



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Formación del complejo BAMLET en calostro bovino
para elaborar queso untable funcional**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencia de los Alimentos

P R E S E N T A

Ing. Karen Argelia Reyes Portillo

Comité:

Dr. Sergio Soto Simental- director, CICyTA, UAEH

Dr. Humberto Hernández Sánchez- co-director, ENCB, IPN

Dra. Aurora Quintero Lira- asesora, CICyTA, UAEH

Dr. Javier Piloni Martini- asesor, CICyTA, UAEH

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Agosto 2020

FIRMA DE ACTA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Agropecuarias
School of Forestry and Environmental Studies

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Formación del complejo BAMLET en calostro bovino para elaborar queso untable funcional", que desarrolla la estudiante Karen Argelia Reyes Portillo

Asistentes:

Dra. Aurora Quintero Lira

Dr. Javier Piloni Martini

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Humberto Hernández Sánchez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando a el estudiante, Karen Argelia Reyes Portillo, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 27 de junio de 2020

Dr. Sergio Soto Simental

Dr. Humberto Hernández Sánchez

Dra. Aurora Quintero Lira

Dr. Javier Piloni Martini



AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis: el Dr. Sergio Soto Simental por comprometer su valioso apoyo y tiempo dedicado a este proyecto.

A mi codirector: el Dr. Humberto Hernández Sánchez, por su confianza, contribución y enseñanzas fundamentales en mi formación en la investigación científica, pero sobre todo por su amistad, igualmente a la Dra. Fernanda Sarahi Farjado por su colaboración durante mi estancia en laboratorio de Biotecnología de Alimentos en el Instituto Politécnico Nacional.

A mis asesores: la Dra. Aurora Quintero Lira y el Dr. Javier Piloni Martini por su aportación y entusiasmo para realizar este trabajo.

A mi familia: Argelia, Jesús, Didier por su incondicional compañía y guiarme hacia el camino de la educación y éxito.

A Jonathan: mi compañero, por compartir con ilusión y motivación este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): por el sustento económico recibido durante el posgrado.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: en particular al Instituto de Ciencias Agropecuarias una vez más, por su contribución a mi formación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUCCIÓN.....	10
CAPÍTULO 2	12
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Calostro bovino	12
2.1.1 Uso de calostro bovino como alimento funcional	13
2.1.2 Producción de calostro bovino	15
2.1.3 Composición del calostro bovino	15
2.2 Complejo BAMLET (Bovine Alfa-lactalbumin Made LEthal to Tumor Cells).....	18
2.2.1 Preparación del complejo BAMLET.....	19
2.2.2 Actividad citotóxica del complejo BAMLET	20
2.3 Quesos untables	21
CAPÍTULO 3	22
3. JUSTIFICACIÓN	22
CAPÍTULO 4	23
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
CAPÍTULO 5	24
5. HIPÓTESIS	24
CAPÍTULO 6	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Recolección de las muestras	25
6.2 Formación del complejo BAMLET	25
6.3 Elaboración de queso untable de calostro bovino con el complejo BAMLET	27
6.4 Electroforesis (SDS-PAGE)	28
6.5 Análisis fisicoquímicos en calostro, quesos y sueros obtenidos.....	29

6.6	Análisis de textura.....	30
6.7	Determinación de la propiedad funcional antihipertensiva del queso untable con el complejo BAMLET.....	30
6.8	Análisis sensorial.....	31
6.9	Análisis estadístico.....	32
CAPÍTULO 7		33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1	Perfil fisicoquímico de calostro bovino nativo	33
7.2	Formación del complejo BAMLET.....	34
7.3	Perfil fisicoquímico de calostro bovino con el complejo BAMLET.....	36
7.4	Obtención de quesos untables con el complejo BAMLET.....	37
7.5	Perfil fisicoquímico de quesos untables con el complejo BAMLET	38
7.6	Perfil fisicoquímico del suero de quesos untables con el complejo BAMLET	39
7.7	Análisis de textura.....	40
7.8	Evaluación de la propiedad funcional antihipertensiva del queso untable con el complejo BAMLET	42
7.9	Análisis sensorial.....	44
CAPÍTULO 8		46
8.	CONCLUSIONES.....	46
CAPÍTULO 9		47
9.	REFERENCIAS	47
CAPÍTULO 10		62
10.	ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación del complejo BAMLET	19
Figura 2. Esquema para elaborar queso untable de calostro bovino con el complejo BAMLET ..	27
Figura 3. Formato usado para la aplicación del análisis sensorial	31
Figura 4. Perfil electroforético obtenido durante la elaboración del queso untable de calostro bovino de segunda (a) y tercera (b) ordeña con complejo BAMLET	35
Figura 5. Quesos untables de calostro bovino de segunda(a) y tercera ordeña (b) con complejo BAMLET	37
Figura 6. Inhibición de la ECA por queso untable con complejo BAMLET	42
Figura 7. Histograma de frecuencias para el análisis sensorial aplicado a muestras de queso untable con el complejo BAMLET	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales componentes del calostro bovino.....	16
Cuadro 2. Propiedades físicas y composición química del calostro bovino y la leche	16
Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos insaturados del calostro bovino	17
Cuadro 4. Principales proteínas del calostro bovino y la leche.....	17
Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas del calostro bovino nativo	33
Cuadro 6. Cantidades de ácido oleico y proteína unidas en la formación del complejo BAMLET puro y en calostro bovino	34
Cuadro 7. Propiedades físicas y químicas del calostro bovino con el complejo BAMLET	36
Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas de queso untable con el complejo BAMLET	38
Cuadro 9. Propiedades físicas y químicas del suero de queso untable con el complejo BAMLET	39
Cuadro 10. Parámetros medidos en el Análisis de Textura.....	40

RESUMEN

El complejo BAMLET (α -lactoalbúmina bovina letal para las células tumorales) es el resultado de la interacción entre la α -lactoalbúmina bovina (α -LA) y el ácido oleico (OA) que ha presentado una alta actividad citotóxica *in vivo* e *in vitro* contra células tumorales, exhibiendo gran selectividad al no dañar las células sanas. El objetivo del presente trabajo, fue generar el complejo BAMLET en calostro bovino para obtener un queso untable como alternativa de alimento funcional. Primeramente, se caracterizó el calostro bovino nativo, determinando su composición proximal, pH, acidez y lactosa. Después se formó el complejo BAMLET mediante la adición de ácido oleico en el calostro en condiciones de calentamiento y sonicación hasta lograr la unión de la α -LA propia del calostro y el ácido oleico agregado. Posteriormente se obtuvieron los quesos untables con el calostro que contenía el complejo verificando su retención en el queso mediante una SDS-PAGE del suero obtenido de los quesos untables, para demostrar que la α -LA no se encontró presente en el suero de queso untable manteniéndose retenida en forma del complejo BAMLET. Se caracterizó el calostro BAMLET, los quesos obtenidos y sueros resultantes mediante análisis proximales, pH, acidez y lactosa, también se determinó la capacidad de inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA) y se realizó un análisis de textura a los quesos, así como un análisis sensorial para determinar la aceptación del consumidor. En general, se presentó un nivel mayor de proteína en los productos resultantes de la segunda ordeña, tanto en calostro (8.02 ± 0.21), queso untable ($13.56\% \pm 0.02$) y suero obtenido ($1.74\% \pm 0.01$). Los quesos untables con el complejo BAMLET resultaron menos duros y menos adhesivos que el queso untable comercial con el que se comparó, además, demostraron su funcionalidad al inhibir a la ECA un $57.52\% \pm 9.17$ y $51.48\% \pm 1.07$ (segunda y tercera ordeña, respectivamente), mientras que en el análisis sensorial, mostraron un nivel de preferencia de “me gusta”, por lo cual, los quesos untables con el complejo BAMLET podrían ser una alternativa como alimento funcional y complementario a tratamientos como el cáncer e hipertensión.

ABSTRACT

BAMLET is a potent cytotoxic complex (**B**ovine **A**lfa lactalbumin **M**ade **L**Ethal for **T**umor cells) which results from the interaction between α -lactalbumin (α -LA) and oleic acid (OA) that has exhibited high cytotoxic activity *in vivo* and *in vitro* against tumor cells, BAMLET is selectively cytotoxic to malignant cells sparing the healthy ones. The objective of the present work was the generation of the BAMLET complex in bovine colostrum to obtain a spreadable cheese as a functional food alternative. Firstly, native bovine colostrum was characterized, determining its proximal composition, pH, acidity and lactose content. Then the BAMLET complex was formed by adding oleic acid to the colostrum under heated conditions and sonication until the binding of the colostrum α -Lactalbumin (α -LA) and the added oleic acid was complete. Subsequently, the retention of the BAMLET complex in the spreadable cheeses was verified by means of SDS-PAGE of the whey. The assay was performed to prove that α -LA was not present in the spreadable cheese whey since it is completely retained in the cheese in the form of the BAMLET complex. BAMLET colostrum, the obtained cheeses and resulting whey were characterized by proximal analysis, pH, acidity and lactose. The inhibition capacity of the angiotensin-converting enzyme (ACE) and a texture profile analysis was carried out on the cheeses, as well as a sensory analysis to determine consumer acceptance. In general, a higher level of protein is shown in the products resulting from the second milking, both in colostrum ($8.01\% \pm 0.21$), spreadable cheese ($13.56\% \pm 0.02$) and whey obtained ($1.74\% \pm 0.01$). BAMLET spreadable cheeses were less hard and less adhesive than the commercial spreadable cheese with which it was compared, and they also demonstrated their functionality by inhibiting ACE by $57.52\% \pm 9.17$ and $51.48\% \pm 1.07$ (second and third milking, respectively), while that, in the sensory analysis, have a preference level of "likes". Therefore, the spreadable cheeses with the BAMLET complex could be a complementary treatment for diseases such as cancer and hypertension.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha pronosticado que será la principal causa de muerte en todos los países del mundo en este siglo, en el 2015 la Organización Mundial de la Salud indicó que fue la primera o segunda causa de muerte en personas menores de 70 años, siendo el cáncer de pulmón el más frecuente (18.4%), seguido por cáncer colorrectal (9.2%), de hígado (8.2%) y de estómago (8.2%) (Li et al., 2019). Incluso a pesar de la intensa investigación que se ha tenido para combatirlo sigue siendo una gran amenaza mundial por su incidencia y mortalidad que crece rápidamente, en consecuencia, la prevención y el desarrollo de antitumorales es apremiante (Chowdhury et al., 2016) por lo tanto, descubrir tratamientos eficaces contra el cáncer es una prioridad en la investigación ya que el tratamiento tradicional con quimioterapia todavía utiliza fármacos muy citotóxicos que matan a todas las células, incluso a las sanas y en consecuencia a la rápida división celular, la mayoría de esos tratamientos tienen un bajo nivel farmacéutico produciendo efectos secundarios graves. Teniendo esto en cuenta, existe una gran necesidad de desarrollar tratamientos contra el cáncer con mayor selectividad (Delgado et al., 2015).

El fenómeno de los complejos citotóxicos de proteína-ácido oleico ha recibido atención continua en los últimos años por su capacidad de matar selectivamente una amplia gama de células cancerosas (Håkansson et al., 2011), en particular, el complejo HAMLET (**H**uman **A**lfa-lactalbumin **M**ade **L**Ethal to **T**umor Cells) que fue informado por Håkansson et al. (1995) y fundó las bases para que complejos similares fueran creados, tal es el caso del complejo BAMLET (**B**ovine **A**lpha-lactalbumin **M**ade **L**Ethal to **T**umor cells), presentando actividad anticancerígena de amplio espectro (cáncer de vejiga, ovario, pulmón, colón, cerebro, papiloma, leucemia, por mencionar algunos) con una gran capacidad para diferenciar a las células sanas sin dañarlas mediante un mecanismo de reconocimiento específico (Rath et al., 2017).

Por lo anterior, el complejo BAMLET tiene un enorme potencial en el ámbito de la salud, dado su actividad y reconocimiento de células cancerígenas puede ayudar a disminuir los efectos adversos de los medicamentos para tratar el cáncer. En este trabajo se ha formado el complejo BAMLET en calostro bovino al saber que contiene aproximadamente 3 g/L de α -lactoalbúmina, con el cual se obtuvieron dos quesos untables como propuesta de alimento funcional exhibiendo además los

beneficios propios del calostro bovino y una alternativa de uso, determinando sus propiedades fisicoquímicas para caracterizar este producto nuevo, evaluar su capacidad funcional mediante la determinación de la inhibición de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina I), importante en la regulación de la presión arterial, asociada con hipertensión y otras enfermedades, como insuficiencia cardíaca, hipertrofia ventricular e infarto (Wu et al., 2014), además de determinar las propiedades texturales y sensoriales de los quesos untables para la aceptación del consumidor.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1. Calostro bovino

El calostro bovino es conocido como la primera leche o la primera secreción producida por la glándula mamaria bovina, que se obtiene dentro de las primeras 48 horas después del parto. Es una mezcla compleja de proteínas, grasa, vitaminas, minerales, péptidos activos, componentes inmunológicos y factores de crecimiento, los cuales son significativamente más ricos que en la leche madura (Dunn et al., 2017; Dzik et al., 2017; Altomare et al., 2016), por esta razón, el calostro es considerado por Buttar et al., (2017) como el “elixir de la vida” al crear la base de la inmunidad de por vida, pues se ha demostrado que sus compuestos brindan las propiedades nutricionales, antimicrobianas y de crecimiento que son esenciales para estimular los sistemas de defensa inmune celular y humoral que el recién nacido necesita para sobrevivir, proporcionando también protección contra infecciones (Menchetti et al., 2016) y mejorando el sistema gastrointestinal (Eslamian et al., 2018; Nikolic et al., 2017).

Las investigaciones sobre el calostro, se han enfocado en evaluar su composición a través del ciclo de lactación (Mi et al., 2016; Kessler, Bruckmaier & Gross, 2014), o bien en las propiedades bactericidas que son aportadas por sus proteínas como lactoferrina, lisozima y lactoperoxidasa, comprobadas en modelos *in vitro* (Chae et al., 2017) e *in vivo* contra ciertos patógenos como *Escherichia coli*, *Rotavirus* y *Cryptosporidium* (Bagwe et al., 2015; Cairangzhuoma et al., 2013). En vista de que la mayoría de sus propiedades se atribuyen a las proteínas presentes, se han llevado a cabo estudios sobre su exploración, evaluación y detección (Cao et al., 2019; Abdel-Salam et al., 2018; Nissen et al., 2017), incluso se ha estudiado el efecto del tratamiento térmico sobre ellas (Tacoma et al., 2017), siendo las inmunoglobulinas las más aclamadas por la comunidad científica (Lopreiato et al., 2017; Abdel-Salam et al., 2014) incluido su escalamiento industrial (Anamika Das & Seth, 2017).

La lactoferrina es otra proteína que ha tenido mucho impacto en la investigación, a causa de exhibir capacidad antimicrobiana (Murata et al., 2013), antiviral y terapéutica revisada por Moreno-Expósito et al., (2018), además de que presenta propiedades anticancerígenas atribuidas a sus péptidos generados durante la digestión del organismo por la acción de enzimas proteolíticas,

también se ha demostrado que las células NK que se encuentran en el calostro proporcionan resistencia contra tumores (Gianfranceschi et al., 2018).

Por otra parte, la α -lactoalbúmina encontrada de manera natural en el calostro también es una proteína que fue descrita con propiedades anticancerígenas siendo capaz de inducir apoptosis a las células tumorales (Ebrahim et al., 2014). De acuerdo con Barreto et al., (2019), los múltiples beneficios del calostro son conocidos desde hace siglos, pero ha sido en los últimos años donde se ha llevado a cabo una revisión de su aprovechamiento en la alimentación y la salud humana principalmente por sus componentes biológicos como los péptidos bioactivos, responsables de las bioactividades que exhibe el calostro bovino incluyendo propiedades antitrombóticas, inmunomoduladoras, antioxidantes, fijadoras de minerales, antimicrobianas, anticancerígenas, promotoras del crecimiento y antihipertensivas (Fajardo-Espinoza et al., 2020; Awargal & Gupta, 2016; Sacerdote et al., 2013).

Estos péptidos están presentes en las proteínas del calostro de forma inactiva, pero pueden activarse al liberarlos durante su procesamiento o durante la digestión gastrointestinal, siendo los péptidos antihipertensivos los que atraen una atención particular ya que tienen la capacidad de actuar como inhibidores de la ECA, desempeñando un papel importante en las enfermedades cardiovasculares debido a la prevalencia de la presión arterial alta en la sociedad. Con base a estas observaciones, el calostro bovino es considerado como un alimento funcional y/o nutraceutico que puede ser usado contra la prevención de diversas enfermedades incluyendo a la hipertensión y como alternativa o terapia complementaria para algunos tipos de cáncer (Bagwe et al., 2015).

2.1.1 Uso de calostro bovino como alimento funcional

Desde la domesticación del ganado bovino, se ha utilizado el calostro en diversos procedimientos médicos aprovechando sus propiedades antibacterianas (Buttar et al., 2017; Conte & Scarantino, 2013), pero de acuerdo con Jenny et al., (2010) fue hasta la década de 1990 cuando creció el interés por desarrollar productos alimenticios con calostro por su gran concentración de componentes bioactivos. Primero se comenzó por usarlo de manera natural tomado junto con la leche madura, mostrando acción terapéutica contra la influenza en adultos mayores (Conte & Scarantino, 2013), después se implementó como suplemento alimenticio en polvo (Godhia & Patel, 2013) en donde a través de varios estudios en humanos y animales indicaron que puede combatir el SIDA, trastornos

cardiovasculares, infecciones, heridas, combatir ciertos tipos de cáncer (Buttar et al., 2017), de igual manera reducir enfermedades respiratorias (Fenger et al., 2016) y problemas gastrointestinales (Jones et al., 2016). Incluso se han realizado alimentos funcionales con calostro bovino o enriquecidos con él para aprovechar todos sus componentes, Saalfeld et al., (2012) produjeron bebidas lácteas y mantequilla adicionando un fermentado de calostro bovino, Assumpção et al., (2015) elaboraron una bebida probiótica a base de soya, calostro y miel, exhibiendo una gran capacidad antioxidante, Abdel-Ghany & Zaki (2018), Ayar, Siçrama & Çetin (2016) y Ahmadi et al., (2011) realizaron un yogurt a base de calostro que presentó una buena aceptación sensorial por parte de los consumidores. Otros productos que también mostraron buena aceptación incluyen un helado descrito por Mouton & Aryana (2015) y leches fermentadas con diferentes porcentajes de calostro bovino realizadas por Nazir et al., (2018). Por otra parte, Poonia & Dabur (2012) elaboraron un postre tradicional indio llamado Khes, asimismo, Anamika Das & Seth (2017) realizaron una cuajada adicionando calostro, mientras que, en el ámbito de tecnológico de alimentos, Ruiz et al., (2016) evaluaron las propiedades funcionales y la seguridad de las bacterias ácido lácticas aisladas del calostro de cabra para su aplicación en fermentaciones de alimentos con el fin de establecer su valor industrial como cultivos iniciadores.

Hasta el momento, el calostro es considerado una sustancia totalmente segura y debido a las funciones que tiene en el organismo proporciona nutrientes que fortalecen el sistema inmunitario, mantienen la microflora intestinal y aceleran la regeneración de tejidos, por consiguiente, el interés en su inclusión en la alimentación humana está aumentando, a pesar de que su uso se ha visto limitado por factores técnicos como la sensibilidad a la oxidación de sus componentes lipídicos (Silva et al., 2019). Sin embargo, en combinación de tecnologías no térmicas, se ha buscado el mejoramiento de sus propiedades y a la vez de su estabilidad, haciendo uso de técnicas como ultrasonicación, fermentación, deshidratación (Bartkiene et al., 2018), liofilización (Botéquio et al., 2012), campos eléctricos pulsados, irradiación (Borad & Singh, 2018) y altas presiones (Foster et al., 2016). La investigación científica subraya la importancia del calostro en la alimentación de los seres humanos e incluso se ha pronosticado que los productos basados en calostro pueden desempeñar un papel importante en el mercado de productos funcionales en el futuro ya que cada vez son más importantes para el consumidor (Dzik et al., 2017).

2.1.2 Producción de calostro bovino

La ganadería en México es una de las actividades productivas más dinámicas y representa uno de los componentes con mayor crecimiento del sector agropecuario a nivel mundial (FIRCO, 2017). Según SAGARPA en 2018, la población de ganado productor de leche en México fue de 2, 489,696 de las cuales el estado de Hidalgo contaba con 198,933 cabezas ocupando el quinto lugar a nivel nacional. En sistemas intensivos de producción de leche, las vacas llegan a producir entre 45 y 90 kg de calostro por cría (Mellado-Bosque, 2010), teniendo variaciones en el rendimiento entre vacas multíparas y primíparas (Kessler, Bruckmaier & Gross, 2014), si se considera que el becerro solo consume el 10% de su peso vivo durante los primeros tres días de vida, en ciertas épocas del año se pueden acumular cantidades importantes de calostro. Scammell (2001) menciona que el calostro bovino representa aproximadamente el 0.5% de la producción anual de una vaca y que en algunos países es recolectado, procesado y comercializado por separado de la leche, a diferencia de México, en el cual casi nunca es comercializado, más bien, la parte que no es aprovechada por la cría en sistemas intensivos de producción, es desechado. Por lo tanto, el uso este calostro genera un nuevo interés en su aprovechamiento por sus beneficios para la salud.

2.1.3 Composición del calostro bovino

Sus componentes pueden clasificarse dentro de tres grandes categorías (Cuadro 1) de acuerdo con Bagwe et al., (2015). Una de las características principales del calostro, es que difiere de la leche madura en composición química y física (Cuadro 2) presentando una consistencia espesa, pegajosa y color amarillento, igualmente por su elevado nivel de proteína, principalmente por la abundancia de inmunoglobulinas, al mismo tiempo, contiene menos lactosa que la leche, de modo que puede ser adecuado para personas con intolerancia a la lactosa (Abdel-Salam et al., 2018; Buttar et al., 2017; McGrath et al., 2016).

También, se ha enfatizado que el calostro bovino es una fuente abundante de ácidos grasos en comparación con la leche madura y que algunas de ellos desempeñan un papel en la prevención de cáncer (Bagwe et al., 2015; Marnila & Korkohen 2011). El perfil de los ácidos grasos insaturados más relevantes en el calostro bovino se puede ver en el cuadro 3. De este modo, la participación de ácidos grasos insaturados en beneficio de la salud humana ha llevado también a considerar al calostro bovino como posible alternativa de alimento funcional (Mašek et al., 2014).

Cuadro 1. Principales componentes del calostro bovino

Componente	Tipo	Usos
Nutricionales	Vitaminas (A, B12, E), minerales, aminoácidos y aceites esenciales	Salud, vitalidad y crecimiento
	Immunoglobulinas (A, D, E, G y M)	IgG neutraliza toxinas y microbios IgM destruye bacterias IgE e IgD antivirales
Factores inmunológicos	Lactoferrina	Antiviral, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, VIH, síndrome de fatiga crónica y otras
	Citoquinas	Comunicación célula-célula y producción de inmunoglobulinas.
	Lisozima	Estimula sistema inmunológico, destruye bacterias y virus
	Enzimas	Lactoperoxidasa-tiocianato, xantina oxidasa y peroxidasa: oxidan las bacterias liberando H ₂ O ₂
	Leucocitos Oligopolisacáridos y glicoconjugados	Producción de interferón. Inhibición de patógenos
Factores de crecimiento	Factor de crecimiento epitelial, insulina I y II, fibroblasto, derivado de plaquetas, transformante A y B y hormona de crecimiento	Mejoran el crecimiento celular y tisular estimulando la formación de DNA

Adaptado de Bagwe et al., 2015

Cuadro 2. Propiedades físicas y composición química del calostro bovino y la leche

Componente	Número de ordeñas postparto				Leche
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
Gravedad específica (gr mL ⁻¹)	1.056	1.040	1.035	1.033	1.032
pH	6.17	6.28	6.28	6.38	6.5
Acidez, % de ácido láctico	0.46	0.28	0.25	0.23	0.14
Sólidos totales (%)	23.9	17.9	14.1	13.9	12.9
Grasa (%)	6.7	5.4	3.9	4.4	4.0
Sólidos no grasos (%)	16.7	12.2	9.8	9.4	8.8
Proteína (%)	14.0	8.4	5.1	4.2	3.1
Caseína (%)	4.8	4.3	3.8	3.2	2.5
Inmunoglobulinas totales (%)	6.0	4.2	2.4	-	0.09
IgG (%)	3.2	2.5	1.5	-	0.06
Nitrógeno no proteico (%)	8.0	7.0	8.3	4.1	4.9
Lactosa (%)	2.7	3.9	4.4	4.6	5.0
Ceniza (%)	1.11	0.95	0.87	0.82	0.74

Adaptado de Borad & Singh 2018

Cuadro 3. Perfil de ácidos grasos insaturados del calostro bovino

Ácidos grasos	Calostro	Leche madura
Palmitoleico C16: 1 ω -9	1.57 \pm 0.08	1.73 \pm 0.11
Oleico C18: 1 ω -9 trans	0.76 \pm 0.13	0.59 \pm 0.06
Linoleico 18: 2 ω -6	6.53 \pm 0.39	7.06 \pm 0.44
Linolénico 18: 3 ω -3	0.61 \pm 0.04	0.43 \pm 0.05

Adaptado de Zou et al., 2015

2.1.3.1. α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina es una de las principales proteínas del suero de leche producida por mamíferos, la cual se encuentra en una concentración de 1.2 g/L en la leche de vaca, mientras que en el calostro bovino se encuentra en 3 g/L (Cuadro 4). Está constituida por 123 aminoácidos, con 4 enlaces disulfuro y un fuerte sitio de unión al calcio, además de tener una afinidad también por otros minerales como el zinc, manganeso, cadmio, cobre y aluminio (Layman, Löndreal & Fernstrom 2018).

Cuadro 4. Principales proteínas del calostro bovino y la leche

Constituyente	Concentración		Masa (kDa)
	Calostro	Leche	
Caseína (α _{S1} -, α _{S2} -, β - y k-) (g L ⁻¹)	26	28	14-22
β -lactoglobulina (β -Ig) (g L ⁻¹)	8	3.3	18.4
α -lactoalbúmina (α -LA) (g L ⁻¹)	3	1.2	14.2
Inmunoglobulinas (Ig) (g L ⁻¹)	20-150	0.5-1.0	150-1000
Lactoferrina (Lf) (g L ⁻¹)	1.5	0.1	80
Lactoperoxidasa (LP) (g L ⁻¹)	0.02	0.03	78
Lisozima (LZ) (g L ⁻¹)	0.0004	0.0004	14
Albúmina sérica bovina (BSA) (g L ⁻¹)	1.3	0.3	66.3

Adaptado de Borad & Singh 2018

Su principal actividad metabólica es la biosíntesis de lactosa (Fontana et al., 2015; Brinkmann et al., 2011), al mismo tiempo mejora la absorción de minerales y es fuente de péptidos con propiedades antibacterianas, influyendo en el sistema inmunitario de los recién nacidos (Dopierała, Krajewska & Prochaska et al., 2019). Recientemente se descubrió que mediante la eliminación de su ion Ca⁽²⁺⁾, el cual es logrado con ajustes de pH y tratamiento térmico, la α -LA pasa a un estado descrito de “glóbulos fundidos” donde se convierte en su forma apo y puede ser estabilizada por un cofactor como un ácido graso insaturado, formando complejos que muestran actividad tumoricida (Nongonierma & FitzGerald 2015). Estos complejos llamados “liprótidos”, presentan

una estructura con un núcleo micelar rodeado por una cubierta de la proteína parcialmente desnaturalizada o desplegada (Frislev et al., 2016). El núcleo principalmente está conformado de ácidos grasos de 18 carbonos, monoinsaturados en la conformación *cis*, como el ácido oleico (C18:1: 9), porque los ácidos grasos *trans* y poliinsaturados no pueden formar los complejos descritos (Delgado et al., 2015; Barbana, Sánchez & Pérez, 2011).

La característica principal de estos complejos es la inducción de muerte a células tumorales, el primer complejo fue descubierto por Håkansson et al., (1995) formado con la α -LA humana y ácido oleico denominado HAMLET, el cual presentó una alta actividad citotóxica *in vivo* e *in vitro*, diferenciando las células sanas e induciendo a apoptosis a células tumorales (Kim et al., 2016; Xiao et al., 2013; Ho et al., 2012). Su descubrimiento causó gran impacto principalmente por su funcionalidad, alta selectividad y afinidad a las células cancerígenas, por ello, se comenzó a ejecutar protocolos para su formación buscando las mejores condiciones para su estabilidad y sobre todo para mantener su acción citotóxica. Recientemente fue descubierto (Dopierała, Krajewska & Prochaska et al., 2019) que este complejo se puede formar de manera natural en el estómago del recién nacido, propiciado por el bajo pH, promoviendo una protección contra tumores en la edad infantil, también se ha sugerido que, durante la digestión de alimentos, las lipasas linguales y gástricas hidrolizan algunos triglicéridos liberando ácido oleico (Nakamura et al., 2013).

Dado al éxito de HAMLET surgió el interés por descubrir proteínas alternativas (Rath et al., 2015), a consecuencia de la limitación de α -LA humana, se incluyeron ensayos de seroalbúmina humana, apomioglobina, parvalbúmina, lactoferrina bovina, albúmina de suero bovino, lisozima recombinante de leche de perro, apo-mioglobina de corazón de caballo, ovoalbúmina de pollo, β 2-microglobulina recombinante, inmunoglobulina humana, lisozima equina (complejo ELOA), β -lactoglobulina (complejo BAGLET), α -lactoalbúmina equina, porcina, ovina, camélida, caprina (GAMLET) y bovina (Complejo BAMLET).

2.2 Complejo BAMLET (Bovine Alfa-lactalbúmin Made LEthal to Tumor Cells)

El complejo BAMLET resulta de la interacción entre la α -LA bovina y el ácido oleico (Figura 1), al cual se le ha atribuido el mismo efecto citotóxico del complejo HAMLET. Fang et al., (2014) demostraron que la α -LA se une al ácido oleico entre su dominio α -helicoidal y la lámina β , mediante fuerzas de Van der Waals y enlaces de hidrógeno, observándose que cuando ocurre la

interacción con la α -LA, el ácido oleico se encuentra en su forma de oleato desprotonado, mientras que la α -LA funciona como portadora del ácido oleico el cual, confiere la citotoxicidad del complejo perturbando la estructura de las membranas lipídicas de las células cancerígenas por su alta afinidad hacia ellas, desestabilizándolas y alterando su función (Rath et al., 2015, Wen et al., 2015; Fontana et al., 2013; Xiao et al., 2013; Fang et al., 2012; Permyakov et al., 2012)

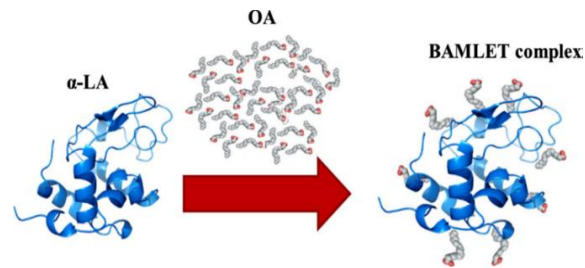


Figura 1. Formación del complejo BAMLET

2.2.1 Preparación del complejo BAMLET

Desde el descubrimiento de sus propiedades tumorocidas, surgió el interés por realizar el complejo citotóxico con diversos protocolos. La forma de preparación original se fundamenta en la técnica de cromatografía, donde la α -LA en su forma apo, mediante la eliminación de su ion calcio es cargada en una columna de intercambio aniónico preconditionada con ácido oleico (Svensson et al., 2000) mostrando una relación de 1:8 de α -LA: OA, respectivamente (Brinkmann et al., 2011; Pettersson-Kastberg et al., 2009). Se han sugerido otros métodos alternativos de preparación del complejo (Spolaore et al., 2010; Kamijima et al., 2008; Mok et al., 2007) mediante la simple mezcla de los dos componentes con una relación de 1:50 α -LA: OA (Fang et al., 2012). Es imprescindible la formación y estabilidad del complejo correctamente, mediante las condiciones necesarias como ajuste de pH, un tratamiento térmico y sonicación (Brinkmann et al., 2011) para conferir la citotoxicidad característica de estos complejos (Rath et al., 2018), porque se sabe que el calentamiento es esencial para ello, por ejemplo, de forma natural en el organismo humano la albúmina se puede unir al ácido oleico en la sangre, pero no muestra actividad anticancerígena (Kaspersen et al., 2014).

2.2.2 Actividad citotóxica del complejo BAMLET

El mecanismo de reconocimiento y sensibilidad del complejo se diferencia de los fármacos anticancerígenos actuales, en que BAMLET tiene un objetivo celular particular para diferenciar a las células cancerígenas y no dañar a las células sanas. Se han propuesto múltiples opciones que incluyen canales de iones de membrana, histonas, mitocondrias, proteosomas, lisosomas, citoesqueleto, α -actinina, anexina y ATP sintasa, no obstante, se ha confirmado que el objetivo inicial de BAMLET es la membrana de las células cancerosas (Rath et al., 2018; Frislev et al., 2017; Nadeem et al., 2015; Kataev, Zherelova & Grishchenko, 2013) que está regulada por una expresión de oncogenes incluidos Ras y c-Myc, simultáneamente enzimas glucolíticas que al localizarlas se activan rutas de señalización específica (Ho et al., 2012; Storm et al., 2011), entonces el complejo libera el ácido oleico en la membrana de la célula, mediante un mecanismo descrito como “descarga”, entrando en un estado citotóxico "solubilizado" y asociándose con la membrana celular (Rath et al., 2017). Al entrar en las células cancerosas se acumula en el compartimiento endolisosomal, induciendo a apoptosis mediante una vía de muerte lisosomal a través de la fuga de catepsinas en el citosol permeabilizando a la membrana plasmática para finalmente, acumularse en el núcleo celular interactuando con las histonas y alterando la estructura de la cromatina de células dañadas (Brinkmann et al., 2011; Rammer et al., 2010).

El complejo BAMLET ha demostrado actividad anticancerígena de amplio espectro *in vitro* en más de 60 líneas celulares e igualmente, eficacia en la reducción de los tumores sin observarse efectos tóxicos para el organismo sano, aún en concentraciones altas (Rath et al., 2018). Referente a los ensayos *in vivo* se incluyen líneas celulares de tumores cancerosos en humanos, ratones y ratas, en cáncer de vejiga (Xiao et al., 2013), papiloma de piel, glioblastoma (Jøhnke & Petersen, 2012), células leucémicas humanas, carcinoma de ovario (Brinkmann et al., 2011), mesotelioma pleural (Rath et al., 2018) y cáncer de colon (Puthia et al., 2014) por mencionar algunos. Para lograr los efectos señalados del complejo BAMLET son necesarias concentraciones bajas, teniendo en cuenta que Fang et al., (2014) encontró la dosis letal media (LD_{50}) de 50.18 μ M para células de hepatoma humano, 45.77 μ M para células de tumor de colon y 47.60 μ M para células de cáncer de mama.

2.3 Quesos untables

El queso untable es un tipo de queso que se conoce por su capacidad para untarse (Ghorbel et al., 2016), se caracteriza por tener una consistencia suave, cremosa y un alto porcentaje de agua. Son de color blanco y homogéneo, con un olor delicado y sabor ligeramente ácido con un toque a diacetilo (Lucera et al., 2018; Gammariello et al., 2008). Gracias a su sabor suave, textura aterciopelada y versatilidad tienen un patrón de alto consumo en varias partes del mundo sobre todo en Europa por grandes sectores de la población, especialmente en niños, atribuyendo su popularidad principalmente a su sabor y fácil aplicación, ya sea en pan, galletas, como aderezo en ensaladas o incorporación en postres (Lucera et al., 2018) confiriéndole una buena adaptabilidad al comercio gracias al uso de empaques atractivos (Mohamed & Shalaby, 2016). Por lo general, los quesos untables se fabrican mediante la coagulación de la leche cruda o pasteurizada, agregando un poco de agua para producir una masa homogénea y emulsionar la grasa hasta conseguir un producto suave y estable (Ghorbel et al., 2016). El agua ayuda a disolver las sales quelantes de calcio, hidratando las proteínas y dispersando los componentes, brindando la suavidad característica de este tipo de quesos. Todos los quesos untables tienen una humedad del 40% al 60%, por ello son susceptibles al deterioro (Gammariello et al., 2008).

A pesar de que la industria láctea, ha mostrado una creciente demanda para producir queso funcional, todavía hay pocos estudios informados, entre ellos se destacan Marchiani et al., (2016) quienes evaluaron la calidad fisicoquímica y nutricional del polvo de orujo de uva para fortificar el queso semiduro, por otra parte Abd Elhamid et al., (2016) propusieron la adición del salvado de trigo en el queso Kariesh, mientras tanto, Lucera et al., (2018) agregaron subproductos de frutas para fortificar el queso untable y Mohamed & Shalaby (2016) incorporaron zanahoria y pulpa de chabacano para obtener un queso con mejores características fisicoquímicas. No obstante, la mayoría de los estudios se han centrado en estudiar sus propiedades reológicas, realizando formulaciones enriquecidas con harinas de subproductos como fuentes de fibra y antioxidantes (Lucera et al., 2018), así como en la búsqueda de mejorar su textura mediante la inclusión de diversos productos, entre ellos, cereales, suero, proteínas lácteas, carbohidratos como β -glucano, almidones modificados y quitosano (Gammariello et al., 2008), pues la textura es considerada una propiedad importante que determina la aceptación del consumidor (Weiserová et al., 2011; Zhang et al., 2011; Cunha et al 2010).

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la humanidad pasa por una crisis a nivel mundial, principalmente porque las enfermedades están rebasando las capacidades de la industria farmacéutica y la medicina, por lo que una de las prioridades de la investigación es crear nuevas alternativas que nos permitan mejorar la condición de vida de las personas. El desabasto de medicamentos contra enfermedades como cáncer, es muy fuerte en el país, con altos costos y una gran limitación para todos los pacientes, además de que los tratamientos utilizados, por ejemplo, la quimioterapia, utiliza fármacos muy citotóxicos que matan las células sanas del organismo y a causa de la rápida división celular, la mayoría de estos tratamientos tienen un índice farmacéutico bajo que produce efectos secundarios graves. Por ello, el crear métodos alternativos eficaces para combatir esta enfermedad es una necesidad creciente.

BAMLET es un complejo formado por la α -lactoalbúmina bovina y ácido oleico que permite atacar más de 60 líneas celulares tumorales con una alta selectividad y sin dañar las células sanas. Aquellas personas que tienen cáncer en niveles avanzados, pueden revertir este proceso gracias a la ayuda de este complejo, de manera que se pretende utilizar la α -lactoalbúmina presente en el calostro bovino para formar el complejo BAMLET y elaborar un alimento funcional con él, conociendo la actividad citotóxica del complejo, además de la naturaleza del calostro bovino que puede ayudar a prevenir y combatir diversas enfermedades como la hipertensión gracias a sus componentes bioactivos.

Es por ello la realización de la presente investigación, al brindar una alternativa natural con base científica para usar el calostro bovino que no es aprovechado por los becerros recién nacidos y que normalmente se desecha por los productores, al no cumplir con los parámetros de calidad de la leche madura, por lo tanto existe una considerable cantidad que se puede implementar en la elaboración de un producto alimenticio que desempeñe un papel importante en el mercado de productos funcionales además de actuar como fuente de α -LA para formar el complejo BAMLET como un nuevo agente anticancerígeno.

CAPÍTULO 4

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Generar el complejo BAMLET en calostro bovino para obtener un queso untable como alternativa de alimento funcional.

4.2 Objetivos específicos

1. Formar el complejo BAMLET agregando ácido oleico al calostro bovino para elaborar un queso untable.
2. Corroborar la retención del complejo BAMLET en el queso untable mediante una SDS-PAGE aplicada en el suero obtenido del queso para su posterior evaluación.
3. Caracterizar el calostro con el complejo BAMLET, el queso producido y el suero resultante mediante análisis fisicoquímicos y proximales para determinar su composición.
4. Determinar las propiedades de textura del queso untable mediante el texturómetro para compararlo con un queso comercial similar.
5. Evaluar la capacidad antihipertensiva del calostro, quesos y sueros obtenidos mediante la inhibición de la enzima ECA para confirmar sus propiedades funcionales.
6. Efectuar un análisis sensorial de los quesos untables mediante una prueba de preferencia para establecer la aceptación del consumidor.

CAPÍTULO 5

5. HIPÓTESIS

La α -lactoalbúmina presente en el calostro bovino forma el complejo BAMLET mediante la adición de ácido oleico, con el cual se obtiene un queso untable funcional.

CAPÍTULO 6

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección de las muestras

Las muestras de calostro se colectaron de la segunda y tercera ordeña de una vaca elegida con las siguientes características: saludable, de tercer parto y raza Holstein, proporcionada en el Rancho Universitario del Instituto de Ciencias Agropecuarias en Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Las muestras de calostro fueron almacenadas y ultra congeladas a -50°C para su uso posterior.

6.2 Formación del complejo BAMLET

6.2.1 Puro

Se siguió el protocolo descrito por Delgado et al., (2015) para estandarizar y controlar el método para luego replicarlo en el calostro bovino. El complejo se formó de manera pura, es decir utilizando 0.0224 g de α -LA purificada disuelta en 5 mL de HCl 1M, agitando la mezcla 24 horas a temperatura ambiente y a continuación se calentó a 85°C . Cuando la mezcla llegó a la temperatura indicada, se requirieron 0.098 g de ácido oleico al 90%, disueltos en 5 mL de etanol, incorporados inmediatamente a la mezcla, seguido de 2 minutos de sonicación mediante el uso de un ultrasonificador (Cole-Parmer, CPX-130, Vernon Hills, USA) al 85% de apertura con intervalos de 10 segundos, la mezcla fue agitada durante 30 minutos a 85°C y enfriada con agua a corriente. Se dejó en agitación constante por 24 horas a 4°C y se centrifugó (Thermo Scientific, Sorvall Legend RT, Mundelein, Illinois, USA) 15 minutos a 2980 rpm a 4°C ; se separó el sobrenadante y se ajustó su pH a 7 con NaOH 5M, seguido de 1 minuto de sonicación, se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 2980 rpm a 4°C y finalmente el precipitado se secó en una estufa a 60°C por 40 minutos, registrando el peso obtenido en una balanza analítica. Para calcular la cantidad de ácido oleico fijado a la α -lactoalbúmina, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$(1) \quad OA \text{ libre} = P_s - P_o$$

$$(2) \quad OA \text{ unido} = OA \text{ agregado} - OA \text{ libre}$$

Donde OA libre, fue el ácido oleico que no se unió a la proteína y quedo en el precipitado; Ps, fue el peso seco del precipitado; Po, el peso del recipiente vacío a peso constante y OA unido, el ácido oleico que se unió a la proteína.

Para conocer los μ moles de ácido oleico unidos en el complejo se usó la siguiente fórmula:

$$(3) \quad M = \frac{m}{PM}$$

Donde M, son los μ mol de OA unidos; m, fueron los μ gramos de OA unidos (10,100 μ g) y PM, es el peso molecular del ácido oleico (282.47 μ g/ μ mol). En tanto, para conocer los μ mol de proteína añadida se determinó con la misma fórmula (3) en donde M, fueron los μ mol de α -LA añadida; m, los μ gramos de α -LA añadida (21,250 μ g) y PM, el peso molecular de la α -LA (14,175 μ g/ μ mol). Finalmente, para determinar los μ mol de OA unidos por cada μ mol de proteína se usó la siguiente relación:

$$(4) \quad x = \frac{1\mu\text{mol } \alpha\text{-LA unido} * \mu\text{mol OA obtenido}}{1\mu\text{mol de } \alpha\text{-LA unido}}$$

Donde x, son los μ mol de OA unidos.

6.2.2 En calostro bovino

Una vez que se tuvo estandarizada y controlada la metodología para la formación del complejo BAMLET, se prosiguió a realizarse en el calostro bovino de segunda y tercera ordeña con algunas modificaciones. Se ajustó el pH de los calostros a 5.5 con ácido láctico al 85% (p/v), se calentó a 85°C en un baño de agua (Fisher Scientific Co, PolyScience 5L, Niles, Illinois, USA) y se agregó el ácido oleico calculado con la fórmula (3), donde M, fueron los μ mol de α -LA unidos; m, los μ gramos de α -LA presentes en calostro bovino (3,000,000 μ g) y PM, el peso molecular de la α -LA (14,175 μ g/ μ mol).

Para cuantificar los μ mol de OA que reaccionaron por los μ mol de proteína unida, se realizó con la siguiente ecuación:

$$(5) \quad x = \frac{211.64\mu\text{mol} * 23.84\mu\text{mol OA}}{1\mu\text{mol de } \alpha\text{-LA unido}}$$

Y finalmente para calcular los μmol de OA que debían agregarse a 250 mL de calostro bovino se determinó con la siguiente ecuación:

$$(6) \quad x = \frac{\mu\text{mol OA agregado a calostro} * PM \text{ OA}}{1 \mu\text{mol de OA}}$$

Por lo tanto, se pesaron 0.36 g de ácido oleico (OA) y se disolvieron en 1 mL de etanol, seguido de 2 min de sonicación a 30°C. La reacción se completó con agitación constante durante 30 min a 85°C, luego fue enfriada bajo agua a corriente y se agitó durante 24 h a 4°C. Las muestras se neutralizaron a pH 7 con NaOH 5M y finalmente se ultrasonicaron durante 1 minuto con las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniendo el calostro bovino con el complejo BAMLET listo para elaborar el queso untable.

6.3 Elaboración de queso untable de calostro bovino con el complejo BAMLET

La elaboración de queso untable se realizó mediante la metodología reportada por Rodríguez-Gutiérrez (2014), con algunas modificaciones de acuerdo al esquema presentado (Figura 2), realizando un queso para cada ordeña.

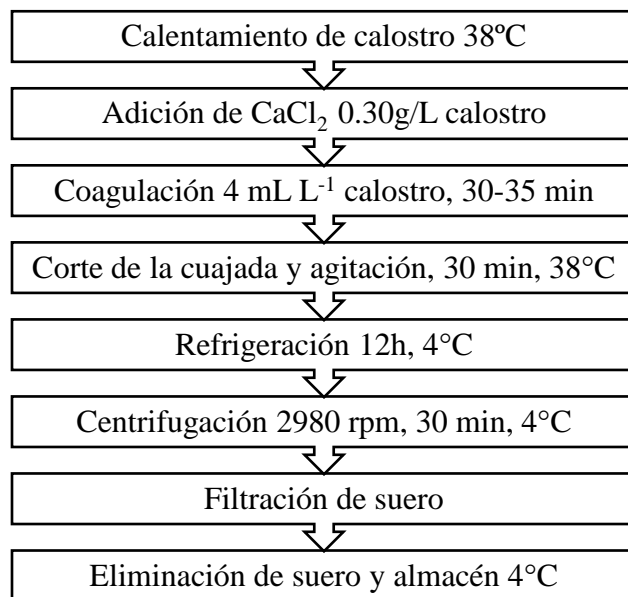


Figura 2. Esquema para elaborar queso untable de calostro bovino con el complejo BAMLET

El calostro con el complejo BAMLET se calentó a 38°C, adicionando cloruro de calcio (0.30g/L de calostro) y agitándose hasta su completa disolución para llevar a cabo el proceso de coagulación adicionando 4 mL de cuajo por litro de calostro, homogenizando la mezcla hasta la

floculación. Luego de transcurrir 30 minutos de reposo, se cortó la cuajada realizando una agitación suave durante 30 minutos a 38°C, se dejó en refrigeración por 12 horas para más adelante centrifugar (Thermo Scientific, Sorvall Legend RT, Mundelein, Illinois, USA) a 2980 rpm durante 30 minutos con el objetivo de desuerar el queso y obtener una consistencia más firme. Se prosiguió a filtrar el suero obtenido mediante un papel filtro Whatman #5 con la ayuda de una bomba de vacío (Cole-Parmer, Air Admiral 79202-00, Vernon Hills, Illinois, USA) para obtener finalmente el queso unttable.

El rendimiento de los quesos se calculó de acuerdo a lo reportado por Frau, Font de Valdez & Pece (2014) con la siguiente fórmula:

$$(7) \quad \text{Rendimiento del queso} = \frac{\text{Peso del queso (kg)}}{\text{Peso de calostro (kg)}} * 100$$

Finalmente, los quesos unttables se almacenaron en ultra congelación a -50°C para sus posteriores análisis y también los sueros resultantes.

6.4 Electroforesis (SDS-PAGE)

Para verificar que el complejo BAMLET se formó correctamente y se retuvo en el queso unttable, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes mediante la metodología propuesta por Laemmli (1970). Se mezclaron 100µL de las muestras, las cuales consistieron en: α-LA pura, suero de calostro nativo de segunda y tercera ordeña, así como los sueros obtenidos de los quesos con el complejo BAMLET, con 100 µL del buffer de muestra sometidos a ebullición por 5 minutos. Se colocaron 10 µL de las muestras en los carriles con gel concentrador al 5% y gel separador al 13%, sometiéndose a una corriente constante y sucesiva a 120 V por 1 h 40 min en el buffer de corrida Tris-Glicina; los geles fueron teñidos con una solución de azul de coomassie R250 con agitación por 15 minutos, luego fueron desteñidos con una solución de metanol, ácido acético y agua durante toda la noche. Las bandas obtenidas se compararon con un marcador de peso molecular de amplio rango Broad Range 61-0317 (BIO-RAD).

6.5 Análisis fisicoquímicos en calostro, quesos y sueros obtenidos

6.5.1 pH

La medición del pH en calostro y suero del queso elaborado, se realizó directamente con un potenciómetro (Hanna Instruments, H1 2211, CDMX, México). Respecto al queso untable, se insertó el electrodo de vidrio directamente en la pasta del queso y se realizó la lectura de acuerdo con Conte & Scarantino (2013).

6.5.2 Acidez titulable (% ácido láctico)

Para determinar la acidez en calostro y suero se empleó la técnica reportada por Alves et al., (2015) titulando 10 mL de la muestra con 0.1N de NaOH usando fenolftaleína como indicador y el resultado fue expresado en grados Dornic (°D).

Para la determinación de acidez en queso se utilizó 10 g de queso diluido en agua templada a 40°C hasta obtener un volumen total de 105 mL, se filtró y se valoró en porciones de 25 mL con solución de NaOH 0.1N. El ácido láctico se calculó de acuerdo a la AOAC 920.124.

6.1.5.3 Densidad

La densidad del calostro y suero de queso de calostro bovino se obtuvo mediante el método del picnómetro, realizado bajo el principio gravimétrico de masa por unidad de volumen reportado por Rudosvsky et al., (2008).

6.5.4 Lactosa

La lactosa se determinó mediante el método de fenol sulfúrico, el cual describe que los carbohidratos son sensibles por naturaleza a ácidos fuertes y a altas temperaturas, por lo que al ocurrir la reacción de hidrólisis ácida se producen monosacáridos y otros subproductos que forman compuestos coloridos, reportado por Dubois et al., (1956).

6.5.5 Análisis químicos proximales

Los análisis fueron determinados de acuerdo con la AOAC (2000), humedad (927.05), cenizas (33.5.05), proteína (991.20) por el método Kjeldahl utilizando el factor de conversión de 6.38 (Vasek, Mazza & Giori 2013) y grasa por el método Gerber (2000.18, 33.7.02).

6.6 Análisis de textura

Se efectuó mediante dos compresiones usando el analizador de textura Brookfield CT3 (Brookfield, Middleboro, Massachusetts, USA) equipado con una celda de carga de 4.5 kg usando un cono TA15/100 de 45° de acrílico transparente de 75 mm de profundidad y 35 mm de longitud. Se analizaron los quesos untables obtenidos del calostro bovino con complejo BAMLET de la segunda y tercera ordeña, además se analizó un queso untable comercial. Se determinaron las características mecánicas primarias de dureza, trabajo dureza terminado y adhesividad mediante el software Texture Pro CT versión 1.4 (Brookfield, Middleboro, Massachusetts, USA), colocando las muestras a temperatura ambiente y con 5 repeticiones cada una (Hussein & Shalaby, 2014).

6.7 Determinación de la propiedad funcional antihipertensiva del queso untable con el complejo BAMLET

Se realizó mediante la determinación de la inhibición de la ECA (Enzima Convertidora de Angiotensina I) siguiendo la metodología reportada por Cushman & Cheung (1971), primero tomando una muestra de 0.5 mL calostro y suero, así como 0.5 gr de queso, diluidas en relación 1:10 con agua destilada, ajustando su pH a 8.3, pH óptimo de la reacción; se mezcló 80 µL de las muestras con 200 µL de buffer de sustrato, el cual constó de hipuril histidil leucina HHL (5mM) disuelto en buffer de boratos (0.1M pH=8.3) con NaCl 0.3 M.

La mezcla se pre-incubo a 37°C por 3 minutos, iniciando la reacción con la adición de 20 µL de la ECA (0.20U/mL), agitando la mezcla de reacción durante 30 segundos en un vórtex y se incubó a 37°C durante 30 minutos; la reacción se detuvo con la adición de 250 µL de HCl 1N, se agregó 1.7mL de etil acetato a los tubos de reacción para extraer el ácido hipúrico, volteando 3 veces los tubos y centrifugándolos (Thermo Scientific, Sorvall Legend RT, Mundelein, Illinois, USA) a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Una vez terminada la centrifugación, se tomaron 800 µL de la

fase orgánica y se calentaron en baño a 92°C por 30 minutos para eliminar el etil acetato, resuspendiendo el contenido de los tubos en 1 mL de agua destilada, con agitación durante 1 minuto para finalmente leer las muestras a 230 nm en un espectrofotómetro (GENESYS 10S Vis, Thermo Scientific, Madison, USA). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$(8) \quad AI (\%) = \left[\frac{B-A}{B-C} \right] * 100$$

Dónde, AI fue la actividad inhibitoria; A, fue la absorbancia de la muestra con el componente inhibidor y la ECA; B, la absorbancia de la ECA sin la muestra (100% de inhibición de la ECA); C, la absorbancia de la mezcla de reacción sin la ECA (0% de actividad de la ECA) y 0% Actividad corresponden a 20 µL de agua destilada en lugar de la enzima.

6.8 Análisis sensorial

Para está evaluación se realizó una prueba de aceptación utilizando una escala hedónica con 7 puntos para el atributo de sabor (Figura 3).



 Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Instituto de Ciencias Agropecuarias ANÁLISIS SENSORIAL DE QUESO UNTABLE		
Nombre:		Edad:
Instrucciones: Frente a usted tiene dos muestras de queso numeradas con tres cifras distintas, pruebe cada una de ellas y entre cada muestra tome un poco de agua, posteriormente marque con “X” la opinión que tenga al respecto de cada una.		
	Número de muestra	
	457	138
Me agrada en extremo		
Me agrada mucho		
Me agrada		
No me agrada ni me desagrada		
Me desagrada		
Me desagrada mucho		
Me desagrada en extremo		
Comentarios: <p style="text-align: center;">¡GRACIAS!</p>		

Figura 3. Formato usado para la aplicación del análisis sensorial

Para el desarrollo de esta prueba fueron requeridos 100 panelistas no entrenados, de 17 a 51 años, miembros de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo a quienes se les proporcionaron las

dos muestras de queso untable obtenido del calostro bovino con complejo BAMLET elaboradas un día anterior a la prueba y en porciones aproximadas de 3 g presentadas en una galleta natural sin sabor, cada una identificada con un código aleatorio de tres dígitos de acuerdo a Macías- Mejía et al., (2019).

6.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron integrados en una base de datos para ser analizados mediante el software SPSS (IBM SPSS Statistics, versión 20, USA). Para el análisis del perfil fisicoquímico de las muestras se aplicó un diseño completamente al azar, mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, para el caso de los resultados del análisis de textura de los quesos obtenidos y el queso comercial, se realizó una comparación de medias mediante la prueba Tukey con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Los resultados de la capacidad antihipertensiva se analizaron con una prueba de t de comparación de medias de muestras emparejadas con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Los datos del análisis sensorial se analizaron primero, con una prueba de Kolmogorov-Smirnov, un valor de $p<0.05$ se consideró una distribución no normal, por lo que se aplicó una prueba no paramétrica de Wilcoxon ($\alpha=0.05$) para verificar la preferencia de los jueces en el sabor de los quesos elaborados.

CAPÍTULO 7

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Perfil fisicoquímico de calostro bovino nativo

El perfil fisicoquímico del calostro bovino nativo se presenta en el cuadro 5. Los datos obtenidos indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los parámetros determinados, como se puede observar la presencia de proteína en el calostro de segunda ordeña (6.60%) fue mayor comparado con la tercera ordeña (4.08%).

Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas del calostro bovino nativo

	Calostro bovino nativo	
	Segunda ordeña	Tercera ordeña
Extracto seco (%)	16.48±0.05 ^a	14.18±0.24 ^b
Humedad (%)	83.52±0.05 ^a	85.82±0.24 ^b
Cenizas (%)	1.01±0.00 ^a	0.89±0.01 ^b
Proteína (%)	6.60±0.29 ^a	4.08±0.28 ^b
Grasa (%)	4.98±0.02 ^a	4.55±0.15 ^b
Lactosa (%)	3.15±0.20 ^a	4.21±0.24 ^b
Acidez (%)	0.42±0.00 ^a	0.38±0.00 ^b
pH	6.19±0.01 ^a	6.17±0.00 ^b
Densidad (g/mL)	1.038±0.00 ^a	1.036±0.00 ^b

Las literales a y b indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para cada determinación.

Las diferencias presentadas en las características fisicoquímicas se atribuyen principalmente a que el calostro con mejor calidad y con la máxima concentración de componentes, es obtenido en la primera ordeña, a medida que las ordeñas avanzan las cantidades de extracto seco, cenizas, proteína, grasa, acidez, pH y densidad disminuyen hasta que el calostro se convierte en leche, entre tanto, los parámetros de humedad y lactosa aumentan hasta alcanzar los valores estándar de la leche madura. La información obtenida en esta caracterización fue similar y coherente a lo reportado por Borad y Singh (2018), aunque pueden presentarse algunas variaciones en los parámetros principalmente por los factores fisiológicos propios de las vacas, en donde se incluyen el número de partos, la edad y la alimentación (Conte & Scarantino, 2013).

7.2 Formación del complejo BAMLET

7.2.1 Puro y en calostro bovino

Las cantidades de ácido oleico (OA) y α -lactoalbúmina (α -LA) que formaron el complejo BAMLET se presentan en el cuadro 6. Se encontró que 23.85 μ mol de OA reaccionaron por cada 1 μ mol de α -LA al formar el complejo de manera pura, obteniendo la misma relación en el calostro bovino de las dos ordeñas.

Cuadro 6. Cantidades de ácido oleico y proteína unidas en la formación del complejo BAMLET puro y en calostro bovino

	Complejo BAMLET	
	Puro	Calostro bovino
OA unido (μ mol)	35.76	5,048.25
α -LA unida (μ mol)	1.50	211.64
Relación μ mol OA: 1 μ mol α -LA	23.85	23.85

Estas proporciones obtenidas de α -LA: OA se encuentran dentro del rango reportado por Dopierała, Krajewska, & Prochaska (2019) para la formación de complejos similares a BAMLET, puesto que describen una unión de 8.5 a 48 μ moles de ácido oleico por cada μ mol de α -LA. La importancia de esta investigación radica en la adecuada adaptación y elección que se tuvo dentro de las diversas metodologías reportadas en la literatura, para poder formar directamente el complejo BAMLET en el calostro bovino con la α -LA presente en él, ya que de acuerdo con Permyakov et al., (2011) para preparar el complejo citotóxico de manera exitosa, se puede hacer por mezcla directa de la proteína y ácido oleico en condiciones alcalinas, bajo calentamiento y con agitación.

7.2.2 Comprobación de la retención del complejo en el queso

En la figura 4 se muestran los perfiles electroforéticos realizados a la proteína α -LA, al suero de calostro bovino nativo y el suero obtenido de los quesos untables con el complejo BAMLET. En el gel (a) se observa en el carril 2 y 7 una banda en los 14,200 kDa indicando la presencia de la α -lactoalbúmina, proteína que fue usada como control, la cual también se muestra en el carril 3 y 6, cargados con el suero de calostro nativo de segunda ordeña, mientras que dicha banda estuvo ausente en el carril 4 y 5 que contenían el suero del queso untable con el complejo BAMLET de

segunda ordeña. En el gel (b) se colocaron las muestras de la tercera ordeña, igualmente observándose que la banda de la α -LA se mostró presente en el suero de calostro nativo (carriles 3 y 6) pero ausente en los sueros del queso untable con el complejo BAMLET (carriles 4 y 5).

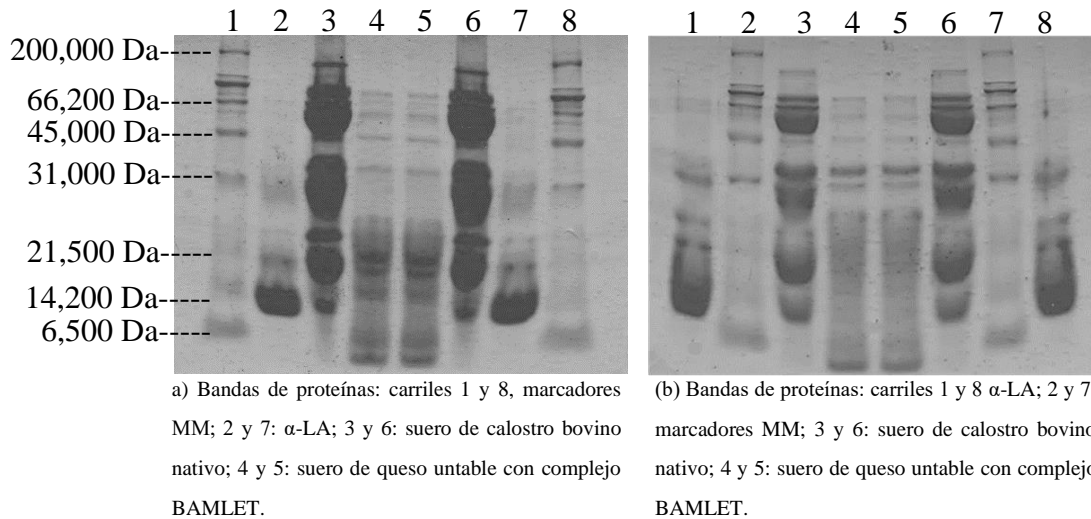


Figura 4. Perfil electroforético obtenido durante la elaboración del queso untable de calostro bovino de segunda (a) y tercera (b) ordeña con complejo BAMLET

Como se puede observar la banda de la α -LA no se encuentra presente en los sueros de los quesos untables elaborados del calostro con el complejo BAMLET, a consecuencia de que esta proteína se unió con el ácido oleico y se mantuvo retenida en forma del complejo dentro de la matriz alimentaria. No obstante este hecho no ocurre convencionalmente en un proceso de elaboración de queso con leche madura, debido a que la mayor parte de la α -LA se pierde en la fracción del lactosuero, Galindo-Amaya et al., (2006), lo comprobaron en un perfil electroforético de suero obtenido de un queso fresco, donde muestran que la banda de la α -LA está presente en los 14,200 kDa y que incluso, al ser una proteína característica del lactosuero, normalmente es aprovechada como un estabilizante en diferentes alimentos (Fontana et al., 2015; Hernández-Rojas & Vélez-Ruíz, 2014). Por lo anterior se puede confirmar que el complejo BAMLET fue creado adecuadamente en el calostro y que además pudo mantenerse retenido en el queso untable exitosamente.

7.3 Perfil fisicoquímico de calostro bovino con el complejo BAMLET

El perfil fisicoquímico del calostro bovino con el complejo BAMLET se indica en el cuadro 7. Los resultados muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los parámetros determinados, excepto en lactosa y pH, además, las fracciones de proteína y grasa son mayores en el calostro de segunda ordeña (8.01% y 12%, respectivamente) a diferencia del calostro de tercera ordeña (5.17% y 4.82, respectivamente).

Cuadro 7. Propiedades físicas y químicas del calostro bovino con el complejo BAMLET

	Calostro bovino BAMLET	
	Segunda ordeña	Tercera ordeña
Extracto seco (%)	16.61±0.45 ^a	15.39±0.30 ^b
Humedad (%)	83.39±0.45 ^a	84.61±0.31 ^b
Cenizas (%)	1.20±0.03 ^a	1.06±0.00 ^b
Proteína (%)	8.01±0.21 ^a	5.17±0.00 ^b
Grasa (%)	12.00±0.00 ^a	4.82±0.05 ^b
Lactosa (%)	3.37±0.70 ^a	3.54±0.29 ^a
Acidez (%)	0.72±0.02 ^a	0.52±0.07 ^b
pH	7.00±0.00 ^a	7.00±0.00 ^a
Densidad (g/mL)	1.05±0.00 ^a	1.03±0.01 ^b

Las literales a y b indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para cada determinación.

El aumento de grasa en comparación con el calostro bovino nativo, se puede atribuir a la adición del ácido oleico para formar el complejo y en cuanto al incremento de proteína, sugiere que el tratamiento térmico realizado para formar el complejo, concentró a las proteínas presentes. Por otra parte, el NaOH utilizado para neutralizar el calostro a pH 7, influyó en la generación de algunas sales, al igual que el ácido láctico empleado para bajar el pH al inicio de la reacción, lo cual ocasionó el aumento del parámetro de cenizas. Diversas metodologías descritas para la preparación del complejo BAMLET y similares (Delgado et al., 2015; Fang et al., 2014; Brinkmann et al., 2011) coinciden en ciertos factores que contribuyen a la formación correcta del complejo citotóxico, incluidos un pH bajo y un tratamiento térmico, el cual conduce a una mejor unión del ácido oleico motivado por la desnaturalización de la α -LA (Liskova et al., 2010; Mossberg et al., 2010), generando que la proteína deje expuesto su núcleo hidrofóbico donde se une el ácido graso, además de que ésta desnaturalización, es la clave del efecto antitumoral del complejo BAMLET (Pettersson et al., 2009) mientras tanto, se conoce, que el pH influye en la conformación proteica, para el acoplamiento de la α -LA:OA (Law & Leaver, 2000).

7.4 Obtención de quesos untables con el complejo BAMLET

En la figura 5 se presentan los quesos untables obtenidos a partir del calostro bovino con el complejo BAMLET de la segunda ordeña (a) y de la tercera ordeña (b). El queso obtenido con la segunda ordeña, mostró un color ligeramente más amarillo y una consistencia más espesa que el de la tercera ordeña.

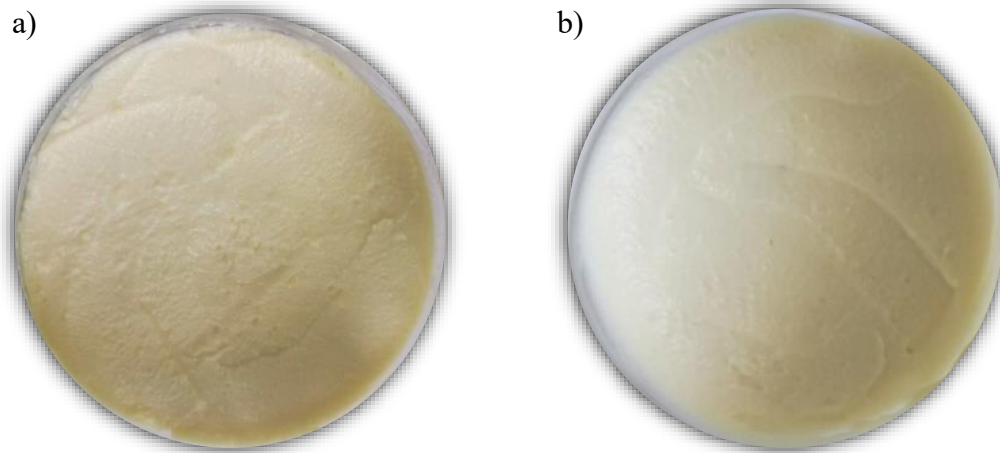


Figura 5. Quesos untables de calostro bovino de segunda (a) y tercera ordeña (b) con complejo BAMLET

Estas características físicas están influenciadas por el contenido de grasa que fue mayor en el calostro de segunda ordeña en contraste con el calostro de tercera ordeña (12% y 4.82%, respectivamente), además de los carotenoides presentes en el calostro bovino (McGrath et al., 2016) que le dan el color característico amarillento diferenciándolo de la leche madura (Abdel-Salam et al., 2018). Sin embargo, la trascendencia de este trabajo radica en la formación y retención exitosa del complejo en el queso untable para ser considerado una fuente potencial de alimento funcional, bajo esta consideración es importante su estabilidad al momento de su consumo para que el complejo llegue adecuadamente a las células blanco y realice su función. Se ha informado previamente (Dopierała, Krajewska & Prochaska et al., 2019) que la α -LA presenta una vida útil y prolongada en el tracto gastrointestinal en presencia de fosfatidilcolina, siendo relativamente resistente a las proteasas digestivas como la pepsina y tripsina, que es conferida por estructura compacta y globular, por lo cual se puede sugerir que este complejo se mantendría estable al momento del consumo, hasta llegar al lugar requerido para efectuar su acción citotóxica. Por otra parte, es importante hacer mención del rendimiento del queso, obteniendo un 40% en el queso

untable de segunda ordeña y un 30% para el queso de tercera ordeña, los cuales son mucho mayores que el rendimiento habitual obtenido para un queso fresco elaborado con leche madura, reportando un aproximado de 17.6% por Ochoa-Flores et al., (2013). El rendimiento del queso depende de la cantidad y proporción de los constituyentes de la materia prima, principalmente de las proteínas presentes (Meza-Nieto et al., 2013), siendo el calostro diferente de la leche madura porque presenta una mayor concentración de sólidos, proteínas y grasa, es razonable el incremento del rendimiento obtenido (Marnila & Korkohen, 2011).

7.5 Perfil fisicoquímico de quesos untables con el complejo BAMLET

El perfil fisicoquímico de los quesos obtenidos del calostro bovino con el complejo BAMLET, se resume en el cuadro 8. Los valores obtenidos de proteína y grasa revelaron que los quesos difieren significativamente entre sí ($p < 0.05$) asimismo, el queso untable BAMLET de segunda ordeña mostró un mayor contenido de proteína (13.56%) en contraste con el de la tercera ordeña (11.00%).

Cuadro 8. Propiedades físicas y químicas de queso untable con el complejo BAMLET

	Queso untable con complejo BAMLET	
	Segunda ordeña	Tercera ordeña
Extracto seco (%)	25.44±0.50 ^a	24.00±1.45 ^a
Humedad (%)	74.56±0.50 ^a	76.00±1.45 ^a
Cenizas (%)	1.81±0.01 ^a	1.80±0.04 ^a
Proteína (%)	13.56±0.02 ^a	11.00±0.11 ^b
Grasa (%)	6.75±0.25 ^a	9.5±0.00 ^b
Lactosa (%)	6.71±0.81 ^a	7.05±0.48 ^a
Acidez (%)	0.23±0.00 ^a	0.26±0.00 ^a
pH	6.77±0.05 ^a	6.79±0.01 ^a

Las literales a y b indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para cada determinación

Los quesos obtenidos exhibieron mayor proteína en comparación del calostro empleado para elaborarlos, pues la unión de la α -LA con el ácido oleico al formar el complejo, mantuvo esta proteína retenida en la matriz alimentaria, sin perderse en el suero como en un proceso convencional (Lappa et al. 2019) de modo que se reflejó en el nivel proteico del queso. Ghorbel et al., (2016) caracterizaron quesos untables comerciales de leche madura, mostrando una cantidad de proteína menor (8.66%-10.13%) al de los quesos untables con el complejo BAMLET, lo cual es atribuido a la composición del calostro, que confiere la aportación de un mayor contenido proteico, principalmente por las inmunoglobulinas presentes (Kamel et al., 2015). Por otro lado,

los quesos untables con el complejo BAMLET también se caracterizaron por bajo porcentaje de grasa (6.75% y 9.5%) y acidez (0.23% y 0.26%) diferenciándose de un queso crema elaborado con leche madura reportado por Brighenti et al., (2018) y a los quesos untables caracterizados por Ghorbel et al., (2016) donde reportan mayor cantidad de grasa (60.68%-59.44%), características atribuidas a la metodología para la formación del complejo.

7.6 Perfil fisicoquímico del suero de quesos untables con el complejo BAMLET

Los análisis fisicoquímicos realizados en los sueros obtenidos de los quesos con el complejo BAMLET arrojaron los datos reportados en el cuadro 9. Se aprecian diferencias significativas ($p < 0.05$) en los parámetros cenizas, proteína y acidez. El contenido de proteína también es mayor en el suero del queso de segunda ordeña (1.74%) que en el de tercera ordeña (1.59%).

Cuadro 9. Propiedades físicas y químicas del suero de queso untable con el complejo BAMLET

	Suero de queso untable con complejo BAMLET	
	Segunda ordeña	Tercera ordeña
Extracto seco (%)	7.15±0.53 ^a	7.12±0.59 ^a
Humedad (%)	92.85±0.53 ^a	92.88±0.59 ^a
Cenizas (%)	1.02±0.08 ^a	0.88±0.01 ^b
Proteína (%)	1.74±0.01 ^a	1.59±0.04 ^b
Grasa (%)	0.20±0.00 ^a	0.30±0.00 ^a
Lactosa (%)	3.55±0.46 ^a	3.63±0.40 ^a
Acidez (%)	0.44±0.01 ^a	0.31±0.01 ^b
pH	6.79±0.06 ^a	6.83±0.01 ^a
Densidad (g/mL)	1.04±0.00 ^a	1.04±0.00 ^a

Las literales a y b indican diferencia significativa ($p < 0.05$) para cada determinación.

La cantidad de proteína presente en el suero obtenido del queso de segunda ordeña se mostró influenciada por la materia prima, es decir el calostro de esta ordeña presentó mayor proteína y, por consiguiente, los productos resultantes a partir del él. Un estudio realizado por Tarango-Hernández et al., (2019) sobre el lactosuero obtenido de queso fresco elaborado con leche madura mostró un inferior porcentaje en minerales, proteína y grasa, suscitado por la limitación de estos nutrientes en la leche a diferencia de la composición del calostro, en consecuencia, el suero obtenido de un queso de calostro tendrá un nivel mayor de nutrientes (Dzik et al., 2017). Diversos autores (Lollo et al., 2014; Guerrero, Ramírez & Puente, 2011; Rodrigues, Texeira & Mendes Da Silva, 2011) han mencionado que el suero de queso puede desempeñar un papel importante en la integridad y motilidad intestinal, fortalecer el sistema inmunológico, el sistema cardiovascular,

mejorar el desempeño atlético e incluso regenerar el músculo, por tanto, el suero del queso con el complejo BAMLET puede tener futuras aplicaciones, por ejemplo en bebidas o fórmulas infantiles por sus componentes presentes brindando una alternativa a este subproducto (Pandey et al., 2019; Hernández-Rojas & Vélez- Ruíz, 2014).

7.7 Análisis de textura

En el cuadro 10 se muestra la información obtenida del análisis de textura realizado en los quesos untables con el complejo BAMLET y en un queso untable comercial. Se observa que entre los quesos con el complejo BAMLET no existen diferencias significativas ($p > 0.05$), mientras que, en el parámetro de adhesividad, el queso de segunda ordeña presenta un valor similar (0.28N) respecto al queso untable comercial (0.40 N). También se aprecia una menor dureza de los quesos con el complejo (1.64 N, 0.87 N, segunda y tercera ordeña, respectivamente) a diferencia del queso untable comercial (13.40 N).

Cuadro 10. Parámetros medidos en el Análisis de Textura

	Queso untable con complejo BAMLET		Queso untable comercial
	Segunda ordeña	Tercera ordeña	
Dureza (N)	1.64±0.40 ^a	0.87±0.22 ^a	13.40±2.26 ^b
Trabajo dureza terminado (J)	0.01±0.00 ^a	0.004±0.00 ^a	0.07±0.00 ^b
Adhesividad (N)	0.28±0.08 ^{ab}	0.17±0.04 ^a	0.40±0.01 ^b

Las literales a y b indican diferencia significativa (Tukey; $p < 0.05$) para cada determinación

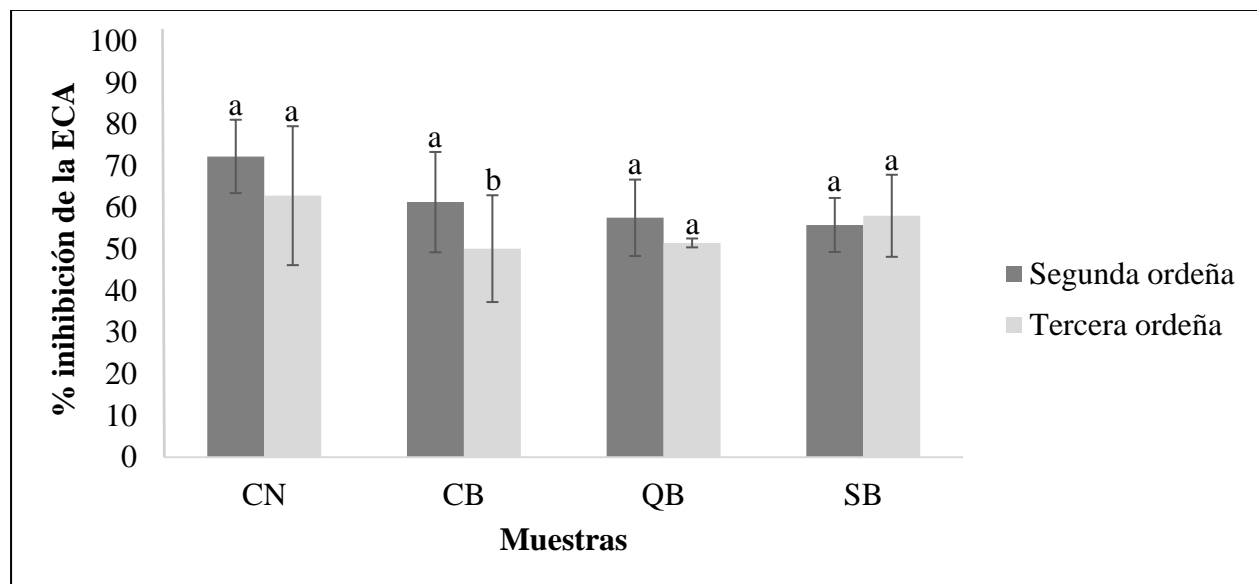
Las diferencias entre los quesos con el complejo BAMLET y el queso untable comercial, se atribuyen al proceso de elaboración y la formación del complejo, percibiéndose varios factores cuya influencia es notoria en la textura de los productos untables, siendo el caso de las condiciones de procesamiento, incluyendo la temperatura, la agitación, la homogenización, la velocidad de enfriamiento, al igual que la composición fisicoquímica del producto, incluido el porcentaje de humedad y de sales, no obstante, la proteína y la grasa son los constituyentes principales que rigen sus propiedades de textura (Bayarri, Carbonell & Costell, 2012; Dimitreli & Thomareis, 2008). Hussein & Shalaby (2014) atribuyen a la grasa la lubricidad y la suavidad del queso, a pesar de que el queso comercial reporta un mayor contenido de grasa en su etiqueta nutrimental (18%) resultó más duro que los quesos untables con el complejo BAMLET los cuales se caracterizaron por un menor contenido de grasa (6.75% y 9.5%, segunda y tercera ordeña, respectivamente), ya que se

han descrito otros factores que contribuyen a la suavidad de los productos untables, de acuerdo con Korish & Abd-Elhamid (2012) una mayor humedad confiere una menor dureza al producto, como se pudo observar en el perfil fisicoquímico de los quesos con el complejo, presentaron niveles altos de humedad (74.56% y 76%, segunda y tercera ordeña, respectivamente) mientras que el queso comercial reporta en su etiqueta una humedad menor (60%), además Lee & Klostermeyer (2001), también atribuyen a que la dureza disminuye con la elevación del pH, dado que el pH de los quesos con BAMLET oscilan entre 6.77 y 6.79 (segunda y tercera ordeña, respectivamente) en contraste con el pH del queso comercial que encuentra alrededor de 4.5. De igual forma, Kaminarides et al., (2006) atribuyen una mayor dureza el adicionar sal (NaCl), de esta manera, al no ser salados los quesos con el complejo BAMLET, resultaron más suaves.

Respecto a la adhesividad, que es definido como el trabajo necesario para superar la fuerza de atracción entre el alimento y la superficie, o bien, aquel que simula el grado en que el queso se adhiere a los dientes durante la masticación se ve aumentada a menor proteína y grasa (Zheng, Liu & Mo, 2016). Contrariamente, los quesos con el complejo BAMLET resultaron menos adhesivos que el queso comercial (22% proteína) a pesar de presentar menor proteína y grasa (13.56% y 11.00%; 6.75% y 9.5% segunda y tercera ordeña, respectivamente), esto podía explicarse por el contenido de sal ya que es un factor influyente en el aumento de la adhesividad de acuerdo con El-Bakry et al., (2011), comprendiendo por qué el queso comercial fue más adhesivo que los quesos untables con el complejo BAMLET los cuales no fueron salados. Sin embargo, su baja adhesividad manifestaría una ventaja en el futuro empaque del producto, puesto que una adhesividad excesivamente alta causa problemas de adherencia del paquete de queso (Juan et al., 2007). Se conoce que los quesos untables se caracterizan por su capacidad de untarse y, por lo tanto, la textura es una propiedad importante que determina la aceptación del consumidor de un alimento (Ghorbel et al., 2016).

7.8 Evaluación de la propiedad funcional antihipertensiva del queso untable con el complejo BAMLET

En la figura 6 se presentan la inhibición de la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA) para evaluar su funcionalidad del alimento determinando su capacidad antihipertensiva. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en las muestras de segunda ordeña, asimismo, el calostro nativo (CN) de segunda ordeña es el que presenta la mayor inhibición (72.27%), mientras que el calostro con el complejo BAMLET (CB) de tercera ordeña es aquel con menor capacidad de inhibición (50.11%) de la ECA.



Valores promedio de 2 mediciones, las literales a y b indican diferencia significativa (Prueba de t con dos colas; $p < 0.05$) para cada determinación. CN= Calostro bovino nativo, CB= Calostro bovino con el complejo BAMLET, QB= Queso untable obtenido con el calostro bovino con complejo BAMLET, SB= Suero del queso untable obtenido con el calostro bovino con complejo BAMLET

Figura 6. Inhibición de la ECA por queso untable con complejo BAMLET

La mayor actividad se observó en calostro nativo de segunda ordeña (72.27%), la cual se podría atribuir a la liberación de péptidos bioactivos (Layman et al., 2018) y en el caso de calostro con el complejo BAMLET, queso untable BAMLET y suero BAMLET de ambas ordeñas, la actividad fue menor que el calostro nativo, lo que indica que un tratamiento térmico a alta temperatura como el que se realizó para la generación de BAMLET, además de un cambio en pH alcalino, deteriora la estabilidad de los péptidos inhibidores de la ECA (Wu et al., 2014), sin embargo no se perdió esta bioactividad, solo disminuyó, pues se conoce que la actividad inhibitoria de la ECA puede

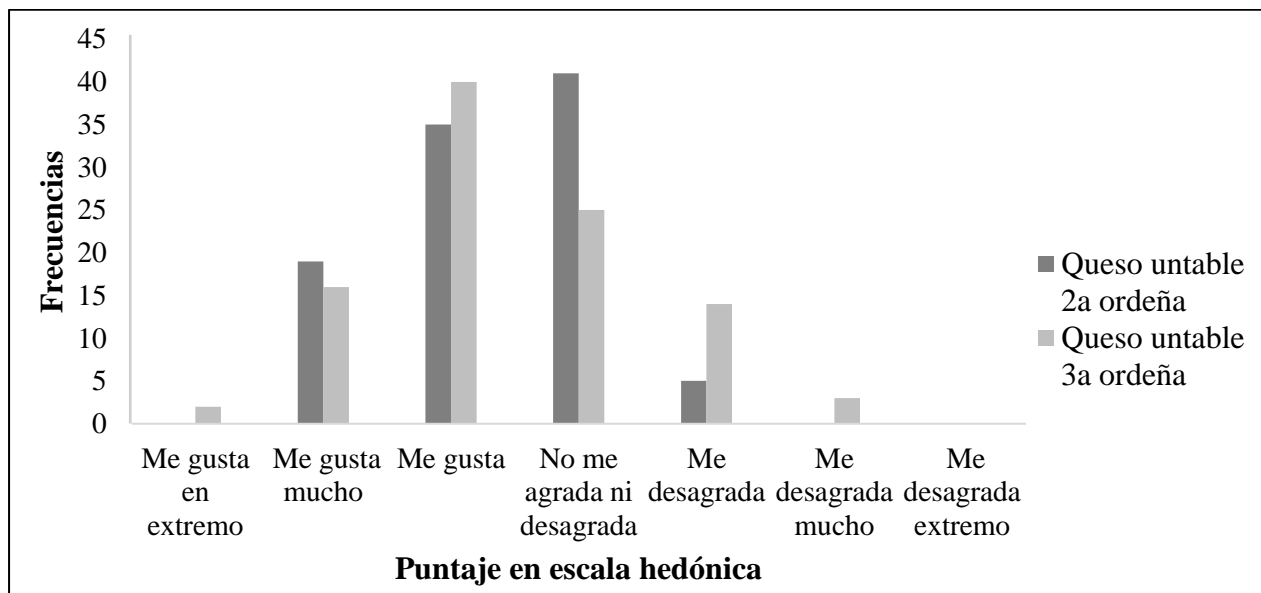
resistir pH 1.0–8.0, pero no condiciones alcalinas pH 9.0–12.0 ni altas temperaturas (110-120 ° C). Aun así, no hubo una diferencia significativa ($p>0.05$) entre las muestras de segunda ordeña.

Por otra parte, el inhibidor sintético utilizado en la prueba fue el captopril, el cual mostró que 21.79 mg inhibieron el 66.19% de la ECA, mientras que una porción de 0.5 g de queso con complejo BAMLET de la segunda ordeña fue suficiente para inhibir el 57.52 ± 9.17 y un 51.48 ± 1.07 el queso de la tercera ordeña. Adeghate et al., (2010) informaron que la dosis inicial recomendada para el captopril para pacientes a largo plazo es de 75 mg/ día, sin embargo, los inhibidores sintéticos como el captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril y ramipril, tienen la desventaja de presentar efectos secundarios como tos, alteraciones del gusto y erupción cutánea (Chen et al., 2013).

Por lo mencionado, se ha buscado identificar inhibidores de la ECA provenientes de fuentes naturales como la leche, soya, pescado y cereales (Ibrahim et al., 2017; Wu et al., 2014), en este caso proponiendo a los quesos untables de calostro bovino, que además contienen el complejo citotóxico BAMLET, sugiriendo una alternativa natural para el tratamiento de la presión arterial como alimento funcional. Además de que los quesos untables mostraron la bioactividad antihipertensiva, 0.52 g de suero obtenido del queso de la segunda ordeña inhibió el 55.80 ± 6.49 de la ECA y por otro lado, el suero del queso de la tercera ordeña inhibió 58.01 ± 9.86 de la enzima, es por ello que este suero puede desempeñar un papel importante en la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades, demostrando que las proteínas de suero contienen una amplia gama de secuencias de péptidos bioactivos (Herrera-Ponce et al., 2019) que pueden desempeñar otras funciones en el sistema cardiovascular, nervioso, digestivo o inmunitario que incluyen propiedades antimicrobianas, reductoras de la presión arterial (o inhibidores de la ECA), capacidad reductora del colesterol, actividades antitrombóticas y antioxidantes, aumento de la absorción de minerales y biodisponibilidad de los mismos, efectos inmunomoduladores, así como características opioides (Tavares et al., 2012).

7.9 Análisis sensorial

En la figura 8, se muestra el grado de satisfacción de sabor de los quesos untables con el complejo BAMLET. En este parámetro evaluado, no se encontró diferencias significativas mediante la prueba no paramétrica de Wilcoxon ($\alpha=0.05$). Se puede observar que la mayor frecuencia de ambos fue en el punto “me gusta” mientras que el queso untable elaborado con la segunda ordeña tuvo un mayor nivel de agrado, puesto que no hubo panelistas que lo calificaran en el punto “me desagrada mucho”.



Frecuencias obtenidas de 100 panelistas no entrenados (Prueba de Wilcoxon, diferencia significativa si $p<0.05$)

Figura 7. Histograma de frecuencias para el análisis sensorial aplicado a muestras de queso untable con el complejo BAMLET

Los niveles de preferencia de los quesos con el complejo BAMLET, se pueden atribuir a la composición del calostro bovino, dado que contiene más grasa que la leche, proporcionando una mayor untuosidad al producto agradable al paladar de los consumidores, los cuales normalmente están acostumbrados al sabor de quesos elaborados con leche normal o madura, además se sugiere que el ácido oleico usado para la formación del complejo, también mejoró las características sensoriales de los quesos. El queso realizado con la segunda ordeña tuvo mayores frecuencias entre los puntos situados de “me gusta mucho” y “no me agrada ni desagrada” que se puede atribuir a que presentó una menor cantidad de grasa (6.75%) en comparación con el de la tercera ordeña (9.5%) ya que los consumidores que evaluaron las muestras mostraron un promedio de edad joven

(24.8 años) informándose previamente (Markey et al., 2017) que este tipo de consumidores pueden ser más sensibles a los cambios en el perfil de composición del queso. El análisis sensorial es una contribución importante e influyente para su posible comercialización que ofrece una perspectiva de la aceptación del consumidor potencial (Mohamed & Shalaby et al., 2016), en este caso, por los resultados obtenidos, ambos quesos untables podrían competir en el mercado de alimentos funcionales.

CAPÍTULO 8

8. CONCLUSIONES

1. Los hallazgos del presente estudio indican que fue efectiva la metodología desarrollada para la formación del complejo BAMLET en calostro bovino y se logró exitosamente la obtención de un queso untable preparado a partir de él.
2. Se corroboró que el complejo BAMLET se mantuvo retenido en la matriz alimentaria mediante una SDS-PAGE realizada en el suero del queso obtenido mostrando que la banda de α -LA estaba ausente y por lo tanto unida al ácido oleico en forma del complejo.
3. Se presentó un aumento en el contenido proteico en el calostro con el complejo BAMLET respecto al calostro nativo, al igual que en los quesos untables obtenidos, además mostraron un menor porcentaje de grasa en comparación con un queso comercial, así mismo, el suero resultante del queso aún se encontró más rico en proteínas, grasas y minerales que un suero de queso normal elaborado con leche madura.
4. Las propiedades de textura del queso untable con el complejo BAMLET sugirieron que se tuvo una mejoría en cuanto a la dureza y adhesividad presentadas, al compararlos con el queso comercial.
5. La evaluación de la capacidad antihipertensiva mediante la determinación de la inhibición de la enzima ECA en el calostro, quesos y sueros obtenidos con el complejo, comprobó que poseen una adecuada capacidad.
6. El análisis sensorial de los quesos untables con el complejo mostró una buena aceptación del consumidor para el queso proveniente de calostro de segunda ordeña.

CAPÍTULO 9

9. REFERENCIAS

Abdel-Salam Z.A., Abdel-Salam S.A.M, Abdel-Mageed I.I., and Harith M.A. (2018). Evaluation of proteins in sheep colostrum via laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Advanced Research*,15, 19-25.

Abdel-Salam Z., Abdel Ghany Sh., and Harith M.A. (2014). Evaluation of immunoglobulins in bovine colostrum using laser induced fluorescence. *Talanta*, 129, 15–19.

Abdel-Ghany A.S., and Zaki D. A. (2018). Production of novel functional yoghurt fortified with bovine colostrum and date syrup for children. *Alexandria Science Exchange Journal*, 39, 651-662.

Abd Elhamid A.M. (2016). Physicochemical, rheological and sensory properties of Egyptian Kariesh cheese containing wheat bran. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 425-432.

Adeghate E., Kalasz H., Veress G., and Teke K. (2010). Medicinal Chemistry of Drugs Used in Diabetic Cardiomyopathy. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 517-51.

Ahmadi M., Velciov A.B., Scurtu M., Ahmadi T., and Olariu, L. (2011). Benefits of bovine colostrum in nutraceutical products. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 17, 42-45.

Altomare A., Fasoli E., Colzani M., Paredes P.X.M., Ferrari M., Cilurzo F., Rumio C., Cannizzaro L. Carini M., Righetti P.G., and Aldini G. (2016). An in-depth proteomic analysis based on ProteoMiner, affinitychromatography and nano-HPLC–MS/MS to explain the potentialhealth benefits of bovine colostrum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 121, 297–306.

Alves A.C., Alves N.G., Ascari I. J., Junqueira F.B., Coutinho A.S., Lima R. R., Pérez J.R.O., De Paula S.O., Furusho-Garcia I.F., and Abreu L.R. (2015). Colostrum composition of Santa Inês sheep and passive transfer of immunity to lambs. *Journal of Dairy Science*, 98, 3706–3716.

Anamika Das D., and Seth R. (2017). Studies on quality attributes of skimmed colostrum powder. *International Journal of Chemical Studies*, 5, 17-20.

AOAC International (2000). Official Methods of Analysis. Vol. 1. 17th. AOAC International, Arlington, VA

Assumpção-Fiorda F., Melo G.V., Thomaz-Soccol V., Pedroni A., Kumar S., and Soccol C.R. (2016). Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 690-697.

Awargal P., and Gupta R. (2016). A review on anticancer property of colostrum. *Journal of Medical and Health Sciences*, 5, 1-9.

Ayar A., Siçrama H. and Çetin I. (2016). The effect of bovine colostrum on the lactic flora of yogurt and kefir. *JSM Biotechnology & Biomedical Engineering*, 4, 1063.

Bagwe S., Tharappel L.J.P., Kaur G., and Buttar H.S. (2015). Bovine colostrum: an emerging nutraceutical. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 12, 1-11.

Barbana C., Sánchez L., and Pérez M.D. (2011). Bioactivity of α -lactalbumin related to its interaction with fatty acids: a review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 51, 783–794.

Barreto I.M.L.G., Rangel A.H.N., Urbano S.A., Bezerra J.S. and Oliveira C.A.A. (2019). Equine milk and its potential use in the human diet. *Food Science and Technology*, 39, 1-7.

Bartkiene E., Bartkevics V., Ikkere L.E., Pugajeva I., Zavistanaviciute P., Lele V., Ruzauskas M., Bernatoniene J., Jakstas V., Klupsaite D., Zadeike D., Viskelis P., and Juodeikiene G. (2018). The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 101, 6787–6798.

Bayarri S., Carbonell I., and Costell E. (2012). Viscoelasticity and texture of spreadable cheeses with different fat contents at refrigeration and room temperatures. *Journal of Dairy Science*, 95, 6926-6936.

Brighenti M., Govindasamy-Lucey S., Jaeggi J.J., Johnson M.E., and Lucey J.A. (2018). Effects of processing conditions on the texture and rheological properties of model acid gels and cream cheese. *Journal of Dairy Science*, 101, 6762–6775.

- Brinkmann C.R., Thiel S., Larsen M.K., Petersen T.E., Jensenius J.C., and Heegaard C.W. (2011). Preparation and comparison of cytotoxic complexes formed between oleic acid and either bovine or human α -lactalbumin. *Journal of Dairy Science*, 94, 2159-2170.
- Borad S.G., and Singh A.K. (2018). Colostrum immunoglobulins: Processing, preservation and application aspects. *International of Dairy Journal*, 85, 201-210.
- Botéquio D.M., Montanari W.N., Linhares A.L., Pauletti P., Susin I., and Machado-Neto R. (2012). Lyophilized bovine colostrum as a source of immunoglobulins and insulin-like growth factor for newborn goat kids. *Livestock Science*, 145, 223–229.
- Buttar H.S., Bagwe S.M., Bhullar S.K., and Kaur G. (2017). Health benefits of bovine colostrum on children and adults. En RR Watson RJ Collier & VR Preedy, editors. *Dairy in Human Health and disease across the Lifespan*. London: Academic Press; 3-20.
- Cao X., Yang M., Yang N., Liang X., Tao D., Liu B., Wu J., and Yue X. (2019). Characterization and comparison of whey N-glycoproteomes from human and bovine colostrum and mature milk. *Food Chemistry*, 276, 266–273.
- Cairangzhuoma M., Yamamoto H., Muranishi M., Inagaki K., Uchida K., Yamashita S., Saito S., Yabe T., and Kanamaru Y. (2013). Skimmed, sterilized, and concentrated bovine late colostrum promotes both prevention and recovery from intestinal tissue damage in mice. *Journal of Dairy Science*, 96, 1347–1355.
- Chae A., Aitchison A., Day A.S., and Keenan J.I. (2017). Bovine colostrum demonstrates anti-inflammatory and antibacterial activity in in vitro models of intestinal inflammation and infection. *Journal of Functional Foods*, 28, 293–298.
- Chen J., Wang Y., Ye R., Wu Y., and Xia W. (2013). Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I-converting enzyme. *Food Chemistry*, 141, 3329–3334.
- Chowdhury M.R., Schumann C., Bhakta-Guha D., and Guha G. (2016). Nanoteranósticos del cáncer: estrategias, promesas e impedimentos. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 291–304.
- Cushman D.W. and Cheung H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648.

Conte F., and Scarantino S. (2013). A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment. *International Food Research Journal*, 20, 925-931.

Cunha C.R., Dias A.I., and Viotto W.H. (2010). Microstructure, Texture, Colour, and Sensory Evaluation of a Spreadable Processed Cheese Analogue Made with Vegetable Fat. *Food Research International*, 43, 723–729.

Delgado Y., Morales-Cruz M., Figueroa C.M., Hernández-Román J., Hernández G., and Griebenow K. (2015). The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α -lactalbumin component. *FEBS Open Bio*, 5, 397-404.

Dimitreli G., and Thomareis A.S. (2008). Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 84,368-374.

Dopierała K., Krajewska M., and Prochaska K. (2019). Binding of α -lactalbumin to oleic acid monolayer and its relevance to formation of HAMLET-like complexes. *International Dairy Journal*, 89, 96-104.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., and Smith F. (1956). Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.

Dunn A., Ashfield A., Earley B., Welsh M., Gordon A., and Morrison S. J. (2017). Evaluation of factors associated with immunoglobulin G, fat, protein, and lactose concentrations in bovine colostrum and colostrum management practices in grassland-based dairy systems in Northern Ireland. *Journal of Dairy Science*, 100, 2068–2079.

Dzik S., Miciński B., Aitzhanovac I., Miciński J., Pogorzelska J., Beisenov A., and Kowalski I.M. (2017). Properties of bovine colostrum and the possibilities of use. *Polish Annals of Medicine*, 24, 295-299.

Ebrahim F., Shankaranarayanan J.S., Kanwar J.R., Gurudevan S., Krishnan U.M., Kanwar R.K. (2014). Identification of Unprecedented Anticancer Properties of High Molecular Weight Biomacromolecular Complex Containing Bovine Lactoferrin (HMW-bLf). *PLOS One*, 9, 1-13.

El-Bakry M., Duggan E., O'Riordan E.D., and O'Sullivan M. (2011). Effect of cation, sodium or potassium, on casein hydration and fat emulsification during imitation cheese manufacture and post-manufacture functionality. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2012-2018.

Eslamian G., Hossein S.A., and Vahdat Z.S. (2018). Effects of early enteral bovine colostrum supplementation on intestinal permeability in critically ill patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition*, 60, 106-111.

Fajardo-Espinoza F.S., Romero-Rojas A., and Hernández-Sánchez H. (2019). Production of bioactive peptides from bovine colostrum whey using enzymatic hydrolysis. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 19, 1-9.

Fang B., Zhang M., Jiang L., Jing H., and Ren F.Z. (2012). Influence of pH on the Structure and Oleic Acid Binding Ability of Bovine α -Lactalbumin. *The Protein Journal*, 31, 564–572.

Fang B., Zhang M., Tian M., Jiang L., Guo H.Y., and Ren F.Z. (2014). Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841, 535–543.

Fenger C.K., Tobin T., Casey P.J., Roualdes E.A., Langemeier J.L., Cowles R., et al. (2016). Enhanced Bovine Colostrum Supplementation Shortens the Duration of Respiratory Disease in Thoroughbred Yearlings. *Journal of Equine Veterinary Science*, 42, 77–81.

Fideicomiso de Riesgo Compartido (FIRCO). (2017). La Ganadería en México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/firco/articulos/la-ganaderia-en-mexico?idiom=es>

Frau F., Font de Valdez G., and Pece N. (2104). Effect of Pasteurization Temperature, Starter Culture, and Incubation Temperature on the Physicochemical Properties, Yield, Rheology, and Sensory Characteristics of Spreadable Goat Cheese. *Journal of Food Processing*, 2014, 1-8.

Fontana A., Spolaore B., and Poverino de Laureto P. (2013). The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834,1125–1143.

Foster D.M. Poulsen K.P., Sylvester H.J., Jacob M.E., Casulli K.E., and Farkas B.E. (2016). Effect of high-pressure processing of bovine colostrum on immunoglobulin G concentration, pathogens, viscosity, and transfer of passive immunity to calves. *Journal of Dairy Science*, 99, 8575–8588.

Frislev H.S., Boye T.L., Nylandsted J., and Otzen D. (2017). Liprotides kill cancer cells by disrupting the plasma membrane. *Scientific reports*, 7, 1-12.

Frislev H.S., Jessen C.M., Oliveira C.L.P., Pedersen J.S., and Otzen D.E. (2016). Liprotides made of α -lactalbumin and cis fatty acids form core-shell and multi-layer structures with a common membrane-targeting mechanism. *Proteínas y Proteómica*, 1864, 847-859.

Galindo-Amaya L.M., Valbuena-Colmenares E., and Rojas-Villaruel E. (2006). Estandarización de la detección del glicomacropéptido por SDS-PAGE como índice de adulteración de leche. *Revista científica*, XVI, 308-314.

Gammariello D., Chillo S., Mastromatteo M., Di Giulio S., Attanasio M., and Del Nobile M.A. (2008). Effect of Chitosan on the Rheological and Sensorial Characteristics of Apulia Spreadable Cheese. *International Journal of Dairy Science*, 91,4155–4163.

Ghorbel D., Bettaieb N.B., Ghrib F., Slema M.B., and Attia H. (2016). Textural Properties of Commercial Processed Cheese Spreads: Instrumental and Sensory Evaluations. *International Journal of Food Properties*, 19, 1513–1521.

Gianfranceschi L.G., Gianfranceschi G., Quassinti L., and Bramucci M. (2018). Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *Journal of Functional Foods*, 47, 252-263.

Godhia M., and Patel N. (2013). Colostrum: its composition, benefits as a nutraceutical: a review. *Current Research In Nutrition and Food Science Journal*, 1, 37-47.

Guerrero-Haber J.R., Ramírez-Perú A.L., Puente-Vidal W. (2011). Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo Santiago. *Tecnología Química*, XXXI, 93-100.

Håkansson A.P., Roche-Hakansson H., Mossberg A.K., and Svanborg C. (2011). Apoptosis-Like Death in Bacteria Induced by HAMLET, a Human Milk Lipid-Protein Complex. *PLOS One*, 6, 1-13.

Håkansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H., and Svanborg C. (1995). Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 8064-8068.

Hernández-Rojas M. y Vélez-Ruíz J.F. (2014) Suero de la leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de ingeniería en Alimentos*, 8, 13-22.

Herrera-Ponce A.L., Alarcón-Rojo A.D., Salmeron I., and Rodríguez-Figueroa J.C. (2019). Physiological health effects of whey protein-derived bioactive peptides: A review. *Rev Chil Nutr*, 46, 205-214.

Ho C.S.J., Rydstrom A., Trulsson M., Balfors J., Storm P., Puthia M., Nadeem A., and Svanborg C. (2012). HAMLET: functional properties and therapeutic potential. *Future Oncology*, 8, 1301–1313.

Hussein G.A.M., and Shalaby S.M. (2014). Microstructure and textural properties of Kareish cheese manufactured by various ways. *Annals of Agricultural Science*, 59, 25-31.

Ibrahim H.R., Ahmed A.S., and Miyata T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8, 63-71.

Jenny M., Pedersen N. R., Hidayat B. J., Schennach H., and Fuchs D. (2010). Bovine colostrum modulates immune activation cascades in human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *The New Microbiologica*, 33, 129-135.

Jøhnke M., and Petersen T.E. (2012). The Alpha-Lactalbumin/Oleic Acid Complex and Its Cytotoxic Activity, *Intech Open*, 120-144.

Jones A.W., March D.S., Curtis F., and Bridle C. (2016). Bovine colostrum supplementation and upper respiratory symptoms during exercise training: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*. 8, 21.

Juan B., Trujillo A.J., Guamis V., Buffa M., and Ferragut V. (2007). Rheological, texture and sensorial characteristics of semi-hard high-pressure sheep milk cheese. *International Dairy Journal*, 17, 248-254.

Kamel N.N., Hafez Y.M., El-Kholy A.F., Maarec Y.A., and Ward G.A. (2015). Periparturient changes in mammary gland secretions in multiparous buffalo cows (*Bubalus bubalis*). *Advances in Environmental Biology*, 9, 12-20.

Kamijima T., Ohmura A., Sato T., Akimoto K., Itabashi M., Mizuguchi M., Kamiya M., Kikukawa T., Aizawa T., Takahashi M., Kawano K., and Demura M. (2008). Heat-treatment method for producing fatty acid-bound alpha-lactalbumin that induces tumor cell death. *Biochemical and Biophysical*, 376, 211-214.

Kaminarides S., Kalogridis D., and Massouras T. (2006). Creation and quality characterization of processed cheeses derived mainly from Halloumi cheese. *Lait*, 86,333-343.

Kaspersen J.D., Pedersen J.N., Hansted J.G., Nielsen S.B., Sakthivel S., Wilhelm K., Nemashkalova E.L., and Permyakov S.E. (2014). Generic structures of cytotoxic lipotides: nano-sized complexes with oleic acid cores and shells of disordered proteins. *Journal of Chemical Biology*, 18, 2693-702.

Kataev A., Zherelova O.M., and Grishchenko V.M. (2013). Effects of oleic acid on ionic channels of plasma membranes of green alga *Chara corallina*. *Biochemistry (Moscow) Suppl Ser A: Membrane Cell Biology*, 7, 141–147.

Kessler E.C., Bruckmaier R.M., and Gross J.J. (2014). Milk production during the colostrum period is not related to the later lactational performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97, 2186–2192.

Kim K.H., Yun S., Mok K.H., and Lee E.K. (2016). Thermodynamic analysis of ANS binding to partially unfolded α -lactalbumin: correlation of endothermic to exothermic changeover with formation of authentic molten globules. *Journal of Molecular Recognition*, 29, 446-451.

Korish M., and Abd Elhamid A.M. (2012). Improving the textural properties of Egyptian kariesh cheese by addition of hydrocolloids. *International Journal of Dairy Technology*, 65, 237-242.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15, 680-685.

Lappa I.K., Papadaki A., Kachrimanidou V., Terpou A., Koulougliotis D., Eriotou E., and Kopsahelis N. (2019). Cheese whey processing: Integrated biorefinery concepts and emerging food applications. *Food*, 8, 347.

Law A.J. and Leaver J. (2000). Effect of pH on the thermal denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48, 672–679.

- Layman D.K., Lönnerdal B., and Fernstrom J.D. (2018). Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 76,444–460.
- Lee S.K., and Klostermeyer H. (2001). The Effect of pH on the Rheological Properties of Reduced-fat Model Processed Cheese Spreads. *LWT-Food Science and Technology*, 34, 288-292.
- Li H.Y., Li P., Yang H.G., Wang Y.Z., Huang G.X., Wang Q., and Zheng W. (2019). Investigation and comparison of the anti-tumor activities of lactoferrin, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin in A549, HT29, HepG2, and MDA231-LM2 tumor models. *Journal of Dairy Science*, 102, 9586-9597.
- Liskova K., Kelly A.L., O'Brien N., and Brodkorb A. (2010). Effect of denaturation of α -lactalbumin on the formation of BAMLET (bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4421–4427.
- Lollo P.C.B., Amaya-Farfan J., Faria I.C., Salgado J.V.V., Chacon-Mikahil M.P.T., Cruz A.G., Oliveira C.A.F., Montagner P.C., and Arruda M. (2014). Hydrolysed whey protein reduces muscle damage markers in Brazilian elite soccer players compared with whey protein and maltodextrin. A twelve-week in-championship intervention. *International Dairy Journal*, 34, 19-24.
- Lopreiato V., Ceniti C., Trimboli F., Fratto E., Marotta M., Britti D., and Morittu V.M. (2017). Evaluation of the capillary electrophoresis method for measurement of immunoglobulin concentration in ewe colostrum. *Journal of Dairy Science*, 100, 6465–6469.
- Lucera A., Costa C., Marinelli V., Saccotelli M.A., Del Nobile M.A., and Conte A. (2018). Fruit and Vegetable By-Products to Fortify Spreadable Cheese. *Antioxidants*, 7,1-10.
- Macías-Mejía B.A., Gómez-Salazar J.A., Mireles-Arriaga A. I., y Rodríguez-Hernández G. (2019). Determinación de parámetros fisicoquímicos y sensoriales de queso fresco de la ciudad de Irapuato. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*,4, 531-537.
- McGrath A.B., Fox F.P., Mcsweeney L.H.P., and Kelly L.A. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Science & Technology*, 96, 33–158.
- Marchiani R., Bertolino, M., Ghirardello D., McSweeney P.L.H., and Zeppa G. (2016). Physicochemical and nutritional qualities of grape pomace powder-fortified semi-hard cheeses. *Journal of Food Science of Technology*, 53, 1585–1596.

Marnila P., and Korhonen H. (2011). Milk, Colostrum. 2a. ed. *Encyclopedia of dairy sciences*, 591-597p.

Markey O., Souroullas K., Fagan C.C., Kliem K.E., Vasilopoulou D., Jackson K.G., Humphries D.J, Grandison A.S., Givens D.I., Lovegrove J.A., and Methven L. (2017). Consumer acceptance of dairy products with a saturated fatty acid–reduced, monounsaturated fatty acid–enriched content. *Journal of Dairy Science*, 100, 7953–7966.

Mašek T., Krstulovic L., Brozic D., Vranic M., Mauric M., Bajic M., and Starcevic K. (2014). Cow colostrum and early milk enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid. *European Food Research and Technology*, 238, 635-640.

Mellado-Bosque M. (2010). Producción de leche en zonas templadas y tropicales. 1a. ed. *Trillas*. México.350 p.

Menchetti L., Traina G., Tomasello G., Casagrande-Proietti P., Leonardi L., Barbato O., and Brecchia G. (2016). Potential benefits of colostrum in gastrointestinal diseases. *Frontiers in Bioscience*, 8, 331-351.

Meza-Nieto M.A., González-Córdova A.F., Piloni-Martini J., and Vallejo-Cordoba B. (2013). Effect of β -lactoglobulin A and B whey protein variants on cheese yield potential of a model milk system. *Journal of Dairy Science*, 96, 6777–6781.

Mi J.D., Zhou J.W., Ding L.M., Wang L., and Long R.J. (2016). Short communication: Changes in the composition of yak colostrum during the first week of lactation. *Journal of Dairy Science*, 99, 818–824.

Mohamed A.G., and Shalaby S.M. (2016). Texture, Chemical Properties and Sensory Evaluation of a Spreadable Processed Cheese Analogue Made with Apricot Pulp (*Prunus armeniaca L.*). *International Journal of Dairy Science*, 11, 61-68.

Mok K.H., Pettersson J., Orrenius S., and Svanborg C. (2007). HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 1–7.

Moreno-Expósito L., Illescas-Montes R., Melguizo-Rodríguez L., Ruiz C., Ramos-Torrecillas J., and Luna-Bertos E. (2018). Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life Sciences*,195,61-64.

Mossberg A.K., Hun K., Morozova-Roche L.A. and Svanborg C. (2010). Structure and function of human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET)-type complexes. *FEBS Journal* 277, 4614–4625.

Mouton E., and Aryana K. J. (2015). Influence of colostrum on the characteristics of ice cream. *Food and Nutrition Sciences*, 6, 480-484.

Murata M., Wakabayashi H., Yamauchi K., and Abe F. (2013). Identification of milk proteins enhancing the antimicrobial activity of lactoferrin and lactoferricin. *Journal of Dairy Science*, 96, 4891-4898.

Nadeem A., Sanborn J., Gettel D.L., James H.C., Rydström A., Ngassam V.N., Klausen T.K., Pedersen S.F., Lam M., Parikh A.N, and Svanborg C. (2015). Protein receptor-independent plasma membrane remodeling by HAMLET: a tumoricidal protein-lipid complex. *Scientific reports*, 5, 1-14.

Nakamura T., Aizawa T., Kariya R., Okada S., Demura M., Kawano K., Makabe K., and Kuwajima K. (2013). Molecular mechanisms of the cytotoxicity of human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) and other protein-oleic acid complexes. *Biochemistry and Molecular Biology*, 288, 14408 –14416.

Nazir T., Pal M.A., and Manzoor A. (2018). Effect of admixing varying levels of whole milk to the colostrum on the sensory quality of fermented colostrum product. *International Journal of Advanced Research in Science, Engineering and Technology*, 7, 156-161.

Nongonierma B.A., and FitzGerald J.R. (2015). Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. *Peptides*, 73, 20-34.

Nikolic I., Stojanovic I., Vujicic M., Fagone P., Mangano K., and Stosic-Grujicic S. (2017). Standardized bovine colostrum derivative impedes development of type 1 diabetes in rodents. *Immunobiology*, 222, 272–279.

Nissen A., Andersen P.H., Bendixen E., Ingvarsen K.L., and Røntved C.M. (2016). Colostrum and milk protein rankings and ratios of importance to neonatal calf health using a proteomics approach. *Journal of Dairy Science*, 100, 2711–2728.

- Ochoa-Flores A.A., Hernández-Becerra J.A., López-Hernández E., and García-Galindo H.S. (2013). Yield, firmness and sensory acceptance of panela cheese with added stabilisers. *Universidad y Ciencia*, 29, 277-286.
- Pandey A., Mishra A.A., Shukla R.N., Dubey P.K., and Vasant R.K. (2019). Development of the Process for Whey Based Pineapple Beverage. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 3212-3228.
- Permyakov S.E., Knyazeva E.L., Khasanova L.M., Fadeev R.S., Zhadan A.P., and Roche-Håkansson H. (2012). Oleic acid is a key cytotoxic component of HAMLET-like complexes. *Biological Chemistry*, 393, 85-92.
- Permyakov S.E., Knyazeva E.L., Leonteva M.V. Fadeev R.S., Chekanov A.V. Zhadan A.P., Håkansson A.P., Akatov V.S., and Permyakov E.A. (2011). A novel method for preparation of HAMLET-like protein complexes. *Biochimie*, 93, 1495–1501.
- Pettersson-Kastberg, J., Mossberg A.K., Trulsson M., Yong Y.J., Min S., Lim Y., O'Brien J.E., Svanborg C., and Mok K.H. (2009). Alpha-Lactalbumin, engineered to be nonnative and inactive, kills tumor cells when in complex with oleic acid: a new biological function resulting from partial unfolding. *Journal of Molecular Biology*, 394, 994–1010.
- Poonia A., and Dabur R. S. (2012). Physico-chemical and sensory properties of khees obtained from buffalo and cow colostrum. *Journal of Dairying, Foods & Home Sciences*, 31, 256-258.
- Puthia M., Storm P., Nadeem A., Hsiung S., and Svanborg C. (2014). Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumour cells). *BMJ-British Medical Journal*, 63, 131–142.
- Rammer P., Groth-Pedersen L., Kirkegaard T., Daugaard M., Rytter A., Szyniarowski P., Høyer-Hansen M., Povlsen L.K, Nylandsted J., Larsen J.E., and Jäättelä M. (2010). BAMLET Activates a Lysosomal Cell Death Program in Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 24-32.
- Rath E.M., Cheng Y.Y., Pinese M., Sarun H.K, Hudson L.A., Weir C., Wang Y.D., Håkansson A.P., Howell V.M., Liu G.J., Reid G., Knott R.B., Duff A.P., and Church W.B. (2018). BAMLET kills chemotherapy-resistant mesothelioma cells, holding oleic acid in an activated cytotoxic state. *PLOS one*, 1-32.

Rath E.M., Duff A.P., Gilbert E.P., Doherty G., Knott R.B., and Bret I.W. (2017). Neutron scattering shows a droplet of oleic acid at the center of the BAMLET complex. *Proteins*, 85, 1371-1378.

Rath E.M., Duff A.P., Håkansson A.P., Vacher C.S., Liu G.J., and Knott R.B. (2015). Structure and potential cellular targets of HAMLET-like anti-cancer compounds made from milk components. *Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 18, 773- 824.

Rodríguez-Gutiérrez J.M. (2014). Determinación de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la leche y queso fresco elaborado con calostro bovino. ITESA. Apan, Hidalgo.

Rodrigues L.R., Texeira J.A., and Mendes Da Silva L. (2011). Potential applications of whey proteins in the medical field. Aspects of Milk and Dairy products. *Taylor & Francis Group*, 221-252.

Rudovsky A., Locher L., Zeynerc A., Sobiraja A., and Wittek T. (2008). Measurement of immunoglobulin concentration in goat colostrum. *Small Ruminant Research*, 74, 265-269.

Ruiz P., Barragán I., Seseña S., and Palop M.L. (2016). Functional properties and safety assessment of lactic acid bacteria isolated from goat colostrum for application in food fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 69, 559-568.

Saalfeld M.H., Pereira D.I.B., Silveira K.R.K., Diniz G.L., Kringel D.H., Alves M.I., Gularte M.A., and Leite F.P.L. (2012). Colostro: a redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, 5, 18-24.

Sacerdote P., Mussano F., Franchi S., Panerai A. E., Bussolati G., Carossa S., Bartorelli A., and Bussolati B. (2013). Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *Journal Dairy Science*, 96, 1745–1754.

SAGARPA. 2018. Leche bovina. Población ganadera de 2007 al 2016. México: SIAP.

Scammell A.W. (2001). Production and uses of colostrum. *Australian Journal of Dairy Technology*, 56, 74-82.

Silva E.G.O., Rangel A.H.N., Mürmam L., Bezerra M.F., and Oliveira J.P.F. (2019). Bovine colostrum: benefits of its use in human food. *Food Science and Technology*, 39, 355-362.

Spolaore B., Pinato O., Canton M., Zambonin M., Polverino de Laureto P., and Fontana A. (2010). α -Lactalbumin forms with oleic acid a high molecular weight complex displaying cytotoxic activity. *Biochemistry*, 49, 8658–8667.

Storm P., Aits S., Puthia M.K., Urbano A., Northen T., Powers S., Bowen B., Chao Y., Reindl W., Lee D.Y., Sullivan N.L., Zhang J., Trulsson M., Yang H., Watson J.D., and Svanborg C. (2011). Conserved features of cancer cells define their sensitivity to HAMLET-induced death; c-Myc and glycolysis. *Oncogen*, 30, 4765–4779.

Svanborg C., Ågerstam H., Aronson A., Bjerkvig R., Düringer C., Fischer W., Gustafsson L., Hallgren O., Leijonhuvud I., Linse S., Mossberg A.N., Nilsson H., Pettersson J., and Svensson M. (2003). HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Advances in Cancer Research*, 88, 1–29.

Svensson M., Håkansson A., Xuberg A.K., Linse S., and Svanborg C. (2000). Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings National Academic Science*, 97, 4221–4226.

Tacoma R., Gelsinger S.L., Lam Y.W., Scuderi R.A., Ebenstein D.B., Heinrichs A.J., and Greenwood S.L. (2017). Exploration of the bovine colostrum proteome and effects of heat treatment time on colostrum protein profile. *Journal of Dairy Science*, 100, 9392–9401.

Tarango-Hernández S., Alarcón-Rojo A.D., Robles-Sánchez M., Gutiérrez-Méndez N., and Rodríguez-Figueroa J.C. (2015). Short communication: Potential of Fresco-style cheese whey as a source of protein fractions with antioxidant and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities. *Journal of Dairy Science*, 98, 7635–7639.

Tavares T.G., and Malcata F.X. (2013). Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension. *Intechopen*, 75-114.

Vasek O.M., Mazza S.M., and Giori G.S. (2013). Physicochemical and microbiological evaluation of corrientes artisanal cheese during ripening. *Food Science and Technology*, 33, 151-160.

Weiserová E., Doudová L., Galiová L., Zák L., Michálek J., Janis R., and Buňka F. (2011). The effect of combinations of sodium phosphates in binary mixtures on selected texture parameters of processed cheese spreads. *International Dairy Journal*, 21, 979–986.

Wen H., Stromland O., and Halskau O. (2015). α -Lactalbumin: Oleic Acid Complex Spontaneously Delivers Oleic Acid to Artificial and Erythrocyte Membranes. *Journal of molecular biology*, 427, 3177-3187.

Wu W., Yu P., Zhang F., Che H., and Jiang Z. (2014). Stability and cytotoxicity of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein. *Biomedicine & Biotechnology*, 15, 143-152.

Xiao Z., Mak A., Koch K., and Moore R.B. (2013). A molecular complex of bovine milk protein and oleic acid selectively kills cancer cells in vitro and inhibits tumour growth in an orthotopic rat bladder tumour model. *BJU International*, 112, 201–210.

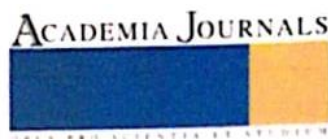
Zhang X., Yang Y., and Zhao D. (2011). Effect of Blueberry on Spreadable Processed Cheese. *Journal of Northeast Agricultural University*, 18, 73–78.

Zheng Y., Liu Z., and Mo B. (2016). Texture Profile Analysis of Sliced Cheese in relation to Chemical Composition and Storage Temperature. *Journal of Chemistry*, 2016, 1-10.

Zou X., Guo Z., Jin Q., Huang J., Cheong L., Xu X., and Wang X. (2015). Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, 185, 362-370.

CAPÍTULO 10

10. ANEXOS



Congreso Internacional de Investigación Academia Journals
Tuxpan 2019
Ciencias y Sustentabilidad

CERTIFICADO

otorgado a

Ing. Karen Argelia Reyes Portillo
Dr. Sergio Soto Simental
Dra. Aurora Quintero Lira
Dr. Humberto Hernández Sánchez
Dr. Javier Piloni Martini
Dra. Norma Güemes Vera

por su artículo intitulado

*Caracterización físico-química y perfil de
textura de queso fresco elaborado con
calostro bovino*

Artículo No. T098

La ponencia de este artículo fue presentada en el congreso llevado a cabo los días 25 al 27 de septiembre del año 2019 en Tuxpan, Veracruz, México. El artículo se incluyó en las siguientes publicaciones: (1) los volúmenes de internet publicados por AcademiaJournals.com con ISSN 1946-5351, Vol. 11, No. 7, 2019 online e indexación por parte de Fuente Académica Plus de EBSCOHOST y (2) en el e-libro intitulado *Competitividad Profesional a Través de la Investigación*, mismo que cuenta con ISBN 978-1-939982-40-7 online. Ambas publicaciones tienen enlaces para su libre acceso en el portal AcademiaJournals.com

Dr. Edalid Álvarez Velázquez
Presidente de la Comisión Organizadora
Directora de la Facultad de Contaduría
Universidad Veracruzana Región Poza Rica-Tuxpan

FACULTAD DE CONTADURÍA



ZONA POZA RICA-TUXPAN

Dr. Rafael Moras
Editor, Academia Journals
Profesor de Ing. Industrial
St. Mary's University, San Antonio, Texas



Cuarto Congreso Internacional Digital de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos

La Red de Investigación, Innovación y Desarrollo Tecnológico en Alimentos Funcionales y Nutraceuticos otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Reyes Portillo KA, Hernández Sánchez H, Fajardo Espinoza FS, Quintero Lira A, Piloni Martini J, Soto Simental S

Por su valiosa participación en la modalidad de **presentación de cartel** dentro de la categoría "Caracterización y Validación de Componentes Bioactivos en Alimentos Funcionales", con el tema **Obtención y caracterización de queso untable funcional a partir de calostro bovino** en el marco del 4º Congreso Internacional Digital en Alimentos Funcionales y Nutraceuticos: 2020 Rumbo al 2021, realizado del 10 al 12 de junio del 2020

Comité técnico/científico

Abraham Wall Medrano



Lilita Santos Zea



Adrián Hernández Mendoza

