Estos resultados fueron 91, 112, 91 y 89% para C8:0, C14:0, 9c12c-C18:2 y 9c12c15c-C18:3 respectivamente en condiciones de BD, y de 109, 114, 71 y 71% para las condiciones de AD.

La **precisión** fue evaluada para AD y BD analizando los coeficientes de variación (CV), valores de repetibilidad y diferencias máximas. La repetibilidad fue calculada como la diferencia máxima permitida entre dos análisis en condiciones de repetibilidad: $2 \times \sqrt{2} \times \sigma(\text{repetibilidad})$.

Para AG presentes en porcentajes superiores al 5%, se permite un máximo de 5% (con un máximo absoluto de 1 g por 100 g) y para AG presentes en porcentajes 1-5%, un máximo de 12% (con un máximo de 0,5 g en 100g) según ISO15885/IDF184. Como se muestra en la tabla 3.2.7.2, la BD presenta valores que cumplen los criterios

establecidos de repetibilidad, sin embargo la AD no cumple estos criterios para varios compuestos, no sólo saturados (C14:0, C15:0, C16:0 y C18:0), sino también insaturados (9c-C16:1, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2, 9c12c15c-C18:3). Estos resultados son similares a los obtenidos para los ensayos realizados sobre muestra de capa lipídica en ambas condiciones AD y BD.

Tabla 3.2.7.2. Evaluación de la precisión para la determinación de AG en leche mediante metilación por MW y empleando catálisis ácida (AD) o básica (BD)

FAs	Material de Referencia						Capa lipídica					
	BD-MW			AD-MW			BD-MW			AD-MW		
	CV	Repetibilidad	MAX-Dif	CV	Repetibilidad	MAX-Dif	CV	Repetibilidad	MAX-Dif	CV	Repetibilidad	MAX-Dif
C8:0	2,26	0,06	0,06	6,78	0,29	0,28	2,60	0,08	0,08	2,45	0,11	0,12
C10:0	1,39	0,18	0,18	1,57	0,23	0,20	1,04	0,15	0,14	2,67	0,39	0,32
C12:0	1,49	0,23	0,23	0,99	0,18	0,15	1,55	0,24	0,17	4,39	0,59	0,61
C14:0	0,84	0,36	0,36	4,15	1,46	1,23	0,22	0,10	0,10	2,88	1,14	1,19
9c-C14:1	2,87	0,07	0,08	4,18	0,09	0,08	5,21	0,14	0,10	12,06	0,29	0,25
C15:0	3,00	0,13	0,11	14,97	0,58	0,55	0,39	0,01	0,01	10,85	0,39	0,35
C16:0	0,89	1,01	0,78	7,91	9,93	9,08	0,50	0,59	0,61	2,65	2,85	2,92
9c-C16:1	1,99	0,05	0,05	13,83	0,29	0,27	0,97	0,02	0,02	7,14	0,13	0,10
C17:0	5,66	0,10	0,10	7,03	0,10	0,09	1,82	0,03	0,03	25,89	0,36	0,30
C18:0	1,42	0,54	0,52	11,03	3,74	3,41	1,23	0,39	0,30	4,16	1,47	1,37
9c-C18:1	0,86	0,27	0,26	4,23	1,18	1,08	0,39	0,12	0,11	2,27	0,67	0,58
9c 12c-C18:2	4,06	0,26	0,24	20,34	1,23	1,14	1,89	0,05	0,05	8,40	0,26	0,24
9c12c15c-C18:3	10,50	0,09	0,08	30,38	0,23	0,24	3,08	0,03	0,02	34,56	0,36	0,33
11f-C18:1	5,46	0,08	0,08	49,14	0,60	0,53	3,53	0,13	0,09	13,44	0,37	0,31
9c 11f-C18:2	7,02	0,05	0,04	4,64	0,03	0,03	6,54	0,06	0,04	21,42	0,23	0,21

AD-MW digestión ácida MW, BD-MW digestión básica MW, CV coeficiente de variación (%); Repetibilidad: $2 \cdot \sqrt{2} \cdot$ desviación estándar de repetibilidad; MAX-Dif: Diferencia máxima entre los valores más altos y más bajos para ese AG; posición sin sombreado: AG 1-5%; posición sombreada: AG >5%. Valores en rojo no cumplen criterios de la Norma.

La caracterización y validación de la metodología MW mediante AD nos lleva a descartarla como análisis de rutina. Por el contrario, la precisión y la exactitud obtenidos para la metodología MW mediante BD son similares a las obtenidas por la metodología de referencia de acuerdo con los requerimientos de la norma ISO15885/IDF184.

Una vez seleccionada la metodología mediante BD, se estudió su **reproducibilidad** mediante nueve experimentos. Tres bombas de MW se usaron para el ataque de 40 mg de muestra de capa lipídica en cada una, mediante tres programas de MW, que fueron ensayados en días distintos.

Lo resultados mostraron que el análisis MAED de los FAME obtenidos permite obtener datos reproducibles, que cumplen los requerimientos de la norma ISO15885/IDF184: 15% de reproducibilidad (con máximo de 4 g por 100 g) para AG presentes en un porcentaje mayor al 5%) y 20% de reproducibilidad (con un máximo de 1 g por 100 g) para AG presentes en porcentajes comprendidos entre 1-5%.

De los ensayos realizados puede concluirse que la transmetilación/extracción de muestras de leche mediante digestión básica MW, puede considerarse una alternativa novedosa y viable para el análisis de AG en muestras de leche, cumpliendo los

parámetros de exactitud y precisión que marcan las normas de análisis de referencia para estos compuestos.

III.3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO Y ESTUDIO DE SU REPERCUSIÓN EN LOS NIVELES DE ELEMENTOS TRAZA EN LECHE DE VACA.

III.3.1. INTRODUCCIÓN

Se denominan alimentos funcionales, aquellos que consumidos regularmente, producen un beneficio específico en la salud, además de sus propiedades nutricionales (Bernal *et al.*, 2011). La frontera entre “nutraceútico” y “alimento funcional” no parece estar clara, siendo la principal diferencia la forma de consumirlo: los nutraceúticos son consumidos en forma de cápsulas, pastillas, ampollas, etc., mientras que los alimentos funcionales son consumidos como alimentos comunes. Hoy en día existen diversas estrategias para mejorar el contenido de nutrientes funcionales en los alimentos aumentando así su beneficio en la salud humana. Dentro de este ámbito, la leche suscita un enorme interés, dada su relevancia en la dieta humana, al ser consumida desde la infancia hasta la ancianidad.

La leche es una excelente fuente de macronutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos) y de micronutrientes (vitaminas, enzimas y minerales). De hecho, es una fuente ideal de macroelementos como el Ca, K y P y de elementos traza como Fe, Cu, Se, Zn, Co y I (Tabla 3.3.1.1). Estos elementos traza son esenciales cuando su ingesta insuficiente produce deficiencias funcionales, cuando el organismo no puede completar su ciclo vital sin él por estar involucrados en sus procesos metabólicos y su efecto no puede ser logrado completamente por ningún otro elemento. Son, por tanto, vitales en el soporte de funciones fisiológicas humanas. Su deficiencia está relacionada con trastornos severos y su sobredosis los convierte en tóxicos.

Tabla 3.3.1.1. Concentraciones de Cu, Co, I, Se y Zn en leche de vaca en el noroeste de España ($\mu\text{g L}^{-1}$)

Elemento	Función	μL^{-1}
Co	componente principal vitamina B ₁₂	4,18-5,56
Cu	co-factor enzimas	38,3-64,5
Fe	transporte O ₂ , constituyente de enzimas	338-468
I	función hormonal (síntesis hormonas tiroideas)	71-6536
Se	antioxidante, anti-carcinogénico, forma parte de la enzima GSHPx	8,3-36,2
Zn	co-factor de enzimas	2957-4154

(Adaptada de Rey-Crespo *et al.*, 2013)

Diversos estudios se han enfocado al contenido y distribución de estos **elementos esenciales** en leche procedente de distintas especies animales. Los resultados muestran que el contenido varía considerablemente y que la composición parece estar afectada por factores genéticos, físicos y ambientales. En el caso de los bovinos, la información acerca de la relación entre la variación genética del animal y el contenido mineral en la leche es limitada (van Hulzen *et al.*, 2009). Otros estudios en cambio han establecido que no existen fuentes genéticas en la variación del contenido mineral, demostrando que es consecuencia del estado de lactación, el estatus nutricional y el clima (Cashman, 2006; Gaucheron, 2005; Phipps *et al.*, 2008). Así, existen estudios sobre la dependencia del contenido y factores genéticos y no genéticos, el estado de lactación (van Hulzen *et al.*, 2009; Pechová *et al.*, 2008b), la región (Sola-Larrañaga y Navarro-Blasco, 2009) y también estudios de especiación en cuanto a su presencia en la leche (Hoac *et al.*, 2007). Estos elementos traza adquieren gran relevancia en las leches fórmula de alimentación infantil ya que están enormemente involucrados en un gran número de procesos. Con respecto a los estudios de especiación, la finalidad de los mismos es mejorar las leches comerciales mediante un conocimiento más detallado de la biodisponibilidad de estos elementos en la leche materna, de ahí las investigaciones relacionadas con la especiación en leches fórmula basadas en leche de vaca vs. leche materna (de la Flor St. Remy *et al.*, 2004b; Fernández Sánchez *et al.*, 2012).

El **Zn**, es co-factor de más de 200 enzimas involucradas en procesos biológicos, particularmente enzimas que participan en la síntesis de proteínas. Otros procesos celulares afectados por este elemento son por ejemplo la síntesis del ADN, la

reproducción, la formación ósea, el crecimiento y la cicatrización de las heridas (Barceloux, 1999).

El **Cu** es un nutriente esencial para todas las especies estudiadas hasta la fecha. Su déficit puede contribuir al desarrollo y progresión de numerosas enfermedades, incluyendo la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. Su deficiencia durante el embarazo puede generar malformaciones en el feto y anomalías neurológicas e inmunológicas (Uriu-Adams, J. y Keen, C. L., 2005). Junto con el Zn, forma parte de la enzima superóxido-dismutasa, que lleva a cabo funciones antioxidantes intracelulares (Tuncer *et al*, 1999). Forma también parte de la ceruloplasmina, una poderosa enzima antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1990) y también han sido documentados sus efectos antiinflamatorios, tanto en animales como en humanos (Milanino *et al.*, 1993).

El **Co** es el componente principal de la vitamina B12 (Finley *et al.*, 2012). Es una molécula compleja y asimétrica que recuerda la estructura de la hemoglobina (ver figura 3.3.1.1). En función del grupo funcional unido a la posición β del Co (por ejemplo Ciano, CN-; hidroxilo, OH-; metilo, Me-), se forman distintas especies (Yanes y Miller-Ihli, 2004). Las cobalaminas se encuentran de forma natural en los alimentos de origen animal como la carne, leche y productos lácteos. Las formas más abundantes en la leche y los lácteos son las hidroxocobalaminas y las metilcobalaminas. La vitamina B12 juega un papel importante en el desarrollo de muchas funciones actuando como coenzima para la síntesis del ADN, el desarrollo y crecimiento celular, metabolismo de carbohidratos, síntesis de proteínas y el desarrollo y mantenimiento de la mielina alrededor de las células nerviosas. Su deficiencia está unida a diversos problemas de salud incluidos desórdenes neurológicos y hematológicos. Son grupos de riesgo en cuanto a la deficiencia de esta vitamina, los ancianos, los vegetarianos y las personas que han sufrido un *bypass* gástrico (Provenzale *et al.*, 2002).

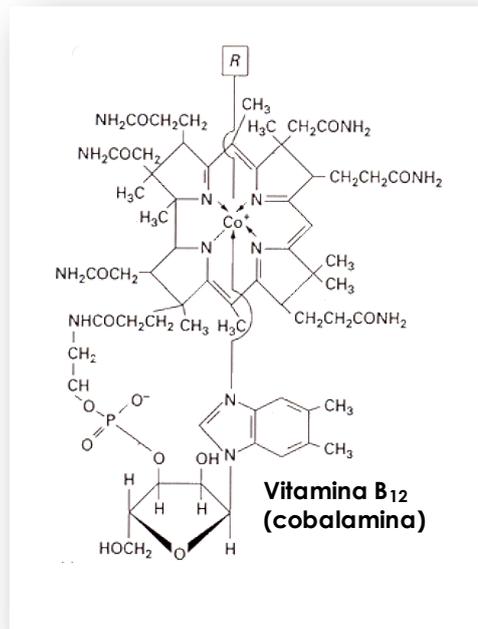


Figura 3.3.1.1. Estructura molecular de la Vitamina B12 (Cobalamina)

El **I** es uno de los elementos traza más importante en la nutrición humana. Su función fisiológica como constituyente de la tiroxina, hormona secretada por la glándula tiroidea, requiere el control de los niveles de consumo, ya que un exceso o defecto tiene un efecto negativo sobre la función tiroidea (Gunnarsdottir y Dah, 2012). El **I** es un elemento esencial en la dieta de los mamíferos, siendo necesario para la síntesis de las hormonas tiroideas (Haldimann *et al.*, 2005): tiroxina o T4 (3,5,3',5'-tetrayodotironina) y su forma activa tironina o T3 (3,5, 3'-triyodotironina). Las hormonas tiroideas juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo del cerebro y del sistema nervioso central y en el control de los procesos metabólicos de carbohidratos, grasas, proteínas y minerales.

Centrándose en los elementos objeto de estudio, el **Se** concretamente, juega un importante papel en diversos procesos biológicos a través de la acción de las selenoproteínas que tienen una importante función antioxidante y detoxificante en el organismo humano. Es necesario para la formación y el funcionamiento de al menos trece proteínas y componentes de la enzima glutatión peroxidasa (GSHPx), principalmente en forma de selenocisteína. Existen estudios publicados sobre su efecto anti-carcinogénico, especialmente en el cáncer de próstata y en algunos tipos de cáncer gástrico (Klein *et al.*, 2003; Fernández-Banares *et al.*, 2002; Schrauzer 2000; Hyo Ji *et al.*, 2012; Nicastro y Dunn, 2013). Su deficiencia, en casos extremos, causa severas cardiomiopatías y anomalías. El suplemento de Se de 200 $\mu\text{g día}^{-1}$ ha

demostrado reducir el riesgo de incidencia de cáncer de pulmón, próstata y colorrectal en humanos (Combs, 200; McIntosh *et al.*, 2014).

La importancia del **Se** en la nutrición humana data de 1979, año en el que se descubrió su efecto profiláctico en la enfermedad de Keshan. El papel clave de Se está relacionado con las importantes funciones de las selenoproteínas, en las que el Se juega un papel estructural y enzimático. Además de su esencial papel como antioxidante, con sus trascendentales implicaciones protectoras contra los radicales libres, el Se también actúa como catalizador para la producción de hormona activa tiroidea, y es necesario para el funcionamiento del sistema inmune. El déficit de este elemento se asocia a la aparición de trastornos del ánimo, y una ingesta elevada parece asociarse con una reducción del riesgo de cáncer. Como otros micronutrientes, el Se debe obtenerse de la dieta. Sin embargo, la concentración de Se es muy variable, porque está directamente relacionada con la concentración de Se en el suelo de las áreas donde se producen los alimentos (Mercadal *et al.*, 2015).

Suplementación de Se. Desde el punto de vista de la nutrición humana y focalizándose en el contenido de Se en leche (tabla 3.3.1.1), éste es generalmente bajo, si se compara con la ingesta diaria recomendada (3.3.1.2). Sin embargo, actualmente es técnicamente posible aumentar las concentraciones de Se en leche mediante la suplementación con Se en las dietas del vacuno lechero (Heard *et al.*, 2007; Juniper, *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2010). Ello ofrece una alternativa para proporcionar un aporte extra de Se en la leche y aliviar las deficiencias del mismo mediante la ingesta de un alimento tan común como la leche, beneficiando así la salud humana.

Tabla 3.3.1.2. Cantidades Diarias Recomendadas (CDR) para Co, Cu, I, Se y Zn

	CDR
Co	2,5 µg B ₁₂
Cu	1mg
I	150 µg
Se	55 µg
Zn	10mg

Fuente: Real Decreto 1669/2009

Existen diversos estudios que muestran el efecto de la suplementación de Se en la producción láctea, para conseguir concentraciones supra-nutricionales de Se (Ceballos *et al.*, 2009; Stockdale *et al.*, 2011), empleando diferentes formas de suplementación (Weiss, 2003) y estudiando su efecto en la especiación de Se (Muñiz-Naveiro *et al.*, 2007) en leche, sangre, y en el queso o el yogurt fabricados con la leche obtenida de animales suplementados (Phipps *et al.*, 2008; Pechová *et al.*, 2008a). La

suplementación de Se puede realizarse mediante dos formas fundamentales, **Se inorgánico**, en forma de sales como selenito sódico o selenato sódico, o en forma de **Se orgánico**, como levaduras enriquecidas en Se en las que la Selenometionina es la forma predominante de Se. En la Unión Europea ambas formas están aprobadas y su uso como suplemento en la dieta animal está permitido hasta dosis máximas de 0,5 mg SeKg⁻¹ de pienso completo, de un contenido en humedad del 12% (Diario Oficial de la Unión Europea, 2014 y 2015). Empleando tasas de suplementación similares, el uso del Se orgánico en forma de levaduras produce un aumento de Se en leche y sangre superior al Se inorgánico, indicando con ello una mejor biodisponibilidad de la forma orgánica (Weiss 2003; Ceballos *et al.*, 2009). Incluso, las nuevas generaciones de suplementos para el ganado se han enfocado en la forma orgánica más eficaz dentro de la suplementación con Se orgánico, la L-selenometionina (figura 3.3.1.2)

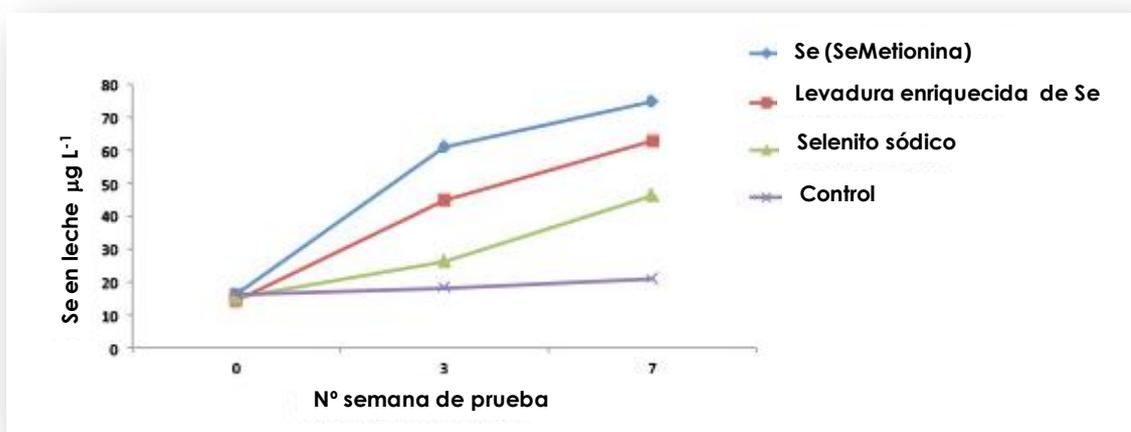


Figura 3.3.1.2. Concentración de Se en leche en función del tipo de suplementación y semana de tratamiento. (Fuente: Orffa/Excential)

Es necesario destacar que el metabolismo mineral juega un papel importante, ya que existen diferencias en las pautas de absorción, transporte, excreción, tasa de renovación de los tejidos y control homeostático entre los elementos minerales. Estos procesos están en equilibrio mediante las distintas formas en que el elemento pueda presentarse y están influidas por el pH de los fluidos del organismo, la presencia de otros minerales, secreciones hormonales o la adición de quelatos. La proporción de mineral que se absorbe en el animal varía según el mineral. Así la utilización del Se ingerido por los alimentos incluye su absorción, transporte, excreción y distribución en los tejidos junto con la transformación metabólica a la forma bioquímica activa.

Ciertos estudios, muestran efectos adversos de la suplementación de Se en el enlace Zn-citrato en el caso de la leche humana (Brätter *et al.*, 1998; Kantola & Vartiainen, 2001; Michalke, 2006). Sin embargo, no existen mucha información publicada sobre el **impacto** de la suplementación de Se en el contenido total de algunos elementos traza como el Zn, Co, Cu y I en leche de vaca. En su mayoría, están enfocados en el perfil de distribución de estos elementos en el suero lácteo como por ejemplo Hoac *et al.* (2008), mostrando una distribución inalterada del Zn y el Cu tras la suplementación.

Ciclo biológico del Se. La homeostasis se podría definir como "la situación de relativa uniformidad que tiene lugar como consecuencia de los ajustes de los seres vivos a los cambios en su medio". Es decir, aunque el animal consuma minerales altamente variables mantiene constante los niveles de los elementos minerales funcionales en los tejidos, gracias a un control homeostático. La gran variación en el consumo y el rendimiento normal es consecuencia de este último. Refiriéndose al Se, casi todo el que se ingiere (70-100%) es absorbido principalmente en el intestino delgado (duodeno) y ciego, sin ningún tipo de control homeostático o fisiológico aparente. Este hecho implica que la cantidad de Se que es absorbida por el organismo depende de la biodisponibilidad de las selenoespecies en el intestino y de su concentración. La absorción del Se inorgánico no es un proceso activo ya que el 90% del Se absorbido es transportado por una proteína. Sin embargo en el caso del Se orgánico, el tipo de transporte difiere según el aminoácido de que se trate: para la selenometionina es un transporte activo, interfiriendo la metionina en su absorción; en cambio para la selenocisteína el transporte es pasivo pues la mayor parte lo hace unido a una proteína. El Se absorbido es distribuido a través de la sangre por los órganos y tejidos, encontrándose las mayores concentraciones en hígado y riñones (figura 3.3.1.3).

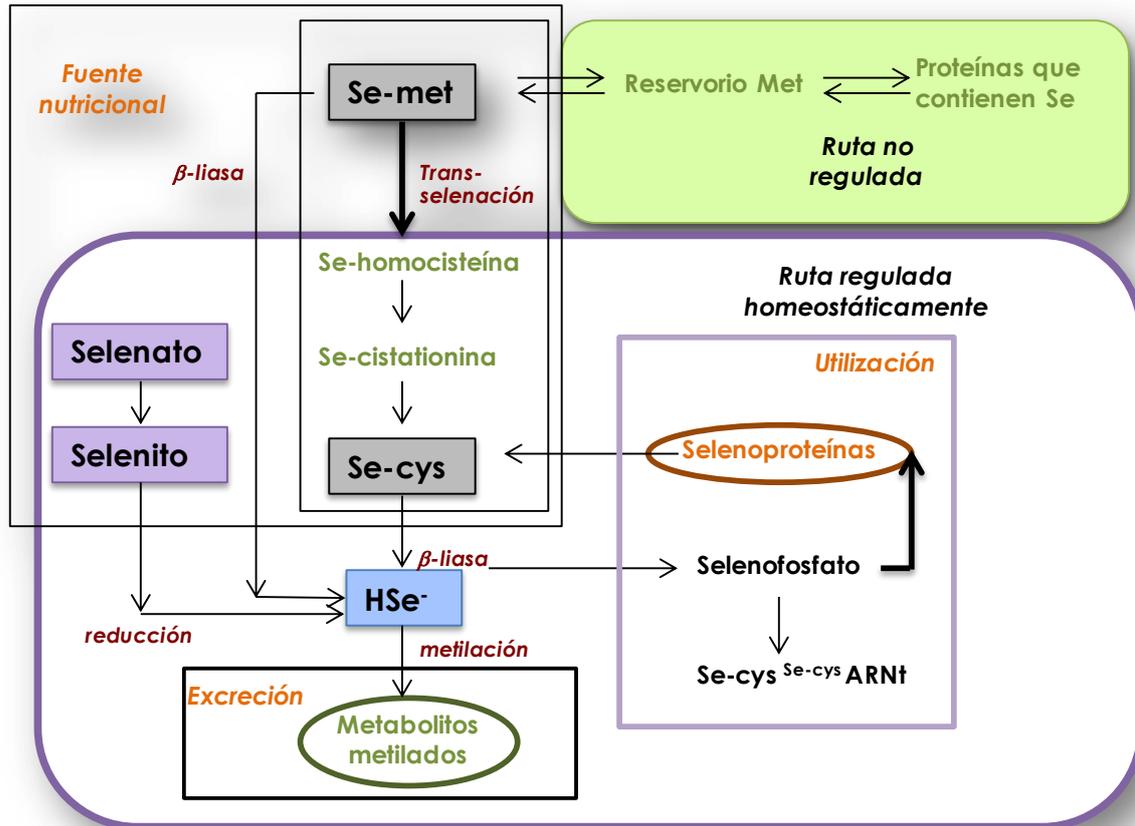


Figura 3.3.1.3. Ruta metabólica del Se
 (Fuente: adaptada de Suzuki, 2005)

Como puede verse en la figura 3.3.1.3, las formas orgánicas e inorgánicas del Se son transformadas en un producto intermedio común, que es posteriormente utilizado en la síntesis de selenoproteínas donde es incorporado como aminoácido único, la selenocisteína (Se-Cisteína). Por lo general, este intermedio común (metabolito clave) se asume que es el seleniuro (Se^{2-}) (Suzuki, 2006) o seleniuro de hidrógeno (HSe^-), aunque es un compuesto altamente reactivo y no es probable que se encuentre en su forma libre. La ruta metabólica del Se inorgánico (selenito o selenato) es más sencilla que la del Se orgánico, que implica la fragmentación de reductora del enlace C-Se mediante la enzima β -liasa. La selenometionina (Se-metionina), es transformada en Se-Cisteína mediante un proceso de trans-selenización. A partir del seleniuro se forma selenofosfato a través de un proceso catalizado por la enzima selenofosfato sintetasa, en el que el nucleótido ATP (adenosín trifosfato) es responsable de la fosforilación. El Se es transferido desde el selenofosfato a una molécula de ARN de transferencia (ARNt) que originalmente transporta serina, pero es transformado en ARNt-Se-cisteína (SeCys-ARNt) por acción de la enzima Se-cisteína sintetasa. El ARNt transporta la Se-cisteína hasta los ribosomas para incorporarla a la cadena proteica a través del codón UGA (González-Iglesias, 2010).

Aparte de esta ruta metabólica común para todas las especies de Se, la Se-metionina puede seguir otra ruta por la que es incorporada intacta a proteínas, de forma inespecífica, en lugar de la metionina (pues el organismo no es capaz de diferenciar ambas moléculas). Estas proteínas que contienen Se-metionina, se clasifican como “proteínas que contienen Se” (figura 3.3.1.4), de las que no se conoce una función biológica específica, excepto la de ser un pool biológico de Se (Butler *et al.*, 1989). Esta incorporación de selenometionina a proteínas, no está regulada por ningún mecanismo homeostático.

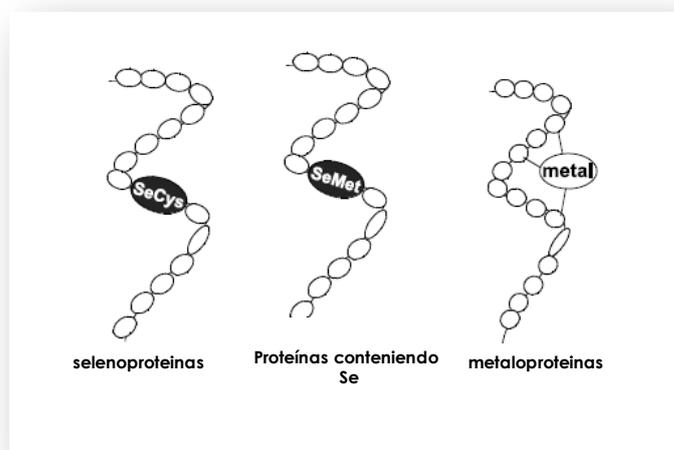


Figura 3.3.1.4. Diferencia entre selenoproteínas, proteínas que contienen Se y metaloproteínas. (Fuente: adaptada de Suzuki, 2005)

Análisis de elementos traza. En la actualidad existen numerosas técnicas analíticas para la cuantificación de los elementos traza en leche. La electroforesis capilar (Suárez-Luque *et al.*, 2007), la espectrometría de absorción atómica (Rahimi *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2010; Bilandzic *et al.*, 2011), la voltamperometría “stripping” (Munóz and Palmero, 2004) se han empleado para determinar metales en leche, aunque actualmente el ICP-MS (Prohaska *et al.*, 2000; Benincasa *et al.*, 2008; Herwig *et al.*, 2011) y el ICP-AES (Yamawaki *et al.*, 2005; Birghila *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2010) son las técnicas más usuales al permitir la cuantificación simultánea de distintos elementos.

El **ICP-MS** es una técnica poderosa para el análisis elemental de matrices biológicas (Sarmiento-González *et al.*, 2008), incluida la leche, dado sus capacidades multielementales y bajos límites de detección (Rivero Martino *et al.*, 2001; de la Flor St. Remy *et al.*, 2004a). El análisis de los elementos traza Co, Cu, Se y Zn, es sencillo; se cuantifican previa mineralización ácida en MW. Sin embargo, tanto para el ataque en MW como para la cuantificación del I mediante ICP-MS, existen una serie de inconvenientes. Primeramente, en la preparación de la muestra de leche para el

análisis, es necesario evitar las pérdidas debido a su volatilidad y a su compleja química redox. A pH bajo el yoduro se oxida fácilmente a I molecular. A alto pH se evita esta oxidación, por lo que es frecuente y conveniente la preparación de las muestras en medio alcalino, como amoníaco (NH₃), hidróxido potásico (KOH) o hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (Vieira *et al.*, 2015).

Con respecto a los inconvenientes relacionados con la cuantificación de I mediante ICP-MS, es necesario señalar que este elemento tiene un alto nivel de detección en comparación con otros elementos debido a su alto potencial de ionización (10,45eV). El segundo son los posibles efectos memoria, debido a la evaporación del I como HI o I₂ desde las gotas que se forman en el aerosol de la cámara de nebulización del ICP-MS. Además, las interferencias de los iones ¹²⁹I⁺, ¹²⁹Xe⁺ y posiblemente los iones ¹²⁷HI₂⁺, hacen que el empleo de una cámara de reacción/colisión con O₂ o He como gas sea una opción adecuada para este tipo de análisis (Reid *et al.*, 2008).

III.3.2. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo es la evaluación del efecto de la suplementación con Se orgánico de la ración de vacas lecheras y su repercusión en el contenido de los oligoelementos Zn, Cu, Co y I mediante la técnica de ICP-MS.

III.3.3. METODOLOGÍA ESTUDIADA

III.3.3.1. Diseño experimental y toma de muestras

El estudio se llevó a cabo durante nueve semanas con un rebaño de ocho vacas de raza Holstein-Freisian multíparas y primíparas, en el segundo tercio de lactación y de producción láctea diaria comprendida entre 15-30L. Este grupo fue dividido en cuatro subgrupos (dos vacas por grupo) y sometidos a cuatro dosis distintas de suplementación de Se en la ración: D0, grupo sin suplementación (grupo de control), D1, D2 y D3 con contenidos crecientes de Se en la ración. Estas concentraciones de Se no pueden ser detalladas debido a cuestiones de confidencialidad, al tratarse de un estudio realizado por el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes de SERIDA para una empresa de producción láctea. El Se empleado en la suplementación fue un derivado de levaduras provenientes de *Sacchromyces cerevisiae* de conteniendo un 63% de Se-metionina y un 36% de otros componentes orgánicos con Se.

Las vacas fueron ordeñadas a las 7:30 de la mañana y 19:30 de la tarde diariamente. Las muestras de leche se recogieron haciendo uso de un muestreador automático asociado a un sistema automático que utiliza el rebaño experimental de producción

de leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA, el cual se muestra en la Figura 3.3.3.1.1., en envases estériles de plástico de aproximadamente 40mL de capacidad. El sistema automatizado registra la cantidad de leche producida por cada animal en cada ordeño.



Figura 3.3.3.1.1. Sistema automatizado de ordeño del rebaño experimental de leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes de SERIDA. 1: Robot de ordeño; 2: Vaca en ordeño; 3: Muestreador automático.

Cada una de las muestras de leche para cada vaca y día estaba constituida por una combinación de la producción matinal y vespertina, proporcional a las producciones de cada animal. Se realizaron análisis de los contenidos en grasa, proteína, lactosa y extracto seco magro, así como el recuento de células somáticas en el Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias, LILA (MilkoScan FT 6000, Foss Electric, Hillerød, Denmark). El muestreo de leche se llevó a cabo antes de iniciar la suplementación ($t=0$) y a los 7 días, 28 y 63 días de tratamiento, $t=1$, $t=2$ y $t=3$ respectivamente. Todas las muestras de leche se conservaron a -40°C hasta su análisis. El desarrollo de este trabajo llevó consigo el análisis de 72 muestras de leche (ver figura 3.3.3.1.2).

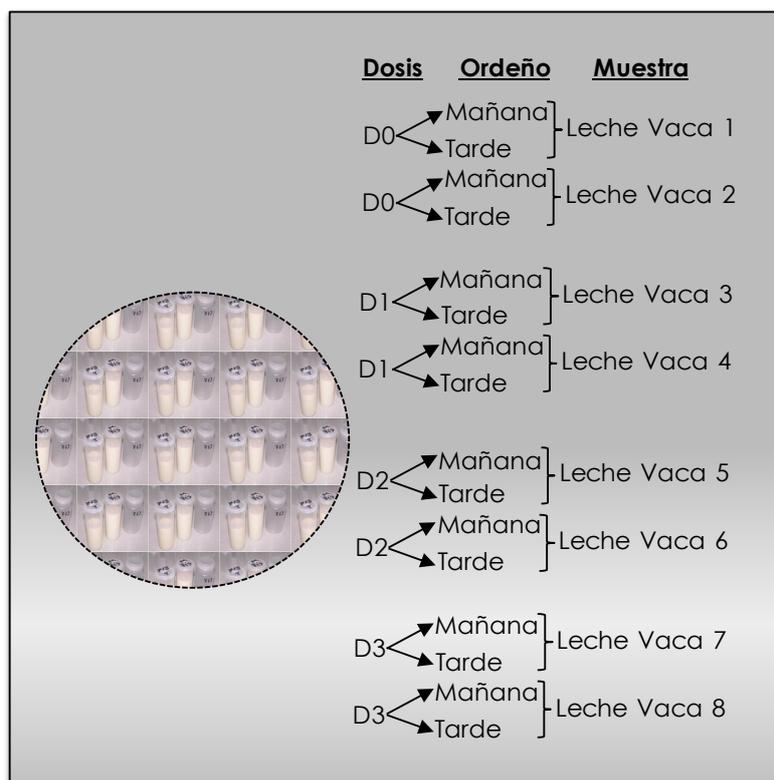


Figura 3.3.3.1.2. Muestreo de leche llevado a cabo durante 9 semanas en el rebaño de leche

III.3.3.2. Instrumentación

Microondas ETHOS One (Milestone, Srl, Sorisole, Italia) ya descrito anteriormente en la sección III.2.4, equipado con un rotor para diez recipientes de digestión de teflón TFM y con un sensor de temperatura (ATC-400). Ver figuras 3.2.4.1 y 3.2.4.2.

ICP-MS Agilent 7500c Octopole Reaction System (ORS) (Agilent Technologies, Tokio, Japón)(figura 3.3.3.2.1): La muestra líquida es aspirada mediante una bomba peristáltica hacia el sistema de nebulización, constituido por un nebulizador tipo Meinhard y una cámara de nebulización de doble paso (tipo Scott, refrigerada por efecto Peltier a 2°C). Este aerosol, se introduce a través del canal de la antorcha en el plasma de argón, que se encuentra parcialmente ionizado (aproximadamente 1%) y que posee una T entre 6000-8000 K. La antorcha (tipo Fassel) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el Ar o gas portador, el intermedio para el Ar auxiliar y el del exterior para el Ar plasmógeno. En el plasma la muestra es desolvatada, vaporizada, atomizada e ionizada.

Los iones formados en el plasma, son extraídos del canal central del plasma a una interfase que se encuentra a vacío (aproximadamente 1torr) a través del cono de

extracción o *sampler* produciéndose una expansión adiabática. A continuación, el haz de iones es transmitido a través de un segundo cono metálico o *skimmer*. Ambos conos constituyen la interfase de extracción por medio de la cual los iones formados en el plasma (aproximadamente 1%) pasan hacia el sistema electrostático de enfoque que se encuentra sometido a alto vacío (10^{-3} – 10^{-4} torr) por la acción de una bomba turbomolecular.

Este haz de iones es entonces enfocado mediante un sistema de lentes de extracción, de enfoque iónico que mediante campos electromagnéticos permiten obtener un haz colimado de iones. Entre el sistema de lentes y el analizador de masas se encuentra la celda de colisión (ORC-octapole reaction cell), que minimiza las posibles interferencias poliatómicas. Esta cámara puede ser presurizada con He, H₂ o mezclas de ambos, cuyas moléculas colisionan y/o reaccionan con los iones procedentes del plasma, rompiendo así posibles iones interferentes.

Una vez alcanzan el analizador de masas, los iones son separados por su relación carga/masa (m/z). El analizador está constituido por un cuadrupolo con cuatro barras de Mo cilíndricas sometidas a corrientes alternas y continuas de radiofrecuencias, actúa como filtro de masas. Finalmente los iones emergentes son detectados por un multiplicador de electrones secundario (SEM) que funciona de modo digital y analógico (dependiendo de la intensidad de los iones).

Las condiciones de operación del ICP-MS fueron optimizadas para la determinación simultánea de Co, Cu, Se y Zn, en muestras provenientes de la digestión ácida MW, y de forma independiente, para el yodo, en muestras provenientes de la digestión básica MW. En las mediciones se empleó celda de colisión/reacción empleando Hidrógeno como gas, para eliminar interferencias. Ambos métodos están detallados en la tabla 3.3.3.2.1.

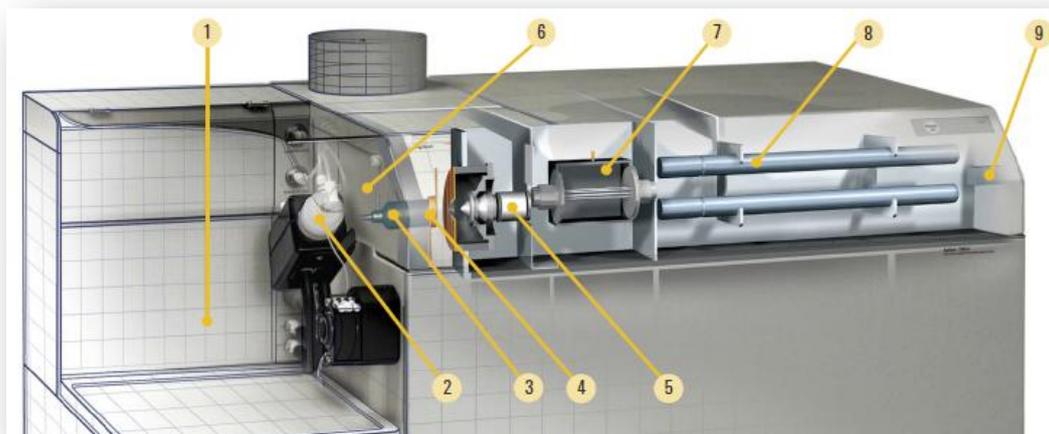


Figura 3.3.3.2.1. Sección del equipo ICP-MS con celda de colisión/reacción (ORC) Agilent 7500c. 1. Área abierta de introducción; 2. Control de T de cámara de spray; 3. Plasma; 4. Sistema Shield Torch (control de energías iónicas); 5. Interfase y lente iónica; 6. Control de flujos de masas; 7. Sistema de reacción octapolo; 8. Sistema de vacío y analizador; 9. Sistema de detección.

Tabla 3.3.3.2.1. Condiciones experimentales de medida en ICP-MS para la determinación simultánea de elementos traza en muestras de leche

CONDICIONES DE MEDIDA ICP-MS		
Parámetros Plasma		
Rf (Lmin ⁻¹)	1500	
Flujo gas plasmógeno (Lmin ⁻¹)	15	
Flujo gas auxiliar (Lmin ⁻¹)	1	
Flujo gas portador (Lmin ⁻¹)	1,12	
Fujo muestra (rps)	0,1	
Isótopos medidos		
Digestión ácida	⁵⁹ Co, ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁶⁴ Zn, ⁶⁶ Zn, ⁶⁷ Zn, ⁶⁸ Zn, ⁶⁹ Ga, ⁷¹ Ga, ⁷⁴ Se, ⁷⁶ Se, ⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se, ¹⁰³ Rh	
Digestión Básica	¹¹³ In, ¹¹⁵ In, ¹²⁷ I	
Isótopos seleccionados cuantificación		
Digestión ácida	⁵⁹ Co, ⁶⁵ Cu, (I.S: ⁷¹ Ga), ⁶⁶ Zn, ⁷⁸ Se (I.S.: ¹⁰³ Rh)	
Digestión Básica	¹²⁷ I (I.S.: ¹¹⁵ In)	
Parámetros celda colisión/reacción		
Flujo gas H ₂	4L min ⁻¹	
Octapole bias	- 13 V	
Qp bias	-11,5 V	
- Adquisición datos-		
Puntos por pico	3	
Tiempo integración (por punto)	0,3s	
Replicas	3	

I.S. estándar interno

III.3.3.3. Reactivos y material de referencia

Para trabajar en el análisis mediante ICP-MS se emplearon los reactivos y disoluciones que a continuación se detallan:

- HNO₃ 65%
- H₂O₂ 30% Suprapur,
- KI 99,5% de pureza para las soluciones estándar de I
- Disolución de hidróxido de tetrametil amonio (C₄H₁₃NO) al 25% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Soluciones patrón de 1000µg mL⁻¹ de Se, Cu, Zn y Co (J.T.Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, The Netherlands)
- Soluciones patrón de Rh, In y Ga de 1000µg mL⁻¹ (Fedelco S.L. ,Madrid, España)
- Material de referencia certificado, BCR-063, leche en polvo desnatada, (Reference Materials and Measurements, Retieseweg, Bélgica).
- Agua ultrapura (Millipore Co., Bedford, USA, Milli-Q water purification system, resistivity 18.2 MΩ cm).
- Filtros Millex-GS, de celulosa de 0,22 µm (Millipore Ireland, Ltd., Cork, Ireland)
- Recipientes de polipropileno desechables (BRAND, Alemania) de 20 y 30 mL de capacidad, para recuperar las disoluciones procedentes del ataque MW. Estos recipientes, se lavaron con HNO₃ 10% Suprapur durante toda la noche y se aclararon con agua ultrapura antes de ser utilizados, para evitar contaminaciones.

III.3.3.4. Procedimiento digestión MW

El análisis de los metales totales incluye todos los metales combinados orgánica o inorgánicamente, tanto disueltos como en partículas y se pueden determinar de forma satisfactoria utilizando técnicas de digestión como la de MW. La digestión de las muestras se llevó a cabo con el objeto de reducir la interferencia de la materia orgánica y convertir el metal asociado a las partículas en una forma (normalmente el metal libre) cuya concentración pueda determinarse por espectrometría, en nuestro caso ICP-MS. El medio ácido ó básico para la digestión de las muestras es proporcionado por las soluciones ácidas o básicas detalladas en el apartado anterior (HNO₃ y TMAH).

Digestión ácida

Tras descongelar y homogeneizar la muestra, una alícuota de 0,5 g de leche (0,1 g en el caso del material de referencia BCR) se pesó en las bombas de ataque del MW, adicionando 1,5mL de HNO₃ 65%, 1,5mL de H₂O₂ al 30% y 5mL de agua ultrapura. Al blanco de ataque se le adicionaron los mismos reactivos pero sin muestra (sustituida

por agua ultrapura). Las muestras se mineralizaron en el horno MW empleando el programa detallado en la tabla 3.3.3.4.1. En todos los sets de ataques de muestras en el MW se incorpora un blanco.

Una vez finalizada la mineralización, las disoluciones resultantes se trasvasaron cuantitativamente a los recipientes de polipropileno y se diluyeron con HNO₃ 1% (dilución de la muestra 1:40 para las muestras de leche, 1:200 para el material de referencia) hasta un peso final de aproximadamente 20g, anotando siempre el peso exacto. Los contenidos en Se, Cu, Co y Zn se determinaron mediante ICP-MS empleando calibración externa y estableciendo el límite inferior del calibrado en 0,06 ng g⁻¹.

Digestión básica

La digestión básica se utilizó para el ataque del I. Tras descongelar y homogeneizar la muestra, una alícuota de 1,0g de leche (0,5g en el caso del material de referencia BCR) se pesó en las bombas de ataque del MW, a continuación se adicionaron 2mL de TMAH 25% y 8mL de agua ultrapura. Los blancos de ataque, consistentes en los mismos reactivos pero sin muestra (sustituida por agua ultrapura), se prepararon y se atacaron en el MW del mismo modo. Las muestras se mineralizan en el horno MW empleando el programa detallado en la tabla 3.3.3.4.1. Tras la mineralización, las disoluciones resultantes se trasvasaron cuantitativamente a los recipientes de polipropileno y se llevaron a un peso final de aproximadamente 20 g con agua ultrapura (dilución de la muestra 1:20 para las muestras de leche, 1:40 para el material de referencia). El contenido en I se determinó mediante ICP-MS empleando calibración externa, y estableciendo el límite inferior del calibrado en 1,5 ng g⁻¹.

Tabla 3.3.3.4.1. Condiciones experimentales de mineralización MW para la determinación simultánea de elementos traza en muestras de leche

PROGRAMAS MW				
Digestión ácida				
		Tiempo (min)	Potencia(W)	T (°C)
	1	0:03:00	900	95
	2	0:10:00	900	160
	3	0:03:00	900	185
	4	0:15:00	900	185
Digestión Básica				
		Tiempo (min)	Potencia(W)	T (°C)
	1	0:20:00	900	180
	2	0:10:00	900	180

III.3.3.5. Medidas ICP-MS

Los patrones se prepararon diariamente. Los patrones de Se, Co, Cu, Zn a partir de una disolución patrón de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada elemento empleando HNO_3 1% como diluyente y los de I empleando una disolución estándar de I de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en TMAH 1% preparada a partir de KI del 99,5% de pureza.

Los isótopos seleccionados finalmente para la cuantificación de cada elemento se detallan en la tabla 3.3.3.4.1. Estos isótopos seleccionados corresponden a los más abundantes no interferidos, y por ello los que proporcionan mejores sensibilidades.

Con respecto a los estándares internos seleccionados, fueron los siguientes: para la cuantificación de Cu, Co y Zn el ^{71}Ga y para el Se, Zn y I el ^{103}Rh . Tanto a los blancos de matriz como a las muestras de leche (líquida y en polvo) digeridas, se les adicionó una cantidad de estándar interno que permitiera obtener una concentración final en la disolución de 10 ng g^{-1} .

Respecto a la cuantificación de I total, existen una serie de complejidades asociadas al alto límite de detección en ICP-MS en comparación con otros elementos, el efecto memoria (Reid *et al.*, 2008) y la incompatibilidad de los estándares internos comúnmente empleados con el medio alcalino (Fernández Sánchez y Szpunar, 1999). Fue necesario utilizar un estándar interno adecuado para su cuantificación, capaz de corregir las interferencias físicas y/o de matriz, y compatible con el medio básico del ataque, siendo el estándar selecciona do el ^{115}In .

III.3.3.6. Análisis estadístico

Los resultados de los contenidos en los elementos traza seleccionados, obtenidos para las distintas suplementaciones de Se, fueron estudiados usando el procedimiento GLM con LSmeans statement proporcionado por el paquete estadístico SAS (1999) de acuerdo al modelo: $Y_{ij} = \mu + A_i + B_j + E_{ij}$; donde Y_{ij} es la variable dependiente, μ es la media, A_i es el día de muestreo, B_j es el efecto de la dosis de Se y E_{ij} el error residual.

III.3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.4.1. Composición láctea

El contenido en grasa y proteína de la leche obtenida de las vacas en ensayo fue analizado con la finalidad de detectar valores anómalos y evaluar su posible influencia en el contenido en elementos traza. Durante el experimento, la producción osciló

desde 27,98 a 20,37 kg día⁻¹; el contenido en grasa desde 4,03 a 3,48 % y la proteína de 3,37 a 3,03 %, siendo todos ellos valores aceptables (ver tabla 3.3.4.1.1).

Tabla 3.3.4.1.1. Producción y composición de la leche en los tres tratamientos de ensayo

Producción láctea y Análisis	Grupo Control	Grupos suplementados Se			s.d.	
	D0	D1	D2	D3		
Producción(kgdía ⁻¹)	24,2	28,0	21,3	20,4	3,42	N.S.
Grasa (%)	3,68	3,48	3,58	3,67	0,093	N.S.
Proteína (%)	3,06	3,14	3,14	3,03	0,056	N.S.
Lactosa (%)	4,89	4,77	4,98	4,98	0,100	N.S.

D0: Grupo control sin suplementación de Se; D1, D2 y D3: Grupos con suplementación creciente en Se (D1, D2 y D3); s.d. desviación estandar; N.S.: No-significativo

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas en los valores de producción de leche diaria, ni en la composición de la leche entre tratamientos, y se encontraron todos los parámetros dentro del rango esperado para este tipo de animales en el segundo tercio de la lactación.

III.3.4.2. Validación de la metodología para el análisis de metales traza en leche de vaca.

Un material de referencia, consistente en leche desnatada en polvo (BCR 063R), fue analizado para la validación de la metodología propuesta anteriormente. Dicho material posee valores certificados para Zn, Cu y I y valores indicativos para Se y no informa para Co.

Seis submuestras del material de referencia se mineralizaron en diferentes secuencias del MW. Tres de ellas para la cuantificación de Cu, Co, Zn y Se (medio ácido) y las otras tres para la cuantificación del I (medio básico). A continuación se procedió a la dilución y posterior preparación de las muestras para el análisis mediante ICP-MS de acuerdo a lo secuencia detallada anteriormente. Cada una de las submuestras se cuantificó por duplicado y todas ellas se analizaron en diferentes días.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.3.4.2.1, en la que se puede observar la total concordancia entre los valores certificados y los obtenidos con la metodología propuesta. Las recuperaciones se encuentran en un rango entre el 100% del Se y Zn y el 105% para el Cu y el I.

Tabla 3.3.4.2.1. Valores de recuperación obtenidos para Se, Cu, Co, I y Zn mediante ICP-MS para el material de referencia BCR 063R ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Elemento	Valor certificado	Valor experimental	Recuperación (%)
Se*	0,129 \pm 0,028	0,13 \pm 0,01	100,7
Zn	49,0 \pm 1,2	49,1 \pm 1,1	100,7
Cu	0,602 \pm 0,038	0,63 \pm 0,01	104,7
I	0,81 \pm 0,10	0,85 \pm 0,06	104,9

Se*: valor indicativo

III.3.4.3. Efecto de la suplementación con Se orgánico, sobre la excreción de Se y otros minerales traza en leche.

En la Tabla 3.3.4.3.1 se muestra la concentración de Se a lo largo del ensayo y del resto de elementos traza estudiados. Los resultados que se recogen son los promedios obtenidos al analizar las dos muestras de leche de las dos vacas incluidas en cada grupo de ensayo (ver figura 3.3.4.3.1).

En el grupo control (D0) los niveles de Se permanecen constantes durante todo el ensayo ($16,7 \pm 2,5 \text{ ng g}^{-1}$), como era de esperar los grupos D1, D2 y D3 muestran un contenido promedio de Se al inicio del ensayo ($t=0$) de $13,6 \pm 1 \text{ ng g}^{-1}$, similar al grupo D0. Con la introducción del suplemento de Se se observa una rápida respuesta en la excreción de Se, por lo que su concentración en leche aumentó rápidamente, alcanzando el séptimo día de ensayo el 100% del nivel de estabilización de D1 y el 80% de D2. Sin embargo, para el grupo con dosis de Se D3, los niveles de Se siguen en aumento hasta el final del experimento, alcanzando 205 ng g^{-1} tras 63 días de suplementación.

La Tabla 3.3.4.3.1 también muestra la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos para Zn, Cu, Co y I. Como puede apreciarse, los valores iniciales previos a la suplementación, para los elementos traza estudiados abarcan un amplio intervalo debido a la variabilidad animal (Zn $4340 \pm 795 \text{ ng g}^{-1}$; Cu= $71 \pm 31 \text{ ng g}^{-1}$; Co= $3.3 \pm 0.7 \text{ ng g}^{-1}$ y I= $310 \pm 248 \text{ ng g}^{-1}$), hecho constatado igualmente para el Se.

Tabla 3.3.4.3.1. Concentración de Se, Cu, Co, I y Zn en muestras de leche pertenecientes a los distintos grupos de suplementación (ng g⁻¹ leche)

Dosis Se	Día Muestreo	Contenido de elementos traza en leche (ng g ⁻¹)				
		Se	Zn	Cu	Co	I
D0	t=0	13,6	5021	112,7	4,2	550,5
D0	t=7	18,0	4198	82,8	4,3	510,1
D0	t=28	16,0	4274	112,9	4,3	381,1
D0	t=63	19,2	5682	135,8	4,8	644,2
	$\mu \pm$ s.d.	16,7 \pm 2,5	4794 \pm 699	111 \pm 22	4,4 \pm 0,3	522 \pm 109
D1	t=0	9,5	3586	40,1	3,4	63,9
D1	t=7	28,1	4656	62,5	3,7	5,6*
D1	t=28	26,1	4122	47,9	3,2	132,9
D1	t=63	28,7	3715	47,0	3,4	88,1
	$\mu \pm$ s.d.	23 \pm 9	4020 \pm 482	44 \pm 9	3,4 \pm 0,2	95 \pm 35
D2	t=0	18,4	5031	55,5	3,2	494,5
D2	t=7	81,8	3957	51,9	2,8	331,5
D2	t=28	102,1	5154	57,1	3,4	394,0
D2	t=63	104,5	6258	67,2	3,9	730,3
	$\mu \pm$ s.d.	77 \pm 40	5100 \pm 941	58 \pm 7	3,3 \pm 0,5	488 \pm 175
D3	t=0	12,9	3720	76,5	2,5	129,5
D3	t=7	79,7	2762	46,0	1,6	145,3
D3	t=28	107,0	4966	60,5	2,2	240,3
D3	t=63	205,3	4262	56,0	2,3	147,9
	$\mu \pm$ s.d.	101 \pm 80	3928 \pm 929	60 \pm 13	2,1 \pm 0,4	166 \pm 50

μ : media; s.d.: desviación estándar

Con la finalidad de llevar a cabo una mejor interpretación de los resultados y evitar esta gran incidencia de la variabilidad animal, considerando el bajo número de animales incluidos en cada grupo, se consideró el nivel de control dentro de cada grupo para cada elemento (t=0) como valor relativo en base 100 y el resto de los valores se expresaron respecto a esa base. Los resultados obtenidos tras esta conversión se muestran en la tabla 3.3.4.3.2.

Tabla 3.3.4.3.2. Concentración en Se, Cu, Co, I y Zn en muestras de leche pertenecientes a los distintos grupos de suplementación, referidos al valor del control como base 100

Dosis	Se	Zn	Cu	Co	I
D0	130 ^a	94	98 ^{ab}	106	93
D1	291 ^{ab}	116	131 ^b	99	118
D2	656	101	105 ^{ab}	105	98
D3	1011 ^b	107	71 ^a	82	137
s.e.	±143,6	±12,1	±11,4	±6,2	±32,0
P - Dosis	*	N.S.	*	N.S.	N.S.
P-Día de muestreo	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

*Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas: *: $P \leq 0,05$; N.S.: no-significativo ($P > 0,05$); s.e.: error estándar de la media*

Estos valores corresponden a la media del contenido de cada elemento traza para los días 7, 28 y 63 del experimento, para cada dosis y cada elemento traza en base 100 con respecto a su control. Se estudió estadísticamente como afectó la "dosis" y el "día de muestreo" a cada uno de los metales traza. El efecto "día de muestreo" no fue significativo para el contenido en ninguno de los elementos traza analizados. Por su parte, el efecto "dosis" resultó significativo para las concentraciones de Se y Cu ($P \leq 0,05$). Centrándose en el Se, las concentraciones abarcan desde 291 en el grupo correspondiente a la dosis D1, hasta 1011 en el grupo correspondiente a la dosis D3 ($P \leq 0,05$). Respecto al contenido en Cu, las concentraciones abarcan desde 71 en el grupo con dosis de Se D3, hasta 131 en el grupo con dosis de Se D1.

En la figura 3.3.4.3.1 se muestra la evolución de las concentraciones en cada uno de los elementos traza considerados, corregidos en base 100 con respecto al control de cada grupo, presentando una forma general acorde con las diferencias estadísticas observadas.

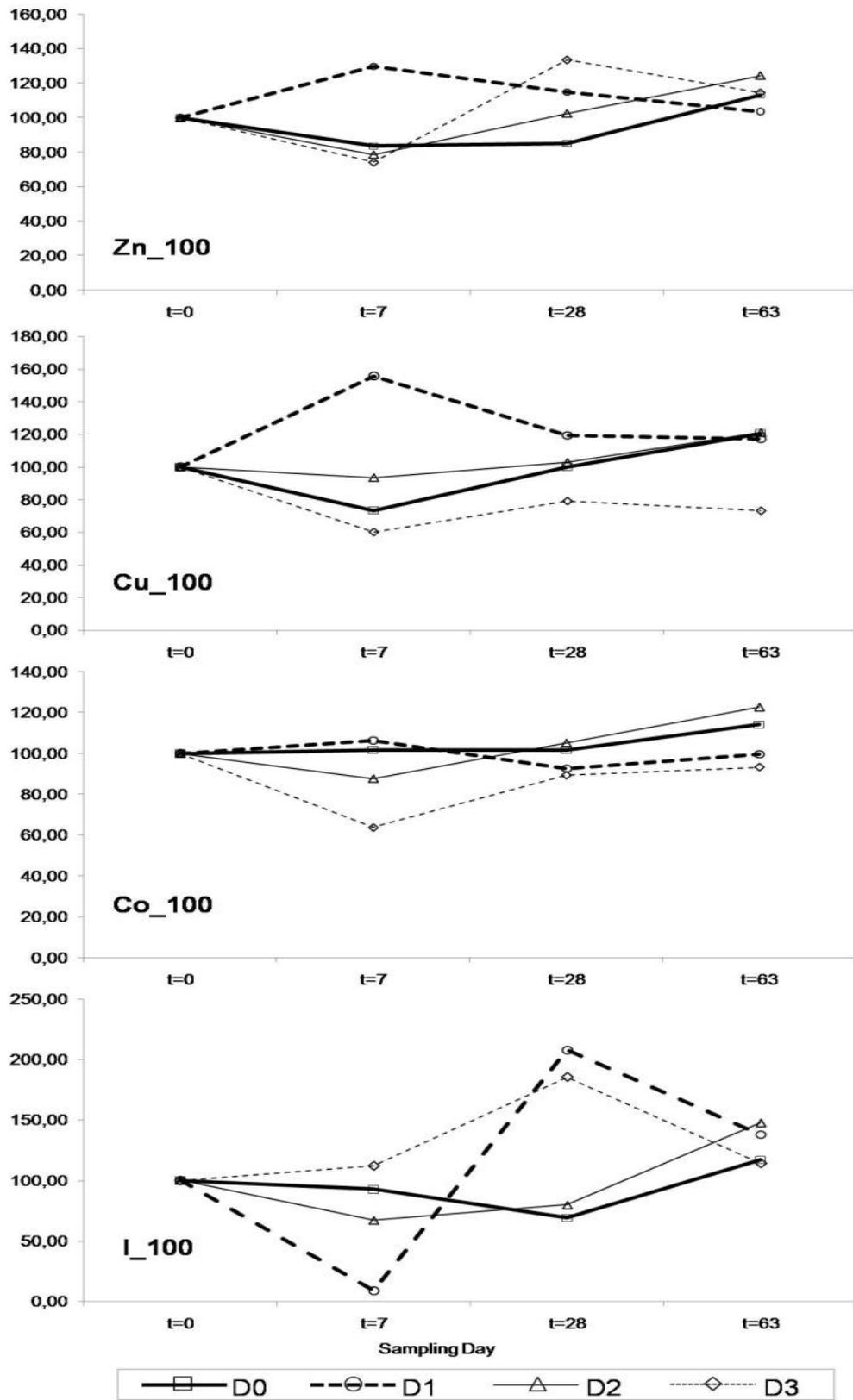


Figura 3.3.4.3.1. Contenido de elementos traza en muestras de leche expresado en base 100 para diferentes dosis de suplementación de Se en diferentes días de muestreo

III.3.4.4. Discusión

Selenio. Es necesario reseñar que los suplementos minerales de la dieta pueden no ser absorbidos adecuadamente debido a interacciones con otros nutrientes a nivel del rumen (Machado *et al.*, 2013). En los rumiantes, la digestión microbiana en el rumen y el retículo precede a la digestión en el abomaso y el intestino delgado (Spears, 2003) y puede alterar la biodisponibilidad de algunos minerales traza.

Los requerimientos nutricionales en vacas lecheras para este elemento son de 0,3 mg kg⁻¹ MS según el NRC (2001), dosis semejante a la suplementación del grupo D1. Existen abundantes referencias bibliográficas de la buena relación entre el contenido en la dieta de Se y su concentración en leche (Ceballos *et al.*, 2009). El consumo de productos animales con un déficit en Se puede influir en el nivel de Se ingerido por los humanos e incrementar el riesgo de déficit en la nutrición humana de este elemento (OMS, 2004). Este riesgo está reconocido por algunos países donde la aplicación del Se como fertilizante en la producción de cereales destinados al consumo humano está requerida por la leyes (Hartikainen y Ekholm, 2001).

Más aún, recientes estudios enfatizan la obtención de productos para consumo humano de alto contenido en Se (Heard *et al.*, 2007). En el presente estudio, los valores para el grupo D0, están en concordancia con los contenidos descritos en otros estudios como Rey-Crespo *et al.*, (2013) y representan el 5% de la CDR para Se, establecida en 70µg día⁻¹ (FDA, 2011).

Sin embargo los grupos con dosis D2 y D3 han alcanzado 15% de la CDR. Aunque la dosis D3 es superior a la dosis permitida como suplemento animal, estas restricciones podrían cambiar en un futuro en beneficio de la demanda de productos beneficiosos para la salud humana (Stockdale *et al.*, 2011). De tal manera que, considerando una ingesta de 250mL de leche diaria, la dosis D2 podría aumentar la ingesta de Se alrededor de 8 veces.

El 15% de la CDR en Se es 8,3 µgSe.100ml⁻¹ de leche (Real decreto 1669/2009, de 6 de Noviembre que modifica al Real Decreto 930/1992 de 17 de julio), alcanzándose en ambos tratamientos (D2 y D3) la mitad de dicha concentración ya en la primera semana del ensayo. En lo que respecta al nivel de excreción de Se en leche, se mantiene por encima incluso a partir de la tercera semana de tratamiento.

Zn, Cu, Co y I. Las concentraciones de Zn, Cu y Co en sangre, tejidos y leche son enormemente dependientes de la ingesta, ya que se relacionan con la regulación de la absorción en el intestino y las demandas de los cambios metabólicos (Windisch, 2002). Sin embargo, en toda estrategia de suplementación debe ser considerado el

riesgo potencial que existe en que las interacciones entre nutrientes afecten la absorción y la biodisponibilidad. Altas dosis de Se podrían dificultar la absorción de otros nutrientes esenciales. En este sentido Hoac *et al.*, (2008), realizaron estudios que mostraron como la distribución de **Zn y Cu en el suero lácteo** no se ve esencialmente afectada por la suplementación de Se. En este experimento, los resultados, muestran que el contenido total de Zn en muestras de leche no parece verse afectado por dietas suplementadas en Se. No obstante, se observa que los niveles de **Cu** en leche pudieran estar influenciados por **dosis altas** de Se (D3), ya que descienden casi un 30%. Pudiera ser que un complejo mecanismo de secreción que envuelve al Cu puede verse influido cuando los animales son sometidos a dosis altas de suplementación de Se. Está documentado que los requerimientos de Cu en los rumiantes varían ampliamente dependiendo de las concentraciones de otros componentes de la dieta (Spears, 2003) y la presencia de Se en proporciones elevadas podría ser un ejemplo. Comparativamente con los humanos, las concentraciones de Se en suero de leche está directamente correlacionadas con el contenido en Zn y no afecta a los niveles de Cu (Michalke, 2006), aunque el suplemento de Se pudiera estar aparentemente correlacionado con un aparente aumento de pérdidas fecales de Cu (Kies y Harms, 1989).

Haciendo un balance de resultados, es necesario tener en cuenta que la leche es una fuente importante de Se, mientras que la leche y los productos lácteos son unas fuentes pobres de Cu y su contribución a la ingesta de Cu es muy baja (5% de la CDR) (Gaucheron, 2011). Si se tienen en cuenta las interrelaciones entre minerales descritas en vacuno lechero (figura 3.3.4.4.1), puede verse que no está descrita interacción entre Se y Cu. No se han descrito casos de antagonismo entre estos dos elementos, en el que la presencia de uno de ellos disminuya la disponibilidad del otro, ni parece haber relación entre los enzimas implicados en una deficiencia/disminución del Cu y el Se.

Tras la actualización del RD/669/2009 por el Reglamento de la UE 1169/2011 para que un alimento pueda ser etiquetado con el aporte de un ingrediente específico, debe estar aportar al menos el 7,5% de la CDR por 100 g o por 100 mL. El 7,5% de la CDR para el Se es de 4,125 μg 100 mL⁻¹, valor que se alcanza tras dos días de tratamiento en estos grupos.

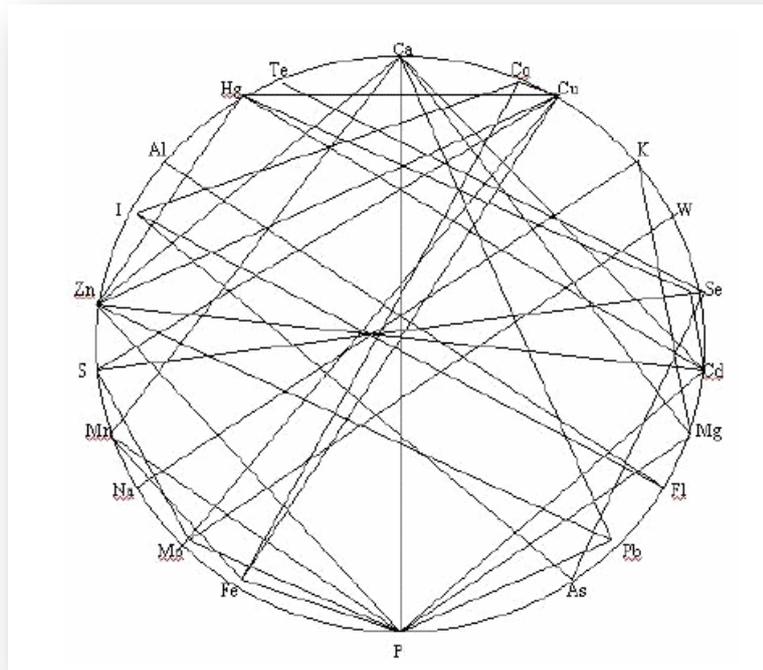


Figura 3.3.4.4.1. Interrelaciones entre elementos minerales
(Fuente: IX Seminario de Pastos y Forrajes. 2005)

Ampliando la visión de conjunto del estudio, puede decirse que el metabolismo, las cantidades necesarias y los niveles de seguridad de los elementos se ven afectados por los demás elementos de la dieta y las interrelaciones deben tenerse en cuenta en muchas circunstancias de la alimentación práctica.

Concluyendo este estudio, el análisis de muestras de leche mediante ataque MW (digestión ácida y básica) y medida mediante ICP-MS ha resultado ser una metodología fiable, validada mediante el análisis de un material de referencia, para el análisis de Se y otros elementos traza. Puede decirse que el suplemento de Se orgánico en la dieta del vacuno lechero incrementa el contenido de Se total en la leche. En función del nivel de suplementación, se conseguirá un incremento determinado del Se en leche, llegando a alcanzar 15% de la CDR. Esta suplementación no parece afectar a otros elementos como Co, Zn y I, aunque el Cu pudiera estar influenciado negativamente.

III. 4. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS NIRS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA LECHE DE VACA A PIE DE CAMPO.

III.4.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la rapidez del análisis NIRS, su forma tradicional de aplicación en el laboratorio (at-line) produce una demora entre el proceso de producción de la leche y el resultado del análisis, lo que en muchas ocasiones no permite un uso adecuado de la información así producida en la toma de decisiones en los diferentes niveles de la cadena de producción agro-ganadera (Brennan *et al.*, 2003, Garrido y Pérez-Marín, 2007).

Sin embargo, la instrumentación NIRS está evolucionando muy rápidamente. Una tendencia generalizada es el diseño de instrumentos portátiles ligeros, de alta velocidad de respuesta (milisegundos) y de bajo coste, que pueden ser instalados en diferentes puntos de la cadena alimentaria, para el **análisis** denominado **on-site**. No obstante, la mayoría de esos instrumentos se diseñan para aplicaciones médicas y farmacéuticas, y no han sido evaluados científicamente en su potencial de aplicación a productos agroalimentarios y sobre todo en condiciones reales del campo y de la industria, existiendo por tanto grandes lagunas para su uso real on-site, de forma tal que permitan la toma de decisiones con la información necesaria para la gestión de sistemas agro-ganaderos complejos en tiempo real.

La combinación de sistemas microelectromecánicos (MEMS) y la espectroscopía digital (DTS) es una de las aportaciones más novedosas que se ha realizado en el ámbito de la integración de otros sensores con la tecnología NIRS. A pesar de la existencia en el mercado de algunos equipos **MEMS-NIRS**, la información científica disponible sobre estas aplicaciones en el sector agroalimentario es escasa. El primero de estos trabajos fue publicado por el grupo de la Universidad de Córdoba (UCO), y mostraba la capacidad del equipo manual Phazir™ para determinar de forma no destructiva ciertos parámetros cuantitativos de nectarinas durante su maduración en árbol y almacenamiento post-cosecha (Pérez-Marín *et al.*, 2009); más tarde también se han publicado trabajos relativos al uso de este instrumento para la evaluación de la vida útil en carne de cerdo (Soldado *et al.*, 2009 y Prado *et al.*, 2011, el análisis de canales de cerdo Ibérico (Zamora *et al.*, 2012) o el control de calidad de la carne de cerdo Asturcelta (De la Roza-Delgado *et al.*, 2014a). Sin embargo, no existen

publicaciones sobre la aplicación de estos instrumentos en el sector productos líquidos heterogéneos.

Una de las grandes limitaciones de la tecnología NIRS es que el desarrollo de aplicaciones necesita etapas previas de optimización para cada producto o proceso. La selección adecuada del instrumento es uno de estos aspectos críticos, junto con la selección de muestras representativas de cada producto, y el desarrollo de algoritmos lineales y no lineales para el tratamiento de la información espectral de grandes bases de datos.

3.4.1.1. Análisis NIRS de la producción láctea

Una de las complejidades que plantea el análisis de leche está relacionada con la **heterogeneidad** de la muestra (Schmilovich *et al.*, 2000, Tsenkova *et al.*, 2000) y su elevado contenido en agua. Aunque existen publicaciones que ponen de manifiesto la utilidad de la tecnología NIRS para predecir parámetros de calidad y microbiológicos en muestra intacta (Tsenkova *et al.*, 1999; Drackova *et al.*, 2008), estas evaluaciones se han realizado con equipos NIRS de laboratorio con amplio rango espectral y diversas posibilidades de presentación de muestra. En lo referente a la caracterización de las producciones lácteas como alimento funcional, como puede ser la determinación de los AGI, investigaciones preliminares han puesto de manifiesto la viabilidad de cuantificación de AG en leche con coeficientes de correlación de 0,9 para alguno de los ácidos grasos de interés (CLA) (De la Roza-Delgado *et al.*, 2010), analizando la leche en estado líquido. Más aún, los resultados obtenidos por Coppa *et al.* (2010) muestran modelos quimiométricos capaces para predecir, en algunos casos 50 ácidos grasos, pero con mejores resultados en leche tras un proceso de desecación que en su estado natural. Sin embargo, ambas investigaciones se han realizado utilizando para ello un equipo de laboratorio de amplias prestaciones, FossNIRSystem 6500, que trabaja en el rango de medida 400-2500 nm, es decir procedimiento at-line. En lo relacionado con la determinación on-site, Kawasaki *et al.* (2008) desarrollaron un sensor NIRS que ubicaron en un robot de ordeño para controlar de manera directa la calidad de la producción láctea, sin embargo, en este punto es necesario precisar que menos del 1% de las explotaciones lecheras disponen de un sistema de ordeño automatizado y que además del elevado coste de estos sistemas de ordeños, la implantación del sensor NIRS supondría un sobrecoste de 50.000 €.

Por otro lado, no cabe duda de que la gestión **ganadería de precisión (Precision Livestock Farming /Smart Livestock Farming) (PLF)**, sustentada en el uso de sensores, de tecnologías de la información y la comunicación y de sistemas de apoyo a la decisión, permitirá la optimización de las prácticas de producción (alimentación, reproducción,

etc.), la mejora de la salud y el bienestar animal, la minimización del impacto ambiental, la eficiencia del trabajo, etc. y, que en definitiva, contribuirá a incrementar la rentabilidad y sostenibilidad de las explotaciones ganaderas. Revisiones recientes sobre el futuro de la ganadería de precisión (Wathes *et al.*, 2008; Banhazi *et al.*, 2012;), contienen importantes conclusiones y reflexiones entre las que se puede destacar que la PLF es la razón principal por la que en el futuro se generalizará el uso de los denominados "Smart sensors" en las explotaciones ganaderas. La tecnología NIRS, como ya se ha comentado en el capítulo de Introducción de este trabajo de Tesis Doctoral, se encuadraría dentro de la definición de "Smart sensors", puesto que entre los avances más destacables en instrumentación NIRS se encuentran la disminución del tamaño y peso de los equipos, disponibilidad de instrumentos portátiles, rapidez en la adquisición de espectros, rapidez en tratamiento y transmisión de la señal, etc. Además, hay que señalar los principales atributos que caracterizan a esta tecnología, también anteriormente comentados, como son su alta velocidad de respuesta, su facilidad de uso en rutina, su carácter no destructivo y ser una tecnología multiproducto y multiatributo, entre otros.

Por tanto, la **optimización de la gestión** de la producción en ganaderías de vacuno de leche pasa por la integración de sensores NIRS, algoritmos matemáticos, TICs y sistemas de apoyo a la decisión, que permitan en tiempo real una gestión individualizada de las raciones en vacas de leche y de la calidad de la leche producida.

III.4.2. OBJETIVO

Integración de sensores MEMS-NIRS portátiles de nueva generación, en sistemas de ayuda a la decisión en explotaciones ganaderas de vacuno de leche, para el control in-situ de calidad de la producción láctea individualmente en el rebaño.

III.4.3. METODOLOGÍA ESTUDIADA

3.4.3.1. Muestras de leche

Para la puesta a punto y optimización de la recogida de espectros de calidad de leche de vaca, se han empleado muestras de leche cruda, procedentes de las vacas del Programa de Investigación en Producción de Leche del SERIDA ubicado en Villaviciosa (Asturias), durante el periodo de enero a abril de 2014. Esporádicamente se recolectaron muestras de vacas seleccionadas aleatoriamente de ganaderías de Asturias, procedentes de explotaciones lecheras de Gozón y Carreño, y se utilizó

adicionalmente una muestra de leche comercial semidesnatada. Las muestras se agruparon en función de las fechas de ordeño o recogida y fueron analizadas en fresco tras una homogenización manual de 20-30 segundos y mantenidas a temperatura a 40°C en un baño de agua con agitación.

La base de datos actual cuenta con más de 400 muestras de leche, procedentes de ensayos de alimentación diversos, con y sin pastoreo, con y sin suplementación, alimentación *unifeed* vs alimentación disgregada, etc., (lo que confiere una gran variabilidad al conjunto) procedentes del rebaño experimental del SERIDA y recogiendo las muestras los miércoles, en períodos quincenales y correspondientes a muestras del ordeño de mañana y tarde, por ser el día en que se recogen las muestras para su análisis de calidad físico-química y bacteriológica en el Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias (LILA).

3.4.3.2. Análisis e instrumentación NIRS

Instrumentos NIR para el análisis de leche líquida

En el presente trabajo se evaluó el potencial de un equipo portátil microPHAZIR para la obtención de espectros de calidad con respecto a un equipo NIRS de laboratorio at-line FOSS NIRSystems 6500. En la Tabla 3.4.3.2.1 se muestran comparadas las características de ambos equipamientos.

Tabla 3.4.3.2.1. Principales características de los instrumentos utilizados

Características principales	Instrumento	
	FOSS NIRSystems 6500	microPHAZIR
Filtro	Monocromador/Predispersivo	Equipo MEMS/Predispersivo
Rango	400-2500 nm	1600-2400 nm
Resolución	2 nm	8 nm (no constante)
Tiempo de integración	1.875 ms	600 ms
Tiempo de medida	60 s (32 escaneos/muestra)	3 s (5 escaneos/muestra)
Ventajas	Altas prestaciones	Portátil
	Condiciones de trabajo controladas (laboratorio)	Compacto y robusto

MicroPHAZIR™ (Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA).

Se trata de un espectrofotómetro portátil de 1,25 Kg para análisis NIR on-line, con filtro óptico de tipo MEMS (Sistemas micro-electro-mecánicos) diseñado para realizar

análisis rápidos no destructivos, con lámpara de tungsteno como fuente de radiación y un único detector de In Ga As de amplio espectro, lo que permite que sea un instrumento de bajo coste con un eficiente consumo energético. Posee una pantalla LCD y baterías recargables con hasta 4 h de operación.

El equipo dispone de un adaptador para el análisis de muestras líquidas al que se acopla una cubeta de cuarzo, de paso óptico de 1 y 2mm(ver Figuras 3.4.3.2.1 y 3.4.3.2.2), lo que permite realizar medidas en reflectancia difusa.



Figura 3.4.3.2.1. Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 1mm para acople a microPHAZIR™

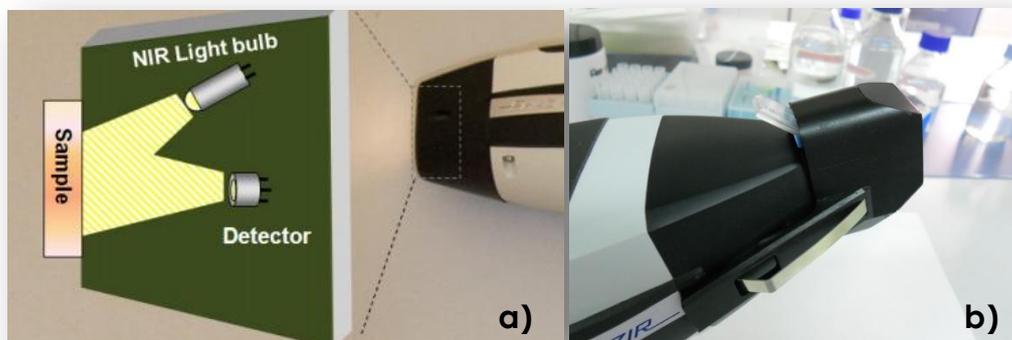


Figura 3.4.3.2.2. Equipo portátil microPHAZIR. (a) Esquema de modo de incidencia de la luz sobre la muestra y (b) Adaptador para líquidos acoplado a microPHAZIR

El rango espectral de trabajo es de 1600 a 2400 nm, con una resolución espectral no contante de 8,7 nm. Trabaja en reflectancia difusa, $\log(1/R)$, donde R se refiere a reflectancia. En función del modo de medida, cada espectro será el resultado de promediar diferentes barridos por muestra. Los datos espectrales son almacenados en la memoria interna del equipo y mediante conexión micro-USB se pueden transferir a un PC, para su posterior análisis y tratamiento. Los datos espectrales se exportan en formato *.csv, y por tanto pueden visualizarse y modificarse con el software Excel (Microsoft Office).

FOSS NIRSystemss 6500 SY II (Silver Spring, MD, USA)

Se trata de un espectrofotómetro de laboratorio (at-line) con sistema monocromador de espectro continuo. Este equipo cuenta con un módulo transport al cual se ha acoplado una cubeta para líquidos opacos de cuarzo con fondo de aluminio reflectante FOSS (Ref. US-ISIH-0398), de paso óptico 17 mm para realizar medidas en transfectancia. Ver figura 3.4.3.2.3 y 3.4.3.2.4.

El instrumento recoge la información espectral en el rango 400-2500 nm, con una resolución espectral de 2 nm. Se ha programado para realizar 16 barridos sobre el fondo interno, 32 barridos por muestra y finalmente realizar otros 16 barridos sobre el fondo interno. El espectro final será el promedio de todos los barridos corregido por el fondo interno.

Se utilizó el software de análisis de rutina ISScan II ver. 1.5 Infracsoft International, Port Matilda, PA, USA, 2000) para la recogida de datos espectroscópicos.



Figura 3.4.3.2.3. Cubeta de cuarzo para líquidos con paso óptico de 17 mm FOSS



Figura 3.4.3.2.4. Equipos on-line FOSS NIRSystemss 6500 y cápsula para líquidos opacos

3.4.3.3. Desarrollo de modelos cuantitativos

Para el desarrollo de las ecuaciones de calibración NIRS, se siguió la metodología habitual que se detalla a continuación (Shenk *et al.*, 2001):

a) pretratamiento de la señal espectral. Se ensayaron diferentes tratamientos de primera y segunda derivada, así como de métodos de corrección del efecto de dispersión de la luz o "scatter" y técnicas de compresión de la información espectral (componentes principales y PLS).

b) optimización de la región espectral a utilizar (rango completo frente a rangos reducidos).

c) desarrollo de los modelos de regresión multivariantes.

Con la metodología descrita, se obtuvieron ecuaciones de calibración NIRS que nos permitieron cuantificar los componentes mayoritarios de la leche: Grasa, proteína, lactosa y conteo de células somáticas en tiempo real. Dichos modelos fueron evaluados con los estadísticos: coeficiente de determinación (RSQ, 1-VR), errores de calibración y validación (SEC y SECV) y coeficiente de variación, RER (relación entre el rango de la población y el error de validación) y RPD (relación entre la desviación estándar de la población y el error de validación). Estos estadísticos se correlacionarán para seleccionar el modelo más exacto y preciso, así como para evaluar la viabilidad del mismo.

III.4.4. PUESTA A PUNTO Y OPTIMIZACIÓN DE LA RECOGIDA DE ESPECTROS DE CALIDAD DE LECHE DE VACA.

Fueron examinados diferentes pretratamientos de las muestras antes del análisis NIR, todos ellos enfocados a obtener una señal espectral de calidad. También, se evaluó la calidad de los espectros NIR utilizando dos cubetas diferentes (de 1 y 17mm) y distintas condiciones instrumentales (figura 3.4.3.2.1 y 3.4.3.2.3).

Las cubetas evaluadas fueron: cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico, y la cubeta, también de cuarzo y paso óptico de 17mm de Foss. En ambos casos se realizaron las medidas en transreflectancia y en el caso de la cubeta de 1mm fue necesario utilizar el adaptador del equipo MicroPHAZIR™. Se evaluó el efecto de la metodología instrumental modificando los siguientes parámetros:

- a) presentación de la muestra empleando las dos cubetas.
- b) número de espectros a promediar para el análisis (entre 5 y 80 scans por espectro)
- c) referencia interna o externa para el análisis de fondo.

En la tabla 3.4.4.1 se muestran los ensayos realizados para optimizar las condiciones instrumentales para el análisis de leche líquida, empleando el equipo portátil y en la tabla 3.4.4.2 los modos de análisis desarrollados.

Tabla 3.4.4.1. Metodologías de análisis instrumental evaluadas con el sensor portátil NIRS MicroPHAZIR para optimizar la recogida de datos espectrales en leche líquida

Número de scans/espectro	Referencia Interna /externa	Cubeta/paso óptico	Adaptador
5	Interna	1 mm	Si
	Externa		
10	Interna	17 mm	No
	Interna	1 mm	Si
	Externa		
	Interna	17 mm	No
80	Interna	1 mm	Si
	Externa		
	Interna	17 mm	No

Tabla 3.4.4.2. Modos de análisis desarrollados para el instrumento microPHAZIR, para realizar medidas sobre muestras de leche cruda de vaca y sus características

Métodos microPHAZIR	Nº escaneos/muestra	Energía mínima de muestra	Referencia interna
Método 1	10	2	Inactivo
Método 2	80	2	Inactivo
Método 3	80	2	Activo
Método 4	80	2	Activo
Método 5	80	0	Inactivo
Método 6	80	1	Inactivo
Método 7	5	0	Activo
Método 8	80	0	Activo

Una vez seleccionadas las aplicaciones más adecuadas se estudió la repetibilidad y reproducibilidad espectral de los modos de análisis de microPHAZIR que presentaron las mejores características de análisis mediante el estadístico Root Mean Square and Correction (RMSC), que es la raíz cuadrática media de la diferencia entre dos espectros de una misma muestra corregido por el bias.

$$RMSC = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{im} - y_{ik})^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n (y_{im} - y_{ik}))^2}{n}}{n - 1}}$$

Dónde:

Y_{im} =Valor de log(1/R) de la submuestra m para la longitud de onda i (λ_i).

$\overline{Y_{ik}}$ =Valor de log(1/R) de la submuestra k para la longitud de onda i (λ_i).

n =número de longitudes de onda empleadas.

3.4.4.1. Resultados y discusión

La leche es una matriz muy compleja para el análisis NIRS, que contiene proteínas en dispersión coloidal, grasa en emulsión y minerales en solución (Marinori *et al.*, 2013). Es un líquido opaco con alto contenido de agua, que origina elevada dispersión de la luz, causada por los glóbulos de grasa de la leche y micelas de caseína en suspensión (Holroyd *et al.*, 2013).

A la complejidad del análisis de muestras de leche hay que unir algunas de las limitaciones del instrumento MEMS-NIRS que incluyen, además del consabido estrecho rango espectral (1600-2400 nm), la energía requerida mínima para el análisis de las muestras. Un parámetro interno del equipo que limitaba la respuesta a señales inferiores a la determinada para el modo de análisis que tenía configurado y que es interpretada como energía de muestra demasiado baja, hecho que genera el error "PLTL" (Power Level Too Low), fue necesario ajustarlo a "0" para obtener una respuesta satisfactoria del instrumento.

Los resultados obtenidos en el equipo portátil analizando la leche cruda empleando el adaptador para el análisis de muestras líquidas y la cubeta de 1 mm, fueron poco prometedores, puesto que en el 90% de las muestras se generaba el error PLTL. Las razones de estas limitaciones pueden estar relacionadas con el efecto de la dispersión de la luz causado por las partículas sólidas de la muestra, por ello, a sabiendas de que el H₂O absorbe fuertemente la radiación NIR debido a los enlaces O-H (bandas de absorción alrededor de 1940nm), se ensayó el efecto de la dilución de las muestras con H₂O y la eliminación de partículas sólidas mediante filtros. Si bien, este pretratamiento de filtrado con filtros de jeringa limita el uso de modelos de calibración NIRS, debido a la desaparición, entre otros, de los glóbulos de grasa.

La Figura 3.4.4.1.1 muestra los resultados obtenidos para una muestra a diferentes diluciones, donde se observa que en el rango 1900-2000 nm existe una saturación de la

señal espectral ($\log(1/R) > 3$), debido a la interferencia de los enlaces hidroxilo en las muestras. Adicionalmente, la sistemática resultó poco repetible y reproducible y aleatoriamente se generaba el error PLTL.

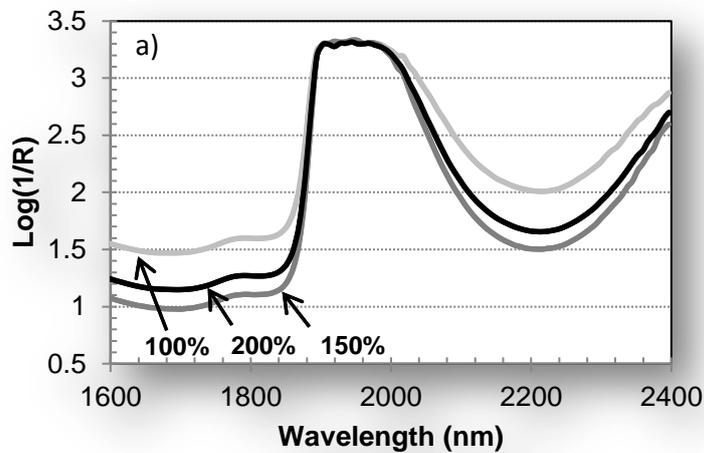


Figura 3.4.4.1.1. Espectros promedio de leche líquida y diluida recogidos en el equipo MicroPhazir

Por otro lado, la combinación dilución y filtración, mostró resultados similares a los de los experimentos anteriores, donde a las muestras tan solo se les aplicaba un pretratamiento de dilución. Se puede apreciar en la Figura 3.4.4.1.2 como se mantiene la saturación en las bandas de agua, generándose también en ocasiones el error PLTL.

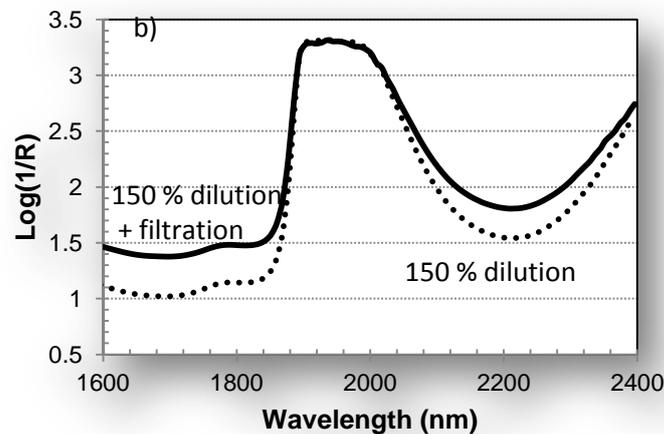


Figura 3.4.4.1.2. Espectros promedio de leche líquida, diluida y filtrada recogidos en el equipo MicroPhazir

En este sentido, Tsenkova *et al.*, (2000) informaron que el contenido de grasa de la leche podría cambiar la línea base de los espectros. Sin embargo, como puede observarse, a pesar de la filtración, no fue posible obtener buenos resultados y se mantiene la saturación en la banda de agua. Teniendo en cuenta la gran variabilidad de la información espectral y la escasa reproducibilidad de los resultados obtenidos

con el equipo portátil, se realizaron las diversas comprobaciones con las modificaciones de la programación instrumental descritas, para obtener con el equipo MicroPhazir espectros similares a los obtenidos en el de referencia.

En base a estos resultados, queda claro que la irreproducibilidad espectral no está relacionada con las partículas sólidas de la muestra sino con la propia configuración del instrumento. Razón por la cual se evaluó la posibilidad de recoger espectros utilizando la cubeta de cuarzo de 17mm de paso óptico y fondo de aluminio.

La Figura 3.4.4.1.3 representa un espectro promedio de leche entera, sin diluir ni filtrar, recogido en el equipo de referencia FOSS NIRSystem. Aunque los espectros también presentan las fuertes bandas de absorción relacionadas con el agua (1450 nm y 1940 nm) en el primer y segundo sobretono de los enlaces hidroxilo (Williams y Norris, 2001), se pueden reconocer claramente bandas de absorción relacionadas con otros componentes tales como grasa (2310 nm) y proteína (2180 nm), aunque más débiles en comparación con los grupos O-H. Después de aplicar pretratamientos matemáticos a los datos espectrales mejora su interpretación.

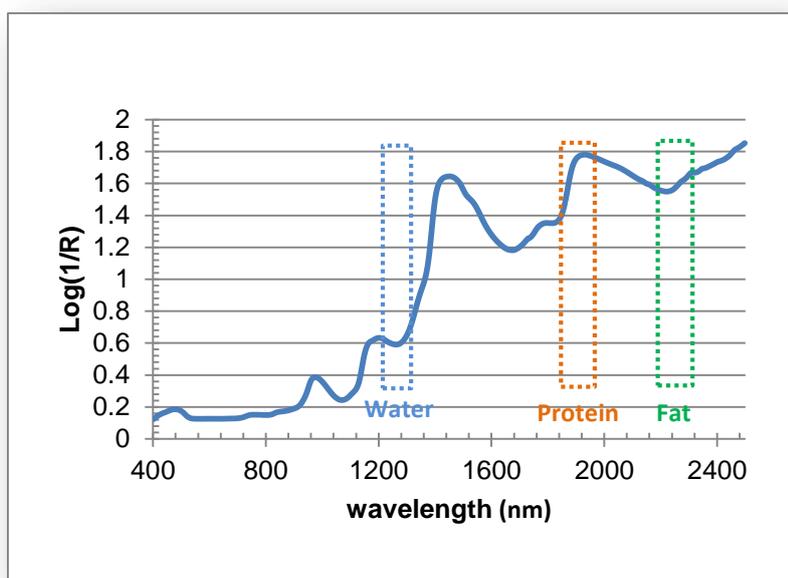


Figura 3.4.4.1.3. Espectros promedio de leche líquida sin pretratamiento recogidos en el equipo de referencia FOSS NIRSystem

Estas longitudes de onda específicas están incluidas en el rango del instrumento portátil (1600-2400 nm), sin embargo probablemente la fuerte absorción del agua y la pequeña ventana de análisis, hacen difícil obtener espectros como los adquiridos con el instrumento de referencia (400-2500 nm).

De todas las alternativas instrumentales para el análisis de la leche líquida en el equipo portátil sin ningún tipo de pretratamiento, los mejores resultados se obtuvieron con la programación en la que el espectro de cada muestra es el promedio de 80 escaneos por muestra y la referencia interna o spectralon está activo. La principal característica de los espectros obtenidos con este modo de análisis es la reducción del nivel de ruido debido al aumento del número de escaneos (80 barridos/muestra. En lo que respecta al uso de los dos tipos de cubetas en este modo (1 mm con adaptador y 17 mm sin adaptador). 1 mm de paso óptico con adaptador, generó espectros más ruidosos que con la cubeta de 17 mm. En la Figura 3.4.4.1.4, se muestran los espectros promedio de 6 muestras individuales de leche entera analizadas en un equipo NIR de referencia con la cubeta de 17 mm y en el MicroPhazir con adaptador y cubeta de 1mm y sin adaptador y cubeta de 17 mm.

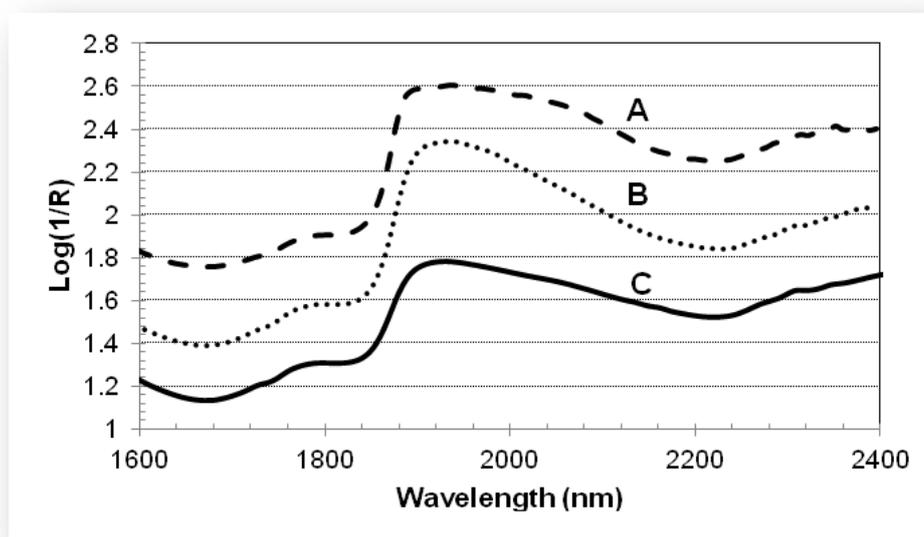


Figura 3.4.4.1.4. Espectros promedio de leche líquida recogidos con diferentes cubetas e instrumentos: A) MicroPHAZIR cubeta 1mm y adaptador; B) MicroPHAZIR cubeta 17 mm sin adaptador; C) Referencia FOSS NIRSystem cubeta 17 mm

Finalmente, se llevaron a cabo los estudios de repetibilidad y reproducibilidad espectral sobre un colectivo de 6 muestras de leche de vaca individuales, que fueron analizadas por triplicado para evaluar la repetibilidad, en tres días consecutivos para el análisis de reproducibilidad intermedia en el equipo MicroPHAZIR empleando las condiciones instrumentales optimizadas y los dos tipos de cubetas mencionadas y su comparación con el equipo de referencia. Se utilizó el estadístico RMSC, como medida de similitud entre espectros. Los resultados obtenidos (ver Tabla 3.4.4.1.1) muestran claramente como el uso de adaptador para el análisis de leche en el equipo portátil, genera mayores errores en los parámetros de precisión espectral que cuando el análisis se efectúa sin adaptador y la cubeta de transreflectancia de 17 mm, siendo

los valores de RMS corregidos por el bias de 11190 vs 5309 y 45207 vs 4799, para repetibilidad y reproducibilidad con y sin adaptador, respectivamente, resultando estos últimos similares a los valores de RMSC obtenidos con el equipo de referencia. Aunque estos resultados ya se incluyeron como hipótesis al principio del estudio debido a las mejores características instrumentales del espectrofotómetro de referencia

Tabla 3.4.4.1.1. Raíz cuadrática media de la diferencia entre espectros corregido por el bias (RMSC) para evaluar la precisión del análisis NIRS en muestras de leche líquida, empleando dos instrumentos y dos tipos de cubetas

Intrumento	Tipo Cubeta	Repetibilidad (RMSC)	Reproducibilidad (RMSC)
microPHAZIR	1-mm + adaptador	11190	45270
	17 mm	5309	4799
Foss NIR System 6500	17 mm	2568	3823

III.4.5. CONSTRUCCIÓN DE UNA BASE DE DATOS ESPECTRAL NIRS CON MUESTRA DE LECHE EN SU ESTADO NATURAL.

Tras la optimización de las condiciones instrumentales, se comenzó a construir la base de datos espectrales, con muestras de leche sin pretratamiento alguno, correspondientes a las vacas en lactación del rebaño experimental del SERIDA.

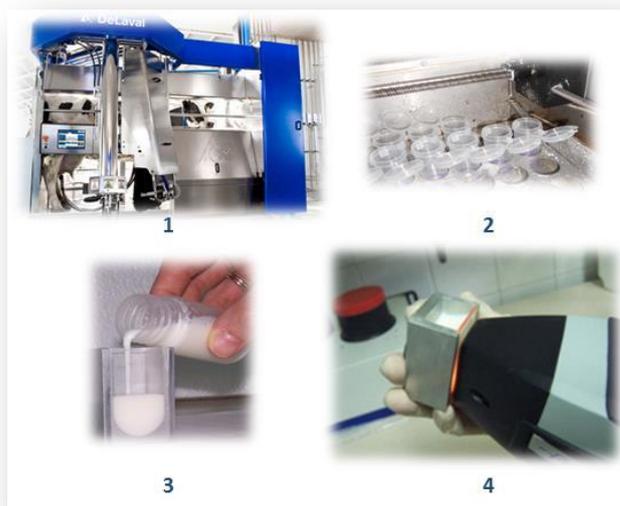


Figura 3.4.5.1. Recogida de muestras y análisis NIRS de leche en el equipo MicroPhazir

La Figura 3.4.5.1, esquematiza la recogida de muestras de leche individual en el sistema voluntario de ordeño (1), tubos de 50 mL para almacenamiento de las

muestras (2); trasbase de la leche tras agitación manual a cubeta de 17 mm (3) y análisis NIRS en el equipo MicroPhazir (4).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado en las condiciones instrumentales anteriormente optimizadas. El espectro final de cada muestra de leche líquida es el promedio de todos ellos.

La base de datos contiene además de los datos espectroscópicos, datos de referencia de los parámetros físico-químico: grasa, proteína, lactosa y sólidos no grasos magro (MSNF) o extracto seco magro (ESM) y microbiológicos (recuento de células somáticas).

3.4.5.1. Resultados y discusión

Los datos de composición media de la base de datos disponible hasta el momento, se presentan en la Tabla 3.4.5.1.1. Como puede apreciarse los valores promedio del porcentaje de grasa y proteína son similares a los establecidos para el pago por calidad de la leche y el recuento de las células somáticas (RCS) inferior al máximo establecido (400.000 células/mL) en la UE. No obstante, la población presenta gran variabilidad, con muestras muy ricas en grasa y proteína, así como leches con altos niveles de células, indicativos de una calidad disminuida, causada por una infección intramamaria que ocasiona mastitis clínica o subclínica (Satu, 2003).

Tabla 3.4.5.1.1. Composición media en parámetros físico-químicos y microbiológicos de la leche

	Grasa (%)	Proteína (%)	Lactosa (%)	ESM (%)	Células somáticas x1000/mL
Promedio:	3,61	3,18	4,87	8,72	173
Desvest:	0,51	0,27	0,22	0,37	370,27
Máx:	5,70	3,97	5,21	9,56	2000
Mín:	2,20	2,00	2,66	6,00	20

ESM: Extracto seco magro

Las siguientes figuras (Figura 3.4.5.1.1 a Figura 3.4.5.1.3) muestran los promedios del espectros/rango y el atributo del conjunto de la base de datos espectrales, para grasa, proteína y células somáticas. A priori, no se observan diferencias de ahí la necesidad , de aplicar pretratamientos matemáticos (por ejemplo derivada) para poder extraer información útil de los espectros que permita establecer correlaciones entre los parámetros de calidad de la leche y los correspondientes espectros.

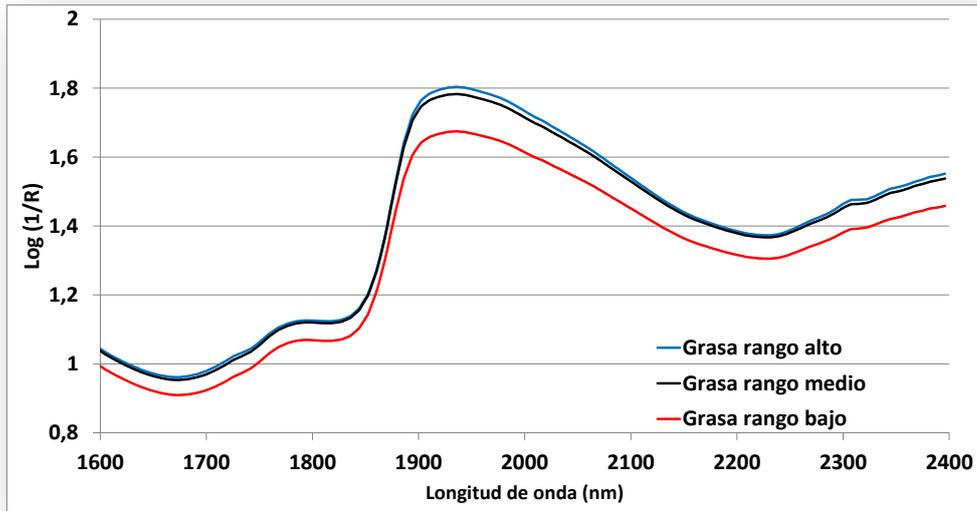


Figura 3.4.5.1.1. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para grasa

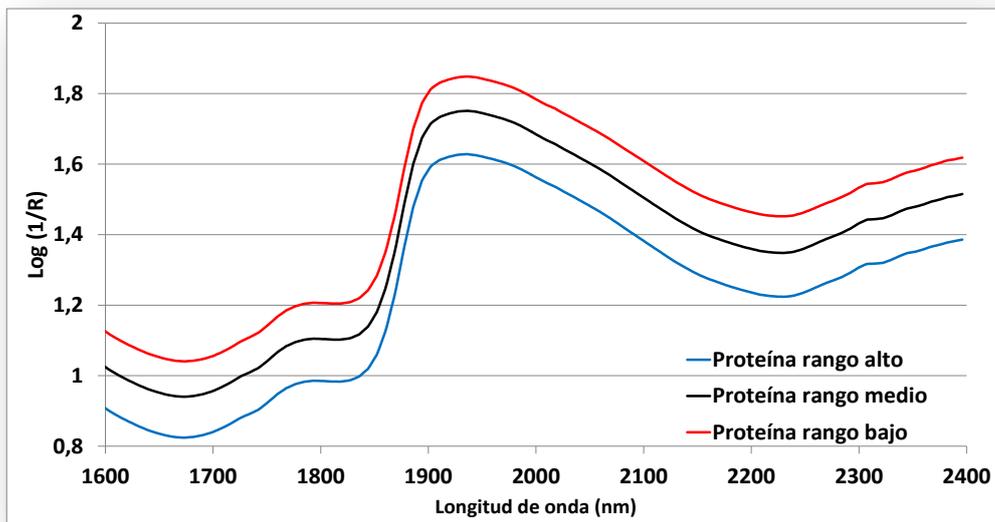


Figura 3.4.5.1.2. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para proteína

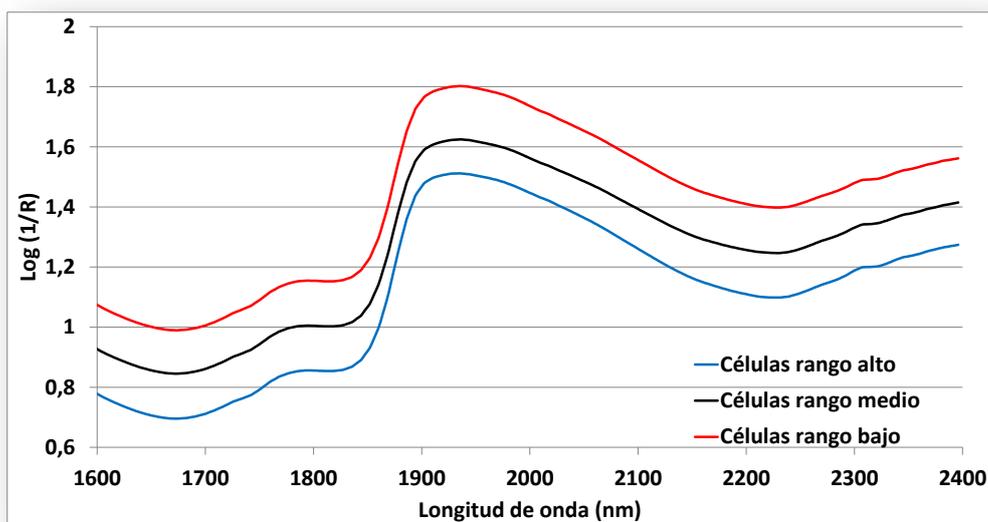


Figura 3.4.5.1.3. Promedios de los espectros/rango y atributo del conjunto de la base de datos espectrales de leche líquida para células somáticas

III.4.6. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS CUANTITATIVOS PARA LA PREDICCIÓN DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS EN LECHE: GRASA, PROTEÍNA, LACTOSA Y EXTRACTO SECO

En el desarrollo de las aplicaciones, la forma de operar se basa en desarrollar el modelo matemático que relaciona los datos espectrales y los datos proporcionados por el método de referencia (Shenk *et al.*, 1996), lo que en muchas ocasiones se ve dificultado por la falta de concordancia entre ambos datos, ya que los métodos de laboratorio y el NIRS podrían medir distintas entidades fisicoquímicas. Generalmente, los métodos utilizados como referencia aportan información sobre las propiedades químicas y/o físicas del producto, mientras que la tecnología NIRS mide las vibraciones moleculares.

Además es necesario tener en cuenta la complejidad de la señal espectroscópica generada, debido a que el espectro NIR proporciona información que en ocasiones es redundante entre otras razones por solapamientos de bandas, lo que hace difícil su interpretación; además, cabe destacar que sobre el espectro NIR influyen una serie de factores tales como la homogeneidad o el modo de presentación de la muestra. Es necesario remarcar que, aunque su uso en rutina es simple e instantáneo, se requiere de conocimientos en el ámbito quimiométrico y el desarrollo de calibraciones y modelos cualitativos o de clasificación, pudiendo prolongarse la obtención de modelos robustos durante años, particularmente, en el caso de productos agroalimentarios.

3.4.6.1. Resultados y discusión

Siguiendo la estrategia descrita en el apartado 3.4.3.3 se desarrollaron los modelos de predicción. Se obtuvieron ecuaciones de calibración NIRS para cuantificar el contenido en grasa, proteína, lactosa y ESM, además del recuento de células somáticas. Tras evaluar diferentes tratamientos de corrección de la dispersión de la luz "scattering", derivadas, segmentos de derivación y gap, subdividiendo la población en diferentes grupos de validación cruzada, los mejores resultados fueron obtenidos con el pretratamiento SNV& Detrent, primera derivada, 10 puntos de derivación y un gap de 5 (SNV&D; 1,10, 5, 1). Los modelos fueron validados con una población externa al conjunto de calibración representada por 40 muestra de leche.

Los primeros modelos de predicción se desarrollaron con un colectivo de calibración de 128 muestras y fueron validados con el colectivo externo de 40 muestras. Estos resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3.4.6.1.1. Variabilidad poblacional y estadísticos de calibración y validación en muestras de leche líquida para determinar su composición

Parámetro	SEC	RSQ	SECV	1-VR	SEP	Rango	Media	SD	RER	RPD
Grasa	0,058	0,982	0,087	0,959	0,124	2,61-5,08	3,572	0,426	28,390	4,896
Proteína	0,078	0,882	0,115	0,750	0,129	2,67-3,70	3,204	0,228	8,956	1,982
Lactosa	0,105	0,524	0,111	0,470	0,122	4,47-5,13	4,843	0,152	5,945	1,369
ESM	0,135	0,780	0,180	0,619	0,231	7,73-9,30	8,723	0,288	8,722	1,600

ESM: extracto seco magro; RSQ y 1-VR: coeficiente de determinación de calibración y validación cruzada; SEC, SECV y SEP: errores de calibración, validación cruzada y validación externa; SD: desviación estándar de la población de calibración; RER: relación entre el rango de la población y el error de validación cruzada y RPD: relación entre la desviación estándar de la población y el error de validación cruzada,

Las correlaciones entre los valores de referencia vs los predichos por los modelos NIRS para grasa, proteína y ESM, se presentan en las siguientes figuras:

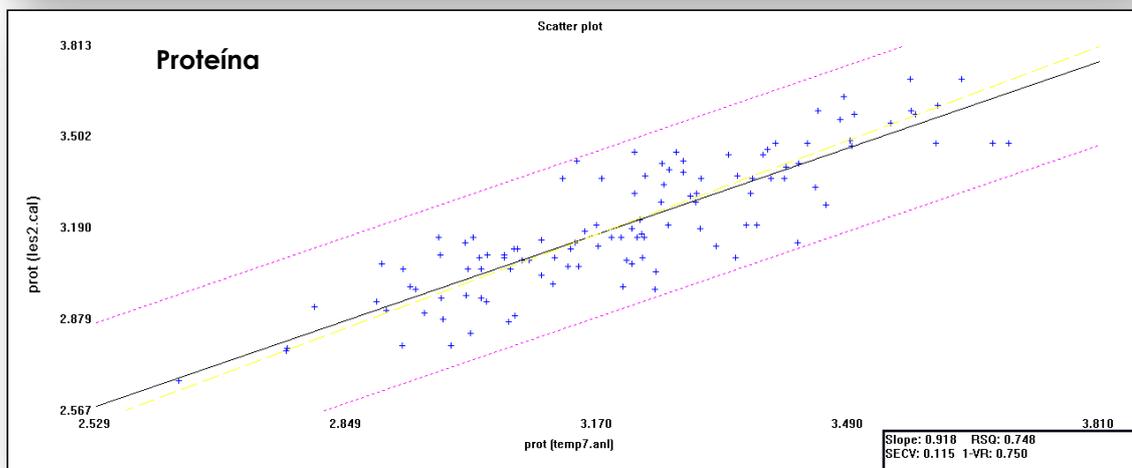
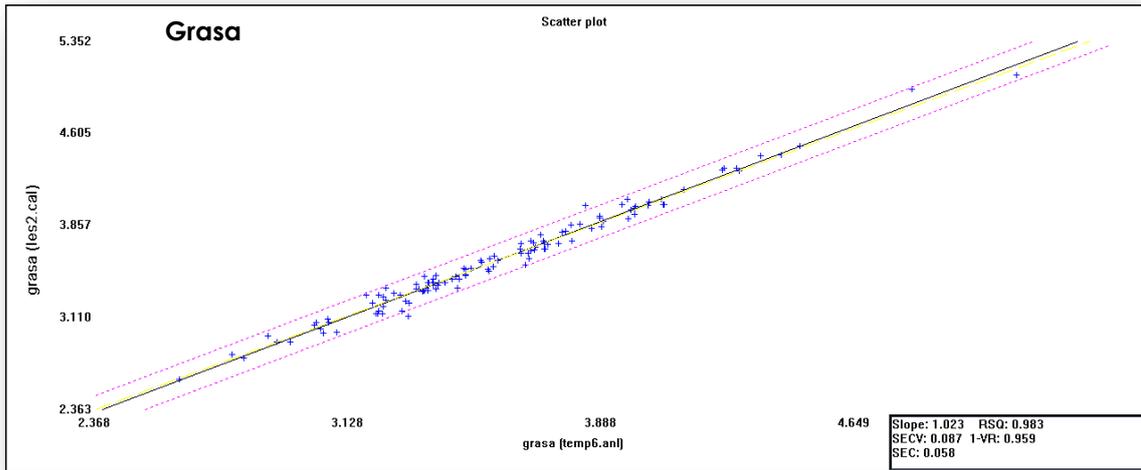


Figura 3.4.6.1.1. Correlación entre los valores de referencia vs predichos NIRS para los parámetros de grasa y proteína en leche líquida

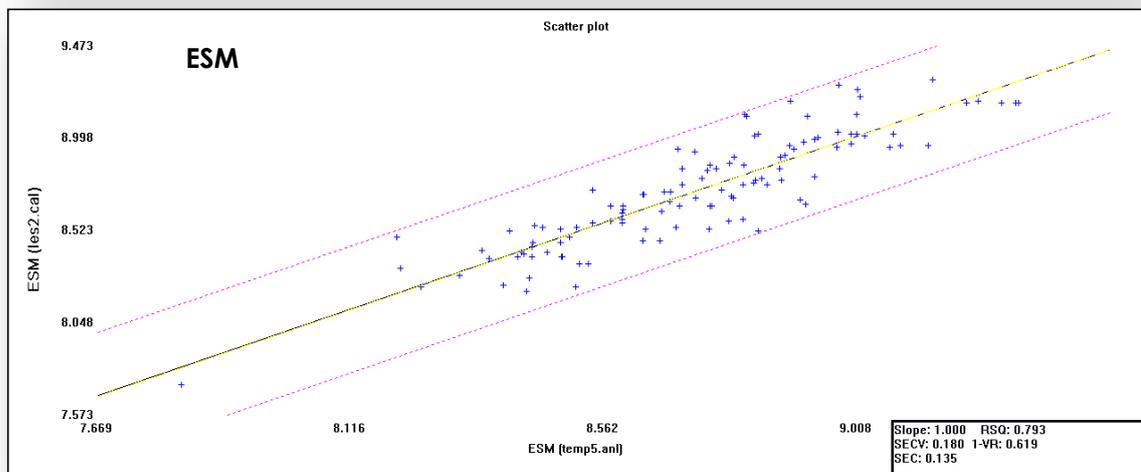
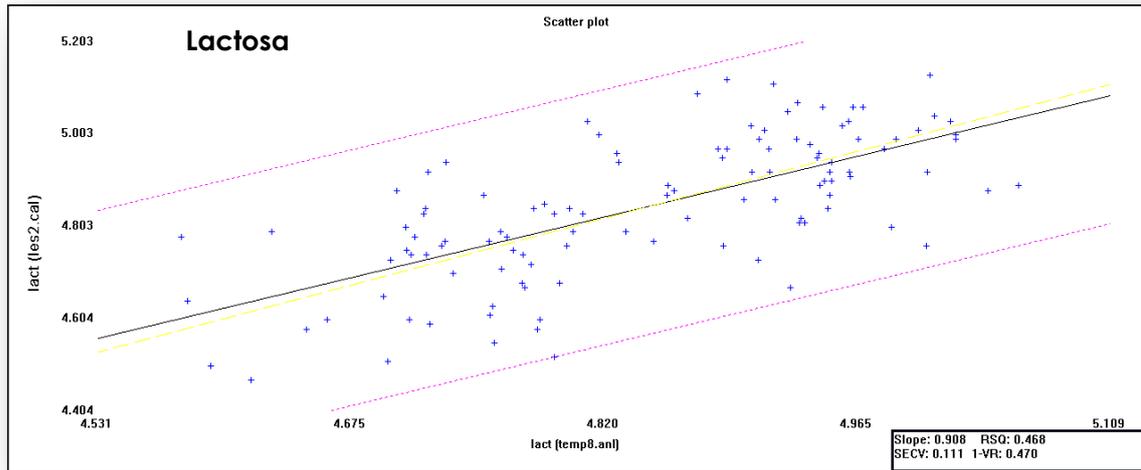


Figura 3.4.6.1.2. Correlación entre los valores de referencia vs predichos NIRS para los parámetros de lactosa y ESM en leche líquida

Atendiendo a los criterios estadísticos que definen la aceptación de los modelos de predicción, puede observarse que los menores errores típicos de calibración (SEC) lo presentan los parámetros de grasa y proteína (0,058 y 0,078 respectivamente), así como los mayores coeficientes de determinación de calibración y validación cruzada RSQ y 1-VR (0,982 y 0,959 para la grasa y 0,882 y 0,750 para la proteína respectivamente) permitirían también utilizarse esta calibración NIRS para predicciones bastante seguras y no sólo para estimaciones groseras como en el caso de la lactosa (0,540), según la clasificación de Williams (2003). Aunque en términos absolutos el error de validación externa o SEP es igual para los parámetros de grasa, proteína y lactosa, siendo mayor el correspondiente al ESM, si se expresan en porcentaje del error con respecto a la media poblacional, los contenidos en lactosa y ESM son los que presentan menor error, aproximadamente del 25%. En cuanto a la capacidad de los modelos para predecir los parámetros en estudio, el valor de RER indicaría (Millmier *et al.*, 2000), que para la lactosa (5,945) podría distinguir entre valores altos y bajos

(modelo cualitativo), para el ESM (8,722) y la proteína (8,956) y la predicción sería cuantitativa, con excelentes estadísticos para la grasa (28,390).

Con respecto a los resultados de validación externa, señalar que son satisfactorios para todos los parámetros, puesto que la relación entre el SEP y el SECV es siempre inferior a 1,5 (Savenije *et al.*, 2006), con un valor mínimo de 1,1 para la lactosa y 1,42 para la grasa.

III.4.7. TRANSFERENCIA DE MODELOS QUIMIOMÉTRICOS ENTRE INSTRUMENTOS MEMS-NIRS.

Actualmente, los avances tecnológicos han minimizado las diferencias entre instrumentos NIRS, incluso del mismo fabricante y modelo, sin embargo, es necesario recurrir a procesos de ajuste de los datos espectrales o de calibración para conseguir transferir modelos de calibración de un equipo a otro. Estas variaciones espectrales, si bien pueden ser debidas a múltiples factores como se expuso con anterioridad, es difícil incorporarlos en la calibración original.

Existen diferentes estrategias que varían en función de la robustez del modelo desarrollado y del tipo de ajuste necesario para hacer el modelo transferible. Se distinguen básicamente dos tipos de métodos (Bouveresse y Massart, 1996; Fearn 2001; Andrew y Fearn, 2004) que dependen así mismo de las características de los equipos a clonar:

a.- Desarrollo de calibraciones robustas para minimizar o eliminar las variaciones entre espectros obtenidos instrumentos: En este método se emplean pre-tratamientos tanto de selección de longitudes de onda robustas a las diferencias instrumentales y la inclusión de espectros de los distintos instrumentos en el colectivo de calibración.

b.- Desarrollo de algoritmos de clonación haciendo uso de estrategias que utilizan muestras de referencia: Este grupo de métodos es el más utilizado en la práctica. Para su aplicación es necesario llevar a cabo la colección de la información espectral de unas muestras de referencia en el equipo considerado máster y en el satélite. En este modo de clonación la selección de las muestras de referencia es crítica, el número tiene que ser lo suficientemente elevado para permitir la estimación de los parámetros de regresión. Más aún dada la dificultad que esta tarea entraña, existen incluso estudios que evalúan el efecto de utilizar diferentes muestras de referencia (Bouveresse *et al.*, 1994). Además, cuando se emplea esta estrategia es muy importante tener en cuenta que las muestras de referencia deben ser los más estables posible durante el

periodo de medida en todos los equipamientos. Además, deben ser muestras similares a las que se van a analizar.

Este procedimiento de estandarización se basa en el hecho de que las diferencias encontradas en los espectros entre diferentes equipos son debidas a diferencias instrumentales y no a cambios en las muestras de clonación (Fearn, 2001). No obstante, para conseguir resultados satisfactorios con la aplicación de los mismos, es crucial que las mismas muestras, en idéntica condiciones, sean analizadas de manera simultánea en los instrumentos a clonar.

El algoritmo utilizado en este trabajo de Tesis Doctoral ha sido planteado con el uso de muestras de referencia (b), empleando el algoritmo patentado por Shenk y Westerhaus (1989, 1991a, 1991b) y que se encuentra recogido en el paquete estadístico WinISI ver. 1.50.

Este procedimiento matemático se basa, según Bouveresse *et al.* (1994), en lo que a continuación se resume:

- Tratamiento en primera derivada de todos los espectros del colectivo de clonación
- Ajuste de las longitudes de onda mediante correlación de los espectros obtenidos con el equipo master y sus homólogos del satélite.
- Ajuste a un modelo cuadrático para la longitud de onda de máxima correlación y sus dos longitudes de onda más próximas.

3.4.7.1. Desarrollo de algoritmos de clonación haciendo uso de estrategias que utilizan muestras de referencia en leche líquida en estado natural

Se llevó a cabo el análisis y almacenamiento de la información espectral de 25 muestras de leche en estado natural de referencia en el equipo considerado máster (MicroPhazir SERIDA) y en el satélite (MicroPhazir UCO) por triplicado, de manera simultánea en cada instrumento. En este modo de clonación la selección de las muestras de referencia es crítica, pues tal y como se mencionó el número tiene que ser lo suficientemente elevado para permitir la estimación de los parámetros de regresión. El algoritmo utilizado fue el patentado por Shenk y Westerhaus ya referenciado.

Antes de iniciar el desarrollo de los algoritmos, se efectuó un CONTRAST (WinISI ver. 1.5) para evaluar las diferencias espectrales en datos brutos, entre las muestras analizadas en el equipo MicroPhazir SERIDA y MicroPhazir UCO, en términos de RMS(C). A continuación, cada uno de las dos conjuntos de muestras de referencia (MicroPhazir

SERIDA y MicroPhazir UCO) fue centrada y de acuerdo con la distancia de cada una de las muestras al centro población, haciendo uso del estadístico H de Mahalanobis, se eligieron según distancia H de menor a mayor, por un lado un total de 20 muestras al azar, 10 muestras (1 de cada 5) y la muestra central, para calcular diferentes algoritmos de clonación.

3.4.7.2. Resultados y discusión

Sobre la colección espectral de 25 muestras de leche líquida, analizadas por triplicado en los dos equipos considerados, se efectuó una comparación de los promedios espectrales de cada muestra analizada cada equipo, y se eliminaron 4 de ellas por tener valores de la raíz cuadrática media de las diferencias corregida por el bias (RMS(c)) elevados (>85.000), lo que se consideró un error en el análisis en alguno de los equipos, por lo cual la colección de los espectros de cada instrumento se redujo a 50 muestras. Sobre éstas, se seleccionaron las muestras de clonación en función de la distancia al centro poblacional y se desarrollaron las correspondientes matrices de clonación: st20 con 20 espectros de las mismas muestras analizadas simultáneamente en el equipo máster y en el satélite; st10 con 10 espectros de muestras y otra con un único espectro de una muestra de leche líquida (st1), que se correspondía a la situada en el centro de la población (valor H=0).

La matriz desarrollada con st20 (ver tabla 3.4.7.2.1), no generó reducciones importantes entre los espectros de ambos instrumentos en términos del estadístico RMS(C), comparando los espectros de las muestras analizadas en el equipo máster vs satélite, antes y después de aplicar la matriz de clonación. Por lo cual se compararon los resultados obtenidos con los algoritmos st10 y st1.

Por tanto, sobre las muestras restantes no incluidas para el desarrollo de los algoritmos, de clonación y utilizando el estadístico RMS(C), se evaluó la eficacia en la reducción de las diferencias espectrales de las matrices de estandarización. En la Tabla 3.4.7.2.1, se puede observar como las diferencias entre los espectros medios de las muestras de leche analizadas en el MicroPhazir del SERIDA y el MicroPhazir de la UCO en términos de RMS(C) se van reduciendo. Cuando ambas colecciones de espectros están sin tratar las diferencias oscilan entre valores de RMS(C) de 77702 a 35483, con un valor medio de 54590. Cuando a la colección de los espectros de la UCO se aplica una transformación matemática desarrollada con una única muestra de leche, los valores de RMS(C) oscilan entre 33900 y 2635, con un valor medio de 16493. Finalmente, cuando el modelo de clonación ha utilizado 10 muestras de referencia, los valores de

RMS(C) oscilan entre 23632 y 2505, con un media de 11818. Estos resultados indican la reducción sensible de las diferencias espectrales entre los dos instrumentos cuando se aplica una matriz de estandarización.

Los resultados ponen de manifiesto que con el algoritmo de clonación de Shenk y Westerhaus se realiza un ajuste satisfactorio de la información espectral entre los espectros recogidos en el instrumento de la UCO y los espectros recogidos en el equipo SERIDA, con valores de RMS(C) promedio 11818 cuando este se calcula con 10 muestras de leche.

Tabla 3.4.7.2.1. Raíz cuadrática media de las diferencias espectrales corregida por el bias (RMSC) para las muestras de evaluación de la transferencia, tras la aplicación de matrices de estandarización

	RMS (C)
SERIDA vs UCO	54590
SERIDA vs UCOst1	16493
SERIDA vs UCOst10	11818
SERIDA vs UCOst 20	53540

III.4.8. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS TRANSFERIDOS

Tras ensayar las diferentes estrategias de clonación de los equipamientos NIRS portátiles, es necesario realizar la validación del proceso de transferencia, por para lo cual se hace necesario utilizar el set de muestras externas de validación (N=40). De hecho las escasas experiencias previas de clonación y transferencia de ecuaciones entre sensores NIRS de nueva generación con selección óptica mediante MEMS-DTS (Fernández Pierna *et al.*, 2010) han puesto de manifiesto además de la influencia del instrumento o producto a analizar, la incidencia del método de calibración y las correcciones matemáticas en la capacidad predictiva de los modelos transferidos.

3.4.8.1. Evaluación de la transferencia de los modelos desarrollados en el SERIDA para leche en estado natural

El modelo validado fue el desarrollado en primer término (Tabla 3.4.6.1.1) para los componentes mayoritarios de la leche utilizados para el pago por calidad en la industria láctea. La evaluación de la transferencia se llevó a cabo sobre 40 muestras de leche, analizadas por triplicado en ambos sensores NIRS.

3.4.8.2. Resultados y discusión

La Tabla 3.4.8.2.1 muestra los valores de los errores estándar de predicción (SEP) obtenidos en el equipo máster MicroPhazir del SERIDA y el satélite MicroPhazir de la UCO, antes y después de aplicar las matrices de estandarización.

Tabla 3.4.8.2.1. Valores de los errores estándar de predicción (SEP) en el equipo máster (SERIDA) y el satélite (UCO) para componentes mayoritarios en leche líquida, tras la aplicación de matrices de estandarización

Parámetro	SEP SERIDA	SEP UCO	SEP UCO st1	SEP UCO st10
Grasa	0,124	1,102	0,208	0,162
Proteína	0,129	0,229	0,203	0,202
Lactosa	0,122	0,165	0,147	0,144
ESM	0,231	1,060	0,291	0,326
GH	1,497	20,000	1,550	1,839

ESM: extracto seco magro; SEP: errores de predicción (validación externa)

En general, los valores de SEP fluctúan enormemente, según el parámetro. Sin aplicar ninguna matriz de clonación los SEP obtenidos en el equipo satélite varían entre casi 10 veces superior para la grasa y 1,35 para la lactosa. Cuando se aplica la matriz de estandarización st1 y la st10, los errores se reducen y en especial para el parámetro de la grasa (1,102 vs 0,208 y 0,162) y el ESM (1,060 vs 0,291 y 0,326). Tal como se muestra en la tabla 3.4.8.2.1 el ratio SEP st1 y SEP st10 oscila entre 0,84 y 1,28 lo que demuestra las excelentes características del ajuste espectral con un amuestra, la del centro poblacional ($H=0$). Además, estos resultados demuestran la importancia de la selección de las muestras para realizar la clonación.

Adicionalmente y como era de esperar, la estandarización reduce sensiblemente los valores de GH, lo que indica una sensible reducción de las diferencias espectrales tras aplicar los algoritmos de clonación (ver tabla 3.4.8.2.1).

No obstante, dichos valores de GH aun se reducen más para SEP UCO st10 tras eliminar cuatro muestras del conjunto de validación que presentaron valores de $GH > 3$ al aplicar el modelo de predicción, con valores de GH que oscilaban entre 10,850 y 3,790, el nuevo valor de GH obtenido es de 1,380

La evaluación final de la transferencia de las ecuaciones NIRS, se realizó con el estadístico SED (error estándar de las diferencias), que evalúa las diferencias de las predicciones para los parámetros considerados entre el equipo máster y el satélite antes y después de aplicar los algoritmos de clonación sobre el colectivo de validación (Tabla 3.4.8.2.2). El valor de SED se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$SED = \sqrt{\frac{\sum(Y_{master} - Y_{satélite})}{N}}$$

Donde Y_{master} e $Y_{satélite}$ son los valores predicho para una muestra en los instrumentos master y portátiles.

Tal y como se muestra en la Tabla 3.4.8.2.2, los valores de SED disminuyeron sensiblemente, especialmente significativa es la disminución en el caso de la grasa y el ESM, llegando a ser incluso del mismo orden que los valores del SEP para el instrumento master. Los valores del SED son similares para la estandarización con 1 muestra y con 10 muestras en todos los parámetros con excepción de la grasa con valores de Sed para 1st de 0.223 y para 10st de 0.140.

Los SED entre el SERIDA y la UCO alcanzaron una gran reducción que oscila entre más del 85% para la grasa, el 40% para proteína y casi el 30% para lactosa y ESM. Estos valores de SED representan alrededor de 1,5 veces el valor de SECV (Tabla 3.4.6.1.1) y de la misma magnitud que los SEP para los parámetros de grasa y proteína. Sin embargo, los valores de SED son sensiblemente inferiores para lactosa y ESM que los errores del modelo, hecho que podría indicar la existencia de algún artificio matemático.

Tabla 3.4.8.2.2. Valores de los errores estándar de las diferencias (SED) de las predicciones en el equipo máster (SERIDA) y el satélite (UCO) para los componentes mayoritarios de la leche líquida, tras la aplicación de matrices de estandarización.

	Grasa	Proteína	Lactosa	ESM
SERIDA vs UCO	1,031	0,276	0,104	1,175
SERIDA vs UCOst1	0,223	0,182	0,055	0,161
SERIDA vs UCOst10	0,140	0,170	0,044	0,194

ESM: extracto seco magro

IV. CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Del trabajo experimental anteriormente descrito, podemos **concluir** que:

1. Los compuestos identificados cualitativamente mediante el análisis GC-MS en nata extraída mediante **centrifugación y ultracentrifugación** o mediante hexano/isopropanol son coincidentes. Es decir, el método de obtención de la fracción lipídica no afecta a los compuestos extraídos. La extracción lipídica basada en la centrifugación de la leche y ultracentrifugación de la capa de nata formada, es sencilla y rápida, sin embargo, muestra menor repetibilidad y reproducibilidad frente a la metodología basada en una primera centrifugación de la leche y posterior extracción con la mezcla de disolventes hexano/isopropanol 3/2. Esta diferencia se puede explicar teniendo en cuenta que en el caso de la extracción mediante disolventes, se trabaja con alícuotas tomadas de una disolución, por lo cual se parte de una matriz homogénea, mientras que en el caso de la centrifugación, se trabaja a partir de una matriz sólida más heterogénea. Ambas metodologías de extracción cumplen los criterios de repetibilidad y reproducibilidad de la metodología oficial.

2. La **temperatura ensayada (80°C)** no influye sobre el proceso de metilación, pero afecta a la repetibilidad y a la reproducibilidad de los ensayos, en general, a temperatura ambiente los valores de σ y CV son más bajos que a 80°C. Los experimentos realizados a 80°C presentan mayor número de rechazos según los criterios de evaluación utilizados, descritos en la norma Norma ISO15885/FIL 184, que los experimentos realizados a temperatura ambiente, tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad.

3. La metodología seleccionada para el análisis de AG en leche, basada en la extracción lipídica mediante centrifugación y ultracentrifugación y metilación a temperatura ambiente, cumple los criterios de repetibilidad y reproducibilidad, así como los de exactitud, como confirma la validación mediante un material de referencia. Por ello, se acepta como **metodología rutina** para ser implementada en un laboratorio de servicio que deba **procesar un número elevado de muestras**.

4. La **transmetilación/extracción** de muestras de leche mediante **digestión básica** empleando energía microondas **MW**, puede considerarse una **alternativa novedosa y viable** para el análisis de AG en muestras de leche. Las condiciones óptimas del proceso pueden fijarse en 40mg de muestra atacada, una T de 50°C y 10min de ataque en condiciones básicas. Dicha metodología cumple los criterios de precisión y

exactitud que marcan las normas de análisis de estos compuestos, siendo similares a los obtenidos mediante el método de referencia. La metodología ácida es descartada, al no cumplir los criterios de exactitud y precisión para compuestos críticos en el estudio desarrollado como son el ácido linoleico (9c12cC18:2) o el ácido α -linolénico (9c12c15cC18:3) respectivamente.

5. La **suplementación** de las dietas de vacuno lechero con **Se de origen orgánico incrementa** la excreción de Se en leche. Dicha suplementación, a una concentración en la ración completa de las vacas cercana a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ que, actualmente constituye el máximo legal permitido, permiten alcanzar la concentración del 7,5% de la CDR en leche en los dos primeros días de ensayo, y el 15% de la CDR a partir de la primera semana. Sería necesario establecer **los límites saludables de suplementación** de Se orgánico en animales en producción para evitar problemas de bioacumulación y toxicidad ambiental.

6. La **suplementación** de la alimentación de vacuno lechero con Se orgánico, a una concentración en la ración completa de las vacas cercana a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, **no interfiere** con las concentraciones en leche de otros elementos traza como el **Zn, Co y I**, aunque parece repercutir negativamente en el nivel de Cu.

7. La **cuantificación multielemental y simultánea** de metales traza mediante ICP-MS es una herramienta rápida y eficaz para el **control de calidad de la leche**, y la evaluación de sus posibles efectos adversos con respecto a la posible presencia de otros metales traza.

8. Entre las diferentes metodologías evaluadas y modos de presentación de muestras utilizando un **instrumento NIRS portátil MicroPhazir** que trabaja en un rango espectral de 1600 a 2400 nm, los mejores resultados para el **análisis de leche líquida sin pretratamiento** se obtuvieron con el Método 8, que se corresponde con la realización de 80 lecturas o scans/muestra, resultando como espectro medio de un análisis el promedio de las 80 lecturas, empleando una cubeta con una parte trasera de aluminio y 17 mm de paso de luz, permitiendo la obtención de buenos espectros, a pesar de la problemática que genera en el análisis NIRS de este tipo de muestras la gran absorción de la banda de agua.

9. La capacidad de los instrumentos **NIR portátiles** para **estimar** los cambios de composición en los principales componentes de la leche para el pago por calidad de manera individual, a partir de **modelos de predicción transferidos** de unos sensores a otros, presentan **resultados prometedores** del proceso de transferencia entre estos instrumentos portátiles.

10. Aunque los **modelos transferidos** son ligeramente menos exactos que los modelos antes de transferir, son **adecuados** para el análisis de la **leche líquida**. Por otra parte, la ligera pérdida de precisión está más que compensado por las **ventajas prácticas y técnicas** que permiten el traspaso de modelos de predicción NIRS de unos sensores a otros, para realizar el **análisis in-situ** para cada muestra individual de leche. Esto puede ser de gran importancia económica para las **medidas de gestión** en las explotaciones lecheras.

V. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Las características nutricionales de los alimentos que componen la dieta humana van más allá del sentido básico de la nutrición. Las exigencias de los consumidores han evolucionado, potenciando el consumo de dietas enriquecidas con la composición óptima para favorecer la salud humana a largo plazo.

Las conexiones entre alimento, salud animal, nutrición animal y productos animales saludables para consumo humano, como la leche, implican una investigación multidisciplinar, en ocasiones muy difícil. En este sentido la presencia de ciertos AG de la leche ha adquirido enorme interés dados sus efectos positivos en la salud humana. La leche es la principal fuente natural de ácido linoleico conjugado (CLA), al que se atribuyen como efectos positivos su acción hipocolesteromiante, acción antiaterogénica y anticancerígena, entre otras. La única vía con capacidad de maniobra para influir sobre la composición de los AG de la leche, posibilitando un enriquecimiento y/o modificación de su composición, es la alimentación del ganado, ya que es responsable del aporte lipídico diario a las vacas productoras de leche.

Existe amplia legislación sobre técnicas analíticas que garanticen la trazabilidad, control y etiquetado de todo tipo de alimentos, pero es necesario desarrollar metodologías capaces de analizar un gran número de muestras que potencien un control eficaz. Por ejemplo, la cuantificación de AG de interés para dar respuesta a las investigaciones planteadas sobre la influencia de la dieta en la composición de AG de la leche, entre otros.

En el apartado Experimental I de la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado la implementación de una metodología que se adapta a las necesidades anteriormente planteadas para la cuantificación de AG de interés en leche. Se ha estudiado la obtención de la fracción lipídica mediante una centrifugación de leche, separación de la nata así obtenida y ultracentrifugación de la misma. Posteriormente se ha optimizado y evaluado el proceso de trasnsmetilación/extracción mediante catálisis básica a diferentes temperaturas. Dichos procesos se han validado por comparación de los resultados con el método de referencia, que incluye una extracción de la fracción lipídica mediante disolventes orgánicos. El método de análisis mediante GC-MS empleado para la cuantificación de los ésteres metílicos de AG así obtenidos, se optimizó para adecuarlo a los AG de interés en el proyecto de investigación asociado (INIA RTA 2007 -0058, *Incremento en el estándar de calidad de la grasa de leche de vaca: Enriquecimiento natural de CLA en leche según el manejo de la alimentación*). Los resultados obtenidos indican que la temperatura no

afecta al número de AG identificados, aunque sí a la reproducibilidad del método, y que el desarrollo de una metodología alternativa a temperatura ambiente, cumple los criterios de precisión y exactitud establecidos por la Norma ISO15885/IDF184, tras validación con un material de referencia con valores certificados.

En el estudio Experimental 2, se desarrolló un procedimiento de extracción-metilación de AG en leche, mediante el empleo del MW como alternativa para la extracción y derivatización convencionales y la combinación de estos dos procesos en un solo paso. Se probaron digestiones en medio ácido (AD) y en medio básico (BD) de dos tipos de muestras: ácido en leche y en fracción lipídica obtenida por centrifugación/ultracentrifugación, y en medio básico para muestras de fracción lipídica. El primer paso para llevar a cabo la puesta a punto de la metodología fue la optimización secuencial de las condiciones experimentales, tanto instrumentales (Temperatura y tiempo), como químicas (ratio muestra/disolvente): primeramente la T, seguida del t y por último el ratio muestra/disolvente. Se analizaron estadísticamente los resultados y se establecieron las condiciones más favorables para AD (50°C, 30 min y 0,5 g de muestra de leche líquida) y BD (50°C, 10 min y 40 mg de muestra en forma de capa lipídica). Se evaluó la exactitud y la precisión del análisis mediante un material de referencia (grasa de mantequilla). La metodología BD muestra una exactitud entre 80-120% para valores menores de 0,05%, entre 90-110% para valores entre 0,5-5% y entre 95-105% para valores superiores a 5%. Por el contrario, en la metodología AD las exactitudes son más bajas para los siguientes AG: C8:0, C10:0, C12:0, C16:0, C17:0, C18:0, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2 y 9c11t-C18:2. Así mismo, la precisión de las metodologías, evaluadas en base a la repetibilidad y CV, cumple los criterios de la Norma ISO15885/IDF184 para la BD; sin embargo, no se cumplen estos criterios para varios compuestos en AD, no solo en AG saturados (C14:0, C15:0, C16:0 y C18:0) sino también insaturados (9c-C16:1, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2, 9c12c15c-C18:3). En base a los resultados obtenidos, la metodología BD se considera la seleccionada, estudiando como punto final su reproducibilidad como método de análisis, resultando ser satisfactoria al cumplir los criterios de evaluación de resultados de la Norma ISO15885/IDF184.

Siguiendo en la línea de la mejora de las características nutricionales de los alimentos que componen la dieta humana, en este caso con características específicas para las personas mayores, se ha desarrollado el apartado Experimental 3 de la presente Tesis Doctoral. En él se describe la influencia de la suplementación con Se orgánico, derivados de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, de vacuno lechero con la finalidad de aumentar el nivel de este elemento en la producción final, que consumido regularmente permita desarrollar una nutrición más equilibrada en este

elemento y su posible repercusión sobre el contenido de cierto oligoelementos Zn, Cu, Co y I en leche.

Este ensayo fue realizado en el rebaño experimental de leche del SERIDA con tres dosis diferentes de Se: D0 o grupo sin suplementación (grupo control), D1, D2 y D3 con contenidos crecientes de Se en la ración. Se tomaron muestras de leche individuales para cada animal. Para el control de metales traza e I, se puso a punto una metodología que lleva asociado el ataque por MW para eliminar la materia orgánica de las muestras de leche y el posterior análisis mediante ICP-MS. Para los metales traza se utilizó un método de digestión de MW ácido y para el I básico. La cuantificación mediante ICP-MS, se realizó empleando un equipo de celda de colisión/reacción y ^{59}Co , ^{65}Cu , ^{78}Se , ^{66}Zn y ^{127}I como isótopos cuantificadores. El método fue validado mediante el análisis de un material de referencia certificado.

Los resultados obtenidos mostraron que el contenido en Se experimenta una rápida respuesta, aumentando rápidamente y alcanzando el séptimo día de ensayo el 100% del nivel de estabilización para D1 y el 80% de D2. Sin embargo, para el grupo D3 con dosis más alta, los niveles de Se aumentan hasta el final del experimento, alcanzando 205 ng g^{-1} tras 63 días de suplementación. Los grupos con dosis D2 y D3 obtienen recuperaciones de Se que alcanzan en la primera semana del ensayo el 15% de la CDR para este elemento ($8,3 \mu\text{g Se} / 100 \text{ ml}$ de leche). En cuanto a los resultados correspondientes al Co, Zn y I, no mostraron efectos significativos para la interferencia con Se a ninguna de las dosis estudiadas, sin embargo, se observa que el contenido en Cu total experimenta un descenso a medida que se incrementa la concentración de Se en leche. No obstante, no se han descrito casos de antagonismo entre estos dos elementos, en el que la presencia de uno de ellos disminuya la disponibilidad del otro, ni parece haber relación entre los enzimas implicados en una deficiencia/disminución del Cu y el Se.

En los estudios que se llevaron a cabo en las secciones III.1, III.2 y III.3, los resultados obtenidos se apoyan en técnicas analíticas robustas, con valores excelentes de precisión y exactitud. Estas metodologías son necesarias para proporcionar información que permita evaluar y optimizar las estrategias de alimentación y el control de las producciones.

Po otro lado, ante la corriente estratégica en la producción láctea, llamada ganadería de precisión o "precisión dairy farming" y basada en la optimización de la gestión de la producción en ganaderías de vacuno de leche, surge la necesidad del control de manejo y de gestión mediante el uso de sensores y tecnologías de la información. Dentro de este enfoque, la tecnología NIRS se posiciona como una

herramienta de altas posibilidades como sensor de respuesta inmediata. Sin embargo, a pesar de la rapidez del análisis NIRS, su forma tradicional en el laboratorio (*at-line*) produce una demora entre el proceso de producción y el resultado que en muchas ocasiones no permite un uso adecuado de la información en la toma de decisiones.

La leche como producto perecedero necesita de una gran agilidad en su analítica para la obtención de resultados que deriven en el posible pago de primas por calidad. Por ello, en la sección Experimental 4 se describe el desarrollo y la evaluación de modelos quimiométricos NIRS para la caracterización de la leche de vaca a pie de campo, mediante sensores MEMS-NIRS portátiles de nueva generación. La finalidad es desarrollar una metodología analítica basada en la tecnología NIRS que permita establecer un control de calidad "*in-situ*" y a tiempo real de las producciones lecheras a nivel de explotación.

Para la puesta a punto y optimización de la recogida de información espectral de calidad en muestras de leche de vaca, se emplearon muestras de leche cruda del Programa de Investigación en Producción de Leche del SERIDA. Se ensayaron diferentes pretratamientos de las muestras de leche y se optimizaron las condiciones instrumentales de medida con el objetivo de obtener una señal espectral satisfactoria. La recogida de los espectros se realizó con un espectrofotómetro portátil MicroPHAZIR con rango de medida de 1600 a 2400 nm, empleando una cubeta de 1mm de espesor con adaptador para la medida y una cubeta de 17mm con fondo reflectante de aluminio. Se desarrollaron ecuaciones de calibración NIRS, realizando un pretratamiento de la señal espectral y aplicando modelos de regresión lineales multivariantes. Los mejores resultados para se obtuvieron recogiendo el espectro de la leche sin pretratamiento alguno utilizando cubeta de 17 mm. Las condiciones instrumentales más adecuadas para la recogida de la información espectral fueron, 80 barridos a promediar por espectro y tres espectros por muestra de leche. Los estadísticos de las ecuaciones de calibración desarrolladas ponen de manifiesto que es posible la predicción cuantitativa del contenido en grasa, proteína y el ESM. Con respecto a la lactosa señalar que es el parámetro que presentó el coeficiente de determinación más bajo, relacionado con el estrecho rango de variabilidad de la población.

Una vez obtenidos los modelos de calibración, se evaluó la posibilidad de transferir los modelos desarrollados en el equipo MicroPhazir SERIDA a otro equipo similar disponible en la Universidad de Córdoba (UCO), considerado máster el NIRS del SERIDA y satélite el MicroPhazir de UCO. Para llevar a cabo la transferencia fu necesario desarrollar diferentes matrices de estandarización con un número variable de muestras de leche,

hasta conseguir el mejor ajuste posible de los espectros del equipo satélite a los del master, sobre una colección espectral de 20 muestras de leche líquida, analizadas también por triplicado, simultáneamente en ambos instrumentos. Se seleccionaron diversos grupos de muestras de clonación en función de la distancia al centro poblacional y se desarrollaron las correspondientes matrices de clonación, con una (la situada en el centro de la población, GH=0, 10 y 20 muestras de leche. En términos del estadístico RMS(C) (raíz cuadrática media de la diferencia entre dos espectros de una misma muestra corregido por el bias), los mejores resultados los mostró la matriz desarrollada con 10 espectros de muestras de leche. La evaluación de la transferencia se llevó a cabo sobre una colección de 40 muestras de leche. Los SED (errores estándar de las diferencias) entre los dos equipos alcanzaron una gran reducción que oscila entre más del 85% para la grasa, el 40% para proteína y casi el 30% para lactosa y ESM.

Por tanto, la presente Tesis Doctoral puede considerarse un compendio de distintas estrategias analíticas que permiten caracterizar la leche, uno de los alimentos básicos en la dieta humana, que representa una importante parte en la dieta del hombre occidental, con la finalidad mejorar y controlar su calidad.

SUMMARY

The nutritive attributes of human food go beyond the strict sense of nutrition. Consumer's requirements have evolved, promoting enriched diets with the optimal composition to benefit long term health.

The connection of food, animal health, animal nutrition and healthy animal products, as cow milk, involves a complex multidisciplinary research. In this sense, milk fatty acids presence has acquired enormous interest due to their positive effects on human health. Dairy milk is the main natural source of conjugated linoleic acid (CLA), a compound with antithrombotic, anticarcinogenic and cholesterol-lowering effects.

Nutrition and feeding management of individual dairy cows can affect milk fatty acid composition as it is responsible of the lipid intake of dairy cows.

There is a broad legislation about analytical techniques in order to guarantee the traceability and labeling of food, but it is necessary to develop methodologies that are able to analyze a high number of samples and promote an efficient control (e.g. fatty acid analysis to support diet influence research in milk fatty acid composition).

Experimental part III.1 of the present Doctoral Thesis consists in the implementation of a methodology to achieve the goal previously proposed for milk fatty acid analysis. The study covers lipid fraction separation by centrifugation and ultracentrifugation and transmethylation/extraction optimization under acidic and basic catalysis and different temperatures. Both processes were validated against reference methodology that applies organic solvents for lipid fraction extraction.

GC-MS program used for chromatographic analyses was optimized for resolution of the fatty acids of interest in the project (INIA RTA 2007 -0058, Incremento en el estándar de calidad de la grasa de leche de vaca: Enriquecimiento natural de CLA en leche según el manejo de la alimentación). The results obtained showed no temperature effect on the fatty acids of interest. Room temperature methodology met precision and accuracy criteria established by ISO15885/IDF184, after its validation using a reference material.

In the experimental part III.2, a one-step transmethylation/extraction methodology applying microwave energy was developed as an alternative to conventional processes. Acidic (AD) and basic (BD) digestions were tested on two types of samples: liquid milk for the acidic digestion and lipid fraction (obtained by centrifugation/ultracentrifugation) aliquots for basic digestion. Experimental conditions

were optimized in operation sequence, temperature, time and finally sample/solvent ratio.

Results were statistically analyzed and the best conditions were chosen as follows: 50°C, 30 min and 0,5 g of liquid milk for AD and 50°C, 10 min and 40 mg of lipid fraction for BD. Precision and accuracy were evaluated by comparison with a reference material (butter fat). BD showed 80-120% accuracy for concentration lower than 0,05%, 90-110% between 0,5-5% and 95-105% for values higher than 5%. AD showed lower accuracy for C8:0, C10:0, C12:0, C16:0, C17:0, C18:0, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2 y 9c11t-C18:2. Moreover, BD met the ISO 15885/IDF184 requirements for repeatability and coefficient of variation. However, AD did not meet them for several fatty acids, not only saturated (C14:0, C15:0, C16:0 and C18:0) but also unsaturated fatty acids (9c-C16:1, 9c-C18:1, 9c12c-C18:2, 9c12c15c-C18:3). From the basis of the results so obtained, BD methodology was selected and its reproducibility was tested meeting the goals established by the ISO norm requirements.

Experimental part III.3 focuses on improving human diet nutritional improvement, specifically for elder people. The influence of organic Selenium dairy ration supplementation by a derivative from *Saccharomyces cerevisiae* was studied concluding that its consumption will help to obtain a more equilibrated nutrition. The effect of this Se supplementation on other trace elements in milk, as Zn, Cu, Co and I was also studied.

This study was carried out with the experimental herd of SERIDA, with four different Se supplementation dosages: D0 without Se supplementation (control group), D1, D2 and D3 with increasing Se supplementation on total mixed ration. Individual samples were analyzed. The methodology applied for the analysis consisted on a microwave basic or acidic digestion, in order to remove organic matter, followed by ICP-MS quantification. Basic digestion was applied for I and acidic for Co, Cu, Se and Zn. Collision/reaction cell was used for ICP-MS analyses and ^{59}Co , ^{65}Cu , ^{78}Se , ^{66}Zn y ^{127}I as isotopes for quantification. Method validation was carried out using a certified reference material.

The results showed that the average Se content in milk rose quickly reaching on day 7, 100 % on D1 and 80% on D2 of steady-state level. Nevertheless, for the highest D3 dosage, Se level increased until the end of the experiment, it rose to 205 ng g⁻¹ after 63 days of Se supplementation.

D2 and D3 dosages groups reached 15% of RDV for Se in the first experiment (8.3 µg Se /100 ml milk). The Co, Zn and I contents did not show significant effects at any Se supplementation level, however, Cu level decreased when Se concentration in milk

increased. No antagonist behaviors were described at the moment, no bio-availability interaction.

These studies summarized above were supported by robust analytical techniques with excellent precision and accuracy values. These methodologies are necessary to evaluate and optimize feeding strategies and production control.

In other hand, Precision Dairy Farming is a concept based on managing production optimization in dairy farming. The need for control through the use of sensors and information and communications technologies (ICT) emerges from this concept. NIRS technology stands out as a high potential tool with high sensor capabilities. In spite of its quick answer, NIRS methodology at line delays the results and it does not allow to use the information provided for making quick decisions.

Milk needs, as perishable product, high speed analytical methodologies to provide information about its composition, given that it is paid based on its quality. Experimental part III.4 describes the development and evaluation of NIRS models for milk characterization in-situ (on-line).

Samples of raw milk from the SERIDA Milk Investigation Production Program were used for the scanning optimization. Different simple milk pre-treatments were tested and instrumental conditions were optimized in order to get optimal spectra. Scanning was carried out with a portable spectrophotometer MicroPHAZIR (1596 a 2396 nm) with 1mm wide cuvette and 17mm wide cuvette reflective aluminum.

NIR calibration equations were developed with spectra pretreatment and linear multivariate regression models. The best results were obtained using the 17mm wide cuvette, averaged of 80 scans and 3 spectra per sample. Equations statistics so obtained showed good prediction for fat, protein and fat free dry matter. Lactose presented the lowest RSQ due to its narrow variability range.

After calibrations models were obtained, the transference from MicroPhazir SERIDA instrument (Master one) to another similar MicroPhazir from the University of Cordoba (slave one). Several cloning sets were developed in order to get the best spectral adjustment between Master and Slave instruments, using 20 milk samples. Different sample groups were used focusing on their GH, with only one sample (GH=0), with 10 and 20 samples. In terms of RMS(C) values, 10 samples group showed the best results. Transfer evaluation was carried out with 40 milk samples group. Standard error of differences (SED) were reduced in 85% for fat, 40% for protein and around 30% for lactose and free fat dry matter.

To summarize, the present work can be considered a summary of different analytical strategies for characterization of milk, a basic component of human diet that represents an important part of occidental diet, in order to improve and control its quality.

VI. TRABAJOS FUTUROS

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

Existe una valoración creciente por parte de los consumidores, no sólo relacionada con la cantidad sino también con la calidad de los alimentos a consumir. Más aún, hay una demanda creciente sobre aquellos productos identificados con una región o una tradición determinada. Todo ello, redundando en un incremento de la diversidad de la producción agraria, y una reactivación de la población local en el medio rural. Mas aún, en la actualidad en España existe una campaña del MAGRAMA cuyo objetivo es colaborar a favor del sector lácteo para lograr un funcionamiento eficiente y sostenible, de las cadenas de valor de la leche y los productos lácteos, mejorando la percepción del consumidor de los productos lácteos como productos de alto valor nutritivo y calidad, y garantizando la sostenibilidad del sector a largo plazo.

El sector lácteo, y la comercialización de productos garantizados como Producto Lácteo Saludable, exigen el desarrollo y la puesta a punto de herramientas analíticas capaces de proporcionar al producto la garantía de calidad y autenticación así como detectar actividades deshonestas o fraudulentas, tanto en lo referente a la calidad como a la seguridad alimentaria.

En este contexto se hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias de análisis químico-bromatológico basadas mayoritariamente en el empleo de herramientas complementarias imprescindibles para la autenticación de alimentos, algunas de las cuales se recogen en la Figura 1. El análisis de elementos traza e isótopos estables posee gran potencial en la identificación del origen de las producciones. A lo largo de sus vidas, los animales absorben cantidades considerables de elementos químicos y compuestos del medio ambiente, los cuales pueden seguir dos vías: la excreción ó la acumulación en sus tejidos. Estos compuestos se incorporan a la cadena alimentaria, bien provenientes de los alimentos que el animal ingiere o del medio ambiente que le rodea. Este aspecto es especialmente relevante en las producciones animales extensivas, en las cuales, los animales pasan la mayor parte de sus vidas en el medioambiente natural, consumiendo la flora local y alimentos procedentes de la propia zona. Los elementos traza y los isótopos estables están en muy baja concentración, y la obtención de resultados satisfactorios depende en gran medida de la técnica analítica empleada siendo la recomendada para el análisis elemental, por sus características: sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión, el ICP-MS, y para la especiación de los metales la combinación HPLC e ICP-MS.

El contenido en ácidos grasos de la leche responde a cambios en la dieta del animal. Ha sido demostrado que un incremento del consumo de forrajes lleva consigo el

aumento del contenido en CLA, ácido Vaccenico y ácidos C18:3 Es por ello, la incorporación de nuevos alimentos y estrategias en podrían inducir un efecto de relativa inmediatez sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. La identificación de estas variaciones exige la utilización de técnicas analíticas de separación cromatográfica, fundamentalmente la Cromatografía de gases (GC) con detectores de Espectrometría de Masas o de ionización de Llama, y el HPLC para poder llevar a cabo la resolución de los ácidos grasos C18:2.

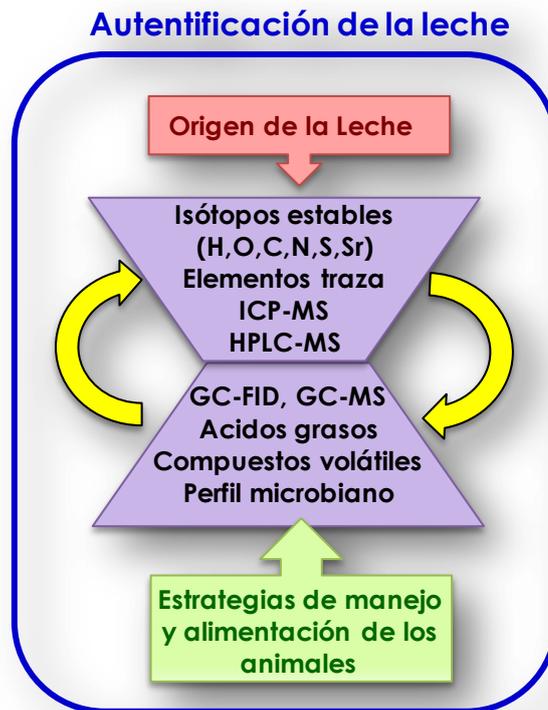


Figura XX. Herramientas y parámetros para la autenticación de alimentos.

Asimismo, la utilización de la información recabada en el desarrollo de las metodologías propuestas anteriormente, permitiría desarrollar estrategias de control de calidad y seguridad alimentaria basadas en el empleo de sensores NIRS portátiles. Más aún se podrían evaluar la posibilidad de su uso para la detección de desviaciones de producto respecto al estándar de calidad y/o seguridad. Se seleccionarán como atributos para establecer los parámetros de discriminación entre aceptabilidad y rechazo en materia de calidad y seguridad alimentaria de la leche.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aebersold R y Mann M (2003) "Mass spectrometry-based proteomics". *Nature*, 13; 422 (6928).

Agilent Technologies (2015) Agilent 8800 Triple Quadrupole. ICP-MS technology transformed. Performance redefined.

Akoglu B, Faut D, Milovic V y Stein J (2001) "Folate and chemoprevention of colorectal cancer: Is 5-methyl-tetrahydrofolate an active antiproliferative agent in folate-treated colon cancer cells?". *Nutrition*, 17, 652.

Alamar MC, Bobelyn E, Lammertyn J, Nicola BM y Moltó E (2007) "Calibration transfer between NIR diode array and FT-NIR spectrophotometers for measuring the soluble solids contents of apple". *PostharVest Biol. Technol.*, 45, 38.

Aldai N, De Renobales M, Barron LJR y Kramer JKG (2013) "What are the trans fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced trans fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements". *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1378.

Allam MF y Lucane RA (2004) "Selenium supplementation for asthma". *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD003538.

Álvarez Nogal PJ (2004) "Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche de vaca". *Ganadería*, nº 27, 60.

Alves S y Bessa RJB (2007) "Identification of *cis*- 12, *cis*-15 octadecadienoic acid and other minor polyenoic fatty acids in ruminant fat". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109, 879.

Alves S y Bessa RJB (2009) Comparison of two gas-liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat. *J. Chromatogr. A*, 1216, 5130.

Andrew A y Fearn T (2004) "Transfer by orthogonal projection: making near-infrared calibrations robust to between-instrument variation". *Chemometr. Intel.l Lab.*, 72, 51.

Andueza D, Rouel J, Chilliard Y, Leroux C y Ferlay A (2013) "Prediction of the goat milk fatty acids by near infrared reflectance spectroscopy". *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, Volume 115, Issue 6, pages 612.

Araujo P, Nguyen T, Froyland L, Wang J y Kang J (2008) "Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices". *J. Chromatogr. A*, 1212, 106.

Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Spiegelman D, Stampfer M y Willet W (1996) "Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow up study". In the United States. *Brit. Med. J.* 313: 84.

Astrup J A, Storach SA (1991) "Chemical Contaminants in Human Milk", CRC Press, Boca Raton, FL.

Aulrich K y Molkentin J (2009) "Potential of near infrared spectroscopy for differentiation of organically and conventionally produced milk". *Landbauforsch Volk* 59: 301.

Banhazi TM, Babinszky L, Halas V, Tscharke M (2012) "Precision Livestock Farming: Precision feeding technologies and sustainable livestock production". *Int. J. Agric. Biology. Eng.*, vol 5, n 4.

Barceloux DG y Barceloux D (1999) "Cobalt". *J Toxicol Clin Toxicol*, Volume 37, Issue 2, 201.

Barnes RJ, Dhanoa MS y Lister SJ (1989) "Standard Normal Variate transformation and De-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra". *Appl. Spectrosc.* 43: 772-777

Barnes RJ, Dhanoa MS y Lister SJ (1993) "Correction to the description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Trend (DT) transformations". *J Near Infrared Spec*, 1: 185-186

Barton FE (2002) "Theory and principles of NIR infrared Spectroscopy". *Spectrosc. Eur.*14/1 (2002)

Bauman DE y Griinari JM (2001) "Regulation and nutritional manipulation of milk fat low-fat milk syndrome". *Livest. Prod. Sci.*, 70, 15.

Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA y Griinari JM (1999) "Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants". *I. Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*, IN.: 1.

Bauman DE, Mather IH, Wall RJ y Lock LA (2006) "Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk". *J. Dairy Sci.* 89: 1235.

Benincasa C, Lewis J, Sindona G y Tagarelli A (2008) "The use of multi element profiling to differentiate between cow and buffalo milk. *Food Chem.* 110, 257-262.

Berckmans D (2003) "Precision livestock farming research". Keynote lecture at the first European Conference on Precision Livestock Farming, Berlin, Germany, June 15-19.

Berckmans D (2004) "Automatic on-line Monitoring of Animals by Precision LivestockFarming". *International Society for Animal Hygiène - Saint-Malo-* , 27-30.

Bernal J, Mendiola JA, Ibáñez E y Cifuentes A (2011) "Advanced analysis of nutraceuticals". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55, 758.

Bewley J (2010) "Precision Dairy Farming: Advanced Analysis Solutions for Future Profitability". *The First North American Conference on Precision Dairy Management University of Kentucky Kentucky, USA.*

Bilandzic N, Đokic M, Sedak M, Solomun B, Varenina I, Knezevic Z y Benic M (2011) "Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia". *Food Chem.*, 127, 63.

Birghila S, Dobrinas S, Stanciu G y Soceanu A (2008) "Determination of major and minor elements in milk through ICP-AES". *Environ Eng Manag J.*, 7, 805.

Bogomolov A, Dietrich S, Boldrini B y Kessler RW (2012) "Quantitative determination of fat and total protein in milk based on visible light scatter". *Food Chem.*, 134, 412.

Bouveresse E, Massart DL y Dardenne P (1994) "Calibration transfer across near-infrared spectrometric instruments using Shenk's algorithm: effects of different standardisation samples". *Anal. Chim. Acta* 297 pp. 405-416.

Bouveresse E y Massart DL (1996) "Standardisation of near-infrared spectrometric instruments: a review". *Vib. Spectrosc.*, 11, 3.

Brätter P, Navarro Blasco I, Negretti de Brätter VE y Raab A (1998) "Speciation as analytical aid in trace element research in infant nutrition". *Analyst*, 123, 821.

Brennan D, Alderman J, Sattler L, O'Connor B y O'Mathuma C (2003) "Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product". *Measurement*, 33, 67-74.

Büchmann N B (2000) "Development of global near infrared transmission calibrations for moisture and protein in cereals using artificial neural networks and very large data sets". In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 9th International Conference*; Davies, A. M. C., Giangiacomo, R., Eds.; NIR Publications: Chichester, U.K.,; pp 231-236.

Butler JA, Whanger PD, Kaneps AJ, y Patton NM (1989) "Influence of dietary methionine on the metabolism of seleno-methionine in rat". *J. Nutri.*, 119, 1001.

Cabassi G, Povolo M, Pelizzola V, Monti L, Genorini E y Contarini G (2013) "Development of a near infrared method for the quantification of the main classes of fatty acids obtained from raw milk by solvent-free extraction". *J Near Infrared Spec*, 21, 395.

Cabral de Lima G, Campos do Lago A, Chaves A, Fadini P y Luccas P (2013) "Determination of selenium using atomically imprinted polymer (AIP) and hydride generation atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 768, 35.

Cachaldora P, García-Rebollar P, Álvarez C, Méndez J y De Blas JC (2008) "Double enrichment of chicken eggs with conjugated linoleic acid and n-3 fatty acids through dietary fat supplementation". *Anim. Feed Sci. and Technol.*, 144, 315.

Casals Mercadal G, Torra Santamaria M, Deulofeu Piquet R y Ballesta Gimeno AM (2005) "Importancia del Selenio en la práctica clínica". *Química Clínica*, 24, (3) 141.

Cashman KD (2006) " Milk minerals (including trace elements) and bone health". *Int. Dairy J.*, 16, 1389.

Ceballos A, Sanchez J, Stryhn H, Montgomery J B, Barkema H W y Wichtel JJ (2009). "Meta-analysis of the effect of oral selenium supplementation on milk selenium concentration in cattle". *J. Dairy Sci.*, 92, 324 - 342.

Central Lechera Asturiana (2015). Circular de condiciones generales de pago de la leche. Junta Rectora, Junio 2015.

Cerosaletti P y Dewing D (2008) "What is precision feed management? The manager; Leading the way to profit through people". Pro-Dairy. Northeast Dairy Business,15.

Chen IS, Shen CSJ y Sheppard AJ (1981) "Comparison of methylene chloride and chloroform for extraction of fats from food products". J. Am. Oil Chem. Soc., 58, 599.

Chen J, Cao Y, Gao H, Yang L y Chen Z (2007) "Isomerization of conjugated linolenic acids during methylation". Chem. Phys. Lipids, 150, 136.

Chen S, Bobe G, Zimmerman S, Hammond EG, Luhman CM, Boylston TD, Freeman AE y Beitz DC (2004) "Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions". J. Agric. Food Chem., 52, 3422.

Cheuk DK, Chau TC y Lee SL (2005) "A meta-analysis on intravenous magnesium sulphate for treating acute asthma". Archives of Disease in Childhood, 90, 74.

Chilliard Y ,Ferlay A, y Doreau M (2001) "Effect of different types of forages animal fat marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids". Livest. Prod. Sci., 70, 31.

Chilliard Y y Ferlay A (2004) "Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties". Repr. Nutr. Dev., 44, 467.

Chouinard PY, Corneau L, Barbano DM , Metzger LE y Bauman DE (1999a) "Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows". J. Nutr., 129 1579.

Chouinard PY, Corneau L, Saebo A y Bauman DE (1999b) "Milk Yield and Composition During Abomasal Infusion of Linoleic Acids in Dairy Cows". J. Dairy Sci., 82, 2737.

Christie WW (1982) "A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters". J. Lipid Research, 23, 1072.

Clare DA y Swaisgood HE (2000) "Bioactive milk peptides: a prospectus J. Dairy Sci., 83, 1187.

Clinuvel Pharmaceuticals (2010) www.clinuvel.com/en/skin-science/skin-sun/light-and-skin-interaction.

Combs GF, Clark LC y Turnbull BW (2001) "An analysis of cancer prevention by selenium". BioFactors, Volume 14, Issue 1-4, 153.

Compañó Beltrán R y Ríos Castro A (2002) "Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos". Capítulo 11. Selección y validación de los métodos analíticos. Pag.213.

Contarini G, Povolo M, Pelizzola V, Monti L, y Lercker G (2013) "Inter laboratory evaluation of milk fatty acid composition by using different GC operating conditions". *J Food Compost. Anal.*, 32, 131.

Coppa M, Ferlay A, Leroux C, Jestin M, Chilliard Y, Martin B y Andueza D (2010) "Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy(NIRS)". *Int Dairy J.*, 20, 182.

Coppa M, Martin B, Agabriel C, Sibra C y Constant I (2012) "Authentication of cow feeding and geographic origin on milk using visible and near-infrared spectroscopy". *J. Dairy Sci.*, 95, 5544.

Coppa M, Revello-Chion A, Giaccone D, Ferlay A, Tabacco E y Borreani G (2014) "Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid and composition on fresh and thawed milk". *Food Chem.*, 150, 49.

Costa-Silva F, Maia M, Matos C, Calcada E, Barros A y Nunes F (2011) "Selenium content of Portuguese unifloral honeys". *J Food Compost. Anal.*, 24, 351.

Covaci MN, Gherghe A y Schepen P (2004) "Time trend investigation of PCBs, PBDEs and organochlorine pesticides in selected n-3 polyunsaturated fatty acid rich dietary fish oil and vegetable oil supplements; nutritional relevance for human essential n-3 fatty acid requirements". *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1780.

Cruz-Hernandez C, Zeyuan D, Jianqiang Z, Hill AR, Yurawecz M, Delmonte P, Mossoba MM, Dugan MER y Kramer JKG (2004) "Methods for Analysis of Conjugated Linoleic Acids and trans-18:1 Isomers in Dairy Fats by Using a Combination of Gas Chromatography, Silver-Ion Thin-Layer Chromatography/Gas Chromatography, and Silver-Ion Liquid Chromatography". *Journal of AOAC International*, Volume 87, Number 2, 545.

Dardenne P (2004) "Calibration transfer in near infrared spectroscopy". In: *Stretching the NIR spectrum to the limit. Proceedings of the 11th International NIR Conference*. Davies, T. and Garrido, Ana (Eds). NIR Publications, Chichester UK, pp.19- 26.

Dasbasi T, Saçmacı S, Ülgen A y Kartal S (2015) "A solid phase extraction procedure for the determination of Cd(II) and Pb(II) ions in food and water samples by flame atomic absorption spectrometry". *Food Chem.*, 174, 591.

de la Flor St. Remy RR, Fernández Sánchez ML, López Sastre JB y Sanz-Medel A (2004a) "Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and preterm formula milk whey by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell". *J. Anal. At.Spectrom*, 19,1104.

de la Flor St. Remy RR, Fernández Sánchez ML, López Sastre JB y Sanz-Medel (2004b) "Determination of essentials and toxic elements in premature human milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-ORC-MS), using an octopole reaction cell". *J. Ana.l Atom. Spectrom.*, 19, 616.

de la Fuente MA, Rodríguez-Pino V y Juárez M (2015) "Use of an extremely polar 100-m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles". *Int. Dairy J.*, 47, 52.

de la Fuente MA y Juárez M (2009) "Fatty acids". In L. Nollet, & F. Toldra (Eds.), *Handbook of dairy foods analysis* (pp. 215e232). Boca Raton, USA: CRC Press

De la Roza-Delgado B, Morales-Almaraz E, Soldado A, González A y Vicente F (2010) "Real time analysis of fatty acids of dairy cow productions based on grazing strategies by Near Infrared Spectroscopy". 2nd Feed for Health Conference. Tromsø, Norway, 15th June.

De la Roza-Delgado B, Soldado A, Gomes de Faria Oliveira AF, Martínez-Fernández A y Argamenteira A (2014a) "Assessing the value of a portable near infrared spectroscopy sensor for predicting pork meat quality traits of "Asturcelta autochthonous" swine breed". *Food Anal Method*, Volumen 7, Nº 1, 151.

De la Roza-Delgado B, Soldado A, González-Arrojo A, Zafra I (2014 b) "An application of portable NIR instruments in quality control of milk". *Proceedings of the FoodTech2014 Congress. II International Congress Food Technology, Quality and Safety. Session III. Emerging Techniques in Food Analysis. Novi Sad (Serbia).*

De Wit J Wagenaar JP, De Vries A y Baars T (2006) "Milk fatty acids in relation to feeding practices on Dutch organic farms". *Joint Organic Congress, Odense, Denmark, May 30-31.*

De Wit J y de Vries A (2008) "Feed composition and strategies to improve polyunsaturated fatty acid levels in organic cow milk". *16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20.*

Delmonte P, Fardin-Kia AR, Kramer JKG, Mossoba MM, Sidisky L y Rader JI (2011) "Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column". *J. Chromatogr. A*, 1218, 545.

Delmonte P, Fardin-Kia AR, Kramer JKG, Mossoba MM, Sidisky L y Tyburczy C (2012) "Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat". *J. Chromatogr. A*, 1233, 137.

Demment MW y Allen LH (2004) "Animal source foods to improve micronutrient nutrition and human function in developing countries". *J. Nutr.*, 133 (Suppl.), 11-S II.

Despaigne F, Walczak B y Massart DL (1998) "Transfer of calibration of near infrared spectra using neutral networks". *Appl. Spectrosc*, 52, 732.

Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF y Scollan ND (2006) "Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems". *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131, 168.

Dhiman TR, Satter LD, Pariza MW, Galli MP, Albright K y Tolosa MX (2000) "Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid". *J. Dairy Sci.* 83, 1016.

Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) N° 847/2014 de la Comisión de 4 de Agosto de 2014 relativo a la autorización de la DL-selenometionina como aditivo en piensos para todas las especies animales.

Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2015/489 de la Comisión de 23 de Marzo de 2015 relativo a la autorización de selenometionina producida por *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R645 como aditivo en piensos para todas las especies animales.

Dodig S y Cepelak I (2004) "The facts and controversies about selenium". Acta Pharma., 54, 261.

Doreau M, Chilliard Y, Rulquin H y Demeyer DI (1999) "Manipulation of milk fat in dairy cows". Recent Advances in Animal Nutrition. PC Garnsworthy. J Wiseman (Eds). Nottingham Press, Nottingham, UK.: 81.

Dracková M, Hadra L, Janstová B, Navratilová P, Pridalová H y Vorlová L (2008) "Analysis of goat milk by Near-Infrared spectroscopy". Acta Vet. (Brno), 77, 415.

Dreiucker J y Vetter W (2011) "Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction". Food Chem., 126, 762.

Elgersma A, Tamminga S y Ellen G (2006) "Modifying milk composition through forage". Anim. Feed Sci. Technol., 131, 207.

Eskilsson CS y Bjorklund E (2000) "Analytical-scale microwave-assisted extraction". J Chromatogr A, 902, 227.

Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. 10-14 Noviembre de 2008. Ginebra.

Rey Crespo F, Miranda M y López-Alonso M (2013) "Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain" Food Chem. Toxicol., 55, 513-518.

FAO producción <http://dairy.ahdb.org.uk/market-information/supply-production/milk-production/world-milk-production/#.VZpmbFlmvgw>. © Agriculture and Horticulture Development Board 2015. AHDB Dairy, Stoneleigh Park, Kenilworth, CV8 2TL, UK. Publicado 5 Junio de 2015. Fuente: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

FAO/OMS/UNU, 2004. *Human Energy Requirements*. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation (Geneva, 1985). (FAO Consumo: Food and Agriculture Organization of the United Nations). <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/en/#.VZ0IXPkiwSI>

Fearn T (2001) "Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review". J. Near Infrared Spec, 9, 229.

Fellner V, Sauer FD y Kramer JKG (1995) "Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture". *J. Dairy Sci.*, 78, 1815.

Feng S, Lock AL y Garnsworthy (2004) Technical Note: "A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk". *J. Dairy Sci.*, 87, 3785.

Fernández Pierna JA, Vermeulen P, Lecler B, Baeten V y Dardenne P (2010) "Calibration transfer from dispersive instruments to handheld spectrometers". *Appl. Spectrosc.*, vol 64, 644.

Fernández Sánchez ML, de la Flor St Remy RR, González Iglesias H, LópezSastre JB, Fernández-Colomer B, Pérez-Solís D, Sanz-Medel A (2012) "Iron content and its speciation in human milk from mothers of preterm and full-term infants at early stages of lactation: A comparison with commercial infant milk formulas". *Microchem J.* 105:108.

Fernández Sanchez L, Szpunar J (1999) "Speciation analysis for iodine in milk by size-exclusion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC - ICP MS)". *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, 1697.

Fernández-Ahumada E, Garrido-varo A, Guerrero JE, Pérez-Marín MD y Fearn T (2008) "Taking NIR Calibrations of Feed Compounds from the Laboratory to the Process: Calibration Transfer between Predispersive and Postdispersive Instruments". *J. Agric. Food Chem.*, 56, 10135.

Fernández-Bañares F, Cabré E, Esteve M, Mingorance MD, Abad-Lacruz A, Lachica M, Gil A y Gassull MA (2002) "Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status". *Am. J. Gastroenterol.*, 97, 2103.

Feudale RN, Tan H y Brown SD (2002) "Piecewise orthogonal signal correction". *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 63, 129.

Finley B L, Andrew DM, Shannon HG y Dennis J (2012) "Dose-Response Relationships For Blood Cobalt Concentrations and Health Effects: A Review of the Literature and Application of a Biokinetic Model". *J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Critical Reviews*, Volume 15, Issue 8, 493.

Folch J, Lees M y Sloane S A (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues". *J. Biol. Chem.*, 226, 497.

Forman JP, Rimm EB, Stampfer MJ y Curhan GC (2005) "Folate intake and the risk of incident hypertension among US women". *JAMA*, 293, 320.

Forsen KM, Jagerstad MI, Wigertz K, Witthoff CM (2000) "Folates and dairy products: a critical update". *JACN*, 19, 100S.

García R (2011) "Corrección de interferencias espectrales y no espectrales en ICP-MS". *ICP-MS Specialist Spain Agilent Technologies*.

García R (2013) "Trucos y consejos en ICP-MS". *ICP-MS Specialist Agilent Technologies Spain, 2013. ICP-MS and Petrochemical Analysis (Glenn Woods)*

Garrido A y Pérez-Marín D (2007) "Sensores NIRS para el control de procesos en la industria de los piensos compuestos". Jornada tecnológica INTERAL. Aplicación de la tecnología NIRS en la industria agroalimentaria. Mejora de la calidad en los procesos productivos". Madrid.

Gaucheron F (2005) "The minerals of milk". *Reprod. Nutr. Dev.* , 45, 473.

Gaucheron F (2011) "Milk and dairy products: A unique micronutrient combination". *J. Am. Coll. Nutr.*, 30:supp5, 400S-409S.

Gebauer SK, Chardigny J, Uhre M, Lamarche BJ, Lock AL, Proctor SD y Baer DJ (2011) "Effects of Ruminant trans Fatty Acids on Cardiovascular Disease and Cancer: A Comprehensive Review of Epidemiological, Clinical, and Mechanistic Studies". *Adv. Nutr.*, 2(4): 332-354.

Geladi P y Dåbakk E (1995) "An overview of chemometrics applications in near infrared spectrometry". *J. Near Infrared Spectrosc.*, 3, 119.

Giua L, Blasi F, Simonetti MS Y Cossignani L (2013) "Oxidative modifications of conjugated and unconjugated linoleic acid during heating". *Food Chem*, 140,680.

González-Iglesias H (2010) "Evaluación de la absorción/biodisponibilidad de suplementos de hierro y selenio en leches fórmula y estudio del efecto de la suplementación con yodo durante la lactancia". Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Goulden JDS (1964) "Analysis of milk by infrared absorption". *J. Dairy Res.*, 31, 273.

Grappin R y Ribadeau-Dumas B (1992) "Analytical methods for milk proteins". En *Advance Dairy Chemistry*, vol 1, Fox P F, ed London: Elsevier.

Griswold KE, Apgar GA, Robinson RA, Jacobson BN, Johnson D y Woody HD (2003) "Effectiveness of short-term feeding strategies for altering conjugated linoleic acid content in beef". *J. Anim. Sci.*, 81, 1862.

Grundy SM (1994) "Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids". *Am. J. Clin. Nutr.*, 60 (6Suppl), 986S.

Gunnarsdottir I, Dahl L (2012) "Iodine intake in human nutrition: a systematic literature review". *Food & Nutrition Research*, 56,19731

Gürkan R, Kir U y Altunay N (2015) "Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV-Vis spectrophotometry". *Food Chem.*, 180, 32.

Haldimann M, Alt A, Blanc A y Blondeau K (2005) "Iodine content of food groups". *J. Food Comp. Anal.*, 18, 461.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) "The antioxidants of human extracellular fluids". Arch. Biochem. Biophys., Volume 280, Issue 1,1.

Hansen M, Sandstrom B y Lonnerdal B (1996) "The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells". Pediatr. Res., 40, 547.

Hara A y Radin NS (1978) "Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent". Anal. Biochem., 90, 420.

Harfoot CG y Hazlewood (1988) "Lipid metabolism in the rumen. In: The rumen microbial ecosystem". PN Hobson (ed), Elsevier Appl. Sci. Publ. Co. Inc., New York, NY. 285-322.

Harfoot CG y Hazlewood GP (1997) "Lipid metabolism in the rumen. The Rumen Microbial Ecosystem". PN Hobson (ed). London, UK, Elsevier: 382-426.

Hartikainen H y Ekholm P (2001) "Selenium inclusion in fertilisers to correct an inadequate national dietary intake. En Guidelines on food fortification with micronutrients". World Health Organization Food and Agricultural Organization of the United Nations

Hartikainen H y Ekholm P (2001) "Selenium inclusion in fertilizers to correct an inadequate national dietary intake". Número 467 de Proceedings International Fertiliser Society), International Fertiliser Society, Edición ilustrada. Editor International Fertiliser Society. ISBN 0853101035, 9780853101031

Haug A, Hostmark AT y Harstad OM (2007) "Bovine milk in human nutrition – a review". Lipids in health Dis., 6,25.

Heard JW, Stockdale CR, Walker GP, Leddin CM, Dunshea FR, McIntosh GH, Shields PM, McKenna A, Young GP y Doyle PT (2007) "Increasing selenium concentration in milk: Effects of amount of selenium from yeast and cereal grain supplements". *J. Dairy Sci.*, , 90, 4117.

Herwig N, Stephan K, Panne U, Pritzkow W y Vogl J (2011) "Multi-element screening in milk and feed by SF-ICP-MS". Food Chem., 124, 1223.

Herzallah SM, Humeid MA and Al-Ismael KM (2005) "Effect of Heating and Processing Methods of Milk and Dairy Products on Conjugated Linoleic Acid and Trans Fatty Acid Isomer Content". *J Dairy Sci* 88,1301.

Hoac T, Stagsted J, Lundh T, Nielsen JH y B Akesson (2008) "Short-term effects of selenium supplementation of cows' feed on the content and distribution of selenium, copper and zinc in bovine milk, whey and blood plasma". *J. Dairy Res.*, 2008, 75, 326.

Hoac T, Lundh T, Purup S, Önning G, Sejrsen K, Akesson B (2007) "Separation of selenium, zinc and copper compounds in bovine whey using size exclusion chromatography linked to inductively coupled plasma mass spectrometry". *J. Agric. Food Chem*, 55, 4237.

Holroyd SE (2013) "The use of near infrared spectroscopy on milk and milk products". *J Near Infrared Spec*, 21, 311.

Horwitz W (1982) "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs". *Anal. Chem*, 54 67.

Hurtaud C, Faucion F, Couvreur S y Peyraud JL (2010) "Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cows diet and milk fatty acid composition and butter properties". *J. Dairy Sci.*, 93, 4, 1429.

Hyo JJ, Dong G S, Yujin K, Dong HC, Kyung BL, Sang SP y JY J (2012) "Clinical Correlation between Gastric Cancer Type and Serum Selenium and Zinc Levels". *Gastric Cancer*, 12(4), 217.

Iñón FA, Garrigues S y de la Guardia M (2004) "Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques". *Anal. Chim. Acta*, 513,401.

Insel P, Turner RE y Ross D (2004) "Nutrition". Second Edition. American Dietetic Association, Jones and Bartlett, USA

International Standard ISO15884/IDF182. Milk fat-preparation of fatty acid methyl esters.

International Standard ISO (IDF 172: 2001) Amd 1:2007 (IDF 172). Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds

International Standard ISO 15885/FIL 184 (Milk fat - Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography),

International Standard ISO 8968-1:2014 (IDF 20-1:2014) Milk and milk products. Determination of nitrogen content. Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation.

Ip CS, Banni E, Angioni E, Carta G, McGinley J, Thopson HJ, Barbano D y Bauman DE(1999) "Conjugated linoleic acid- enriched butter alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats". *J. Nutr.*, 129, 2135.

Isaksson T, Naes T (1988) "The Effect of Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy". *Appl. Spectrosc*, 42: 1273.

ISI (1999) A collection of new NIRS topics. FOSS NIRSystems/TECATOR. Infrasoft International LLC, Sylver Spring, MD, USA.

IX Seminario de Pastos y Forrajes. 2005. Avances en nutrición mineral del ganado bovino. Ciria Ciria J., Villanueva Marín R. y Ciria García de la Torre J.

Jahreis G, Fritsche J y Steinhart H (1997) "Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system". *Nutr. Res.*, 17, 1479.

Jensen RG (2002) "The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000". *J. Dairy Sci.*, 85, 295.

Jensen RG y Newberg DS (1995) "Bovine milk lipids". Páginas 543-575 en *Handbook of milk composition*. R. G. ed. Academic Press, San Diego, CA.

Jiang J, Bjoerck L, Fonden R y Emanuelson M (1996) "Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk: Effects of feed and dietary regimen". *J. Dairy Sci.*, 79, 438.

Juniper DT, Phipps RH, Givens DI, Jones AK, Green C y Bertin G (2008) "Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of a selenium enriched yeast". *J. Anim Sci*, 86, 197.

Kantola M y Vartiainen T (2001) "Changes in selenium, zinc, copper and cadmium contents in human milk during the time when selenium has been supplemented to fertilizers in Finland". *J. Trace Elem. Med Bio*, 15, 11.

Kawasaki M, Kawamura S, Tsukahara M, Moritab S, Komiyab SM y Natsugac M (2008) "Near-Infrared spectroscopy sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot". *Computers and Electronics in Agriculture*, 63, 22.

Kay JK, Mackle TR, Auldish MJ, Thompson NA y Bauman DE (2004) "Endogenous synthesis of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture". *J. Dairy Sci.*, 87, 369.

Kaylegian KE, Lynch JM, Fleming JR y Barbano DM (2009a) "Influence of fatty acid chain length and unsaturation on mid-infrared milk analysis". *J. Dairy Sci.*, 92(6), 2485.

Kaylegian KE, Dwyer DA, Lynch JM, Bauman DE, Fleming JR y Barbano DM (2009b) "Impact of fatty acid composition on the accuracy of mid-infrared fat analysis of farm milks". *J. Dairy Sci.*, 92(6), 2502.

Khan N, Jeong I, Hwang I, Kim J, Choi S, Nho E, Choi J, Park K y Kim K (2014) "Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)". *Food Chem.*, 147, 220.

Khanal RC, Dhiman TR, McMahon DJ y Boman RL (2003) "Consumer acceptability characteristics of conjugated linoleic acid (CLA) enriched milk and cheese". *J. Dairy Sci.* 86 (Suppl. 1), 356 (Abstr.).

Khanal RC y Olson KC (2004) "Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: A review". *Pakistan J. Nutr.*, 3(2) 82.

Khoomrung S, Chumnanpuen P, Jansa-ard S, Nookaew I and Nielsen J (2012) "Fast and accurate preparation fatty acid methyl esters by microwave-assisted derivatization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Appl Microbiol Biotechnol* 94,1637.

Kies C, Harms JM (1989) "Copper absorption as affected by supplemental calcium, magnesium, manganese, selenium and potassium" *Adv.Exp.Med.Biol.*, 258, 45-58.

Kingston HM y Jassie LB (1988) "Introduction to Microwave Sample Preparation", eds. Kingston, H.M. and Jassie, L.B., American Chemical Society, Washington DC, pp. 155-166

Klein EA, Thompson IA, Lippman SM, Goodman PJ, Albanes D, Taylor PR y Coltman C (2003) "SELECT: the selenium and vitamin E cancer prevention trial. Urol. Onco.: Seminars and Original Investigations". Volume 21, Issue 1, 59.

Kliem KE, Aikman PC, Humphries DJ, Morgan R, Shingfield KJ y Givens DI (2009) "Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with extruded linseeds on milk fatty acid composition in Jersey and Holstein cows". *Animal*, 3,1754.

Knapp G (1991) "Mechanized techniques for sample decomposition and element preconcentration" *Microchimica Acta* 104, 1, 445.

Korayem A. (2013) The "what", the "how" and the "why" of Fourier transform near infrared spectrometry on a chip scale. *NIR n* Volume 24 Issue 3, Pages 7.

Kramer JKG, Fellner V, Dugan MER, Sauer FD, Mossoba MM y Yurawecz MP (1997) "Evaluating Acid and Base Catalyst in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total trans Fatty Acids". *Lipids*, 32,1219.

Kramer JKG, Hernandez M, Cruz-Hernandez C, Kraft J y Dugan MER (2008) "Combining Results of Two GC Separations Partly Achieves Determination of All cis and trans 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 Except CLA Isomers of Milk Fat as Demonstrated Using Ag-Ion SPE Fractionation". *Lipids*, 43, 259.

Lanher BS (1996) "Evaluation of Aegys MI 600 Fourier Transform Near Infrared Milk analyser for analysis of fat, protein, lactose and solids non-fat: a compilation of eight independent studies". *J. AOAC Int.*, 79, 1388.

Larsen TM, Soren T y Arne A (2003) "Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and humans studies". *J. Lipid Res.*, 44, 2234.

Lawless F, Murphy JJ, Harrington D, Devery R y Stanton C (1998) "Elevation of sis-9, trans-11- octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation". *J. Dairy Sci.*, 81, 3259.

Leaf A, Xiao YF, Kang JX y Billamn GE (2003) "Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids". *Pharm. Therapeut*, 98, 355.

Lefier D, Grappin R y Pochet S (1996) "Determination of fat, protein and lactose in raw milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by analysis with a conventional filter based analyser". *J. AOAC Int.*, 79, 711.

Liu R, Zhang J, Mou Z, Haob S and Zhang Z (2012) "Microwave-assisted one-step extraction-derivatization for rapid analysis of fatty acids profile in herbal medicine by gas chromatography-mass spectrometry". *Analyst* 137,5135.

Livingstone K, Humphries D, Kirton P, Kliem K, Givens D y Reynolds C (2015) "Effects of forage type and extruded linseed supplementation on methane production and milk fatty acid composition of lactating dairy cows". *J. Dairy Sci.* 98, 4000.

Ljung K, Palm B, Grander M y Vahter M (2011) "High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods – A matter of concern". *Food Chem.*, 127, 943.

Lock AL y Shingfield KJ (2004) "Optimising milk composition. Dairying—Using Science to Meet Consumers' Needs". Kebreab E, Mills J, Beever DE (Eds), Occ. Pub. No. 29, Brit. Soc. Anim. Sci. Nottingham University Press, Loughborough, UK: 107–188.

Luis G, Rubio C, Revert C, Espinosa A, Gonzalez-Weller D, Gutierrez AJ y Hardisson A (2015) "Dietary intake of metals from yogurts analyzed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES)". *J. Food Comp. Anal.*,39,) 48.

Luna P, Juárez M y de la Fuente MA (2005) "Validation of a Rapid Milk Fat Separation Method to Determine the Fatty Acid Profile by Gas Chromatography". *J. Dairy Sci.*, 88, 3377

Luquet FM (1991) "Leche y productos lácteos. Vaca – Oveja - Cabra". 1 La leche. De la mama a la lechería, Acribia, Technique et Documentation – Lavoisier, , Capitulo 1

Machado VS, Bicalho MLS, Pereira RV, Caixeta LS, Knauer WA, Oikonomou G, Gilbert RO y Bicalho RC (2013) Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows". *Vet. J.*, 197, 451.

Mahalanobis PC (1936) "On the generalized distance in statistics". *Proceedings of the National Institute of Science of India*, 12, 49.

Manual de Industrias Lácteas. Gösta Bylund, M., Sc. 1996. Tetra Pak Processing Systems AB. S-221 86 Lund. Suecia.

Marinoni L, Monti L, Barzaghi S y de la Roza-Delgado B (2013) "Quantification of casein fractions and of some of their genetic variants in phosphate buffer by near infrared spectroscopy". *J Near Infrared Spec.*, 21, 385.

Martens H y Martens M (2000) "Modified jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling (PLSR)". *Food Qual. Prefer.*, 11, 5.

Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte I y Kaufman L (1988) "Chemometrics: A textbook". 1st Edition. New York. Elsevier Science.

Maurice-Van Eijndhoven MHT, Soyeurt H, Dehareng F y Claus MPL (2013) "Validation of fatty acid prediction in milk using mid-infrared spectroscopy across cattle breeds". *Animal*, 7, 348.

Mc Donald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD y Morgan CA (2006) *Nutrición Animal*. 6ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza.

Mc Intosh GH, Hu Y y Young GP (2014) "Food selenium and the prevention of colorectal cancer" Selenium in the environment and Human Health – Bañuelos, Lin & Yin (Eds).. Taylor & Francis Group, London, ISBN 978-1-138-00017-9.

McDonald P, Edwards RA, Greenhalg JFP y Morgan CA (1995) Animal Nutrition, Prentice Hall. London, UK.

McGuire MA y McGuire MK (2000) "Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health". J. Anim. Sci., 77, 1.

Mckinsty PJ, Indyk HE y Kim ND (1999) "The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES)". Food Chem. 65, 245.

Mertens DR (2010) Mertens Innovation & Research LLC; Belleville, WI. NIR on the GO 2010

Michalke B (2006) "Trace element speciation in human milk". *Pure Appl. Chem*, vol 78, N°1, 79.

Milanino R, Marrella M, Gasperini R, Pasqualicchio M, Velo G (1993) "Agents and Actions", "Copper and zinc body levels in inflammation: An overview of the data obtained from animal and human studies" Volume 39, Issue 3, pp 195-209.

Millmier A, Lorimor J, Hurburgh C, Fulhage C, Hattey J, Zhang H (2000) "Near-infrared sensing of manure nutrients". *Trans ASAE*, 43, 903-908.

Millmier P (2003) "Near infrared technology-Getting the best out of light". PDK Projects, Nanaimo, Canada.

Mir Z, Rushfeldt ML, Mir PS, Paterson LJ y Weselake RJ (2000) "Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues". *Small Rum. Res.*, 36, 25.

Mjos SA (2005) "Properties of trans isomers of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid methyl esters on cyanopropyl stationary phases". *J. Chrom. A*, 1100,185.

Mohammed R, Stanton CS, Kennelly JJ, Kramer JKG, Mee JF, Glimm DR, O'Donovan M y Murphy JJ (2009) "Grazing cows are more efficient than zero-grazed and grass silage-fed cows in milk ruminic acid production". *J. Dairy Sci*, 92 , 3874.

Moltó - Puigmartí C, Castellote AI y López – Sabater MC (2007) "Conjugated linoleic acid determination in human milk by fast – gas chromatography". *Analytica Chic. Acta*, 602, 122.

Moore JH y Christie WW (1981) "Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. En: Lipid metabolism in ruminant animals". WW Christie (Ed). Pergamon Press, New York, NY.: 228.

Morales-Almaraz E (2009) "Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche mediante el pastoreo complementario a las dietas completas mezcladas". Tesis doctoral. Zaragoza.

Morales-Almaráz E, Vicente F, Soldado A, Martínez-Fernández A y de la Roza-Delgado B (2008) "Effect of different grazing times on milk fatty acid composition". 22nd General Meeting of the European Grassland Federation. Uppsala, Sweden. 9-12 June. "Biodiversity and animal feed. Future challenges for grassland production" Grassland Science in Europe, 13: 412.

Morales-Almaráz E, Vicente F, González A, Soldado A, Martínez-Fernández A y de la Roza-Delgado B (2009) "Fatty acids profile and characteristics fermentation of ruminal fluid of dairy cows feeding TMR complemented with different grazing times". En: Ruminant physiology. Digestion, metabolism, and effects of nutrition on reproduction and welfare (eds. Y Chilliard, F Glasser, Y Faulconnier, F Bocquier, I Veissier and M Doreau). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. pp. 286-288

Muñiz-naveiro O, Domínguez-González R, Bermejo-Barrera A, Bermejo-Barrera P, Cocho JA, Fraga y JM (2007) "Selenium speciation in cow milk obtained after supplementation with different selenium forms to the cow feed using liquid chromatography coupled with hydride generation-atomic fluorescence spectrometry". *Talanta*, 71, 158.

Muñoz E y Palmero S (2004) "Determination of heavy metals in milk by potentiometric stripping analysis using a home-made flow cell". *Food Control* 15, 635-641.

Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T (2002) "A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification". NIR Publications: Chichester, UK.

Nascimento RS, Froes RES, Silva NOC, Naveira RLP, Mendes DBC, Neto, National Research Council (NRC) 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th Rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

Nicastro HL y Dunn (2013) "Selenium and Prostate Cancer Prevention: Insights from the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT)". *Nutrients*, 5(4), 1122.

Nilsson M, Holst JJ y Bjorck IM (2007) "Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks". *Am J Clin Nutr* ., 85, 996.

Norris KH y Hart JR (1965) "Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds". International Symposium Washington, 4, 19.

O'Brien K, Mazin B, McHugh S, Meeker S, Bumble B (2012) "ARCONS: a Highly Multiplexed Superconducting UV-to-Near-IR Camera". IAU Symposium 285 385-388.

O'Brien N, Hulse C, Friedrich D, Van Milligen F, von Gunten M, Pfeifer F y Siesler H (2012) "Miniature near-infrared (NIR) spectrometer engine for handheld applications". Proc. SPIE 8374, Next-Generation Spectroscopic Technologies V, 837404 doi:10.1117/12.917983

Orffa/Excential) <http://nutricionanimal.info/nuevo-selenio-organico-para-alimentacion-animal/Publicado> 22/07/2014

Orkarsson A, Palminger Hallén I y Sundberg J (1995) "Exposure to toxic elements via breast milk". *Analyst* 120, 765.

Osborne BG y Fearn T (1988) "Near infrared spectroscopy in food analysis". Essex, UK: Longman Scientific & Technical.

Osborne BG (2000) "Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis". En R.A. Meyers (Ed) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

Osborne BG, Fearn T y Hindle PH (1993) "Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverages analysis". En B.G. Osborne, T. Fearn y P.H. Hindle (Eds.) *Food and beverages analysis* (p- 11-35). 2nd ed., Longman Group, Burnt Mill, Harlow, Essex, England, UK.

O`Sullivan A, O`Connor B, Kelly A y Mc Grath MJ (1999) "The use of infrared methods for análisis of milk and dairy products". *Int. J. Dairy Technol.*, 52, 4, 139.

Palmquist DL y Jenkins TC (2003) "Challenges with fats and fatty acid methods". *J Anim Sci* 81:3250-3254.

Pariza MW, Park Y y Cook EM (2000) "Mechanisms of conjugated linoleic acid: evidence and speculation". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 223 8.

Park Y, Albright KJ, Cai ZY y Pariza MW (2001) "Comparison of Methylation Procedures for Conjugated Linoleic Acid and Artifact Formation by Commercial (Trimethylsilyl)diazomethane". *J. Agric. Food Chem.*, 49 (3), 1158.

Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W y Pariza MW (1999) "Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice". *Lipids*, 34, 235.

Parodi PW (1999) "Conjugated linoleic acid and another anticarcinogenic agents of bovine milk fat". *J. Dairy Sci.*, 82, 1339.

Pavia DL, Lampman GM y Kriz GS (2000) "Introduction to spectroscopy". 3rd edition ed. Brooks/Cole.

Pechová, A., Janstová, B., Misurová, L., Dracková, M., Vorlová, L., Pavlata, L. (2008a). "Impact of supplementation of various Selenium forms in goats on quality and composition of milk, cheese and yogurt". *Acta Vet. Brno*, 77, 407.

Pechová A, Pavlata L, Dvorák R, Lokajová E (2008b) "Contents of Zn, Cu, Mn and Se in milk in relation to their concentrations in blood, milk yield and stage of lactation in dairy cattle". *Acta Vet. Brno*, 77, 523.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A y Guerrero JE y Gómez A (2005) "Implementation of LOCAL algorithm with NIRS for compliance assurance in compound feedingstuffs". *Appl. Spectrosc.* 59, 69.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A, Guerrero JE y Gutiérrez-Estrada JC (2006a) "Use of Artificial Neural Networks in Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Calibrations for Predicting the Inclusion Percentages of Wheat and Sunflower Meal in Compound Feedingstuffs". *Appl. Spectrosc.* 60, 1062.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A y Guerrero-Ginel JE (2006b) "Remote near infrared instrument cloning and transfer of calibrations to predict ingredient percentages in intact compound feedstuffs". *J Near Infrared Spec.*, 14, 81.

Pérez-Marín D, Sánchez MT, Paz P, Guerrero JE, Garrido-Varo A, Soriano MA (2009) "Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on tree ripening and postharvest storage". *Postharvest Biology and Technology* 52, 300.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A y Guerrero JE (2007) "Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis". *Talanta* 72, 28.

Phipps RH, Grandison AS, Jones AK, Juniper DT, Ramos-Moralos E y BertinG (2008) "Selenium supplementation of lactating dairy cows: Effects on milk production and total selenium content and speciation in blood, milk and cheese". *Animal*, 2, 11, 1610.

Prado N, Fernández-Ibañez V, González P y Soldado A (2011) "On-site NIR spectroscopy to control the shelf life of pork meat". *Food Anal. Methods*, vol. 4, 4, 582.

Precht D y Molкетин J (1999) "Analysis and seasonal variation of conjugated linoleic acid and further cis/trans isomers of C18:1 and C18:2 in bovine milk fat". *Kieler Milchwirtsch. Forschungsber*, 51, 63.

Precht D y Molкетин J (2000) "Identification and quantitation of cis/trans C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry". *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 102, 102.

Precht D y Molкетин J (2003) "Overestimation of linoleic acid and trans-C18:2 isomers in milk fats with emphasis on trans D9, trans D12-octadecadienoic acid". *Milchwissenschaft*, 58, 30.

Prohaska T, Köllensperger G, Krachler M, De Winne K, Stingeder G y Moens L (2000) "Determination of trace elements in human milk by inductively coupled plasma sector field mass spectrometry (ICP-SFMS)". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 15, 335.

Provenzale D, Rinhold RB, Golner B, Irwin V, Dallal GE, Papathanasopoulos N, Sahyoun N, Samloff IM y Russell RM (2002) "Evidence for diminished B12 absorption after gastric bypass: oral supplementation does not prevent low plasma B12 levels in bypass patients." *J. Am. Coll. Nutr.*, 11, 29 - 35.

Rahimi E, Hashemi M y Toriki Baghbadorani Z (2009) "Determination of cadmium and lead in human milk". *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 6, 671.

Rayman MP (2002) "The argument for increasing selenium intake". Proceedings of the Nutrition Society, 61, 203.

Real decreto 1669/2009, de 6 de Noviembre que modifica al Real Decreto 930/1992 de 17 de julio

Reid HJ, Bashammakh A, Goodall PS, Landon MR, O'Connor C y Sharp BL (2008) "Determination of iodine and molybdenum in milk by quadrupole ICP-MS". Talanta, 75, 189 - 197.

Rey-Crespo F, Miranda M, López-Alonso M (2013) "Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain". Food Chem. Toxic., 55 513.

Rivero Martino FA, Fernández-Sánchez ML y Sanz-Medel A (2001) "The potential of double focusing-ICP-MS for studying elemental distribution patterns in whole milk, skimmed milk and milk whey of different milks". Anal. Chim. Acta, 442 , 191.

Ruiz-Rodriguez A, Reglero G, Ibañez E (2010) "Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51,305.

Rutten MJM, Bovenhuis H, Hettinga KA, van Valenberg HJF y van Arendonk JAM (2009) "Predicting bovine milk fat composition using infrared spectroscopy based on milk samples collected in winter and summer". J. Dairy Sci., 92, 6202.

Alves SP, Bessa RJB (2009) "Comparison of two gas-liquid chromatograph columns for the analysis of fatty acids in ruminant meat". J. Chromatogr. A., 1216, 5130,

Sackman JR, Duckett SK, Gillis MH, Bealin CE, Parks AH y Eggelston RB (2003) "Effects of forage and sunflower levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets". J. Anim. Sci., 8, 3174.

Saeyes W, Mouazen AM, Ramon YH (2005) "Potential for onsite and online analysis of pig manure using visible and near infrared reflectance spectroscopy". Biosystems Engeneering. 91, 393.

Salter AM, Daniels ZCTR, Wynn RJ, Lock AL, Garnsworthy PC y Buttery PJ (2002) "Manipulating the fatty acid composition of animal products. What has and what might be achieved?". Recent advances in animal nutrition (Ed. P.C. Garnsworthy y J. Wiseman), p.33-44. Nottingham Univ. Press., Nottingham, U.K.

Sanders RA (1984) "Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the field of food and beverages". In analysis of Food and Beverages, pp 554-583. New York Academic Press.

Sarmiento-González A, Marchante-Gayón JM, Tejerina-Lobo JM, Paz-Jiménez J y Sanz-Medel A (2008) "High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis". Anal. Bioanal. Chem. 391, 2583.

SAS (1999). SAS/STATTM User's guide. Statistical Analysis System Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.

Satu P (2003) "Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis". *Vet. Res.* 34, 565–578

Savenije B, Geesink GH, van der Palen JGP y Hemke G (2006) "Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy". *Meat Sci.*, 73, 181.

Schmilovih Z, Shmulevich I, Notea A y Maltz E (2000) "Near Infrared spectroscopy of milk in its heterogeneous stage". *Comput Electron Agric*, 29, p. 195.

Schrauzer GN (2000) "Anticarcinogenic effects of selenium". *Cellular and Molecular Life Sciences*. Volume 57, Issue 13, 1864. TITULO

Schröder M y Vetter W (2013) "Detection of 430 fatty acid methyl esters from a transesterified butter sample". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 90, 771.

Shenk JS y Westerhaus MO (1991a) "Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression". *Crop Sci.*, 31, 469.

Shenk JS y Westerhaus MO (1991b) "Population structuring of Near Infrared spectra and modified partial least squares regression". *Crop Sci.*, 31, 1548.

Shenk JS y Westerhaus MO (1995a) "Analysis of agricultural and Food products by near infrared reflectance spectroscopy". Monograph. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.

Shenk JS y Westerhaus MO (1995b) "Routine operation, calibration, development and network system management manual". NIRSystem Inc., SilverSpring, MD, USA.

Shenk JS y Westerhaus MO (1996) "Comparison of standardization techniques Calibration the ISI way. En: Near Infrared Spectroscopy the Future Waves. Ed.: Davies, A.M.C. y Williams, P. NIR publications, Chichester, UK. p. 12/198.

Shenk JS y Westerhaus MO (1989). U.S. Patent N° 4866644, Sept. 12.

Shenk JS, Workman JJ y Westerhaus MO (2001) "Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products". *Handbook of Near Infrared Analysis*. Second Edition. Burns D.A. y Ciurczak E.W. (Eds.). Practical Spectroscopy Series, Vol. 27. Marcel Dekker, USA.

Shenk JS, Workman JJ y Westerhaus MO (1992) "Application of NIR Spectroscopy to Agricultural products". In D.A. Burns & E.W. Ciurczak (Eds), *Handbook of Near-Infrared Analysis* (pp 383-432), New York: Marcel Dekker, Inc.

Shingfield KJ, Chilliard Y, Toivonen V, Kairenius P y Givens DI (2008) "Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk". *Adv. Exp. Med. Biol.*, 606, 3.

Shingfield KJ, Reynolds CK, Hervás, Griinari JM Grandison AS y Beever DE (2006) "Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows". *J. Dairy Sci.*, 89, 714.

Siesler HW, Ozaki Y, Kawata S y Heise HM (2002) "Near Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications". Wiley-Vch, Weinhen, Alemania.

Simopoulos AP (2002) "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids". Dossier: Polyunsaturated fatty acids in biology and diseases. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56, 365.

Soares VA, Kus MMM, Peixoto ALC, Carrocci JS, Salazar, RFS y Filho HJI (2010) "Determination of nutritional and toxic elements in pasteurized bovine milk from Vale do Paraiba region (Brazil)". *Food Control*, 21, 45–49.

Söderholm SL, Damm M and Kappe CO (2010) "Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis". *Mol Divers* 14, 869.

Sola- Larrañaga C y Navarro – Blasco I (2009) "Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain". *Food Chem.*, 112, 189.

Soldado A, Fernández-Ibáñez V, Álvarez M, Martínez A, Prado N, González P, Díaz J y De la Roza-Delgado B (2009) "Ability of on site NIR spectroscopy to predict shelf life extension of the pork meat". 14th International Conference on Near Infrared Spectroscopy. Bangkok (Tailandia).

Soldado A, de la Roza-Delgado B, Martínez-Fernández A, Vicente F, Fernández-Ibañez V, Garrido-Varo A, Pérez-Marín D y Guerrero-Ginel JE (2007) "Transferability Studies Between FT Near Infrared Systems: Detection of Meat and Bone Meals in Feedstuffs". XXXV Colloquium Spectroscopicum Internationale (CSI XXXV). Book of Abstracts. pp 378. Xiamen (China).

Soyeurt H, Dehareng F, Gengler N, Mc Parland S, Wall E, Berry DP, Coffey M y Dardenne P (2011) "Midinfrared prediction of bovine milk fatty acids across multiple breeds, production systems, and countries". *J. Dairy Sci.*, 94(4), 1657.

Sparr C and Björklund E (2000) "Analytical-scale microwave-assisted extraction". *J Chromatogr A* 902:227-250.

Spears JW (2003) "Trace mineral bioavailability in ruminants". *J. Nutr. (Comparative Trace Element Nutrition)*, 133 (5 Suppl 1), 1506S-9S.

Spence AJ, Jimenez-Flores R, Qian M y Goddik L (2009) "The influence of temperature and pressure factors in supercritical fluid extraction for optimizing nonpolar lipid extraction from buttermilk powder". *J. Dairy Sci.*, 92, 458.

Stockdale CR, Shields PM, Mckenna A, Walker GP, Dunshea FR y Doyle PT (2011) "Selenium levels in cows fed pasture and concentrates or a total mixed ration and supplemented with selenized yeast to produce milk with supra-nutritional selenium concentrations". *J. Dairy Sci.*, 94, 262 - 272.

Suarez-Luque S, Mato I, Huidobro JF y Simal-Lozano J (2007) "Determination of major metal cations in milk by capillary zone electrophoresis". *Int. Dairy J.*, 17, 896.

Supelco Ionic Liquid GC Columns, Introduction to the Technology, 2010. sigmaldrich.com/il-gc.

Suzuki KT (2005) "Metabolomics of Selenium: Se metabolites based on speciation studies". *J. Health Sci.*, 51 (2), 107.

Suzuki KT, Doi C y Suzuki N (2006) "Metabolism of ⁷⁶Se-methylselenocysteine compared with that of ⁷⁷Se-Selenomethionine and ⁸²Se-Selenite". *Toxicol. Appl. Pharm.*, 217, 185.

Swarbrick B (2014) "Review: Advances in instrumental technology, industry guidance and data management systems enabling the widespread use of near infrared spectroscopy in the pharmaceutical/biopharmaceutical sector". *J Near Infrared Spec.*, Volume 22, Issue 3, Pages 157.

Swierenga H, de Groot PJ, de Weijer AP, Derksen MWJ y Buydens LMC (1998) "Improvement of PLS model transferability by robust wavelength selection". *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 41, 237.

Telecommunications Software System Group (TSSG), centro de excelencia de Tecnología de Información y Comunicación (Information and Communications Technologies (ICT)). info@tssg.org. Waterford Institute of Technology West Campus . Carriganore. Waterford.

Thyholt K e Isaksson T (1997) "Near infrared spectroscopy of dry extracts from high moisture food products on solid support – a review". *J Near Infrared Spec.*, 5, 179.

Tillmann P, Reinhardt TC y Paul C (2000) "Networking of near infrared spectroscopy instruments for rapeseed analysis: a comparison of different procedures". *J. Near Infrared Spec.*, 8, 101.

Tsenkova R, Atanassova S, Itoh K, Ozaki Y y Toyoda K (2000) "Near Infrared spectroscopy for biomonitoring : Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers". *J. anim. Sci.*, 78, 515.

Tsenkova R, Atanassova S, Toyoda K, Ozaki Y, Itoh K y Fearn T (1999) "Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition" *J. Dairy Sci.*, vol.82, 11, 2344-2351.

Tuncer S, Kamanli A, Akçil E, özelçi G, Kavas, Seçkin B, Atay MB (1999) "Trace element and magnesium levels and superoxide dismutase activity in rheumatoid arthritis" *Biological Trace Element Research*, Volume 68, Issue 2, 137.

U. S. Food and Drug Administration. 14. Appendix F: Calculate the Percent Daily Value for the Appropriate Nutrients. Page Last Updated: 05/23/2011. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodLabelingNutrition/FoodLabelingGuide/ucm064928.htm>.

UNE 34824:1983. Leche. Determinación del contenido en extracto seco total. Estado: Vigente CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

UNE 34826:1983 .Leche. Determinación del contenido en lactosa. Estado: Vigente. CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

UNE 34837:19886 Leche. Butirómetros Gerber para la determinación del contenido en materia grasa. Estado: Vigente CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

UNE 34-898:1986. Leche. Determinación del contenido en materia grasa. (Método de rutina).Estado: Vigente CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

UNE EN-ISO 1211:2010. Leche. Determinación del contenido de grasa. Método gravimétrico (Método de referencia). (ISO 1211.2010) Estado: Vigente CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

UNE-EN ISO 12966-1:2015 . Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos. Parte 1: Directrices sobre cromatografía de gases moderna de los ésteres metílicos de ácidos grasos. (ISO 12966-1:2014). Estado: Vigente. CTN: AEN/CTN 34/SC 6 - SEMILLAS OLEAGINOSAS Y PRODUCTOS GRASOS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL

UNE-EN ISO 12966-2:2011. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos. Parte 2: Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. (ISO 12966-2:2011). Estado: Vigente. CTN: AEN/CTN 34/SC 6 - SEMILLAS OLEAGINOSAS Y PRODUCTOS GRASOS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL.

UNE-EN ISO 12966-3:2010. Aceites y grasas de origen animal y vegetal. Cromatografía de gases de esteres metílicos de ácidos grasos. Parte 3: Preparación de esteres metílicos utilizando hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH). (ISO 12966-3:2009). Estado: Vigente. CTN: AEN/CTN 34/SC 6 - SEMILLAS OLEAGINOSAS Y PRODUCTOS GRASOS DE ORIGEN ANIMAL Y VEGETAL

UNE-EN ISO 8968-1:2014. Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de nitrógeno. Parte 1: Método Kjeldahl y cálculo de la proteína bruta. (ISO 8968-1:2014). Estado: Vigente. CTN: AEN/CTN 34/SC 5 - LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MUESTREO

Uriu-Adams JY , Carl L y Keen CL (2005) "Trace Elements and Human Health Copper, oxidative stress, and human health". Mol Aspects Med, Volume 26, Issues 4–5, 268.

van Hulzen KJE, RC Sprong R, van der Merr y van Arendonk JAM (2009) "Genetic and nongenetic variation in concentration of selenium, calcium, potassium, zinc, magnesium and phosphorus in milk of Dutch Holstein-Fresian cows". J. Dairy Sci. vol 92, No. 11, 5754.

Vanhatalo A y Shingfield KJ (2009) "Improving the fatty acid profile of milk fat by animal nutrition". Feed for Health: 1st international Workshop. Milan, Italy.

Vieira da Silva S, Sogari R, Moraes EM, Wagner R, Pereira NS y Smanioto J (2015) "Evaluation of bromide and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination". <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.087>.

Silva WB (2010) "Comparison between ordinary least squares regression and weighted least squares regression in the calibration of metals present in human milk determined by ICP-OES". *Talanta* 80, 1102.

WALKER GP, DUNSHEA FR, HEARD JW, STOCKDALE CR y DOYLE PT (2010) "Output of selenium in milk, urine and feces is proportional to selenium intake in dairy cows fed a total mixed ration supplemented with selenium yeast". *J. Dairy Sci*, 93, 4644.

Walsh SW, Williams EJ y Evans ACO (2011) "A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows". *Animal Reproduction Science*, Volume 123, 3-4, 127.

Wang Y, Veltkamp DJ, Kowalski BR (1991) "Multivariate instrument standardization" *Anal. Chem.*, 63(23), 2750.

Wathes CM, Kristensen HH, Aerts JM, Berckmans D (2008) "Is precision livestock farming an engineer's daydream or nightmare, an animal's friend or foe, and a farmer's panacea or pitfall?". *Comput. Electron Agric., Smart Sensors in precision livestock farming*, Volume, 64, Issue 1, 2.

Watkins BA, Feng S, Strom AK, DeVitt AA, Yu L y Li Y (2003) "Conjugated linoleic acid alter the fatty acid composition and physical properties of egg yolk and albumen". *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6870.

WEISS WP (2003) "Selenium nutrition of dairy cows: Comparing responses to organic and inorganic selenium forms". *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proc. Alltech's 19th Ann. Symp.* T. P. Lyons and K. A. Jacques, ed.. Pages 333 - 343, Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Whetsel KB (1968) "Near Infrared spectrophotometry". *Appl. Spectrosc. Review*, 2,1.

Wijesundera C, Shen Z, Wales WJ y Dalley DE (2003) "Effect of cereal grain and fibres supplements on the fatty acid composition of milk fat of grazing dairy cows in early lactation". *J. Dairy Res.*, 70, 257.

Wilbey RA (1993) "Pasteurization of foods: Principles of pasteurization". In *Encyclopedia of food science*, Food technology and nutrition (pp. 3437-3441), Academic Press.

Williams P, Norris K (2001) "The physics of near infrared scattering and chemical principles of near-infrared technology". En P. Williams y K. Norris (Eds.) *Near Infrared technology in the agricultural and food industries* (2^o edición) (p 1-38) American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA.

Williams P, Norris K (Eds) (2001) "Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries". American Association of Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota, USA.

Williams PC (2001) "Implementation of near-infrared technology". In: Williams PC, Norris KH (eds) Near-Infrared technology in the agricultural food industries. AACC Inc, St. Paul, MN, pp 145–169.

Williams SM (2000) « Dietary fatty acids and human health". *Ann. Zootech.*, 49 165.

Williams PC, Sobering DC (1996) "How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations". In: Near Infrared Spectroscopy: the future waves. Davies A.M.C., Williams P. (Eds.). NIR Publications, Chichester, UK, pp: 185-188.

Windisch W (2002) "Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements". *Anal. Bioanal. Chem.*, 372, 421.

WinISI II Project Management v.1.50 , Infrasoft International, Port Matilda, PA

Wold S, Antii SH, Lindgren F y Óhman J (1998) "Ortogonal signal correction of near infrared spectra". *ChemIntell. Lab. Syst*, 44, 175.

Wold, S. (1972). "Kemisk Tidskrift", 3, 34. Journal of official statistics: JOS : an international quarterly / published by SCB, Statistics Sweden. – Stockholm : Statistics Sweden

Wolf R (2005) "What is ICP-MS? and more importantly, what can it do?" Research Chemist, USGS/CR/CICT, March 2005. Crustal Geophysics and Geochemistry Science Center

Woods VB y Fearon AM (2009) "Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review". *Livest. Sci.*, 126, 1.

Yamawaki N, Yamada M, Kanno T, Kojima T, Kaneko T y Yonekubo A (2005) "Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women". *J. Trace Elem. Med Biol.* ,19, 171.

Yanes EG, Miller-Ihli NJ (2004) "Cobalamin speciation using reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry". *Spectrochim. Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, Volume 59, Issue 6, 891.

Zamora Rojas E. (2013) "Control no destructivo e in situ de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano". Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Departamento de Nutrición Animal.

Zamora-Rojas E, Pérez-Marín D, De Pedro-Sanz E, Guerrero-Ginel JE y Garrido-Varo A (2012) "In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer". *Meat Sci.*90 (3), 636.

Zhuravlev A , Zacharia A, Gucer S, Chebotarev A, Arabadji M y Dobrynin A (2015) "Direct atomic absorption spectrometry determination of arsenic, cadmium, copper, manganese, lead and zinc in vegetable oil and fat samples with graphite filter furnace atomizer". *J Food Compost. Anal.*, 38, 62.